

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM UVA POR GC-MS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Volpatto

Santa Maria, RS, Brasil

2013

ESTUDO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA POR GC-MS

Fernanda Volpatto

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 de grau de **Mestre em Química.**

Orientador: Prof. Dr^a. Martha Bohrer Adaime
Coorientador: Prof. Dr. Arci Dirceu Wastowski
Coorientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**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**

**ESTUDO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM UVA POR GC-MS**

Elaborada por
Fernanda Volpatto

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr^a. Martha Bohrer Adaime – Orientadora (UFSM)

Prof. Dra. Tania Mara Pizzolato

Dr. Manoel Leonardo Martins

Santa Maria, 29 de julho de 2013.

AGRADECIMENTOS

À minha tríade de orientadores Prof. Dr^a. Martha Bohrer Adaime, Prof. Dr. Renato Zanella e Prof. Dr. Arci Dirceu Wastowski pela orientação e prontidão nas respostas às dúvidas. Prof. Dr. Renato e Prof. Dr^a. Martha, agradeço imensamente por me acolherem como mestranda, mesmo sem me conhecerem e desenvolvendo os experimentos em outro laboratório. Prof. Dr. Arci agradeço pelas conversas e pelo conhecimento compartilhado diariamente.

Ao grupo LARP pela receptividade e pela ajuda que recebi neste período.

Aos meus colegas do CESNORS, principalmente meus colegas de setor, Alana, Bruna, Davi, Diego, Lucindo, Michele e Paulo, pelo incentivo e pela compreensão, afinal, sem a parceria de vocês esse mestrado não teria sido possível. Um abraço especial à Vitória, que me ensinou muito no pouco tempo que trabalhamos juntas. Da mesma forma agradeço ao Diretor do CESNORS, Prof. Dr. Genésio Mario da Rosa, por ter concedido a oportunidade de conciliar estudo e trabalho.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa Gerenciamento Ambiental e Manejo de Recursos Hídricos (GAMRH) pelas trocas de conhecimento e agradável convívio.

Às maravilhosas amigas de Frederico Westphalen, Andressa, Carol, Lilica e Márcia, pela companhia, pelos momentos de descontração e por me aguentarem numa fase tão narcisista, principalmente nesses últimos meses. Pelos mesmos motivos agradeço às queridas que tive a sorte de conhecer e dividir apartamento, Morga e Méris.

A toda minha família, que é o meu alicerce, especialmente minha mãe, que, na sua simplicidade, sempre me incentivou e reconfortou. Às minhas pequenas Katialis e Yasmin, que alegram minha vida, mesmo sem perceberem que fazem isso. À minha família dedico este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Química pela contribuição na minha formação.

À UFSM pelo ensino gratuito e de qualidade.

A Deus por colocar tantas pessoas especiais na minha vida.

EPÍGRAFE

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando á beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

(Isaac Newton)

É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada
vai além do que se vê.

(Los Hermanos)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA POR GC-MS

Autora: Fernanda Volpatto
Orientador: Prof^ª.Dr^ª. Martha Bohrer Adaime
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de julho de 2013.

Os órgãos regulamentadores estão se tornando cada vez mais rigorosos no que se refere à qualidade dos alimentos. Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos, que auxiliem monitoramento de resíduos de agrotóxicos, e torna-se fundamental em laboratórios de rotina.

Este estudo objetivou o desenvolvimento e validação de um método analítico para o preparo da amostra e determinação multiclasse de resíduos de agrotóxicos em uva da variedade Isabel. O preparo de amostra baseou-se no procedimento QuEChERS com determinação por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Diversos materiais sorventes foram testados na etapa de limpeza do preparo da amostra, como PSA, C18, Florisil, Carvão ativo e alumina, sendo que o sorvente que apresentou maior eficiência na limpeza do extrato foi o Florisil.

O método ficou assim definido: a 10 g da amostra, casca, polpa e sementes, processada em liquidificador foram adicionados 10 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético, 4 g de sulfato de magnésio e 1 g de acetato de sódio. Essa mistura foi agitada manualmente por 1 minuto, centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos. 2 mL do sobrenadante foram coletados e misturados com 300 mg de sulfato de magnésio e 400 mg de Florisil, que foram novamente agitados e centrifugados. 1 mL do sobrenadante foi pipetado e levado a um concentrador e o volume reduzido a 200 µL.

A eficiência do método foi comprovada através da validação, apresentando limites de detecção abaixo dos Limites Máximos de Resíduos permitidos pelos órgãos reguladores e recuperações entre 70 e 120% com RSD menor que 20%, para a maioria dos agrotóxicos estudados, com exceção para trifloxistrobina, tebuconazol e tetradifona. A utilização da técnica “*matrix matched*” é de extrema importância, uma vez que foi observado que houve grande influência positiva da matriz na realização da análise, aumentando o sinal cromatográfico de todos os analitos estudados.

Palavras Chave: QuEChERS, uva, agrotóxicos, GC-MS

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program en Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

STUDY METHOD FOR DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN GRAPE BY GC-MS

Author: Fernanda Volpatto
Advisor: Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime
Santa Maria, 29 July, 2013.

The regulatory agencies are becoming increasingly stringent as regards the quality of the food. Thus, the development of analytical methods that help monitoring of pesticide residues, and it is essential in routine laboratories.

This study aimed at the development and validation of an analytical method for sample preparation and determination of multiclass pesticide residues in grape variety Isabel. The sample preparation was based on the QuEChERS procedure with determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Several sorbent materials were tested in the cleaning step of the sample preparation, such as PSA, C18, Florisil, alumina and active carbon, with the sorbent with the highest efficiency in cleaning the extract was the Florisil.

The method was defined as follows: 10 g of the sample, peel, pulp and seeds, processed in a blender was added 10 mL of acetonitrile with 1% acetic acid, 4 g of magnesium sulfate and 1 g of sodium acetate. This mixture was stirred manually for 1 minute, centrifuged at 3,000 rpm for 20 minutes. 2 mL of the supernatant was collected and mixed with 300 mg of magnesium sulfate and 400 mg of florisil, which were agitated and centrifuged again. 1 mL of the supernatant was pipetted and brought to a concentrator and the volume reduced to 200L.

The efficiency of the method was proven through validation, with detection limits below the maximum residue limits allowed by regulators and recoveries between 70 and 120% with RSD lower than 20% for most pesticides studied, except for trifloxystrobin, tebuconazole and tetradifon. Using the technique matrix matched is extremely important, since it was observed that there was a large positive influence on the performance of the array analysis by increasing the signal chromatographic all analytes studied.

Keywords: QuEChERS, grape, pesticides, GC-MS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características nutricionais de algumas espécies de uva.	18
Tabela 2: Efeitos agudos e crônicos provocados pelos agrotóxicos.....	22
Tabela 3: Fungicidas registrados no MAPA para controle das doenças fúngicas da videira... 26	
Tabela 4: Agrotóxicos registrados no MAPA para controle de pragas nas videiras.	28
Tabela 5: Parâmetros analíticos exigidos para a validação de metodologias analíticas	33
Tabela 6: Listagem dos agrotóxicos estudados durante o desenvolvimento do método	55
Tabela 7: Concentração de cada padrão na solução estoque e volume utilizado para preparo da solução Mistura-1	56
Tabela 8: Programação inicial de temperatura	65
Tabela 9: Programação de temperatura otimizada.....	65
Tabela 10: Tempos de retenção e razões massa/carga dos analitos determinados	65
Tabela 11: Fatores utilizados para o planejamento fatorial 2^3	90
Tabela 12: Planejamento fatorial 2^2 comparando Florisil com PSA	91
Tabela 13: Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos na variedade Isabel	95
Tabela 14: Limites de detecção e de quantificação para os analitos na variedade Isabel	97
Tabela 15: Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método na variedade Isabel	98
Tabela 16: Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método na variedade Isabel	99
Tabela 17: Avaliação do efeito matriz do método	100
Tabela 18: Resíduos de agrotóxicos encontrados em amostras reais	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de extração, partição e limpeza dos métodos QuEChERS.....	40
Figura 2: Quadro representativo dos testes de extração e limpeza do extrato	58
Figura 3: Etapa de extração do teste A1.....	59
Figura 4: Etapa de limpeza do teste A1.	60
Figura 5: Etapa de extração do preparo da amostra com e sem utilização de tampão acetato .	67
Figura 6: Extratos purificados com diferentes materiais sorventes	68
Figura 7: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A1	70
Figura 8: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B1.....	71
Figura 9: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A2	72
Figura 10: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B2.....	73
Figura 11: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A4.....	74
Figura 12: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B4.....	75
Figura 13: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A5.....	76
Figura 14: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B5.....	77
Figura 15: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A6.....	79
Figura 16: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B6.....	80
Figura 17: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A7.....	81
Figura 18: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B7	82
Figura 19: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A3.....	84
Figura 20: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B3.....	85
Figura 21: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A8.....	86
Figura 22: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B8.....	87
Figura 23: Percentual de agrotóxicos com recuperação entre 70 e 120% na concentração de 0,05 mg kg ⁻¹	88
Figura 24: Percentual de agrotóxicos com recuperação entre 70 e 120% na concentração de 0,5 mg kg ⁻¹	89
Figura 25: Resultados dos efeitos do planejamento fatorial 2 ³	90
Figura 26: Porcentagens de recuperações usando Florisil e PSA apresentadas geometricamente.....	92
Figura 27: Esquema geral do método proposto	93

Figura 28: Cromatograma no modo SIS do branco da matriz da amostra.	94
Figura 29: Cromatograma no modo SIS dos analitos de interesse determinados na matriz da amostra.	94
Figura 30: Inclinações das curvas obidas no solvente e na matriz para o composto metalaxil.	101

LISTA DE REDUÇÕES

ANVISA - Agência Nacional da Vigilância Sanitária

AOAC - do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*

AP - analito protetor

ASE - Extração Acelerada com solvente, do inglês, *Accelerated Solvent Extraction*.

BHC - Hexaclorobenzeno, do inglês, *benzene hexachloride*

C18 - Octadecilsilano

CAS - do inglês, *Chemical Abstracts Service*

CCAB - Comitê do Codex Alimentarius do Brasil

CCPR - Comitê Codex sobre Resíduos de Pesticidas, do inglês, *Codex Committee on Pesticide Residues*

CEN – do francês, *Comité Européen de Normalisation*

CRC - Coordenação de Resíduos e Contaminantes

CV - coeficiente de variação

DAS - Secretaria de Defesa Agropecuária

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão Relativo

D-SPE - Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*

ELL - Extração Líquido-Líquido

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GC x GC - Cromatografia Gasosa Bidimensional, do inglês, *Two-Dimensional Gas Chromatography*

GCB - Carvão grafitizado do inglês, *graphitized carbon black*

GC-MS/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês, *gas chromatography coupled Tandem Mass Spectrometry*

HF-LPME - Microextração em Fase Líquida com Fibras Ocas, do inglês, *Hollow Fibre Liquid Phase Microextraction*

IDA - Ingestão Diária Aceitável

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IT – armadilha de íons, do inglês, *Ion Trap*

JMPR - Comitê de Especialistas FAO/OMS sobre Resíduos de Pesticidas, do inglês, *Joint FAO/WHO Meetings on Pesticide Residues*

LANAGROS - Laboratórios Nacionais Agropecuários

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial do inglês, *Liquid Chromatography coupled Tandem Mass Spectrometry*

LC-UV - cromatografia líquida com detector ultravioleta, do inglês, *Liquid Chromatography coupled Ultra-Violet*

LOD - Limite de Detecção, do inglês, *Limit of Detection*

LODi - Limite de Detecção do instrumento, do inglês, *Limit of Detection instrument*

LODm - Limite de Detecção do método, do inglês, *Limit of Detection method*

LMDR - Limite Mínimo de Desempenho Requerido

LMR - Limite Máximo de Resíduos

LP-GC/MS - Cromatografia Gasosa à Baixa Pressão acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês, *Fast low-pressure coupled Tandem Mass Spectrometry*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês, *Limit of Quantitation*

LOQi - Limite de Quantificação do instrumento, do inglês, *Limit of Quantitation instrument*

LOQm - Limite de Quantificação do método, do inglês, *Limit of Quantitation method*

MAE - Extração Assistida por Microondas, do inglês, *Microwave Assisted Extraction*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEKC - cromatografia eletrocinética micelar, do inglês, *Micellar Electrokinetic Chromatography*

MIP - Manejo Integrado de Pragas

MMA - Ministério do Meio Ambiente

MRC - Materiais de Referência Certificados

MS - Ministério da Saúde

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

MWCNT - Nanotubos de Carbono de Multicamadas, do inglês, *Multi-Walled Carbon Nanotubes*

NPC - Não Permitido para a Cultura

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARA - Programa Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos

PDMS/DVB - polidimetilsiloxano/divinilbenzeno

PIF - Produção Integrada de Frutas

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PSA - amina primária-secundária, do inglês, *primary secondary amine*

QuEChERS – rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, do inglês, *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*

SDME - Microextração em Gota Suspensa, do inglês, *Single Drop Microextraction*

SFE - Extração em Fluido Supercrítico, do inglês, *Supercritical Fluid Extraction*

SIM – Monitoramento de Íons Seleccionados, do inglês, *Single Ion Monitoring*

SIS – Armazenagem de Íons Seleccionados, do inglês, *Selected Ion Storage*

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

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês, *Solid Phase Microextraction*

t_R - tempo de retenção

UHPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance acoplada à Espectrometria de Massas sequencial, do inglês, *Ultra High-performance Liquid Chromatography coupled Tandem Mass Spectrometry*

UPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Alta Pressão acoplada à Espectrometria de Massas sequencial, do inglês, *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*

TOF – Tempo de voo, do inglês, *Time-of-flight*

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Estrutura química e nomes oficiais dos agrotóxicos estudados

Anexo 2 – Recuperações obtidas para os agrotóxicos estudados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 VARIEDADES DA UVA	17
2.2 PRODUÇÃO DE UVA	19
2.3 AGROTÓXICOS	20
2.4 CONTROLE FITOSSANITÁRIO	25
2.5 PROGRAMAS DE CONTROLE DO USO DE AGROTÓXICOS	28
2.6 REGISTROS DE AGROTÓXICOS	31
2.7 A IMPORTÂNCIA DAS ANÁLISES PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	32
2.8 VALIDAÇÃO	32
2.9.1 SELETIVIDADE	33
2.9.2 LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO	34
2.9.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	34
2.9.4 EXATIDÃO	35
2.9.5 PRECISÃO	35
2.9.6 ROBUSTEZ	36
2.10 PREPARO DA AMOSTRA	37
2.10.1 QUECHERS	39
2.11 EFEITO MATRIZ	45
2.12 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	47
2.12.1 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS	53
3.2 EQUIPAMENTOS	53
3.3 LIMPEZA DAS VIDRARIAS	54
3.4 ESCOLHA DOS AGROTÓXICOS A SEREM AVALIADOS	54

	15
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	55
3.6 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO	57
3.7 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	57
3.8 ESTUDO DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	58
3.8.1 PLANEJAMENTO FATORIAL	60
3.9 VALIDAÇÃO	60
3.9.1 LINEARIDADE E INTERVALO LINEAR	61
3.9.2 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	61
3.9.3 PRECISÃO	62
3.9.4 EXATIDÃO	62
3.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ	63
3.11 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS	64
4.1.1 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO	66
4.2 PREPARO DE AMOSTRA	67
4.2.1 AVALIANDO OS TESTES DE PREPARO DA AMOSTRA	69
4.3 AVALIAÇÃO DA ETAPA DE CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO	92
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	95
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ	100
4.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	102
5 CONCLUSÕES	103
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	104
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

A viticultura brasileira tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos, tanto no que se refere à produção destinada às exportações como ao mercado interno, isso exige expansão na área cultivada e na tecnologia de produção. Porém, o sistema de produção de uvas praticado atualmente é altamente dependente da aplicação de agrotóxicos, envolvendo o uso de substâncias tóxicas, perigosas à saúde humana e ao ambiente. Como acontece em outras culturas, a uva pode sofrer contaminação cruzada, ou seja, resíduos de agrotóxicos oriundos do controle fitossanitário de outras culturas, próximas à videira, podem ser detectados.

Devido ao risco que oferecem, há programas que objetivam controlar a quantidade de resíduos de agrotóxicos em alimentos, como o *Codex Alimentarius*, Produção Integrada de Frutas (PIF) e o Programa Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA). As amostras com níveis de agrotóxicos acima dos limites máximos de resíduos (estabelecidos pela Agência Nacional da Vigilância Sanitária, ANVISA, no Brasil, ou outros órgãos internacionais como o *Codex*) indicam a aplicação incorreta de defensivos agrícolas. Produtos não autorizados também podem ser encontrados.

Assim, o monitoramento de resíduos de pesticidas nesta fruta torna-se essencial para garantir a segurança alimentar aos consumidores, especialmente em uma situação em que os regulamentos estão se tornando cada vez mais rigorosos na maioria dos países.

Este estudo objetivou o desenvolvimento e validação de um método analítico para o preparo da amostra e determinação multiclasse de resíduos de agrotóxicos em uva da variedade Isabel. O preparo de amostra baseou-se no procedimento QuEChERS com determinação por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Variedades da uva

Existem, no mundo, milhares de variedades de uva, a maioria delas pertence à espécie *Vitis vinifera*. As principais variedades tintas de *Vitis vinifera* cultivadas no Brasil para a produção de vinhos finos são: Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinotage, Syrah e Tannat. Já as variedades brancas são: Chardonnay, Malvasia Bianca, Moscato Branco, Moscato Canelli, Prosecco, Riesling Itálico (GUERRA, 2009). Entre as uvas finas de mesa (consumo *in natura*) as mais produzidas são a cultivar Itália e a Rubi, enquanto que para as uvas comuns de mesa, destacam-se as variedades Niágara Rosada, Niágara Branca e Isabel, respondendo por 50% do volume comercializado de uvas *in natura* (RITSCEL, 2010).

A variedade Isabel é tida como um híbrido natural de *Vitis labrusca* x *Vitis vinifera*. Segundo registros, originou-se na Carolina do Sul, Estados Unidos, entre 1820 e 1830, foi levada para a Europa e chegou ao Rio Grande do Sul pela Ilha dos Marinheiros entre 1839 e 1842, constituindo-se na base do desenvolvimento da vitivinicultura brasileira. Isabel é uma cultivar de alta fertilidade e rusticidade, proporcionando colheitas abundantes com poucas intervenções de manejo. É consumida como uva de mesa, usada para a elaboração de vinhos branco, rosado e tinto, e no fabrico de doces e geleias. A Niágara Branca, cultivar de *Vitis labrusca*, ganhou expressão a partir de 1910, substituindo a Isabel como uva de mesa nos anos subseqüentes. É considerada relativamente rústica e resistente a doenças. A Niágara Branca vem perdendo espaço, como uva de mesa, para a Niágara Rosada, que é uma mutação genética da própria Niágara Branca (NACHTIGAL, 2005).

A cultivar Itália é uma cultivar de película branca, resultado do cruzamento entre 'Bicane' e 'Moscatel de Hamburgo', realizado em 1911. Dentre as principais características da cultivar Itália destacam-se a alta produtividade, o sabor moscatel e a boa resistência ao transporte e ao armazenamento. Porém, é relativamente sensível às doenças, principalmente míldio e oídio. A cultivar Rubi surgiu de uma mutação da cultivar Itália apresentando as mesmas características, com exceção da cor da película que se apresenta rosada (NACHTIGAL, 2005).

O clima, principalmente temperatura, umidade e radiação solar, tem forte influência sobre o desenvolvimento, produção e qualidade da uva. Essa influência ocorre em todos os estágios fenológicos da videira, sendo que cada estágio necessita de quantidade adequada de luz, água e calor (GUERRA, 2009). Além disso, as características nutricionais da uva variam dependendo da espécie, do grau de maturação e do modo de armazenamento pós-colheita (SOUZA, 2010). A tabela 1 apresenta os valores de textura (em fruto inteiro) e características nutricionais em casca e em polpa de uva das variedades Itália, Rubi e Niágara Rosada em um estudo realizado por Souza e colaboradores (2010). Neste mesmo estudo, as uvas analisadas apresentaram variação de umidade de 84,8 a 92,4% nas cascas e 84,9 a 89,9% nas polpas dos frutos, porém, esses valores podem variar de 65 a 94 % (SOUZA, 2010).

Tabela 1: Características nutricionais de algumas espécies de uva.

	Casca de uvas			Polpa de uvas		
	Itália	Rubi	Niágara Rosada	Itália	Rubi	Niágara Rosada
Textura (g. f ¹)	54,0 ab	72,3 a	36,7 b			
Ph	4,53 a	4,66 a	4,03 b	4,32	4,64	4,31
Acidez (g de Ác. tartárico 100 g ⁻¹)	0,57 c	0,43 d	0,88 a	0,56 d	0,45 e	0,99 b
Sólidos solúveis (° BRIX)	16,1 a	12,1 b	12,5 b	16,4 a	11,4 c	13,1 b
Sólidos totais (g.100g ⁻¹)	15,2 a	7,7 b	14,0 a	15,1 ba	10,1 b	11,4 b
Teor de água (g.100g ⁻¹)	84,8 b	92,3 a	86,0 b	84,9 b	89,9 a	88,5 a
Carboidratos (g.100g ⁻¹)	14,8 a	7,2 b	12,9 a	15,0 a	10,7 ab	11,3 ab
Açúcares redutores (g.100g ⁻¹)	13,6 a	3,7 c	8,7 b	14,1 a	10,0 b	8,2 b
Açúcares totais (g.100g ⁻¹)	13,6 da	3,9 c	8,9 b	14,6 a	10,0 bc	9,2 c
Proteína (g.100g ⁻¹)	0,72 a	0,40 b	0,76 c	0,79 a	0,41 d	0,80 a
Fibra (g.100g ⁻¹)	1,03 b	1,52 a	0,82 c	0,35 cd	0,77 a	0,28 d
Lipídeos (g.100g ⁻¹)	0,34	0,35	0,36	0,30	0,29	0,31
Cinzas (g.100g ⁻¹)	2,00 a	0,43 b	2,11 a	0,61 b	0,39 b	0,97 a
Ácido ascórbico (vitamina C) (mg100g ⁻¹)	8,7 b	6,2 c	4,9 a	5,06 a	5,14 a	4,02

* Mesma letra na coluna: as médias não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05)

Fonte: SOUZA, 2010.

2.2 Produção de uva

As uvas foram trazidas para o Brasil pelos primeiros imigrantes europeus que iniciaram o cultivo em terras e clima que mais se aproximavam da sua origem, como a região sul do país. Mais tarde, verificou-se que poderiam ser cultivadas sobre altas temperaturas e condições do semiárido brasileiro no Nordeste, sendo que nesta região a cultivo de vinhas teve início na década de 80. A viticultura brasileira ocupa, atualmente, área de 81 mil hectares, com vinhedos desde o extremo Sul até regiões próximas à Linha do Equador. Duas regiões se destacam: o Rio Grande do Sul e os polos de frutas de Petrolina/Pernambuco e de Juazeiro/Bahia, no Submédio do Vale do São Francisco (MAPAa). No Rio Grande do sul destacam-se três regiões produtoras: a tradicional região da Serra Gaúcha e as regiões emergentes: Campanha e Serra do Sudeste (GUERRA et al, 2012).

O Rio Grande do Sul é responsável pela produção, em média, de 777 milhões de quilos de uva por ano, onde são elaborados 330 milhões de litros de vinhos e mostos (sumo de uvas frescas que ainda não tenham passado pelo processo de fermentação). A maior parte da produção nacional de uva é destinada à elaboração de vinhos, cerca de mais de 90% (MAPAa).

Especialmente nos últimos anos, o comércio mundial de frutas tem apresentado significativa ampliação, devido em grande parte, às mudanças importantes relacionadas com hábitos, padrões e renda dos consumidores que vêm se direcionando para a aquisição de alimentos frescos e que apresentam maiores garantias em termos de qualidades nutricional, sanitária e organoléptica (LAZZAROTTO, 2013).

Nas últimas duas décadas a produção com finalidades para atender demandas de consumo *in natura* tem crescido a taxas anuais próximas de 13%, enquanto que as exportações deste produto aumentaram em cerca de 26% ao ano. Holanda, Estados Unidos e Reino Unido, são os maiores importadores de uva de mesa do Brasil. Quanto às importações, o Brasil importa grande quantidade de vinhos finos do Chile, da Argentina e da Itália e uvas de mesa da Argentina e do Chile (LAZZAROTTO, 2013, MAPAa).

Sobre a produção, é relevante ressaltar que as uvas de mesa no Brasil podem ser divididas em dois grupos: um formado pelas uvas finas (*Vitis vinifera*), representado principalmente por cultivares como a itália e suas mutações (rubi, benitaka e brasil) e outro pelas uvas comuns ou rústicas (*Vitis labrusca*), cuja representante principal é a cultivar niágara rosada (LAZZAROTTO, 2013).

2.3 Agrotóxicos

Segundo a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, consideram-se agrotóxicos ou afins:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento;

A definição da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) é mais ampla, segundo esta, agrotóxicos referem-se a qualquer substância destinada a prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças no homem ou animal, espécies indesejáveis de plantas ou animais que causam danos ou que de alguma forma interferiram na produção, no processamento, no armazenamento, no transporte ou na comercialização de alimentos ou madeira, assim como, substâncias que podem ser administradas aos animais. O termo inclui, ainda, substâncias destinadas para uso como reguladores de crescimento da planta, desfolhantes, dessecantes, agentes para o desbaste de frutos ou para prevenir a queda prematura de frutos, e as substâncias aplicadas às culturas, antes ou depois da colheita para proteger o produto da degradação durante o armazenamento e transporte (FAOSTAT, 2010).

Já o resíduo de agrotóxico é definido como sendo qualquer substância presente no alimento, proveniente do uso de agrotóxicos, como os produtos de conversão, metabólitos, produtos de reações e impurezas consideradas com alguma significância toxicológica. Este termo inclui resíduos de substâncias desconhecidas ou de fontes inevitáveis (como o meio ambiente), bem como o uso de produtos químicos conhecidos (PRESTES, 2007).

Os primeiros inseticidas usados foram os naturais de origem orgânica ou inorgânica. Os inseticidas inorgânicos mais utilizados foram arseniatos de cálcio e chumbo (verde Paris), cupratos (calda bordalesa), enxofre em pó, vários sulfatos, cal, fluorsilicato de bário, aminosselenossulfito de potássio (criolite) e óleos minerais. Entre estes, os arseniatos mostravam-se extremamente tóxicos ao homem, aos animais e ao meio ambiente como um

todo. Dentre os inseticidas orgânicos de origem natural foram muito utilizados, nicotina, nor-nicotina, anabasina, piretrinas e aletrina, rotenóides como a rotenona e quassina. Um inseticida conhecido desde o primeiro século da era cristã era o piretro, constituído basicamente de piretrinas, extraído das folhas do *Chrysanthemum cinerariaefolium*, uma espécie de crisântemo (SANTOS, 2007).

Depois da Segunda Guerra Mundial houve um grande aumento populacional e econômico, fazendo com que a produção agrícola de alimentos buscasse novos meios para aumentar sua produtividade. Para isso, máquinas agrícolas, fertilizantes, sementes melhoradas e agrotóxicos foram inseridos na agricultura com o objetivo de aumentar a produção por área plantada. A síntese de novos agrotóxicos contou ainda com capital físico e intelectual, antes direcionado às resoluções dos problemas da Guerra, esse período ficou conhecido como a Revolução Verde. (RIBAS, 2009, MORAGAS, 2003).

Em 1940, Paul Mueller, da companhia suíça GEISY, observou que o Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), sintetizado por Zeidler em 1874, era um potente inseticida. A sua pronunciada propriedade inseticida, aliada à baixa solubilidade em água, alta persistência e sua forma de ação, propiciou que seu uso se expandisse rapidamente. O DDT foi muito usado durante a Segunda Guerra Mundial, sendo pulverizado na pele da população para prevenir epidemias de tifo transmitidas por piolhos, que causavam alta mortalidade. Ele foi usado, também, em grandes áreas do globo terrestre para eliminar o mosquito vetor da malária. Mais tarde, o DDT foi utilizado no controle de pragas da agricultura, particularmente em colheitas com alto rendimento econômico (FLORES, 2004).

Os agrotóxicos oferecem risco à saúde humana, sendo introduzidos no organismo através das vias cutânea, digestiva, por meio de alimentos, e respiratória, com a absorção de partículas de pó (FLORES, 2004). Os efeitos do contato com pesticidas sobre a saúde humana podem ser agudo ou crônico. O efeito agudo é capaz de causar dano aparente em um período de 24 horas, já o crônico resulta da exposição continuada a doses relativamente baixas de produtos potencialmente tóxicos. A tabela 2 relaciona alguns dos principais efeitos agudos e crônicos, provocados pelo contato com agrotóxicos, com o grupo químico a que pertencem e à praga que controlam. (RIBAS, 2009).

Quando aplicados diretamente no solo, os agrotóxicos podem ser degradados por reações químicas como hidrólise, fotólise ou ação de microrganismos. Entretanto, as moléculas com baixa taxa de degradação permanecem por muito tempo no ambiente sem sofrer qualquer alteração. Fatores ambientais como temperatura, conteúdo de matéria

orgânica, acidez, umidade e tipo de solo tem grande influência sob as taxas de degradação de agrotóxicos (SANCHES 2003).

Tabela 2: Efeitos agudos e crônicos provocados pelos agrotóxicos

Classificação	Grupo Químico	Intoxicação Aguda	Intoxicação crônica
Inseticidas	Organofosforados e carbamatos	Fraqueza Cólica abdominal Vômito Espasmos musculares Convulsão	Efeitos neurológicos retardados Alterações cromossomais Dermatites de contato
	Organoclorados	Náusea Vômito Contrações musculares involuntárias	Arritmias cardíacas Lesões renais Neuropatias periféricas
	Piretróides sintéticos	Irritação das conjuntivas Espirros Excitação Convulsão	Alergias Asma brônquica Irritação das mucosas Hipersensibilidade
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteira Vômito Tremores musculares Dor de cabeça	Alergias respiratórias Dermatites Doença de Parkinson Cânceres
	Fentalamida	-	Teratogênese
	Dinitrofenóis e pentaclorofenol	Dificuldade respiratória Hipertermia Convulsão	Cânceres Cloroacnes
Herbicidas	Fenoxiacéticos	Perda de apetite Enjoo Vômito Fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas Cânceres Teratogênese
	Dipiridilos	Sangramento nasal Fraqueza Desmaio Conjuntivite	Lesões hepáticas Dermatites de contato Fibrose pulmonar

Fonte: RIBAS, 2009

Além de depender das características do solo, a persistência (ou degradação) dos agrotóxicos depende também das propriedades físico-químicas das substâncias. Moléculas de alto peso molecular contendo halogênios e/ou anéis aromáticos, por exemplo, são mais persistentes. Essas moléculas podem ser adsorvidas nas partículas do solo ou sofrer

lixiviação, atingindo lençóis freáticos ou águas superficiais. No ar, as moléculas podem ser transportadas por muitos quilômetros, atingindo áreas muito distantes da região de aplicação (SANCHES, 2003; FLORES, 2004).

Antes de um agrotóxico poder ser usado, este deve estar registrado para a cultura e para a praga alvo, para isso o Ministério da Saúde faz uma avaliação toxicológica, prévia ao registro, visando permitir a comercialização dos agrotóxicos que, usados de forma adequada, não causem danos à saúde nem deixem resíduos perigosos nos alimentos. Já a avaliação de impacto ambiental realizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) tem por objetivo permitir o uso apenas de produtos compatíveis com a preservação do meio ambiente (MIELE, 2003b)

A Lei 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto 4.074, de 04 de janeiro de 2002, no parágrafo único do art. 2º, classifica os agrotóxicos de acordo com a toxicidade em: I- extremamente tóxico (faixa vermelha); classe II - altamente tóxica (faixa amarela); classe III - medianamente tóxica (faixa azul) e classe IV - pouco tóxica (faixa verde). Já a Portaria Normativa IBAMA Nº 844, de 15 de outubro de 1996, no seu Art. 3º classifica os agrotóxicos quanto ao potencial de periculosidade ambiental baseando-se nos parâmetros bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico, carcinogênico, como segue: Classe I - Produto Altamente Perigoso; Classe II - Produto Muito Perigoso; Classe III - Produto Perigoso; Classe IV - Produto Pouco Perigoso.

Há diversas maneiras para a classificação dos agrotóxicos, uma delas é de acordo com o tipo de praga a ser controlada: os herbicidas são usados para matar as plantas invasoras ou ervas daninhas, fungicidas para matar os fungos, acaricidas para matar os ácaros, molusquicidas para matar lesmas, caracóis e caramujos e inseticidas para matar insetos. Este último grupo tendem a ser o mais perigoso para o homem (SOUZA, 2006).

Outra maneira de classificar os agrotóxicos é através do modo de ação: contato é o resultante da absorção pelo tegumento (pele) do organismo alvo em borrifações residuais ou espaciais, ingestão é o pesticida que age e penetra no organismo alvo através da via oral, fumegante é o pesticida que alcança o organismo alvo na forma de vapor, através de suas vias respiratórias. (PRESTES, 2007). Quanto à persistência, os agrotóxicos são classificados segundo o tempo de meia vida, que é o tempo necessário, após aplicação, para que tenha sua eficácia reduzida à metade. Consideram-se persistências: curta até 90 dias, média de 91 a 180 dias e longa maior que 180 dias. O deslocamento dos agrotóxicos no ambiente durante sua

meia vida pode ser pequeno (até 20 cm), médio (de 21 a 60 cm) ou grande (maior que 60 cm) (PRESTES, 2007).

Quimicamente os agrotóxicos são agrupados em: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros. Os organoclorados apresentam, frequentemente, alta resistência à degradação química e biológica e alta solubilidade em lipídios. A combinação entre a baixa solubilidade em água e a alta capacidade de adsorção na matéria orgânica leva ao acúmulo desses compostos ao longo da cadeia alimentar, especialmente nos tecidos ricos em gorduras dos organismos vivos. O Hexaclorobenzeno (BHC, do inglês, *benzene hexachloride*) é um exemplo de organoclorado que, apesar de ser classificado como de persistência intermediária, é bastante estável à ação da luz, do calor, do ar e de ácidos fortes, sendo capaz de permanecer no solo, sem se decompor totalmente, por cerca de cinco anos (FLORES, 2004)

Os agrotóxicos organofosforados são ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico. Nos últimos 30 anos, inseticidas organofosforados têm sido amplamente usados como alternativa para substituir compostos organoclorados, oferecendo forte atividade biológica e fácil degradação. Porém, apresentam como desvantagem a alta toxicidade. Estes compostos impedem a transmissão de novos impulsos e geram vários danos ao organismo como convulsões, parada respiratória e coma (SANTOS, 2007; SANCHES, 2003).

O grande avanço dos inseticidas organofosforados na agricultura e de seu conhecimento científico na relação estrutura-atividade deu-se pela descoberta do composto parathion por Schrader em 1944, primeiro produto de novo grupo de inseticidas revolucionários usados até hoje. O glifosato, organofosforado altamente usado, é efetivamente forte contra 90 tipos de ervas-daninhas e praticamente não apresenta toxicidade para mamíferos, peixes e pássaros, mostrando não haver bioacumulação nos alimentos e ser biodegradado em produtos naturais (SANTOS, 2007)

Os carbamatos derivam do ácido carbâmico, constituindo o grupo químico dos agrotóxicos compostos por ésteres de ácido metilcarbônico ou dimetilcarbônico. Muitos destes produtos já foram proibidos em vários países em virtude do seu efeito altamente cancerígeno (LIMA, 2001). Assim como os agrotóxicos organofosforados, os carbamatos têm tempos de residência relativamente curtos no meio ambiente, resolvendo o problema da persistência e acumulação associadas aos compostos organoclorados, mas, aumentarem a toxicidade aguda ao homem e aos animais quando ainda se encontram na sua forma ativa (LIMA, 2001; DELGADO, 2001).

Agrotóxicos piretróides são sintetizados a partir do composto natural piretrina. Considerados eficazes e seguros por perturbarem o sistema nervoso dos insetos em níveis de exposição que resultam em pouca ou nenhuma toxicidade aguda em mamíferos e serem rapidamente degradados no meio ambiente. Assim, os piretróides são amplamente utilizados em ambientes urbanos para controlar vários insetos. Estes produtos químicos são muito menos tóxicos para mamíferos do que os compostos organofosforados e carbamatos, mas apresentam uma toxicidade aguda para uma vasta gama de organismos aquáticos e abelhas (SYMINGTON, 2008).

Os triazóis são compostos pela adição de radicais químicos diferentes a uma molécula básica de 1,2,4-triazol. Possuem elevada fungitoxicidade, porém apresentam efeito residual prolongado (LOMBARDI, 2002). Estrobirulinas são fungicidas derivados de compostos naturais extraídos de alguns fungos, que atuam competindo por nutrientes com os outros fungos e ao mesmo tempo inibem a atuação destes competidores através de produção de substâncias anti-fúngicas. Em doses adequadas este grupo de agrotóxicos mostra-se seguro tanto no manuseio quanto na utilização, sendo rapidamente decomposto no ambiente e não provocando efeitos fitotóxicos (LOMBARDI, 2002).

O sistema de produção de uvas praticado atualmente é altamente dependente da aplicação de agrotóxicos. A qualidade na tecnologia de aplicação de agrotóxicos é de extrema importância por envolver o uso de substâncias tóxicas, normalmente perigosas à saúde humana e ao ambiente. Aliado a isso, o respeito ao período de carência (intervalo de tempo compreendido entre a última aplicação do pesticida e a colheita) diminui o risco de exposição da população (SOUZA, 2006).

2.4 Controle fitossanitário

O controle fitossanitário (aplicação eficiente de agrotóxicos) nas videiras tem por objetivos a produção da uva sem contaminação por doenças, pragas e agrotóxicos, levando em consideração a preservação do meio ambiente, baixo custo e o respeito às normas de aplicação. A eficiência da aplicação de agrotóxicos depende do conhecimento dos fatores que propiciam o desenvolvimento da doença ou praga, como umidade, temperatura, exposição ao sol, vento, etc. Assim como, do momento correto da pulverização, do tamanho da gota, do intervalo entre as aplicações e da eficiência dos produtos escolhidos (SALTON, 2008).

Cada espécie de uva apresenta uma resistência maior ou menor às doenças e às pragas, sendo que as medidas de controle são específicas para cada enfermidade. Temperaturas amenas e umidade elevada são condições que favorecem o desenvolvimento de fungos nas videiras. Dentre as doenças fúngicas que mais atacam as videiras encontra-se o Míldio, Antracnose, Escoriose, Podridão da Uva Madura, Podridão Amarga, Mancha nas Folhas, Podridão Descedente e Fusariose. As medidas de controle para estas doenças incluem espaçamento adequado, fuga de áreas de baixada úmidas, adubação equilibrada, poda verde, construção de quebra-vento quando a área for exposta a ventos frios, além do controle químico (MIELE, 2003a).

O tratamento químico pode ser realizado com fungicidas de contato, de profundidade e sistêmicos. Fungicidas de contato protegem somente a superfície coberta pela aplicação, são facilmente destruídos pelas altas temperaturas, radiação solar e lavados pela chuva. Os fungicidas com ação de profundidade podem atuar sobre o fungo no interior das folhas, porém não circulam na planta e também só protegem as partes pulverizadas, são mais eficazes quando aplicados preventivamente. Os produtos sistêmicos circulam pela seiva da planta, podem proteger as partes não pulverizadas da planta. Embora mais eficazes, não se recomenda mais de duas a três aplicações por safra, pois há riscos do aparecimento de raças resistentes. Esse problema pode ser evitado através de um programa de alternância de produtos (MIELE, 2003a). A Tabela 3 apresenta os fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle das doenças fúngicas da videira.

Tabela 3: Fungicidas registrados no MAPA para controle das doenças fúngicas da videira.

Ingrediente ativo	Tipo	Míldio	Antracnose	Escoriose	Podridão da uva madura	Mancha da folha	Podridão amarga
Azoxystrobin	S	X					X
Benalaxyl + Mancozeb	S	X					
Captan	C	X			X		
Carbendazim	S		X				
Chlorothalonil	C	X	X		X		
Chlorothalonil + Tiofanato metil	C+S	X	X		X	X	
Cymoxanil + Famoxadone	S	X					
Cymoxanil + Mancozeb	P	X					

Cymoxanil + Maneb	P	X						
Difenoconazole	S					X		
Dithianon	C	X	X					
Enxofre	C							X
Fenarimol	S							X
Folpet	C	X	X		X	X		
Fosetyl-Al	S	X						
Hidróxido de cobre	C	X	X			X		X
Imibenconazole	S		X					
Iprodione	C							X
Iprovalicarb + Propineb	S+C	X						
Mancozeb	C	X	X	X	X	X		
Mancozeb + Metalaxyl-M	S	X						
Mancozeb + Oxicloreto de cobre	C	X			X	X		
Mancozeb + Zoxamide	C	X						
Mancozeb + Tiofanato metil	C+S		X					
Maneb	C	X			X	X		
Metconazole	S					X		
Oxicloreto de cobre	C	X	X	X	X	X	X	X
Pyraclostrobin	S	X						
Tebuconazole	S				X	X		
Tiofanato metil	S	X	X		X	X		
Triadimenol	S	X						

C = fungicidas de contato, S = sistêmico e P = fungicidas de profundidade

Fonte: (MIELE, 2003a).

Doenças causadas por vírus e bactérias são as mais complexas e de difícil tratamento, sendo necessário, em casos extremos arrancar a planta, queimá-la e fazer rotação de cultura por alguns anos antes de utilizar a área para o cultivo novamente. Além das doenças, as videiras podem ser afetadas por pragas como cochonilhas, ácaros, besouros, vespas e abelhas. O controle químico pode ser feito por armadilhas com inseticidas e, se a infestação for intensa, com aplicação de inseticida em toda a videira. A Tabela 4 apresenta os agrotóxicos registrados no MAPA para controle de pragas das videiras (MIELE, 2003a).

Tabela 4: Agrotóxicos registrados no MAPA para controle de pragas nas videiras.

Praga	Agrotóxico
Filoxera	Fenitrotiom Paratim metil
Cochonilhas da parte aérea	Paratim metil + óleo emulsionável Fenitrotiom + óleo emulsionável Óleo emulsionável
Cigarrinha	Fenitrotiom Triclorfom
Mosca das frutas	Fenthion Triclorfom
Besouros desfolhadores	Fenitrotiom Triclorfom
Ácaro branco	Enxofre Abamectin
Ácaro erinose	Enxofre
Ácaro rajado	Abamectin

Fonte: (MIELE, 2003a).

2.5 Programas de controle do uso de agrotóxicos

Há órgãos que buscam controlar o uso e verificar a quantidade de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Internacionalmente, há o *Codex Alimentarius*, um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e da Organização Mundial da Saúde (OMS). Trata-se de um fórum internacional de normalização sobre alimentos, criado em 1962, e suas normas têm como finalidade proteger a saúde da população, assegurando práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos, criando mecanismos internacionais dirigidos à remoção de barreiras tarifárias.

Dentro da estrutura do *Codex Alimentarius* há o Comitê Codex sobre Resíduos de Pesticidas (CCPR, do inglês, *Codex Committee on Pesticide Residues*), que tem como missão considerar métodos de amostragem e análise para a determinação de resíduos de pesticidas, elaborar as listas prioritárias de pesticidas a serem avaliados/reavaliados, estabelecer Limites Máximos de Resíduos (LMR) (LAMY, 2011).

Há ainda o Comitê de Especialistas FAO/OMS sobre Resíduos de Pesticidas (JMPR, do inglês, *Joint FAO/WHO Meetings on Pesticide Residues*), composto por especialistas independentes internacionalmente reconhecidos, que presta aconselhamento científico ao

CCPR. O JMPR tem como objetivo realizar avaliações sobre resíduos de agrotóxicos em alimentos e recomendar os LMRs ao CCPR. Após consideração pelo CCPR, os LMR podem ser adotados pelo Codex Alimentarius (LAMY, 2011).

Como órgão representante do *Codex* no Brasil, temos o Comitê do Codex Alimentarius do Brasil (CCAB), criado em 1980 e composto por 14 membros, sendo órgãos do governo, indústrias e órgãos de defesa do consumidor. Um dos objetivos do CCAB é harmonizar os LMR do Brasil, estabelecido pela ANVISA e os LMR da *Codex Alimentarius*, para assegurar práticas leais no comércio internacional (LAMY, 2010).

O MAPA, através da sua Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) e da Coordenação de Resíduos e Contaminantes (CRC), coordena o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em produtos de origem Animal e Vegetal. PNCRC é um programa federal de inspeção e fiscalização de alimentos, que visa verificar a presença de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, como resíduos de medicamentos veterinários, de agrotóxicos ou afins, de contaminantes ambientais (ex: aflatoxinas) e de contaminantes inorgânicos (metais pesados)(MAPAb).

As amostras utilizadas para o monitoramento do PNCRC são oficiais e coletadas por Fiscais Federais Agropecuários em propriedades rurais, estabelecimentos beneficiadores, supermercados e em centrais de abastecimento. As análises são realizadas pelos Laboratórios Nacionais Agropecuários (LANAGROS), que são os laboratórios oficiais do MAPA, ou por laboratórios públicos e privados credenciados, acreditados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) pela Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (MAPAb).

Os resultados do monitoramento PNCRC são divulgados anualmente. Para o ano-safra 2011/2012, 67 amostras de uva foram analisadas, sendo que 17,92% não estavam em conformidade. Entre os resíduos irregulares detectados encontram-se ciprodinil, acefato, dimetoato, propagarito e trifloxistrobina, que têm o uso Não Permitido para a Cultura (NPC), fenexamida e ometoato, que são de uso proibido e indexarbe e carbendazim acima do LMR (BRASIL, 2013).

Com o objetivo implantar ações que visam controlar o uso de agrotóxicos que podem causar riscos à saúde humana, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), iniciou em 2001 o Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos e em 2003 o projeto transformou-se no Programa Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). O programa tem fornecido subsídios à tomada de decisão para restrição e banimento de agrotóxicos perigosos à população, desenvolvimento de ações de controle de agrotóxicos,

estabelecimento de uma rede de laboratórios para analisar resíduos de agrotóxicos, banco de dados e ações de capacitação (ANVISA, 2009, 2010).

No ano de 2009 houve 26 estados participantes do programa, pesquisando 234 ingredientes ativos de agrotóxicos em 20 culturas diferentes. Neste mesmo ano, as principais irregularidades encontradas nas amostras estudadas foram: presença de agrotóxicos em níveis acima do LMR em 2,8% das amostras, utilização de agrotóxicos não autorizados (NA) em 23,8% das amostras e resíduos acima do LMR e NA na mesma amostra em 75% do total (ANVISA, 2010).

Para a uva, por exemplo, 35,2% das amostras continham agrotóxicos NA, 8,5% acima do LMR e 12,7% com resíduos acima do LMR e NA na mesma amostra. Os agrotóxicos NA encontrados na uva foram: acefato, buprofenzina, ciazofamida, cipermetrina, ciprodinil, clorfenapir, clospirifós, clotianidina, deltametrina, diclorvos, dimetoato, dimetomorfe, endossulfan, espiridiclofeno, espiromesifeno, etofenproxi, fempiroximato, flufenoxurom, fosmete, metamindofos, metomil, monocrotofós, procloraz, propargito, tiabendazol e trifloxistrobina. Os agrotóxicos acima do LMR encontrados foram: carbendazim, ciproconazol, etefom e iprodiona (ANVISA, 2010). No ano de 2010 não houve monitoramento de resíduos de agrotóxicos para a cultura da uva (ANVISA, 2011).

As amostras com níveis de agrotóxicos acima do LMR evidenciam a aplicação incorreta do produto, principalmente no que se refere ao número de aplicações, à quantidade de ingrediente ativo por hectare, por ciclo ou por safra da cultura e o descumprimento do período de carência. Quanto à utilização de produtos não autorizados, podem existir dois tipos de irregularidades: aplicação de um agrotóxico não autorizado para a cultura, mas com ingrediente ativo com uso permitido para outra cultura, ou, aplicação de agrotóxico banido do Brasil ou que nunca teve registro no país. (ANVISA, 2010).

O uso de agrotóxicos não autorizados (NA) apresenta duas conseqüências negativas: a primeira é a exposição do trabalhador rural aos agrotóxicos que apresentam elevada toxicidade aguda e/ou crônica, e a utilização de agrotóxicos não registrados para a cultura implica no aumento do risco dietético de consumo de resíduos desses agrotóxicos, uma vez que esse uso não foi considerado no cálculo do impacto na Ingestão Diária Aceitável (IDA) (ANVISA, 2010).

A produção sem o uso de agrotóxicos é uma das características da produção orgânica. Para se tornar um agricultor orgânico, é necessário que o produtor seja submetido a um processo de investigação das condições ambientais da propriedade, considerando aspectos sobre o uso de adubos químicos e agrotóxicos nos últimos anos, proximidades com áreas

produtoras convencionais, qualidade da água, etc, assim como, consentir inspeções periódicas das entidades certificadoras. As certificadoras, então, emitem um certificado declarando que o produtor está autorizado a usar a marca de certificação em seus produtos (SANTOS; MONTEIRO, 2004).

Outro sistema para controlar uso de agrotóxicos é Produção Integrada de Frutas (PIF), que surgiu como uma extensão do Manejo Integrado de Pragas (MIP). O surgimento desse programa deveu-se à necessidade de reduzir o uso de agrotóxicos e proporcionar maior atenção e respeito ao ambiente, fazendo uso de métodos de cultivo ecologicamente seguros e controlando todas as etapas do manejo de cada cultura. O conceito de qualidade na PIF inclui a parte estética e organoléptica da fruta e a segurança para o consumidor, quanto à isenção de resíduos de agroquímicos (GARRIDO, 2010).

Quando uma fruta é produzida pelo sistema PIF recebe um selo de conformidade, atestando sua qualidade, com a garantia organismo certificador. No Brasil, a Avaliação da Conformidade PIF é um parceria do MAPA com o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO).

2.6 Registros de agrotóxicos

O registro de agrotóxicos objetiva determinar seus perigos potenciais, assim como, diminuir os riscos aos usuários. As atividades para avaliação da toxicidade de um agrotóxico devem ser desenvolvidas antes que o produto chegue ao mercado, permitindo o estabelecimento dos LMR (BRASIL, 2002).

A Lei de Agrotóxicos e Afins nº 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece que só poderão ser produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados os agrotóxicos que estejam previamente registrados em órgão federal, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura.

O Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta esta Lei, estabelece as competências para os órgãos envolvidos no registro: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério da Saúde (MS) e do Ministério do Meio Ambiente (MMA). Cabe a estes ministérios, no âmbito de suas respectivas áreas de competências, avaliar e classificar toxicologicamente os agrotóxicos, monitorar os resíduos de agrotóxicos e

afins em alimentos de origem vegetal, estabelecer os LMRs e o intervalo de segurança de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura agrícola, promover a reavaliação de registro de agrotóxicos, seus componentes e afins, entre outras funções.

2.7 A importância das análises para determinação de resíduos de agrotóxicos

Produtos agrícolas como frutas, vegetais e cereais são as matrizes mais analisadas em laboratórios de rotina, apresentando freqüentemente resíduos de agrotóxicos de diversas classes. Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos multirresíduo de agrotóxicos para a determinação nestes tipos de alimentos (PRESTES et al, 2009)

A uva é amplamente cultivada e consumida no mundo, assim como seus derivados. Além do uso de agrotóxicos pelos produtores, a uva pode sofrer contaminação a partir de fontes indiretas, tais como cultivo de outros produtos agrícolas próximo às videiras, agro-insumos contaminados, etc. Assim, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos nesta fruta torna-se essencial para garantir a segurança alimentar aos consumidores e para dos regulamentos estão se tornando cada vez mais rigorosos na maioria dos países (LI, ZHANG, SHI, 2011).

2.8 Validação

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação pode ser de dois tipos: validação no laboratório e validação completa. Validação no laboratório consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade (RIBANI, 2004).

A validação completa envolve todas as características de desempenho e em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida. Os parâmetros analíticos usados para a validação devem ser baseados na intenção do uso do

método, ou seja, um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços (RIBANI, 2004).

A ANVISA, através da Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003, e o INMETRO, através do documento DOQ-CGCRE-008 de fevereiro de 2010, exigem alguns parâmetros que devem ser verificados para a validação de metodologia analítica, que são apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros analíticos exigidos para a validação de metodologias analíticas

INMETRO	ANVISA
Especificidade / Seletividade	Especificidade / Seletividade
Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
	Curva de calibração
Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação
Sensibilidade	
Exatidão e tendência	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetibilidade (precisão intra-corrída)
Precisão intermediária	Precisão intermediária (precisão inter-corrída)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza da medição	

Fonte: RIBANI, 2004

2.9.1 Seletividade

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies, como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar porventura, presentes. Experimentos para avaliação da seletividade envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2010).

2.9.2 Linearidade e faixa de trabalho

Linearidade é a habilidade de um método de demonstrar que os resultados obtidos são dependentes da concentração do analito, dentro de um intervalo (ANVISA, 2003). Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica (RIBANI, 2004). Em análises cromatográficas a linearidade pode ser verificada através das curvas de calibração construídas plotando a razão entre as áreas dos picos obtidas do analito e do padrão interno versus a concentração das soluções (CUNHA, 2009; RODRÍGUEZ, 2009) A equação linear da reta que relaciona área e concentração é:

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico,);

x = concentração;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação. O coeficiente de correlação linear (r) expressa o quanto a reta pode ser considerada adequada para o estudo de caso (INMETRO, 2010). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação superior a 0,99, com no mínimo cinco concentrações diferentes, e o INMETRO um valor acima de 0,90. Valores de coeficiente de determinação (r^2) são tidos como satisfatórios a partir de 0,98 (RIBANI, 2004)

A faixa de trabalho, ou intervalo, expressa uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado, sendo que, a concentração da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

2.9.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Limite de detecção (LOD, do inglês, *Limit of Detection*) é a quantidade do analito presente em uma amostra que ainda pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada (ANVISA, 2003). A determinação do LOD é importante, principalmente pelo fato de que a detecção de um analito não muda de zero para um. Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído (INMETRO, 2010).

Limite de Quantificação (LOQ, do inglês, *Limit of Quantification*) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003). LOQ corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco), devendo-se adotar, para a análise em nível de traços, como a concentração mais baixa da curva analítica (INMETRO, 2010).

2.9.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico, também chamada de tendência ou recuperação, é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (RIBANI, 2004). O uso de materiais de referência certificados (MRC), comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação podem ser usados para a determinação da exatidão (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010)

Pela dificuldade de se obter MRC, a exatidão é mais comumente determinada através de ensaios de recuperação, porém, a limitação deste tipo de determinação é que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI, 2004).

2.9.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de mesma amostra (ANVISA 2003), normalmente expressa como estimativa do desvio padrão (DP) ou do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (INMETRO, 2010). A precisão pode ser avaliada em três níveis:

- Repetibilidade (precisão intra-corrída): expressa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

- Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes quando se busca a padronização de metodologia analítica.

Em métodos que quantificam compostos em quantidades macro requerem um DRP de 1 a 2%, para métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos DRP de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI, 2004). A ANVISA, porém, não admite valores superiores a 5%.

2.9.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez e, constatando-se sua susceptibilidade às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003).

Uma maneira de se determinar a robustez de um método é o teste de *Youden*. Este teste permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (INMETRO, 2010). As variações das condições que são testadas em cromatografia líquida são: variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas,

temperatura e fluxo da fase móvel. Já em cromatografia gasosa as variações são: diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e velocidade do gás de arraste (ANVISA, 2003).

2.10 Preparo da amostra

Devido às concentrações dos analitos serem geralmente baixas e apresentarem propriedades químicas distintas a determinação de resíduos de agrotóxicos exige uma etapa prévia de preparo da amostra. Sendo assim, o principal objetivo do preparo da amostra é promover a extração dos analitos de interesse da matriz com o mínimo de interferentes. A extração dos analitos da amostra talvez seja a etapa mais difícil e demorada de uma análise cromatográfica, que, dependendo da técnica utilizada e devido à complexidade da matriz exige ainda uma etapa de purificação do extrato, chamada de *clean-up*, essa etapa é fundamental para reduzir as interferências e o efeito matriz (PRESTES, 2009).

Na literatura há diversos métodos que podem ser empregados para as mais diferentes amostras, todos buscando maior eficiência na extração de resíduos de agrotóxicos. Técnicas clássicas, como extração líquido-líquido (ELL) e Soxhlet, já não são muito usadas por exigirem um grande volume de solvente orgânico. Métodos multirresíduos são mais empregados atualmente por analisarem um maior número de resíduos de agrotóxicos em uma única corrida cromatográfica. São características desejáveis em um método multirresíduo de preparo de amostra: incluir o maior número de agrotóxicos possíveis, recuperações próximas a 100%, remover os possíveis compostos interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança, ou seja, utilizar pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade (PRESTES, 2009).

A partir da década de 90 a preocupação com o meio ambiente e o aumento no número do número de técnicas amostras a serem analisadas em menores espaços de tempo, provocou o aumento de técnicas que utilizam menores volumes de solventes aliando conceitos como miniaturização e automatização (PRESTES, 2009).

Atualmente há uma enorme variedade técnicas de preparo de amostra e outras novas vêm surgindo como, por exemplo, a Microextração em Fase Líquida com Fibras Ocas (HF-LPME, do inglês, *Hollow Fibre Liquid Phase Microextraction*), que surgiu da miniaturização da ELL. A HF-LPME é simples, eficiente, barata, usa microlitros de solvente e provê uma excelente capacidade de purificação da amostra (LI, 2011; BOLAÑOS, 2008, EMÍLIO, 2010).

Wang e colaboradores (2012) desenvolveram um método para determinação de resíduos de sete agrotóxicos em amostras de pepino com extração por HF-LPME e determinação por UHPLC-MS/MS. Li e colaboradores (2011) também utilizaram HF-LPME para a determinação de 25 agrotóxicos em uvas frescas.

Outro exemplo é a Microextração em Gota Suspensa (SDME, do inglês, *Single Drop Microextraction*) que envolve o uso de uma micro gota de solvente orgânico suspensa na ponta da agulha de uma micro seringa e mergulhada na amostra. (EMÍDIO, 2010). Apesar de usar uma quantidade irrisória de solvente, SDME não é uma técnica muito robusta devido à baixa estabilidade da micro gota. (EMÍDIO, 2010, AMVRAZI e TSIROPOULOS, 2009). Utilizando a SDME Amvrazi e colaboradores (2009) estudaram a influência de cloreto de sódio, sacarose e pH na extração dos agrotóxicos em amostras de uva e maçã, concluindo que a adição de sal e de sacarose diminuiu a eficiência de extração de quase todos os agrotóxicos estudados, contrariando o que se esperava com o efeito *salting out*.

Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês, *Solid Phase Microextraction*, SPME) é mais comum do que as anteriormente citadas, consiste na partição dos analitos entre a fase estacionária da fibra revestida por uma camada polimérica e a amostra. Filho e colaboradores (2010) utilizaram a SPME para a extração de resíduos de quatorze agrotóxicos em amostras de manga com posterior determinação por GC-MS. Uma grande vantagem da SPME é a possibilidade de eliminação de solventes, porém, apresenta como desvantagens problemas de precisão, poucas fibras disponíveis no mercado, morosidade na otimização do método e percentual de recuperação baixo (PRESTES, 2011).

A Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*) é muito conhecida e utilizada em laboratórios de rotina, requer volume reduzido de solventes orgânicos, apenas para a dessorção dos analitos retidos, podendo ser usada para a extração, purificação ou concentração (ALMEIDA, 2004). Yang e colaboradores (2011) utilizaram extração com acetonitrila e SPE para a determinação de resíduos de 88 agrotóxicos em frutas silvestres (framboesa, morango, uva e mirtilo), Pérez e colaboradores (2008a) utilizaram SPE para a determinação de oito agrotóxicos em sucos de uva, laranja, maçã e abacaxi, previamente diluídos em água.

Apesar de a SPE apresentar uma série de vantagens, como a utilização de reduzido volume de solventes, não degradação de compostos durante a extração e curto tempo de execução, possui algumas desvantagens como custos elevados para aquisição e manutenção do equipamento e operação complicada (PRESTES, 2011).

2.10.1 QuEChERS

O método QuEChERS (*quick* – rápido, *easy* – fácil, *cheap* – barato, *effective* – eficaz, *rugged* – robusto e *safe* – seguro) foi inicialmente desenvolvido por Anastassiades e colaboradores e publicado em 2003, com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes na época. Durante o desenvolvimento do método, os autores revisaram as condições comumente utilizadas na análise multirresíduo de agrotóxicos e propuseram este novo método de preparo de amostra. Um novo método de limpeza denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (D-SPE, do inglês, *Dispersive Solid Phase Extraction*) foi proposto juntamente com o método QuEChERS (PRESTES, 2009).

Apesar de a SPE garantir uma melhor limpeza do extrato, a D-SPE fornece recuperações maiores e mais reprodutíveis para analitos com características ácidas ou básicas, como por exemplo, acefato, carbendazim, imazalil, metamidofós, pimetrozina e tiabendazol (WILKOWSKA, 2011). As grandes vantagens da D-SPE em relação a SPE são a possibilidade de realizar a combinação de diferentes tipos de sorventes de acordo com a necessidade do analista, do tipo de matriz ou do equipamento que será utilizado na determinação e a remoção de água residual de forma simultânea com a limpeza do extrato (CABRERA, 2012). Além disso, a D-SPE é mais rápida e barata, por não precisar de equipamento específico com vácuo e controle de fluxo e utilizar menores quantidades de sorvente. O cuidado que se deve ter ao utilizar esta técnica é que o sorvente utilizado deve remover os componentes da matriz e não os analitos (WILKOWSKA, 2011).

O método QuEChERS original, como pode ser observado pela Figura 1, emprega uma etapa de extração dos analitos da amostra usando 10 gramas da amostra, e 10 mL de acetonitrila. A adição de sais como sulfato de magnésio e cloreto de sódio promove a partição entre as fases orgânica e aquosa, essa mistura é, então, agitada e centrifugada. O sobrenadante é coletado, submetido ao *clean up* (D-SPE), uma etapa de purificação que utiliza 1 mL do extrato, sulfato de magnésio e etilenodiamino-N-propil (PSA, do inglês, *primary secondary amine*), e então, agitação e centrifugação novamente (PRESTES, 2009). A abordagem QuEChERS é muito flexível, tanto que pequenos ajustes nas quantidades de sorvente têm pouco impacto sobre as recuperações de agrotóxicos, ao contrário de pH e solvente que pode ter grandes impactos (LEHOTAY, 2010).

Até então, os solventes mais usados para a extração de agrotóxicos em amostras de alimentos eram acetona, acetato de etila e acetonitrila. Acetato de etila apresenta a vantagem de ser apenas parcialmente miscível em água, porém, extrações realizadas com acetonitrila contêm menos substâncias interferentes, como ceras, gorduras e pigmentos lipofílicos, que as realizadas com acetato de etila e acetona. Além do mais, a acetonitrila podem ser facilmente separada da água, através da adição de sais inorgânicos, sendo este o solvente de preferência na metodologia QuEChERS (WILKOWSKA, 2011, ANASTASSIADES, 2003a).

	QuEChERS original	QuEChERS acetato	QuEChERS citrato
Extração	10 g amostra + 10 mL acetonitrila	15 g amostra + 15 mL acetonitrila	10 g amostra + 10 mL acetonitrila
Partição	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O + C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1,5H ₂ O
Limpeza	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA
Análise Cromatográfica			

Fonte: Prestes, 2011

Figura 1: Etapas de extração, partição e limpeza dos métodos QuEChERS.

Um solvente ideal para análise de resíduos de agrotóxicos multiclasse deve atentar para alguns requisitos importantes: os analitos de interesse devem ser suficientemente solúveis e estáveis no dado solvente, eficiência na extração de agrotóxicos de polaridades diferentes, capacidade de evitar a co-extração de interferentes, imiscibilidade em água ou a

possibilidade de induzir a partição usando aditivos, compatibilidade com as técnicas utilizadas na etapa de limpeza e propriedades físico-químicas que permitam a análise de uma gama diversificada dos resíduos de pesticidas no sistema cromatográfico, baixa toxicidade, inflamabilidade e custo (MAŠTOVSKÁ, 2004).

Neste sentido, Maštovská e colaboradores (2004) propuseram a acetonitrila como melhor solvente para a extração de agrotóxicos em uma análise multirresíduo. Quando a troca de solventes for necessária, tolueno é considerado o mais apropriado, devido à estabilidade de agrotóxicos dissolvidos e à polaridade média (boa solubilidade de vasta gama de agrotóxicos). A baixa volatilidade do tolueno torna-o adequado para a preparação e armazenamento a longo prazo das soluções de agrotóxicos (MAŠTOVSKÁ, 2004).

Os sais inorgânicos são imprescindíveis na realização do método QuEChERS, já que são os responsáveis pela separação das fases acetonitrila:água. O cloreto de sódio (NaCl), por exemplo, aumenta a força iônica da solução, diminuindo a solubilidade do analito orgânico na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica, causando o chamado efeito *salting-out*. A adição de cloreto de sódio durante a partição melhora, especialmente, a recuperação de agrotóxicos polares (GARBI, 2010, ANASTASSIADES, 2003a). A utilização de sais secantes tem a finalidade de melhorar a recuperação de agrotóxicos polares, com este propósito o sulfato de magnésio (MgSO₄) foi escolhido no desenvolvimento do método QuEChERS devido sua maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais, porém sulfato de sódio (Na₂SO₄) também pode ser utilizado (WILKOWSKA, 2011).

Outra vantagem no uso de sulfato de magnésio, é que sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (PRESTES, 2011). Variando a quantidade de cloreto de sódio adicionado à amostra durante o partição com sulfato de magnésio, é possível controlar a gama de polaridade do método e, assim, a quantidade de interferentes no extrato. A mistura de sulfato de magnésio e cloreto de sódio usada no QuEChERS original evita a co-extração de alguns interferentes, como a frutose por exemplo (WILKOWSKA, 2011).

Materiais sorventes são utilizados na etapa de limpeza com o propósito de remover interferentes que resistiram à etapa de extração. O PSA possui elevado efeito quelante, devido aos grupos amino primário e secundário que formam uma estrutura bidentada, atua como um trocador aniônico e pode interagir com outros compostos através de pontes de hidrogênio (ANASTASSIADES, 2003a). Essas características fazem com que PSA torne-se eficiente na remoção ácidos graxos (ácido oléico, palmítico e linoléico) e outros ácidos orgânicos e

demais compostos polares presentes na matriz (PRESTES, 2011, BANERJEE, 2007). PSA, porém, não remove gorduras nem a cor do extrato, por isso, compostos como clorofila e caroteno, devido à sua natureza não polar e alta massa molecular podem interferir na análise de agrotóxicos (BANERJEE, 2007).

O pH também influencia a recuperação dos agrotóxicos que, em geral, são mais estáveis a pH mais baixo, como por exemplo, clorotalonil, captana, folpete, e diclofluanida, que degradam-se rapidamente a pH mais elevado. O uso de PSA na etapa de limpeza aumenta o risco de degradação destes agrotóxicos devido à presença dos grupos amino que podem remover a acidez dos extratos. No entanto, há agrotóxicos que apresentam baixa recuperação a pH baixo, como imazalil e tiabendazol, porque protonam na fase aquosa devido a presença de íons H^+ e não migram para a fase orgânica (ANASTASSIADES, 2003a).

Um das primeiras modificações do método QuEChERS foi a adição de acetato de sódio e ácido acético, causando o efeito tamponante a pH 4,8, o método assim executado é chamado de QuEChERS acetato. Há ainda o método QuEChERS citrato que utiliza citrato de sódio diidratado, hidrogenocitrato sesquihidratado e ácido cítrico como responsáveis pelo efeito tamponante a pH 5,0-5,5. QuEChERS acetato foi adotado em 2007 como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Em 2008, o *Comité Européen de Normalisation* (CEN), oficializou o método QuEChERS citrato como método de referência na União Europeia (PRESTES, 2011).

Outras modificações é a adição de outros materiais sorventes no método QuEChERS. O octadecilsilano (C18) por exemplo, é normalmente usado em amostras com teor de gordura maior que 2%, mas também é usado junto ao PSA em diversos tipos de matrizes. Já o carvão grafitizado (GCB, do inglês, *graphitized carbon black*) pode reduzir o teor de clorofila e esteróis, porém, provoca também a remoção de agrotóxicos com estruturas planares devido à sua grande área superficial e aos seus grupos polares com alto potencial para a formação de pontes de hidrogênio (PRESTES, 2009, PRESTES, 2011). Como alternativa ao GCB há o sorvente polimérico ChloroFiltr®, que remove de maneira seletiva a clorofila, não afetando as recuperações de compostos planares (CABRERA, 2012).

A alumina ou óxido de alumínio (Al_2O_3) é geralmente empregada na separação cromatográfica de compostos lipofílicos. Pelo fato de poder ser preparada com características ácida, neutra ou alcalina, é bastante útil na separação de analitos com polaridades diferentes. O Florisil é utilizado para separação de analitos apolares ou com baixa polaridade

(CABRERA, 2012) e, atualmente, tem sido empregado para no preparo de amostra por MSPD (CAPRIOTTI, 2013).

A terra diatomácea destaca-se pelo seu baixo custo, alta área superficial e baixa massa específica, tendo como componente majoritário a sílica, a qual se encontra na forma hidratada. Quando testado como sorvente na D-SPE, empregando QuEChERS modificado, terra diatomácea apresentou resultados satisfatórios apenas para 9 dos 26 agrotóxicos estudados. Ao ser misturado com C18, esse número subiu para 14 (CABRERA, 2012).

Novos sorventes vêm sendo desenvolvido, a quitosana, por exemplo, é um polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos, através de um processo de alcalinização sob altas temperaturas. Quitina e quitosana são biopolímeros renováveis, de baixo custo e suscetíveis a alterações químicas para aumentar sua capacidade de adsorção (CABRERA, 2012).

Zhao e colaboradores (2012) sintetizaram um novo sorvente para D-SPE a partir de tetraetilenopentamina, são os nanotubos de carbono de multicamadas (MWCNT, do inglês, *Multi Wall Carbon Nanotubes*). Comparando com o PSA, observaram que os nanotubos de carbono proporcionavam melhor limpeza do extrato sem comprometimento na recuperação de agrotóxicos. Este sorvente remove com eficiência pigmentos, ácidos orgânicos e açúcares.

Muitos pesquisadores vêm buscando a melhoria no método QuEChERS, desenvolvendo novos métodos e comparando com os já oficializados. Banerjee e colaboradores (2007) testaram QuEChERS com extração com acetato de etila e acetonitrila para a determinação de 83 agrotóxicos de classes diferentes em uva, concluído que, mesmo apresentando menor extração de componentes da matriz, acetato de etila gera recuperações menores para vários analitos. Os autores também testaram a adição de dietileno glicol que melhorou a recuperação, pois preveniu a perda de analitos durante a evaporação.

Shia apud Lehotay (2010) compararam os métodos QuEChERS original, QuEChERS modificado com tampão acetato e QuEChERS modificado com tampão citrato em amostras de uva, aveia, laranja e abacate, concluindo que o tampão acetato oferece melhores recuperações para agrotóxicos dependentes do pH, para todas as matrizes estudadas.

Walorczyk e colaboradores (2011) determinaram 160 agrotóxicos em vinho empregando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial (GC-MS/MS, do inglês, *Gas Chromatography–Mass Spectrometry tandem*). Os autores comparam o procedimento de extração/partição do método QuEChERS original com QuEChERS acetato e QuEChERS citrato sendo que o procedimento que apresentou melhores resultados na extração foi QuEChERS citrato, este foi então otimizado. Uma das desvantagens quando

empregado o uso de tampão acetato apresentada pelos autores é que a partição entre as fases orgânica e aquosa possuem quase a mesma cor, dificultando a pipetagem do sobrenadante.

Na etapa de purificação três testes foram realizados, também baseados na etapa de *clean-up* do QuEChERS, sendo que todos empregavam 5 mL do sobrenadante da etapa anterior: no primeiro teste foi usado sulfato de magnésio e PSA, no segundo foi acrescentado 0,25 g C18 e no terceiro 0,050 g de GCB. Nesta etapa o teste que utilizou C18 apresentou melhores resultados. Os autores observaram que o carvão grafitizado proporciona a obtenção de um extrato quase incolor, mas ao mesmo tempo causa inaceitáveis perdas de analitos, com recuperações menores que 70% dos agrotóxicos suscetíveis a adsorção como clorotalonil, tiametoxam, tiabendazol, ciprodinil, doniconazole, diflufenican, pirazofós, procloraz e imibenconazol (WALORCZYK, 2011).

Baseados na metodologia QuEChERS, Cunha e colaboradores (2009) testaram o sorvente OASIS HLB (poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)) para a determinação de 27 agrotóxicos na uva, no mosto e no vinho por cromatografia gasosa a baixa pressão acoplada a espectrometria de massas (LP-GC/MS, do inglês, *Fast Low-Pressure Gas Chromatography–Mass Spectrometry*). Oasis HLB, por possuir características hidrofílicas e lipofílicas, tem a capacidade de remover a cor do extrato, porém, não é observado aumento na recuperação dos analitos. Os autores estudaram ainda a possibilidade de substituir a acetonitrila por tolueno ou acetato de etila, mas não obtiveram bons resultados.

Dasgupta e colaboradores (2010) determinaram 160 agrotóxicos e 25 contaminantes orgânicos na uva e no vinho utilizando uma abordagem semelhante com o QuEChERS, porém, usando acetato de etila como solvente. Rodríguez e colaboradores (2009), que determinaram 11 fungicidas na uva e no vinho, também fizeram uma abordagem similar ao QuEChERS, utilizando uma mistura de acetato de etila e hexano (1:1) e a purificação do extrato foi feita por SPE com PSA e GCB.

Patil e colaboradores (2009) elaboraram um método de preparo de amostra de vinho para determinação de agrotóxicos empregando extração com acetato de etila e partição com sulfato de sódio, seguida da purificação do extrato por D-SPE com 200 mg de Florisil e mais uma D-SPE com 25 mg de de PSA. A limpeza com Florisil ajudou na remoção de cerca de 90% de interferentes, enquanto que a etapa seguinte de purificação com PSA foi eficiente na remoção de ácidos graxos e açúcares. Os autores compararam, além disso, acetato de etila e acetonitrila como solventes para a extração, observando que acetato de etila proporciona menor co-extração de açúcares, porém as recuperações de ciprodinil e buprofezin são menores.

O método QuEChERS foi desenvolvido para as amostras com umidade superior a 75%. Para produtos com um teor de água inferior a 25% como cereais, frutos secos e especiarias, o método deve ser adaptado, reduzindo a quantidade de amostra e adicionando água para que a amostra fique mais acessível ao solvente de extração. Marchis e colaboradores (2012) determinaram agrotóxicos em grãos de soja e milho utilizando o QuEChERS com algumas modificações, como adição de água na etapa de extração e a etapa de limpeza foi realizada com o água e isooctano. Kolberg e colaboradores (2011) utilizaram o QuEChERS para a determinação de 24 agrotóxicos por GC-MS em farelo, farinha e grãos de trigo homogeneizando 500 g da amostra com 1500 mL de água purificada.

Além dos estudos já citados, o método QuEChERS original e suas modificações já estão sendo aplicados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em diversos tipos de matrizes, como frutas e vegetais (LU, 2012, ZHAO, 2012, SINHA, 2012, CERVERA, 2012, KOESUKWIWAT, 2010), folhas de bananeira (CURBELO, 2011), tomate (MELO, 2012), azeitonas (LÓPEZ, 2010), leite (JEONG, 2012), solo (ROUVIÈRE, 2012) entre outros. Medicamentos humanos e veterinários também podem ser determinados em diversos tipos de matrizes usando o QuEChERS para o preparo da amostra, como por exemplo, leite bovino (KEEGAN, 2009), tecido animal (STUBBINS, 2009), solo (BRAGANÇA, 2012), alimento para bebês (LUIZ, 2012), sangue (PLÖSSL, 2006), mel, geleia real e própolis (AGUI, 2012). Outro exemplo é a determinação de micotoxinas em milho para pipoca (FERREIRA, 2012), em ovos (FRENICH, 2011) e em macarrão (SIRHAN, 2011).

2.11 Efeito matriz

O efeito matriz pode aumentar ou diminuir a intensidade do sinal analítico no extrato da matriz comparado com a mesma concentração em solução com solvente puro (ECONOMOU, 2009; CUNHA, 2009). O efeito matriz depende de vários fatores, como o número de sítios ativos na coluna, as condições cromatográficas, a natureza do pesticida, o tipo e a quantidade da matriz e a concentração de agrotóxicos na matriz. A estratégia mais eficiente para compensar o efeito matriz é o uso de padrões internos deuterados para cada pesticida, porém, para muitos agrotóxicos não há padrões deuterados. Outra estratégia é realizar a curva de calibração na matriz, sendo que esta é usada por praticamente todos os pesquisadores. Outro fator que pode ajudar a diminuir o efeito matriz, em caso de análise por

GC é a adição de uma parte isotérmica no final da rampa de aquecimento da análise cromatográfica para remover compostos de alto ponto de ebulição da coluna e a utilização de pré-coluna para proteger a coluna da contaminação excessiva (CUNHA, 2009).

Cunha e colaboradores (2009) avaliaram o efeito matriz para diferentes agrotóxicos na uva, no vinho e no mosto, observando que o sinal cromatográfico aumentou para a maioria dos agrotóxicos estudados. Para Walorczyk e colaboradores (2011) 85% dos compostos estudados em vinho apresentavam aumento do sinal cromatográfico na presença de matriz. O efeito matriz pode melhorar a forma do pico, reduzindo o ruído e aumentando a sensibilidade. Esse aumento do sinal cromatográfico ocorre porque os componentes da matriz co-extraídos bloqueiam os sítios ativos da fase estacionária da coluna cromatográfica e permitem que um grande número de compostos alcancem o detector (SOUZA, 2011).

Walorczyk e colaboradores (2011) fizeram um estudo para avaliar a possibilidade de fazer a curva de calibração das amostras apenas no solvente puro, e não na matriz da amostra. O objetivo principal deste experimento foi verificar se os padrões de agrotóxicos preparados em solvente puro poderiam ser usados para calibrar o sistema cromatográfico em caso de indisponibilidade de extrato de vinho estar totalmente livre de agrotóxicos. Mas observaram que a curva de calibração feita na matriz fornecia resultados mais precisos, com menor desvio padrão.

Um importante aspecto, que pode ser considerado quando métodos analíticos são desenvolvidos para estudo de amostras complexas, é a comparação entre as equações da curva de calibração dos padrões em solventes puros e na matriz da amostra. Esta avaliação pode demonstrar se há influência no efeito matriz pelas alterações na inclinação e no intercepto da curva de calibração (PÉREZ, 2008b).

Segundo Carpinteiro (2010), se a supressão do sinal do analito for inferior a 20%, é viável usar a curva de calibração no solvente para a quantificação dos analitos nas amostras. Para Zhao (2012) o efeito matriz pode ser avaliado através da razão das áreas dos picos na matriz e no solvente, estabelecendo que, se o valor obtido for entre 0,9 e 1,1, o efeito da matriz pode ser ignorado.

Carpinteiro e colaboradores (2010) avaliaram o efeito matriz, em amostras de vinho tinto e branco, através da comparação das áreas dos picos cromatográficos do extrato sem analito e do extrato adicionado de analito. Essa adição foi feita depois da SPE, apenas para avaliar a interferência da matriz, e não perdas durante o processo de preparo da amostra. Os resultados mostraram que a maioria dos compostos sofreu pouco efeito da matriz, entre 10 e 20%.

Entre os agrotóxicos mais suscetíveis ao efeito matriz encontram-se os que apresentam os grupos fosforados (-PO), hidroxila (-OH), os azol (-N), amino (-R-NH-), imidazol, benzimidazol, carboxila (-COOH), carbamato (-O-CO-NH-) e ureia (-NH-CO-NH-). Estes tipos de moléculas interagem com os grupos silanol ($\equiv\text{Si-OH}$) e, eventualmente, com íons metálicos em superfícies de vidro, quando estas não são silanizadas (ANASTASSIADES, 2003b).

Para evitar efeito matriz, analitos protetores (APs) podem ser usados. APs são compostos que interagem com os sítios ativos do sistema GC, diminuem a degradação térmica e/ou a adsorção de analitos. O conceito de adicionar APs ao extrato de amostras e também ao solvente livre da matriz proporciona uma mesma resposta em ambos os casos (RODRÍGUEZ, 2009). Para Rodríguez e colaboradores (2009) valores de recuperação dos analitos na uva e no vinho sem o uso de APs são piores que os obtidos com uso de APs.

ANASTASSIADES e colaboradores (2003b) avaliaram 93 possíveis analitos protetores em extratos de frutas e vegetais, sendo que, os que obtiveram melhores resultados eram os que continham múltiplos grupos hidroxila, tais como açúcares e derivados do açúcar, dentre estes, o gulanolactone foi o mais eficaz para a maioria dos agrotóxicos testados.

Apesar da influência da matriz ser um aspecto bastante pronunciado, uma mesma matriz pode ser usada para a análise de mais de um tipo de amostra. Bolaños e colaboradores (2008) testaram a influência da matriz vinho branco, tinto e espumante, cerveja alcoólica e não alcoólica na recuperação de agrotóxicos pelo método HF-LPME, concluindo que a matriz não tinha influência sobre a eficiência da extração.

2.12 Técnicas cromatográficas

Para a determinação de agrotóxicos as técnicas mais utilizadas são as cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*), especialmente espectrometria de massas seqüencial (MS/MS, do inglês, *Mass Spectrometry tandem*). Esta técnica que permite obter grande quantidade de informação estrutural sobre o analito, assegurando sua identificação com maior exatidão do que quando feita apenas com base nas suas características de retenção. Além disso, quando existem compostos que não podem ser totalmente separados pela técnica cromatográfica empregada, usando espectrometria de massas é possível detectá-los individualmente se possuírem diferentes massas molares ou

gerarem diferentes espectros de massas. Quando se utiliza a MS/MS é possível obter maior detectabilidade e menores limites de detecção e quantificação do que quando se utiliza MS, devido aos modos de varreduras possíveis de serem realizados, o que favorece a sua aplicação à análise de traços (CHIARADIA, 2008).

O princípio da espectroscopia de massas é a fragmentação de moléculas formando íons carregados, que são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z) e fornecendo, então, um espectro da abundância relativa de cada fragmento. Desde que as mesmas condições de fragmentação sejam empregadas, o padrão de fragmentação é característico para cada composto (SKOOG, 2009).

A ionização pode ocorrer de diversas formas, em GC as mais utilizadas são a ionização por elétrons (IE) e na ionização química (IQ), sendo que a amostra deve apresentar-se na forma gasosa e na presença de vácuo. Na IE as moléculas neutras na forma gasosa entram na câmara de ionização onde são bombardeadas pelo feixe de elétrons. Ao chocar-se com o elétron a molécula perde uma carga negativa formando o íon molecular representado por M^+ , o íon molecular, por sua vez, gera fragmentos menores. Esta é a técnica mais clássica de ionização (SOARES, 2006; BRMASS)

A IQ ocorre na presença de um plasma (gás com mais de 1% de partículas ionizadas). Quando é empregada a IQ positiva ocorre a formação de um íon positivo, o íon molecular protonado $(M + H)^+$, enquanto que ao empregar IQ negativa ocorre a formação de íon negativo por adição de um elétron ou de uma espécie negativamente carregada. A observação do íon molecular é uma das vantagens da IQ, já que produz menor fragmentação que a IE. Um dos gases mais usados na IQ é o metano (SOARES, 2006).

Entre os diferentes analisadores de massas já desenvolvidos, os mais conhecidos são o quadrupolar, tempo de voo (TOF, do inglês, *Time of Flight*) e o armadilha de íons (IT, do inglês, *Ion Trap*). O analisador de massas quadrupolar consiste em quatro barras cilíndricas, sendo que as barras opostas são conectadas e carregadas eletricamente, um par é carregado positivamente e outro negativamente, em adição um potencial de radiofrequência é aplicado. Para obter o espectro de massa os íons são acelerados entre as barras, os fragmentos carregados com m/z específicas (que são selecionadas pelo analista) chegam ao detector, enquanto que, fragmentos com m/z menor ou maior que o selecionado colidem com as barras e são inativados (SKOOG, 2009).

No analisador de massas TOF uma força eletromagnética uniforme é aplicada aos íons que percorrem um tubo no qual não há campo elétrico nem magnético. A velocidade adquirida pelos íons até chegarem ao detector, que se encontra na outra extremidade do tubo,

é inversamente proporcional à sua m/z , dessa maneira os íons podem ser separados e detectados (MARTINS, 2004).

O analisador de massas IT é um quadrupolo tridimensional que captura os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” graças à aplicação de uma radiofrequência. Variando-se a radiofrequência aplicada, íons de certa razão m/z tornam-se instáveis, de forma que são libertados da “armadilha”. O íon trap permite realizar novas fragmentações dentro da “armadilha” tornando a técnica ainda mais sensível (CHIARADIA, 2008).

Uma maneira de tornar os analisadores de massa mais sensíveis é o acoplamento entre eles, também conhecida como espectrometria de massas sequencial, como por exemplo, triplo quadrupolo, onde o analisador de massa quadrupolar (Q1) é seguido por uma célula de colisão (q2) e por mais um quadrupolo (Q3). Nesta técnica seleciona-se um íon precursor no primeiro quadrupolo, que é fragmentado na célula de colisão, gerando novos íons que chegam ao terceiro quadrupolo, onde ocorre uma nova seleção de íons que serão detectados (CHIARADIA, 2008).

Outro tipo de acoplamento é a combinação de um analisador quadrupolar com um por tempo de voo (Q-TOF) onde Q3 é substituído por um analisador TOF. Este instrumento, ao invés de varrer sequencialmente um intervalo de m/z selecionadas, detecta todos os íons que entram no tubo de voo em um tempo específico, o que só é possível devido à alta velocidade de varredura do TOF (CHIADARIA, 2008).

Depois do analisador de massa, finalmente, um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, gerando o espectro de massas (SOARES, 2006).

Os modos de operação da espectrometria de massas podem influenciar fortemente nos resultados das análises e variam conforme o tipo de analisador utilizado. No modo SCAN, o espectrômetro de massas é programado para analisar todas as m/z do seu espectro de operação. O modo de Monitoramento de Íons Selecionados (SIM, do inglês, *Single Ion Monitoring*) faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados para fora do detector (VÉKEY, 2001).

O modo Armazenagem de íons Selecionados (SIS, do inglês, *Selected Ion Storage*), é equivalente ao SIM, porém recebe essa denominação quando se usa analisador IT. Nesse modo há acúmulo de íons selecionados na armadilha iônica (*trap*), enquanto os demais íons são expulsos através da aplicação de determinadas radio frequências (SASSINE, 2002).

Quando se faz uso da espectrometria de massas sequencial há a possibilidade de realizar o monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês, *Multiple Reactions Monitoring*), onde dois ou mais íons são selecionados pelo modo SIM e são novamente fragmentados. Essa técnica é extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001).

2.12.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para análise de resíduos de agrotóxicos

Em cromatografia gasosa o tipo de coluna mais usada para análise de uva e vinho é a que possui 95% de dimetilpolisiloxano e 5% difenil (PATIL, 2009, AMVRAZI, 2009, WALORCZYK, 2011, CUNHA, 2009, DASGUPTA, 2010) com dimensões de 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,5 µm ou 0,25 µm de espessura do filme. Esta fase estacionária possui baixa polaridade e resiste a altas temperaturas. O gás hélio é sem dúvida o mais usado como fase móvel em vazões que variam de 0,7 a 2,6 mL/min (LI, 2011, PATIL, 2009, AMVRAZI, 2009, WALORCZYK, 2011, CUNHA, 2009, DASGUPTA, 2010, BANERJEE, 2008). O tempo da análise cromatográfica varia de 8 minutos (CUNHA, 2009) a cerca de 50 minutos (PÉREZ, 2008a, AMVRAZI, 2009) com temperaturas do forno que chegam a 310 °C (RODRÍGUEZ, 2009).

O padrão interno mais usado é o trifenilfosfato (triphenylphosphate, TPP), tanto em cromatografia líquida como gasosa (PÉREZ, 2008a, RODRÍGUEZ, 2009, WALORCZYK, 2011, BANERJEE, 2007, CUNHA, 2009). Este composto é principalmente indicado quando o preparo de amostra é feito pelo método QuEChERS, pois apresenta elevada recuperação (>98%) na fase orgânica, além de não interagir com o sorvente PSA utilizado na etapa *clean-up*.

Alguns pesquisadores acoplam duas colunas cromatográficas capilares para promover uma melhor separação dos analitos. Este tipo de cromatografia é chamado de cromatografia gasosa bidimensional (GC x GC). O conjunto de colunas típico para GC x GC é constituído de uma coluna capilar convencional, com até 30 m de comprimento e diâmetro internos de 0,25 a 0,32 mm, acoplada a outra coluna com comprimento menor que 2 m (PEDROSO, 2009).

Quanto às fases estacionárias das colunas utilizadas em GC x GC, comumente a primeira possui características apolares ou pouco polares e a segunda com características polares e mais seletivas. Sendo não-seletiva, a separação na primeira coluna será governada pelas pressões de vapor dos analitos, e cada fração coletada pelo modulador conterá espécies com pontos de ebulição próximos. Como a fase estacionária da segunda coluna é mais seletiva, esses analitos de volatilidade próxima, contidos em cada fração, serão diferentemente retidos, dependendo do tipo e magnitude das interações específicas entre eles e a fase estacionária seletiva. A escolha do conjunto de colunas é dependente dos compostos presentes na amostra analisada e, por isso, o conjunto de colunas ideal deve ser investigado previamente (PEDROSO, 2009).

Banerjee e colaboradores (2008) utilizaram uma coluna capilar apolar RTX-5MS, contendo 5% difenil e 95% dimetilsiloxano, acoplada a uma coluna capilar polar TR-50MS, contendo 50% fenil polisilfenileno-siloxano, para a determinação de 51 agrotóxicos em uva.

Dasgupta e colaboradores (2010) também adaptaram duas colunas cromatográficas (GC x GC) para a determinação de 160 agrotóxicos e 25 contaminantes orgânicos persistentes. Uma das colunas foi a DB-5MS, 95% de dimetilpolisiloxano e 5% difenil, a outra é a V-17 da Varian (50% fenil e 50% dimetilpolisiloxano), mas, nem assim o autor conseguiu que todos os analitos eluíssem separadamente. Porém, o pesticida triazofós e o componente da matriz do vinho etil hexil cinnamate, que possuem em comum fragmentos com m/z 161 e 162 eluem juntos em GC convencional puderam ser separados por GC x GC. Dasgupta cita captana, captafol, diclofluanide como compostos problemáticos, pois podem degradar durante a análise.

Outra técnica utilizada é a *Fast GC*, que busca reduzir o tempo de análise, mesmo que isto signifique diminuição da resolução dos picos, empregando para isso colunas capilares mais curtas, diâmetro internos menores, programação de temperatura mais rápida, aumento da velocidade do gás de arraste ou pressão abaixo da ambiental (Low Pressure - Gas Chromatography, LP-GC) (CUNHA, 2009, PEDROSO, 2009). Cunha e colaboradores (2009), desenvolveram um método para determinação de 27 agrotóxicos em uva, mosto e vinho empregando LP-GC, comparando sua eficiência com a GC convencional. As duas colunas cromatográficas utilizadas possuíam a mesma fase estacionária, 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano, diferindo apenas em suas dimensões: a coluna da GC convencional possuía 30 m de comprimento e 25 μm de diâmetro interno, com fluxo de gás hélio de 1 mL min^{-1} , o tempo total desta análise foi de 24 minutos. Já a coluna da LP-GC possuía 15 m de comprimento e 0,32 μm de diâmetro interno, com fluxo de gás hélio de 2,6 mL min^{-1} , o tempo

total de análise foi de oito minutos. Os autores observaram que a relação sinal ruído, S/N, foi menor em LP-GC, e que não houve diferença na resolução dos picos cromatográficos. A grande vantagem da *Fast GC* é a redução do tempo de análise, que neste caso foi de 24 para 8 minutos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes, solventes e materiais utilizados

Os seguintes reagentes solventes foram utilizados na realização deste estudo:

- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Ácido acético grau HPLC (Vetec, Brasil);
- Tolueno grau HPLC (Mallinckrodt, EUA)
- Sulfato de magnésio anidro (J. T. Baker, Japão);
- Acetato de sódio (Vetec, Brasil);
- Cloreto de sódio (ACS, Brasil);
- Florisil (Anidrol, Brasil);
- Bondesil PSA, com partículas 40 μm (Varian, EUA);
- Bondesil C18, com partículas 40 μm (Varian, EUA);
- Alumina
- Carvão ativo
- Tubos de centrifugação tipo Falcon de 50 mL e 15 mL;
- Vidrarias comuns de laboratório;
- Gás hélio, 99.999% de pureza (Linde, Brasil);
- Padrões sólidos de agrotóxicos (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha)

3.2 Equipamentos

- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas, marca Varian, equipado com:

- cromatógrafo a gás, modelo 3900,
- espectrômetro de massas, tipo *Ion Trap*, modelo 2100T,
- amostrador automático, modelo CP 8400,

- coluna capilar VF-5MS (5% fenil-95% polidimetilsiloxano), 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme,
- sistema de filtração de gás hélio, Restek,
- sistema de aquisição de dados através do software Workstation 6.9;
- Balança Analítica, modelo AY220, marca Shimadzu;
- Concentrador, modelo TE 0195, marca Tecnal
- Centrífuga, modelo 206 BL, marca Fanem
- Centrífuga, modelo 810T, marca Novatécnica
- Compressor de ar odontológico - isento de óleo, marca Schulz, modelo MSV 6
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável, marca Digipet

3.3 Limpeza das vidrarias

A vidraria empregada na execução deste trabalho foi inicialmente lavada com detergente, enxaguada com água corrente e com água destilada, seguido de lavagem com acetonitrila p.a. e secos em estufa de circulação de ar à 100°C, por no mínimo 30 minutos, exceto as vidrarias volumétricas. Os materiais limpos foram então armazenados em armário fechado.

3.4 Escolha dos agrotóxicos a serem avaliados

Atualmente há um grande número de agrotóxicos utilizados para produção de alimentos, só os monitorados pelo PARA passam de 200 e os controlados pela Comunidade Europeia passam de 350, dificultando o desenvolvimento de métodos que abranjam todo o escopo de agrotóxicos existentes. Com este intuito buscou-se desenvolver um método para determinação dos agrotóxicos mais usados para a cultura da uva. Os agrotóxicos selecionados foram os que mais frequentemente foram detectados pelo monitoramento do PARA nos anos de 2008 e 2009. Destes considerou-se os agrotóxicos que eram passíveis de serem determinados por cromatografia gasosa. Os agrotóxicos finalmente selecionados encontram-se listados na tabela 6, resultando em 19 agrotóxicos de diversas classes e grupos químicos

estudados. A estrutura química e o nome oficial dos agrotóxicos estudados encontram-se no ANEXO 1.

Tabela 6: Listagem dos agrotóxicos estudados durante o desenvolvimento do método

Agrotóxicos	Grupo Químico	Classe	Classificação toxicológica	Nº CAS*
Bifentrina	Piretróide	Inseticida, formicida e acaricida	Classe II	82657-04-3
Buprofenzina	Tiadiazinona	Inseticida e acaricida	Classe IV	69327-76-0
Ciprodinil	Anilino pirimidina	Fungicida	Classe III	121552-61-2
Clorotalonil	Isoftalotrila	Fungicida	Classe III	1897-45-6
Endossulfan (alfa, beta e o metabólito sulfato)	Organoclorado	Acaricida e inseticida	Classe I	115-29-7
Epoxiconazol	Triazol	Fungicida	Classe III	135319-73-2
Etofenproxi	Éter difenílico	Inseticida	Classe IV	80844-07-1
Fempropatrina	Piretróide	Inseticida e acaricida	Classe II	39515-41-8
Metalaxil	Acilalaninato	Fungicida	Classe II	70630-17-0
Miclobutanil	Triazol	Fungicida	Classe I	88671-89-0
Permetrina (cis e trans)	Piretróide	Inseticida e formicida	Classe III	52645-53-1
Procimidona	Dicarboximida	Fungicida	Classe IV	32809-16-8
Tebuconazol	Triazol	Fungicida	Classe IV	107534-96-3
Tetradifona	Clorodifenilsulfona	Acaricida	Classe IV	116-29-0
Tiabendazol	Benzimidazol	Fungicida	Classe IV	148-79-8
Triadimefon	Triazol	Fungicida	Classe III	43121-43-3
Trifloxistrobina	Estrobilurina	Fungicida	Classe II	141517-21-7
Cafeína**				58-08-2
Quintozeno***	Cloroaromático	Fungicida	Classe III	82-68-8

* CAS: *Chemical Abstracts Service* **padrão interno, *** padrão de controle

Fonte: ANVISA

3.5 Preparo das soluções analíticas

De cada pesticida escolhido para a realização deste estudo, preparou-se uma solução estoque com concentração de aproximadamente 1000 mg L⁻¹. Essas soluções foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas a -18 °C. Foi efetuada a correção das concentrações pela pureza do padrão e pela massa exata da pesagem. A solução Mistura-1 foi

preparada através da diluição das soluções estoques, de modo a conter a mistura dos agrotóxicos na concentração de 40 mg L⁻¹. O solvente utilizado foi tolueno por conferir maior estabilidade na armazenagem dos padrões (MAŠTOVSKÁ, 2004). Esta solução foi usada durante todo o desenvolvimento do método, sendo que para sua conservação foi armazenada em frasco âmbar e estocada a -18 °C. A tabela 7 apresenta a concentração exata de cada solução estoque (corrigida como mencionado acima), bem como o volume utilizado para preparação da solução Mistura-1, para um volume de 20 mL. A solução Mistura-2 foi preparada partindo da solução Mistura-1, diluindo-se 625 µL desta solução a 5 mL, resultando na concentração de 5 mg L⁻¹.

Tabela 7: Concentração de cada padrão na solução estoque e volume utilizado para preparo da solução Mistura-1

Agrotóxicos	Conc. na solução estoque (mg L⁻¹)	Volume utilizado (µL)
Bifentrina	1002	798
Buprofenzina	1000	800
Cyprodinil	1000	800
Clorotalonil	996	803
Endossulfan alfa	1003	798
Endossulfan beta	1028	778
Endossulfan sulfato	1004	797
Epoconazol	1000	800
Etofemprox	1004	797
Fempropatrina	1000	800
Metalaxil	1009	793
Miclobutanil	996	803
Permetrina cis	960	833
Permetrina trans	970	825
Procimidona	1007	794
Tebuconazol	1021	783
Tetradifona	1016	787
Tiabendazol	1000	800
Triadimefon	1024	781
Triflaxistrabina	1000	800
Cafeína	1030	-
Quintozeno	1467	-

Devido ao fato da resposta dos analitos serem diferenciadas quando se encontram presentes na matriz e a fim de prevenir erros na quantificação e identificação, utilizaram-se “brancos” das matrizes selecionadas para preparação da curva analítica. As curvas analíticas

foram preparadas através da solução Mistura-1 e Mistura-2 no solvente e na matriz, com concentrações que variaram de 0,02 a 2,0 mg L⁻¹.

3.6 Seleção do padrão interno

Para corrigir pequenas diferenças que podem acontecer durante a injeção, utilizou-se o método de padronização interna, que consiste na adição de um composto chamado padrão interno às soluções a serem analisadas no sistema cromatográfico. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração (variada) do analito de interesse. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção (t_R) próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra (RIBANI, 2004).

Cafeína e trifenílfosfato foram testados como padrões internos. Quintozeno foi utilizado como padrão de controle sendo adicionado nas amostras e nas curvas analíticas antes da extração para controlar possíveis problemas durante a extração. Padrões internos e de controle foram utilizados na concentração de 1 mg L⁻¹ na matriz.

3.7 Otimização das condições cromatográficas

Inicialmente cada padrão de pesticida foi avaliado individualmente no sistema cromatográfico, seguindo a programação de temperatura descrita na tabela 8 e vazão de gás de arraste de 1 mL min⁻¹. Esta avaliação teve como objetivo identificar o tempo de retenção (t_R) e o padrão de fragmentação de cada composto. Com base nestas informações, uma solução com todos os padrões foi preparada e novamente analisada nas condições cromatográficas mencionadas. A programação de temperatura foi então otimizada.

3.8 Estudo do procedimento de extração

Amostras de uva para serem utilizadas como “branco” da variedade Isabel, foram obtidas no Colégio Agrícola de Frederico Westphalen, onde o único tratamento fitossanitário que recebiam era a aplicação da Calda Bordalesa ou Verderame, cujo o princípio ativo é o sulfato de cobre.

Primeiramente as amostras de uva foram lavadas em água corrente e processadas em liquidificador com casca, polpa e semente, após foram congeladas e armazenadas até o momento da análise. Para a extração dos resíduos de agrotóxicos os métodos QuEChERS (ANASTASSIADES, 2003) e QuEChERS acetato (LEHOTAY, 2005) foram estudados. Outras combinações e materiais sorventes também foram avaliados, como demonstra a figura 2. Cada teste de extração foi combinado com um teste de limpeza: A1, B1, A2, B2 e assim por diante, totalizando 18 experimentos testados. As quantidades de sorventes utilizados foram baseados em estudos já realizados e citados no item 10.2.1.

Extração							
Teste	Amostra (g)	Acetonitrila (mL)	ACN 1% Ác Acético (mL)	MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	CH ₃ COONa (g)	
A	10	10	0	4	1		
B	10	0	10	4		1	
Limpeza							
Teste	Sobrenadante (mL)	MgSO ₄ (mg)	PSA (mg)	C18 (mg)	Florisil (mg)	Carvão ativo (mg)	Alumina (mg)
1	2	300	50	0	0	0	0
2	2	300	50	0	0	20	0
3	2	300	50	200	0	0	0
4	2	300	0	200	0	0	0
5	2	300	0	200	0	20	0
6	2	300	0	0	300	0	0
7	2	300	0	0	400	0	0
8	2	300	40	0	200	0	0
9	2	300	0	0	0	0	200

Figura 2: Quadro representativo dos testes de extração e limpeza do extrato

Para o primeiro teste foram pesados 10 g (+/- 0,05 g) de amostra em tubo tipo Falcon com capacidade de 50 mL, a esta foram adicionados o MIX para a fortificação e quintozeno (padrão de controle), em seguida, uma leve agitação foi realizada para a homogeneização do sistema. Para a extração, 10 mL de acetonitrila foram adicionados e, novamente, uma leve agitação foi realizada. Após 4 g de sulfato de magnésio e 1 g de cloreto de sódio foram adicionados, essa mistura foi agitada manualmente por 1 minuto e centrifugada a 3.000 rpm por 20 minutos. Na figura 3 observa-se a separação das fases orgânica (acetonitrila), dos constituintes sólidos da uva, da água presente na uva e dos sais adicionados para realizar a extração.

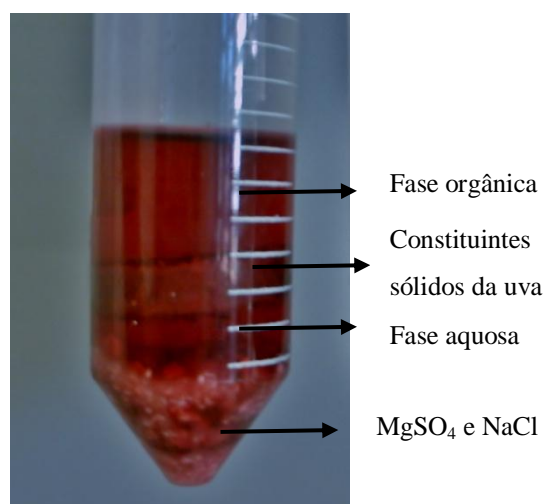


Figura 3: Etapa de extração do teste A1.

Para a etapa de limpeza, 2 mL do sobrenadante foram pipetados e adicionados a um tubo tipo Falcon com capacidade de 15 mL que continha 300 mg de sulfato de magnésio e 50 mg de PSA. O tubo foi manualmente agitado por 1 minuto e centrifugado a 3.000 rpm por 30 minutos (figura 4). 1 mL do sobrenadante foi coletado e o padrão interno foi adicionado. Os demais testes foram realizados da mesma maneira, apenas alterando-se os materiais utilizados. Todos os testes foram realizados em triplicata, em três níveis de fortificação.

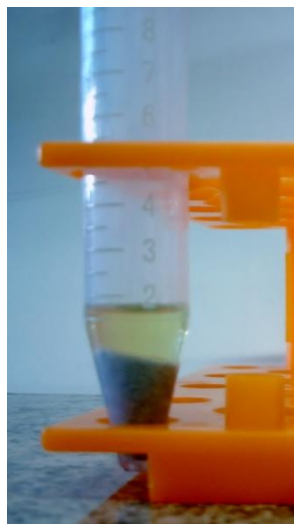


Figura 4: Etapa de limpeza do teste A1.

Após o método de extração e limpeza ser definido, uma etapa de evaporação do solvente e concentração dos analitos foi incluída, na tentativa de alcançar níveis mais baixos de LOD e LOQ.

3.8.1 Planejamento fatorial

Planejamento fatorial foi realizado a fim de confirmar o teste que permitisse extração mais adequada dos analitos. Primeiramente um planejamento fatorial 2^3 foi realizado comparando experimentos realizados com PSA e C18. Após foi realizado uma comparação entre os efeitos de PSA e Florisil conforme descrito por Brums (2010).

3.9 Validação

A validação da metodologia foi realizada com o método de superposição de matriz (“*matrix-matched*”), que consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância. Este método é usado

para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse (RIBANI, 2004).

3.9.1 Linearidade e intervalo linear

A linearidade das curvas analíticas foi verificada a partir das soluções preparadas em triplicata na matriz da amostra. Através do método matemático de regressão linear, a equação da reta pôde ser montada e o do coeficiente de determinação (r^2) calculado.

3.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Após a determinação da linearidade prosseguiu-se com a determinação do limite de detecção do instrumento (LODi, do inglês, *Limite of Detection instrumetn*) e do método (LODm, do inglês, *Limit of Detection method*), assim como o limite de quantificação do instrumento (LOQi, do inglês, *Limit of Detection instrument*) e do método (LOQm, do inglês, *Limit of Quantification method*). O LODi corresponde à menor concentração do analito que produz sinal 3 vezes o ruído da linha de base, enquanto que LOQi corresponde à menor concentração do analito que produz sinal 10 vezes o ruído da linha de base (ORSO, 2011).

Dividindo-se o valor de LODi pelo fator de concentração (FC) do método de extração, obtém-se o LODm, em mg kg^{-1} . Da mesma maneira, obtém-se o LOQm dividindo-se o valor de LOQi pelo fator de concentração do método de extração. Na prática considera-se o valor verdadeiro do LOQm como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentar recuperações entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20% (ORSO, 2011). O fator de concentração é calculado pela equação 1:

$$FC = V_i/V_f \quad (1)$$

Onde:

V_i = Volume inicial do extrato da amostra

V_f = Volume final do extrato da amostra

3.9.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada segundo a repetibilidade e precisão intermediária. Foram analisadas, em triplicata e no mesmo dia, amostras fortificadas em três concentrações diferentes. Para avaliação da precisão intermediária do método, utilizaram-se dias diferentes para preparo das amostras fortificadas. Os resultados, em termos porcentagem, para estes dois níveis de precisão são expressos como desvio padrão relativo (DRP) por meio da equação 2:

$$\text{DRP (\%)} = \frac{\text{DP}}{\text{CMR}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

DP: estimativa do desvio padrão absoluto

CMR: concentração média das replicatas

3.9.4 Exatidão

A exatidão, expressa através de ensaios de recuperação, foi verificada em três níveis concentração, com 3 réplicas cada. O cálculo foi realizado através da razão da concentração média determinada experimentalmente (C_1) e a concentração teórica correspondente (C_2), como segue na equação 3:

$$\text{R (\%)} = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad (3)$$

3.10 Avaliação do efeito matriz

Para a avaliação do efeito matriz realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas obtidas empregando-se soluções analíticas em acetonitrila e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz. O cálculo foi realizado através da equação 4:

$$EF (\%) = \frac{X1-X2}{X2} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

X1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada padrão de agrotóxico preparadas na matriz (uva);

X2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada padrão de agrotóxico preparadas no solvente (acetonitrila).

3.11 Análise de amostras reais

Após o método ser validado, amostras reais adquiridas com produtores e analisadas em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do sistema cromatográfico GC-MS para a determinação dos analitos

Os analitos foram analisados separadamente no sistema cromatográfico, no modo *full-scan*, com uma programação de temperatura pré-estabelecida pelo laboratório (Tabela 9), na concentração de 10 mg L^{-1} , para confirmar os espectros de massas e os tempos de retenção. Os seguintes analitos não foram detectados ou apresentavam picos assimétricos e alargados, por isso, foram excluídos do método: azoxistrobina, boscalida, carbaril, cipermetrina, ciproconazol, deltametrina, dimetoato, fenazaquim, fosmete, iprodiona, iprovalicarbe e metamil.

Com a definição dos analitos a serem determinados, buscou-se, então, a redução do tempo total da análise mantendo a resolução entre os picos dos analitos em estudo. Uma solução contendo todos os analitos foi injetada, com a programação de temperatura pré-estabelecida pelo laboratório, observando-se que a maioria dos compostos eluíam entre 12 e 20 minutos e que muitos coeluíam.

Com o objetivo de separar os compostos que coeluíam as taxas de aquecimento das etapas 2 e 3 foram diminuídas, chegando a $25 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ na segunda etapa e $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ na segunda etapa. Taxas de aquecimento menores que estas foram testadas, porém, não resultaram em melhoria na separação dos compostos. Outra observação foi que os últimos compostos a eluírem, permetrina cis e trans e etofemproxi, apresentavam picos assimétricos, por isso uma etapa com taxa de aquecimento de $30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ foi incluída no final da análise. A programação de temperatura otimizada é apresentada na tabela 9.

A temperatura do injetor foi de $300 \text{ }^\circ\text{C}$. O volume de injeção que inicialmente foi de $1 \text{ } \mu\text{L}$ passou a $2 \text{ } \mu\text{L}$ no modo *splitless*, para que houvesse picos maiores e, conseqüentemente, mais fáceis de serem identificados, a vazão do gás de arraste foi de 1 mL min^{-1} . As temperaturas da linha de transferência, do *manifold* e do *ion trap* foram, respectivamente, $290 \text{ }^\circ\text{C}$, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e $240 \text{ }^\circ\text{C}$.

Com a programação de temperatura definida, procedeu-se a elaboração do método no modo Armazenamento de Íons Seleccionados (SIS, do inglês, *Selected Ion Storage*) onde o íon com massa/carga (m/z) que apresentasse maior intensidade foi escolhida como quantificador e

o segundo como confirmador. A tabela 10 apresenta a ordem de eluição dos compostos, o tempo de retenção e os íons de quantificação e confirmação.

Tabela 8: Programação inicial de temperatura

Etapa	Temperatura (°C)	Razão de aquecimento (°C/min)	Tempo de espera (min)	Total (min)
1	80		1	1
2	160	25	0	4,2
3	260	8	18,30	35,00

Tabela 9: Programação de temperatura otimizada

Etapa	Temperatura (°C)	Razão de aquecimento (°C/min)	Tempo de espera (min)	Total (min)
1	80		1	1
2	200	25	0	5,8
3	230	3	0	15,8
4	260	15	0	17,8
5	280	30	6,5	25,0

Tabela 10: Tempos de retenção e razões massa/carga dos analitos determinados

	Analito	t_R (min)	Íon de quantificação (m/z)	Íon de confirmação (m/z)
PS	Quintozeno	8,485	295	265
1	Clorotalonil	8,884	266	268
PI	Cafeína	9,400	194	109
2	Metalaxil	10,003	206	249
3	Triadimefom	11,206	208	57; 181
4	Cyprodinil	11,984	224	210
5	Procimidona	12,592	96	283
6	Endossulfan alfa	13,636	339	207

7	Miclobutanil	14,508	179	181
8	Buprofenzina	14,572	175	105
9	Endossulfan beta	15,917	195	339
10	Trifloxistrobina	16,935	131	206
11	Endossulfan sulfato	17,156	387	272
12	Tebuconazol	17,634	250	125
13	Epoconazol	18,002	192	138
14	Bifentrina	18,380	181	166
15	Fempropatrina	18,707	181	265
16	Tetradifona	19,002	356	159
17	Permetrina cis	20,557	183	165
18	Permetrina trans	20,739	183	165
19	Etofemproxi	22,511	163	135

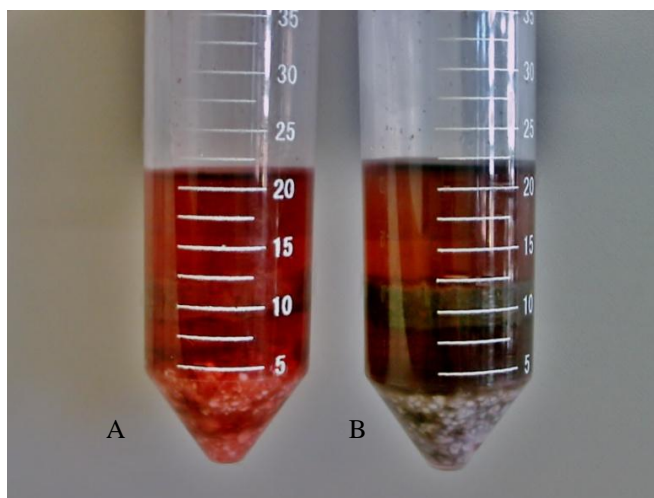
Sabe-se que quanto menores forem os íons m/z , maior a probabilidade de que haja interferentes de baixo peso molecular provenientes da amostra. Neste estudo deu-se preferência para valores de m/z maiores que 100, porém, para dois compostos não foi possível, procimidona e triadimefom. O íon mais intenso para a procimidona foi de 96 e o segundo 283. Já para o triadimefom o íon mais intenso foi de 57, muito maior que o segundo, 208. Dessa maneira para o composto triadimefom, 208 foi escolhida como de quantificação e, para qualificação foram escolhidos outros dois, 57 e 181. Dasgupta e colaboradores (2010) e Soleas e colaboradores (2000) também utilizaram íons 208 na determinação de triadimefom e íon 96 para a determinação de procimidona por cromatografia gasosa.

4.1.1 Seleção do padrão interno

Primeiramente o trifenilfosfato foi utilizado como padrão interno, porém, este eluía junto com epoxiconazol, não sendo possível a separação destes compostos mesmo com a otimização da programação de temperatura. Cafeína foi então escolhida e passou então a ser utilizada como padrão interno.

4.2 Preparo de amostra

A figura 5 mostra o extrato já centrifugado e a separação das fases (como já descrito no item 3.8) da etapa de extração do preparo de amostra para o teste que utiliza acetoneitrila, sem adição de ácido acético (A) e para o teste que utiliza acetoneitrila acidificada a 1% com ácido acético. Observa-se que a coloração de “B” é mais escura, provavelmente devido à mudança de pH, já que o pH da uva da variedade Isabel é 3,5 (SATO, 2008) e o tamponamento é em pH 4,8. As antocianinas presentes na uva e solúveis na fase aquosa são as responsáveis pela coloração avermelhada, perdendo essa cor com o aumento do pH, chegando a cor azul em pH entre 6,5 e 9 (MARÇO, 2008). Após a etapa de purificação do extrato, praticamente não se observa diferenças visuais entre A e B.



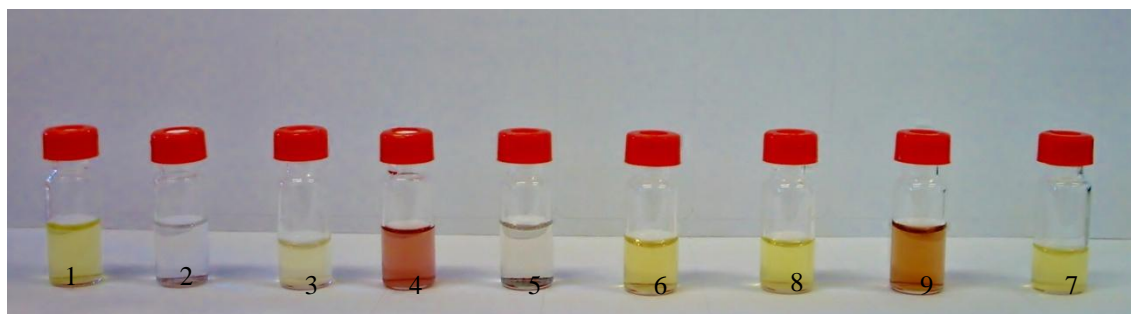
A – Sem tampão acetato, B – com tampão acetato

Figura 5: Etapa de extração do preparo da amostra com e sem utilização de tampão acetato

Na figura 6, que exhibe os extratos dos testes realizados, observa-se a diferença de coloração entre eles. Os testes que utilizaram carvão ativado (2 e 5) apresentam coloração mais clara, como já era esperado devido à tendência de que este sorvente tem na remoção de cor e de compostos orgânicos (MUSSATO, 2004), enquanto que os teste com C18 (4) e Alumina (9) apresentam coloração mais escura. Os demais apresentam coloração semelhante.

Por hora, pode-se inferir que carvão ativado é o que apresenta melhor limpeza de extrato, devido à remoção da cor e de outros possíveis interferentes e que C18 e Alumina, ao contrário, são os que tem mais dificuldade na limpeza de extrato.

A escolha do melhor teste para ser usado para o preparo da amostra foi realizado comparando os resultados das recuperações em três níveis diferentes de fortificação: 0,05; 0,5 e 2,0 mg L⁻¹. O teste que apresentou melhores índices de recuperação, entre 70 e 120%, com RSD menor que 20% para o maior número de analitos, foi então escolhido para dar sequência ao desenvolvimento do método.



1-PSA, 2-PSA+Carvão ativo, 3-PSA+ C18, 4-C18, 5-C18+Carvão ativo, 6- Florisil 300 mg, 8- PSA+Florisil, 9- Alumina, 7- Florisil 400 mg

Figura 6: Extratos purificados com diferentes materiais sorventes

Os resultados de recuperação encontradas no primeiro nível de fortificação, 0,05 mg L⁻¹ foram menores que nos outros dois níveis, onde observou-se que muitos analitos não foram detectados, ou com recuperação fora da faixa de 70 e 120%. Entre os analitos que apresentaram resultados adequados, independente do teste realizado, no primeiro nível de fortificação encontram-se procimidona, bupropenzina, ciprodinil, permetrina cis e permetrina trans. Entre os agrotóxicos com maior dificuldade de determinação, independente do teste realizado, pode-se citar: clorotalonil, triadimefom, miclobutanil, tebuconazol e epoxiconazol.

No nível mais alto de fortificação, de 2,0 mg L⁻¹ praticamente todos os analitos ficaram com recuperações entre 95 e 105% em todos os testes, com exceção da fempropatrina no teste A9 que obteve recuperação de 87%, do tebuconazol e do epoxiconazol que não foram recuperados no teste B4. Na concentração 0,5 mg L⁻¹ os valores variaram um pouco mais.

Para a maioria dos testes, o uso de tamponamento ácido gerou resultados relativamente melhores. Isso de certa maneira já era esperado, uma vez que o tamponamento ácido fornece maior estabilidade e recuperação para a maioria dos analitos estudados, com exceção do tiabendazol que, a pH baixo, encontra-se protonado na fase aquosa, ocasionando sua perda durante a etapa de partição (ANASTASSIADES, 2003). Maiores detalhes sobre os testes realizados e sobre as recuperações obtidas podem ser vistos na figura 2 e no anexo 2, respectivamente.

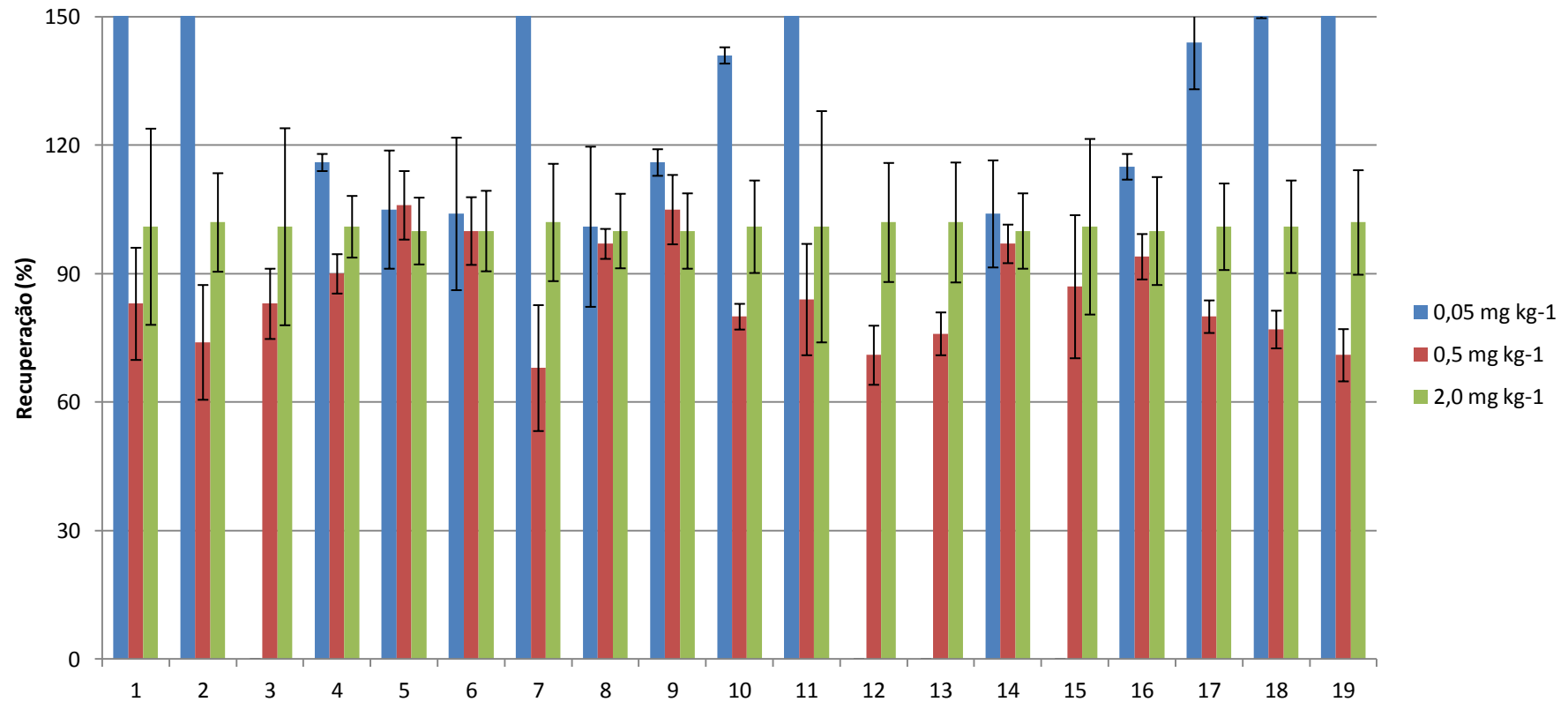
4.2.1 Avaliando os testes de preparo da amostra

4.2.1.1 Testes com carvão ativado

Primeiramente os testes A1 e A2, B1 e B2 foram comparados, a diferença entre eles é a adição de carvão ativado na etapa de purificação do extrato (A2 e B2). Foi observado que os testes com carvão ativado apresentaram maiores problemas nos dois primeiros níveis de fortificação e, em $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, muitos analitos não foram detectados, como pode ser visto através dos gráficos apresentados nas figuras 7, 8, 9 e 10. Isto se justifica pelo fato de carvão ativado ter a tendência de adsorver compostos orgânicos, principalmente os que apresentam estrutura planar, como tiabendazol, clorotalonil e ciprodinil (ANASTASSIADES, 2003).

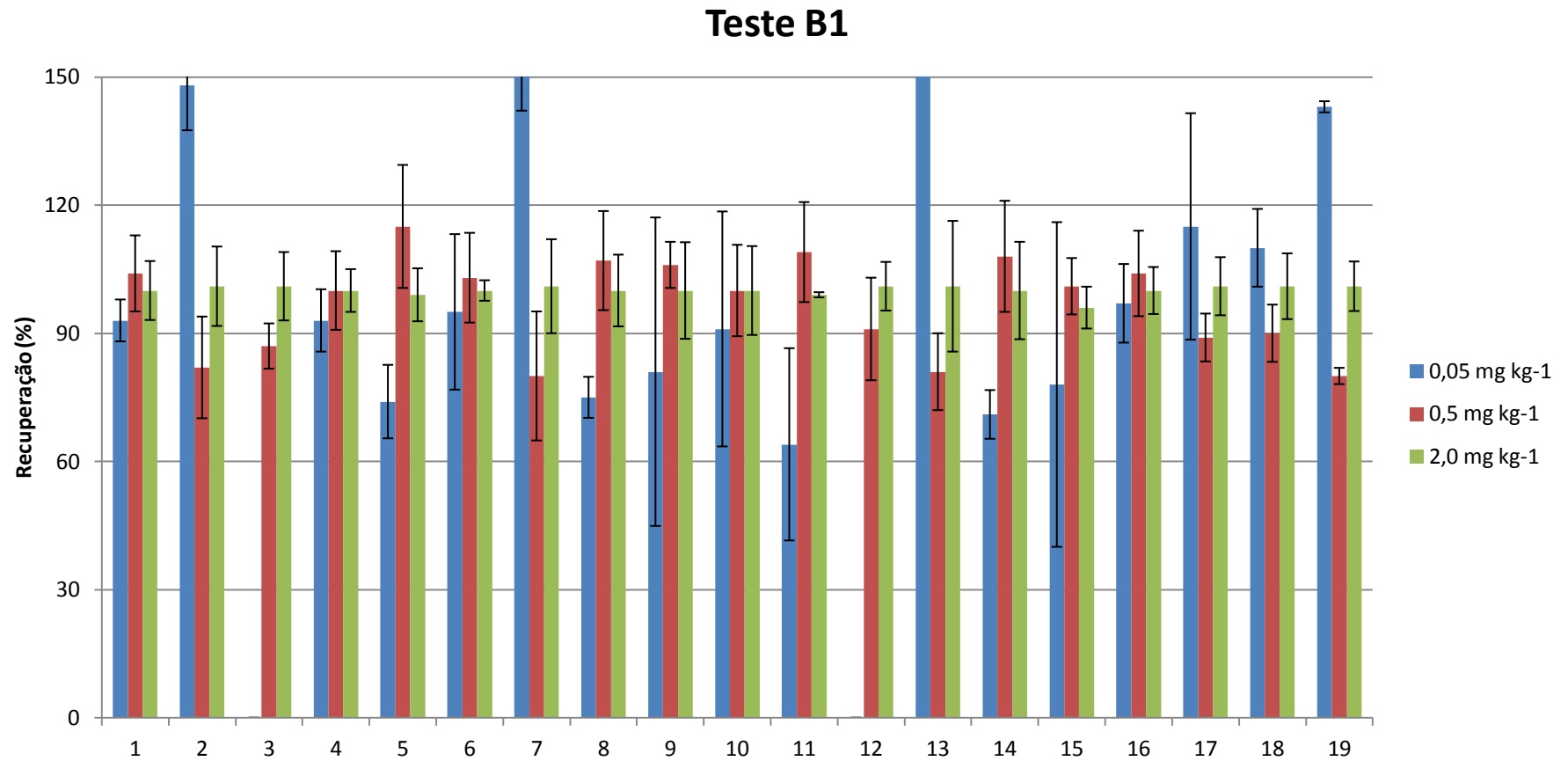
Ao comparar os testes A4 e A5, B4 e B5, onde a diferença também é o uso de carvão ativado na etapa de purificação do extrato (A5 e B5), observou-se que o teste em que não foi adicionado carvão, apresentou recuperações piores que os testes que utilizaram apenas C18 para purificação (A4 e B4). Isso provavelmente ocorreu devido ao fato de C18 ser mais útil na purificação de extratos de matrizes gordurosas. A5 e B5 tiveram cinco agrotóxicos não recuperados no primeiro nível de concentração, mas A5 teve desempenho ligeiramente melhor que B5. Os gráficos da figura 11, 12, 13 e 14 auxiliam na comparação destes testes, onde observa-se claramente que vários agrotóxicos não foram detectados no menos nível de fortificação, principalmente no teste A4 e B4.

Teste A1



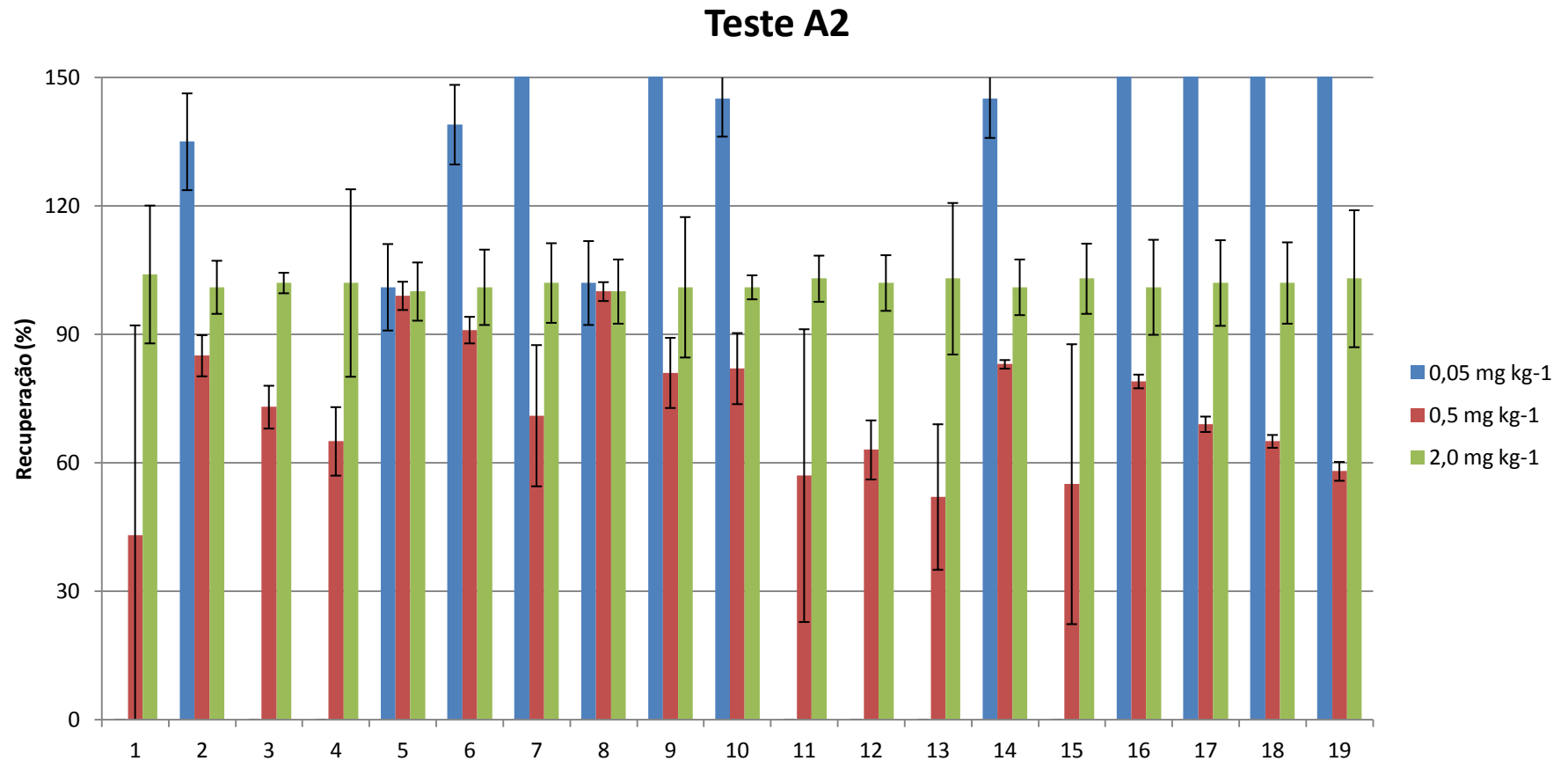
1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 7: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A1



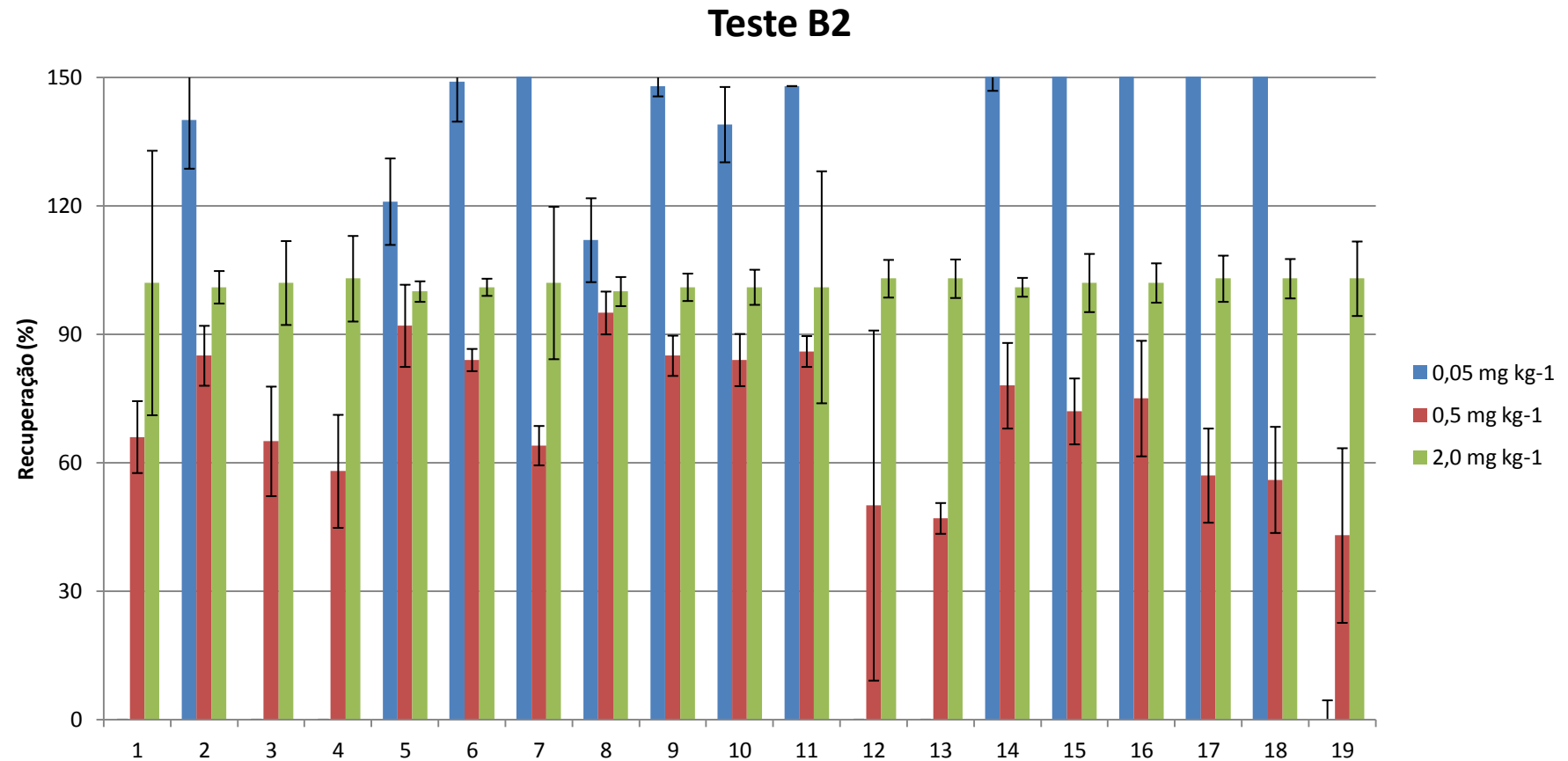
1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 8: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B1



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epoxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

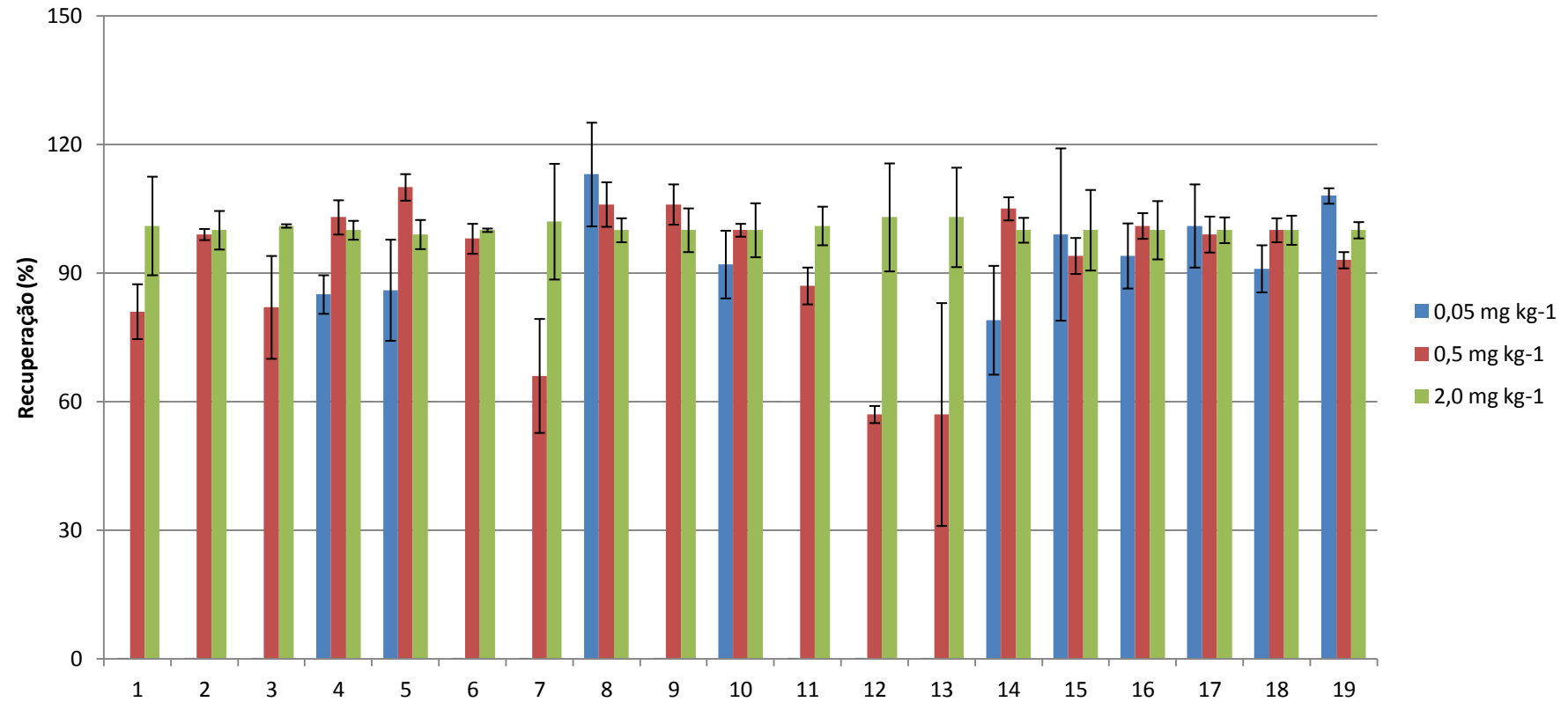
Figura 9: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A2



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

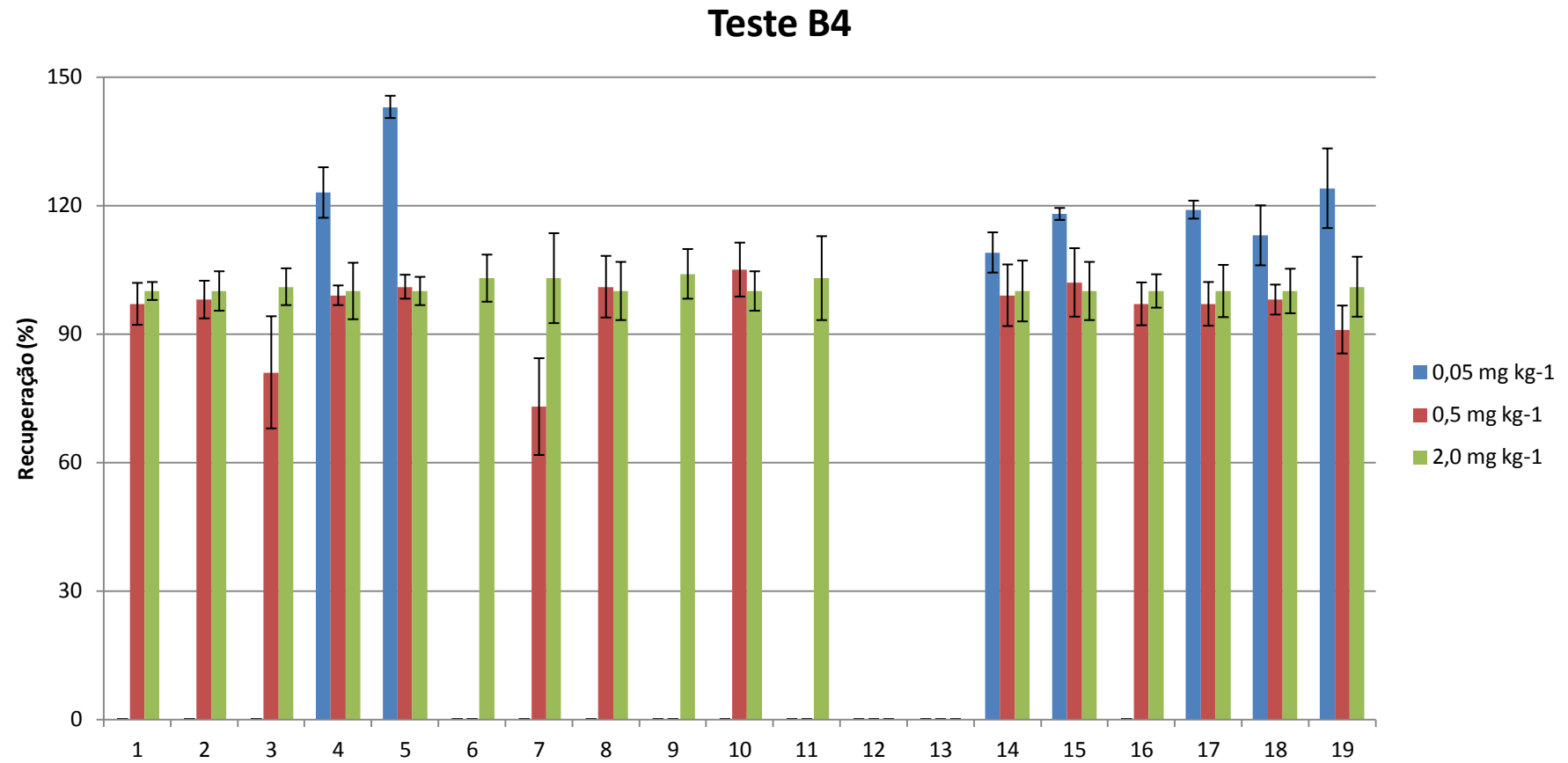
Figura 10: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B2

Teste A4



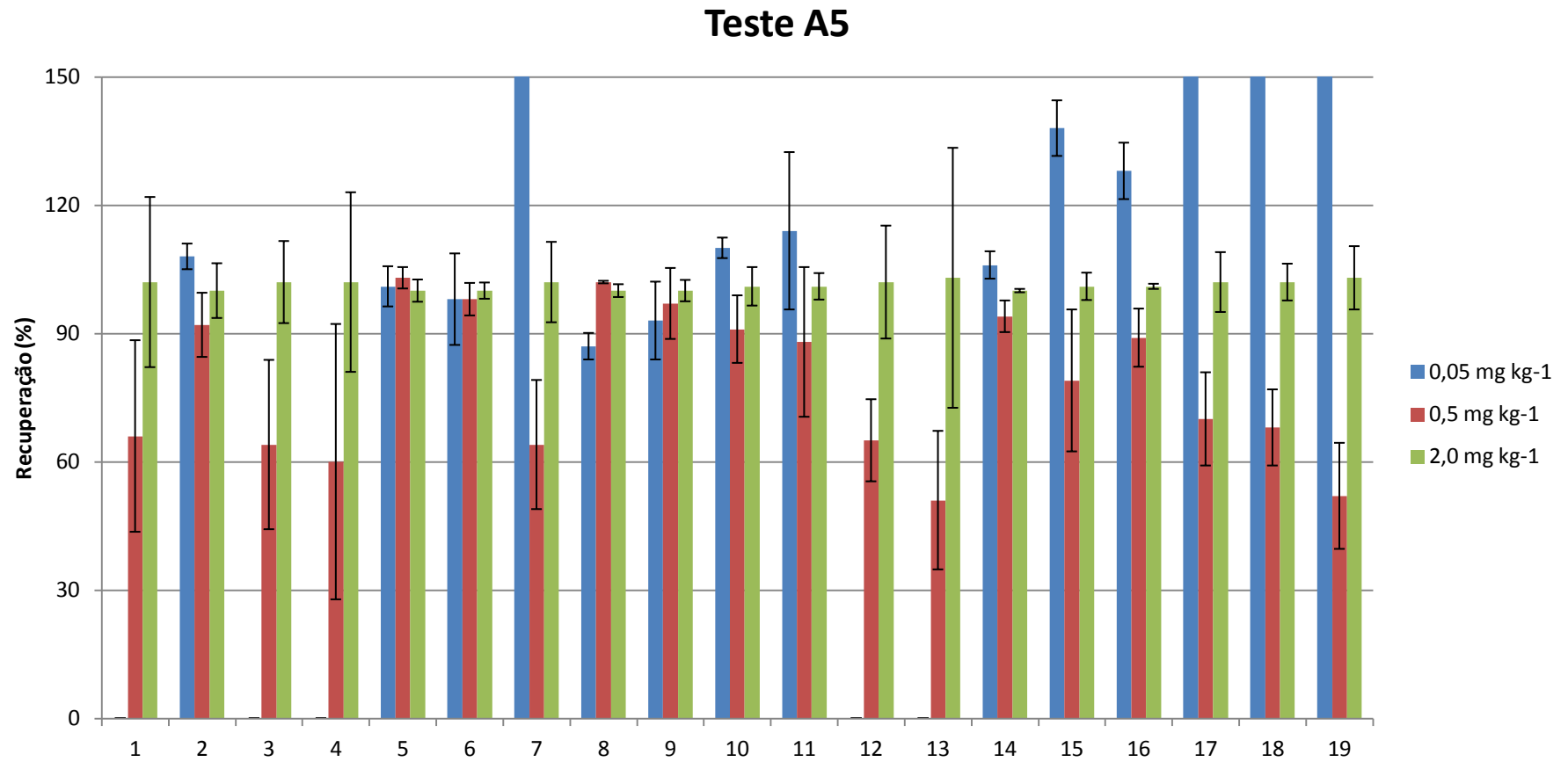
1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 11: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A4



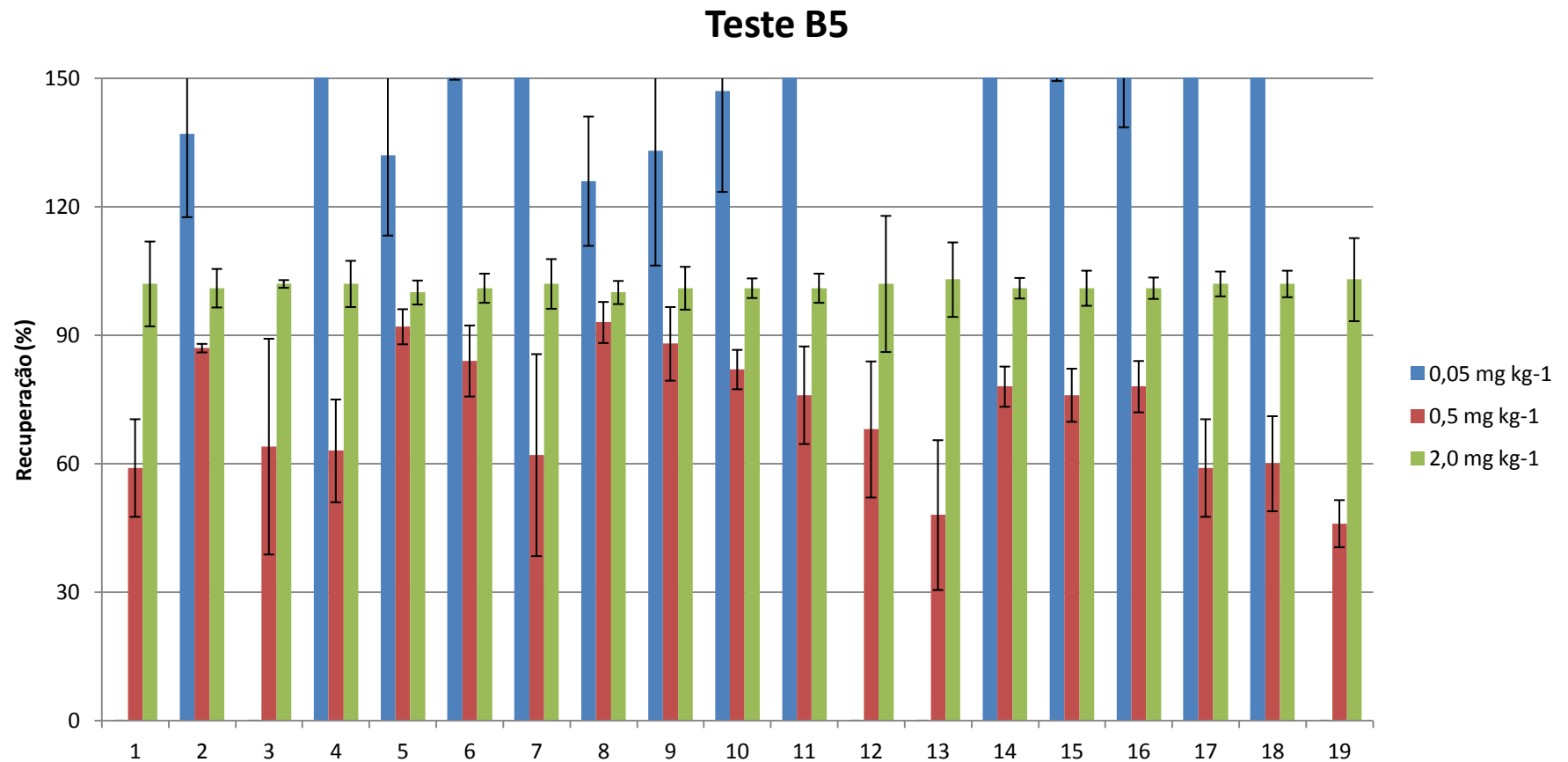
1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 12: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B4



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epoxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 13: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A5



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 14: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B5

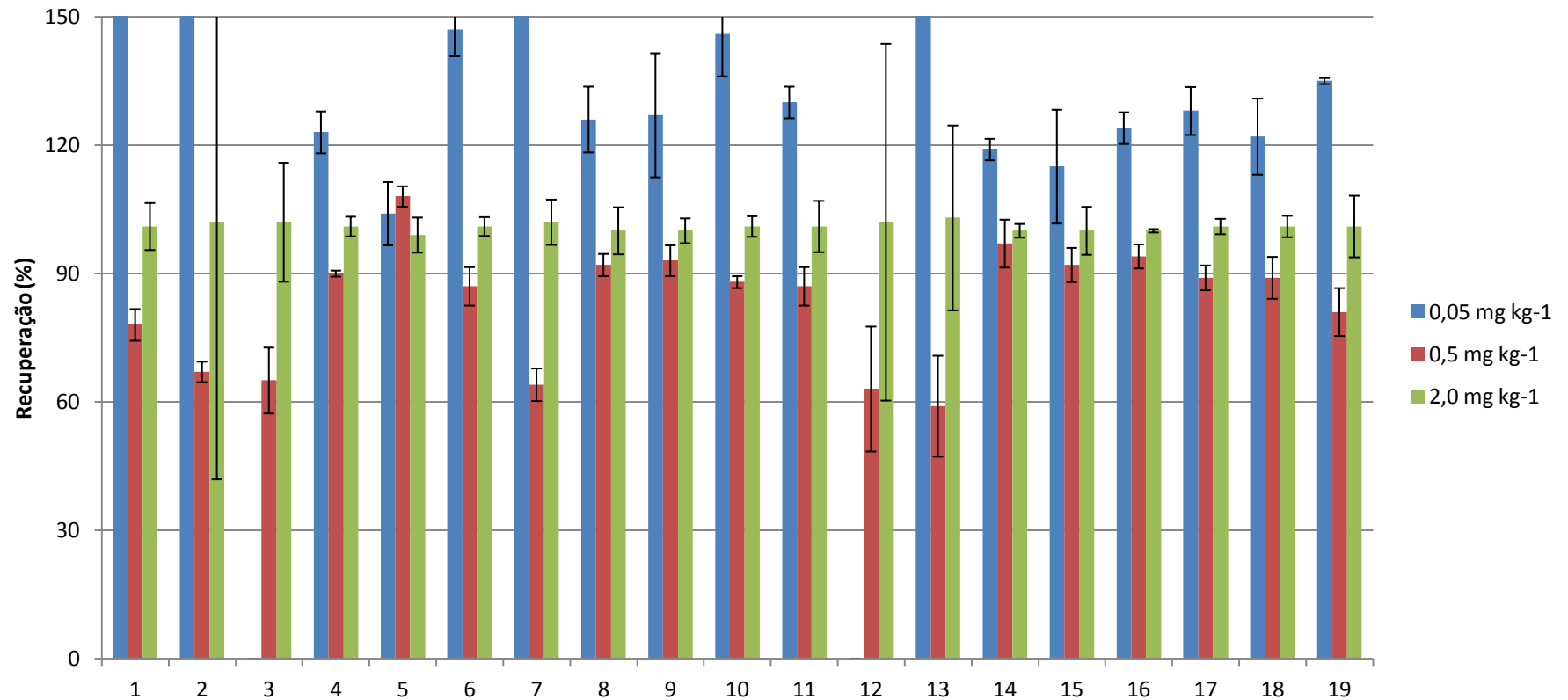
4.2.1.2 Testes referentes à quantidade de Florisil utilizada

Os testes A6, A7, B6 e B7 foram realizados para avaliar qual a melhor quantidade de Florisil a ser utilizada, em A6 e B7 foram utilizadas 300 mg e em A7 e B7 400 mg. Em A7 quatro analitos não foram recuperados, clorotalonil, triadimefom, endossulfan sulfato e fempropatrina (no primeiro nível de fortificação), enquanto que, para A6 triadimefom e tebuconazol não foram detectados. Porém, A6 apresentou maior número de agrotóxicos fora dos limites de recuperação, 70 e 120%. Gráficos que ilustram as recuperações dos agrotóxicos são apresentados nas figuras 15, 16, 17 e 18. Clorotalonil é uma analito facilmente degradável e a pH elevado, converte-se a 4-hidroxi-2,5,6-tricloroisoftalonitrila (PRESTES, 2009), o que pode justificar a não recuperação para este analito no teste A7, em que não foi usado o tamponamento ácido.

Em B7 apenas para triadimefom não foi detectado, no primeiro nível de fortificação, enquanto que para B6 outros quatro compostos não foram detectados. Concluiu-se que, tanto para “A” quanto para “B”, a utilização de maior quantidade de Florisil, 400 mg, resultou em melhores de recuperações. Quanto à quantidade de Florisil utilizada, resultados parecidos foram encontrados por Miao e colaboradores (2013) na determinação de resíduos de pesticidas em sementes de lótus. Estes autores relataram que não houve diferença entre as quantidades de 300 e 400 mg de Florisil (para cada 1,5 mL de sobrenadante) e que estas quantidades proporcionam resultados melhores que as outras testadas: 100 mg, 200 mg e 500 mg. Comparado A7 e B7, verificou-se que B7 foi o que apresentou melhor desempenho.

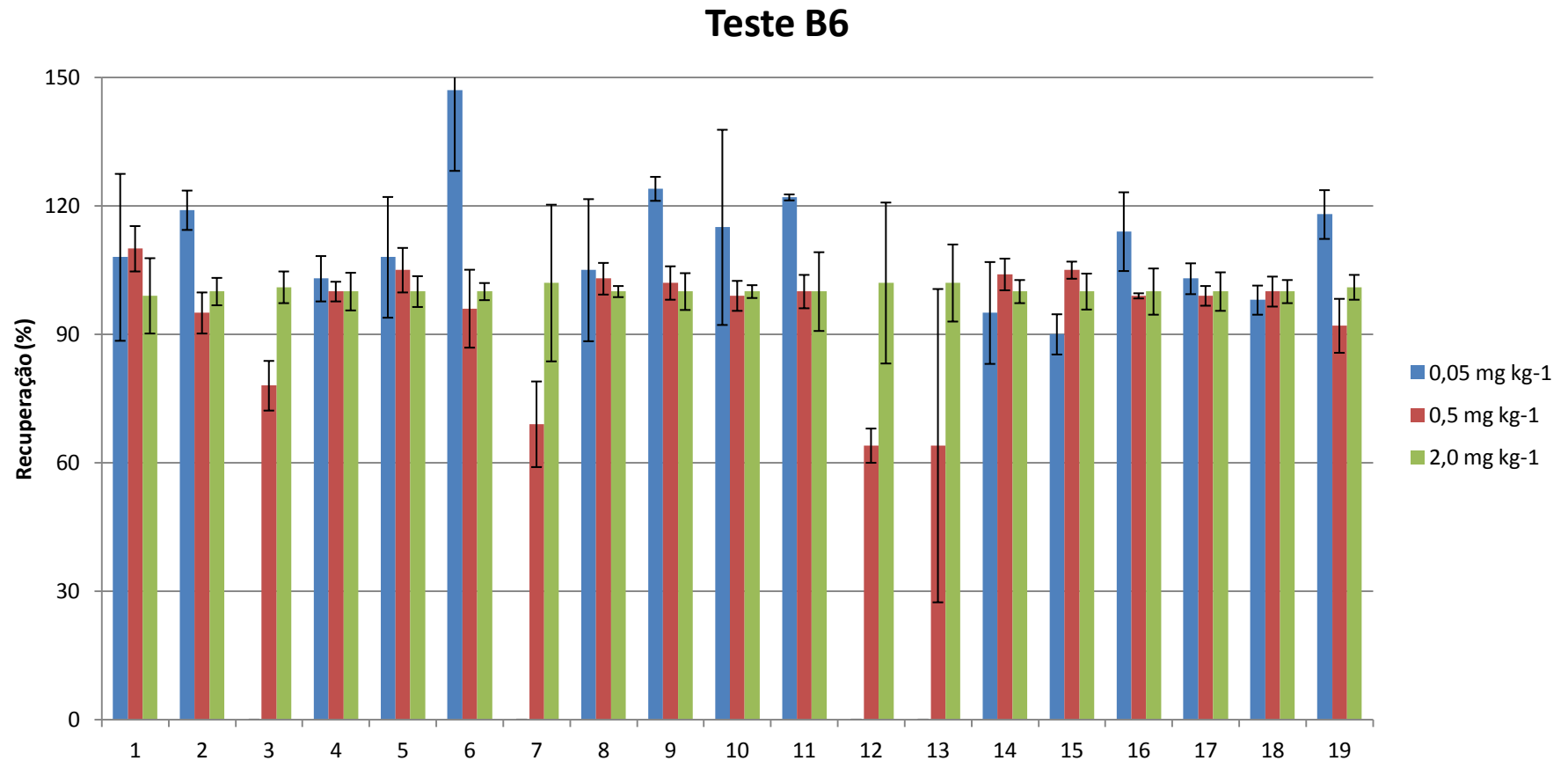
Maiores quantidades de florisil não foram testadas uma vez que com o extrato fica adsorvido no material sorvente, ocasionando menores quantidades de sobrenadante que podem ser coletadas.

Teste A6



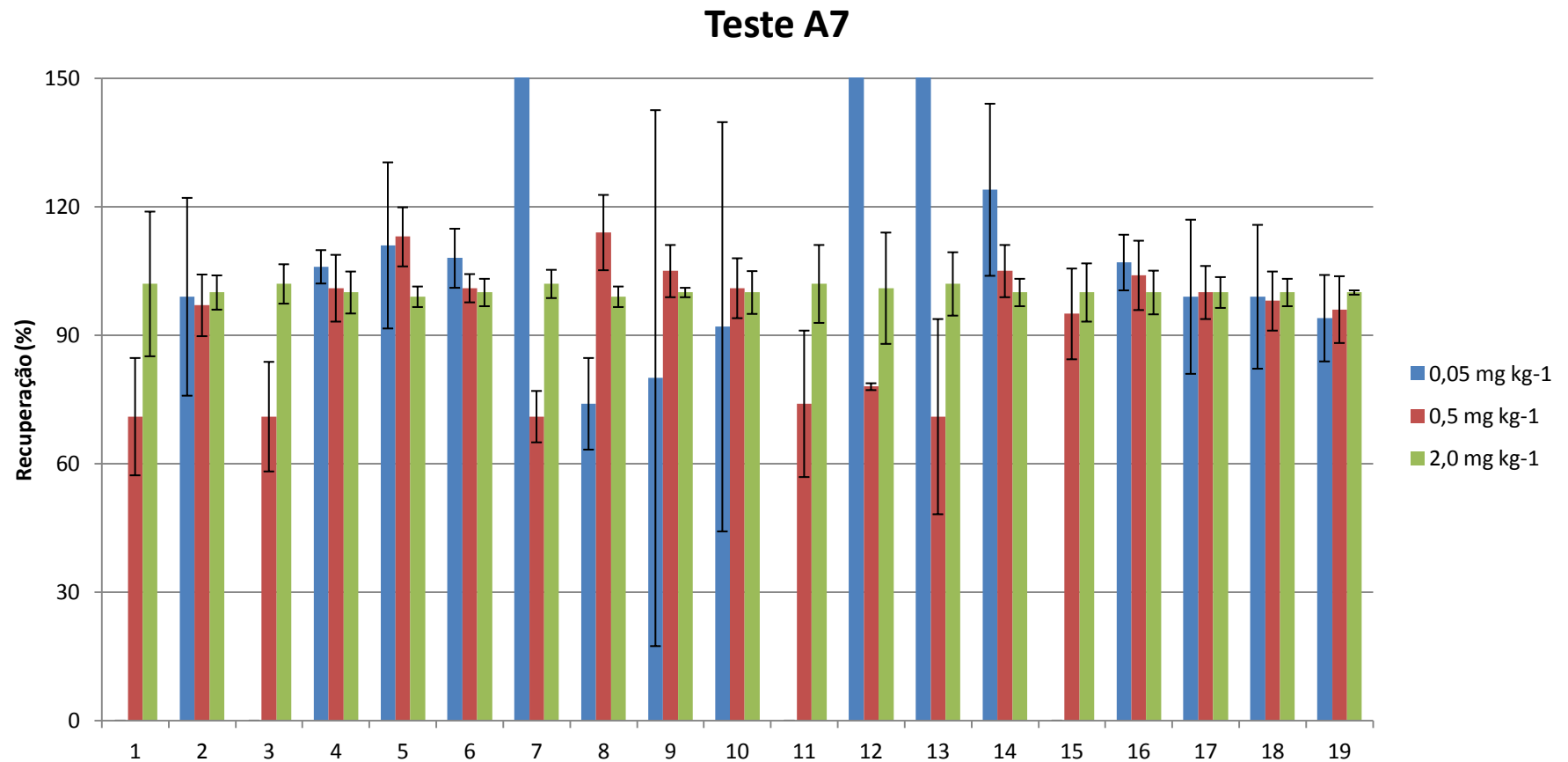
1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 15: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A6



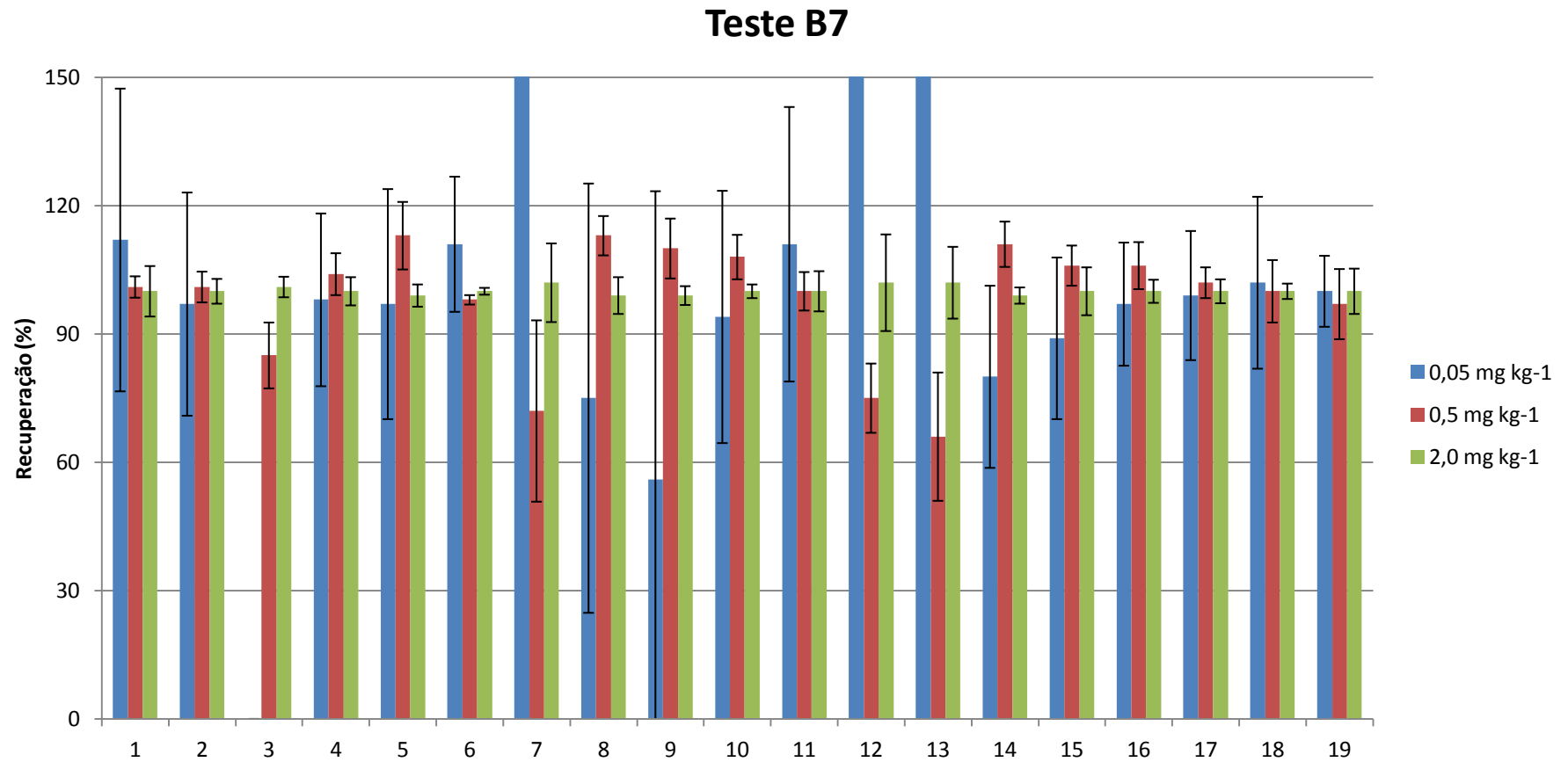
1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 16: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B6



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 17: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A7



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

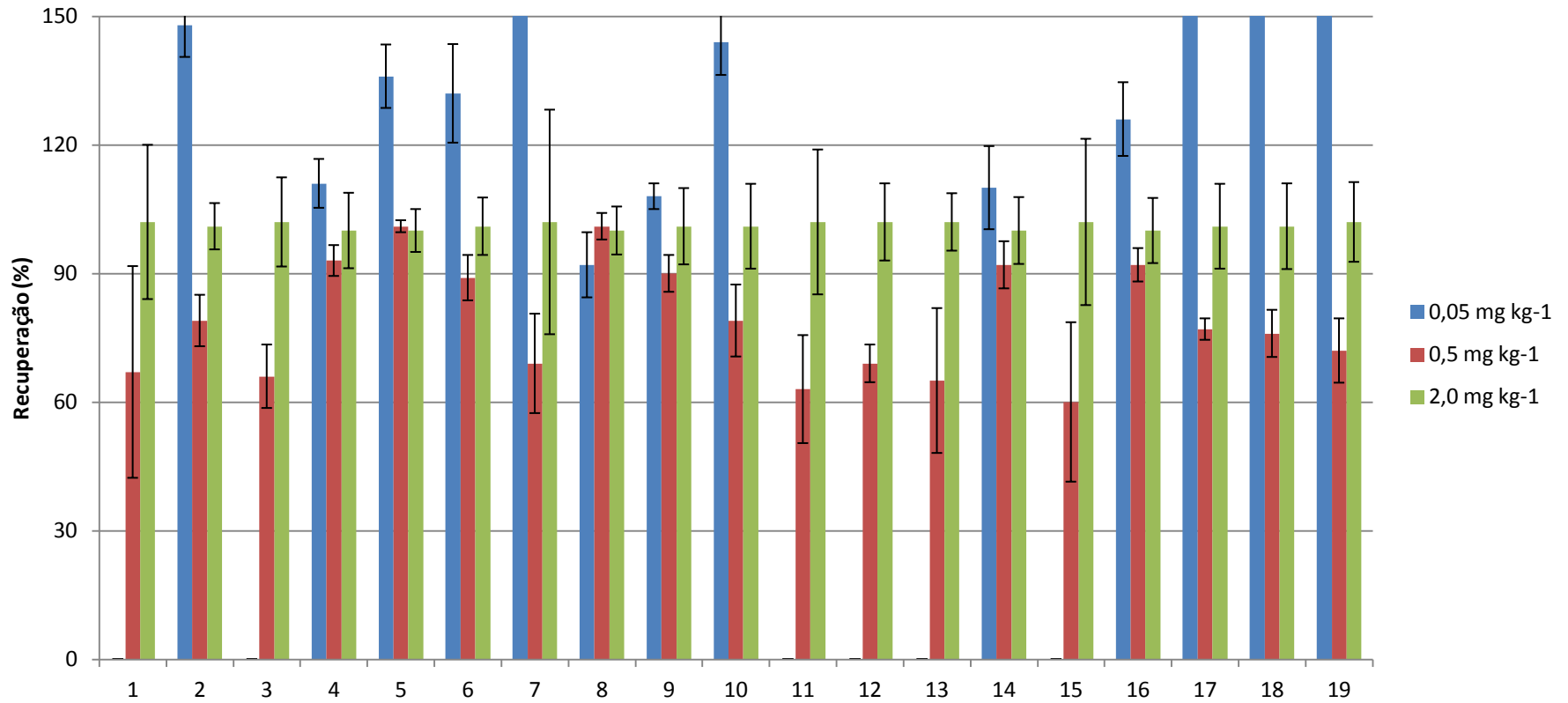
Figura 18: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B7

4.2.1.3 Testes com a adição de outros sorventes ao PSA

Outro estudo realizado foi a adição de outros sorventes ao PSA na etapa de purificação. Os sorventes adicionados foram C18, testes A3 e B3, e Florisil, A8 e B8, que foram comparados com A1 e B1, em que só foi utilizado PSA. Entre A3, A1 e A8, o último teste, no primeiro nível de fortificação, foi o que apresentou menor número de analitos não detectados, triadimefon e tebuconazol, para A1 foram quatro analitos não detectados e A3 seis. Porém, no segundo nível de fortificação o teste A1 foi o que obteve o melhor desempenho.

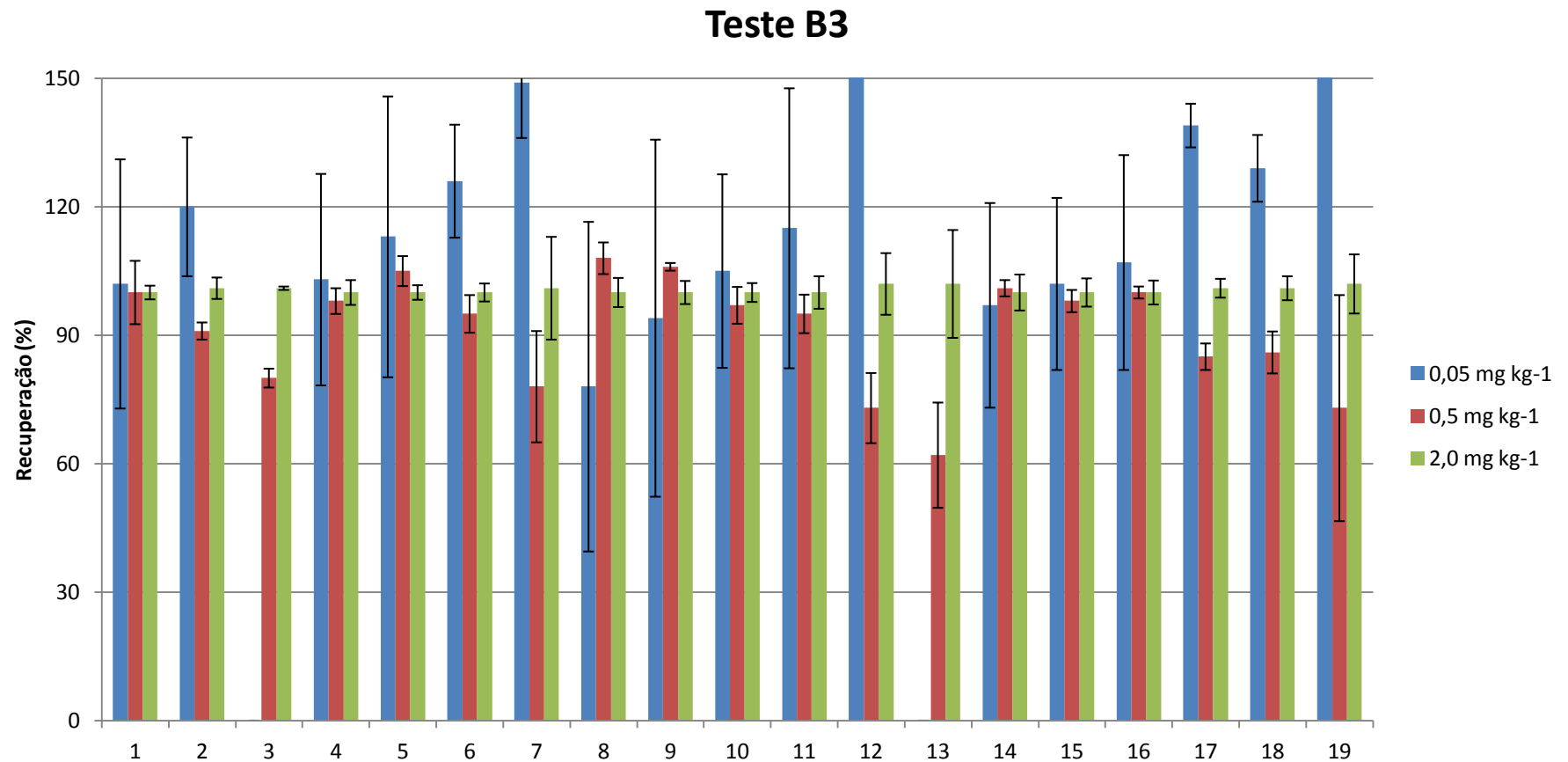
Entre B1, B3, B8, verifica-se que B1 é o que apresenta o menor número de analitos não recuperados ou fora dos limites de recuperação, 70 e 120%. Deduz-se, então que a adição dos sorventes estudados ao PSA não apresentou melhorias significativas na recuperação e, conseqüentemente, na determinação desses compostos. Comparando-se A1 e B1, observa-se melhor desempenho de B1. Os gráficos das figuras 19, 20, 21 e 22 apresentam as recuperações dos agrotóxicos nos testes A3, B3, A8 e B8.

Teste A3



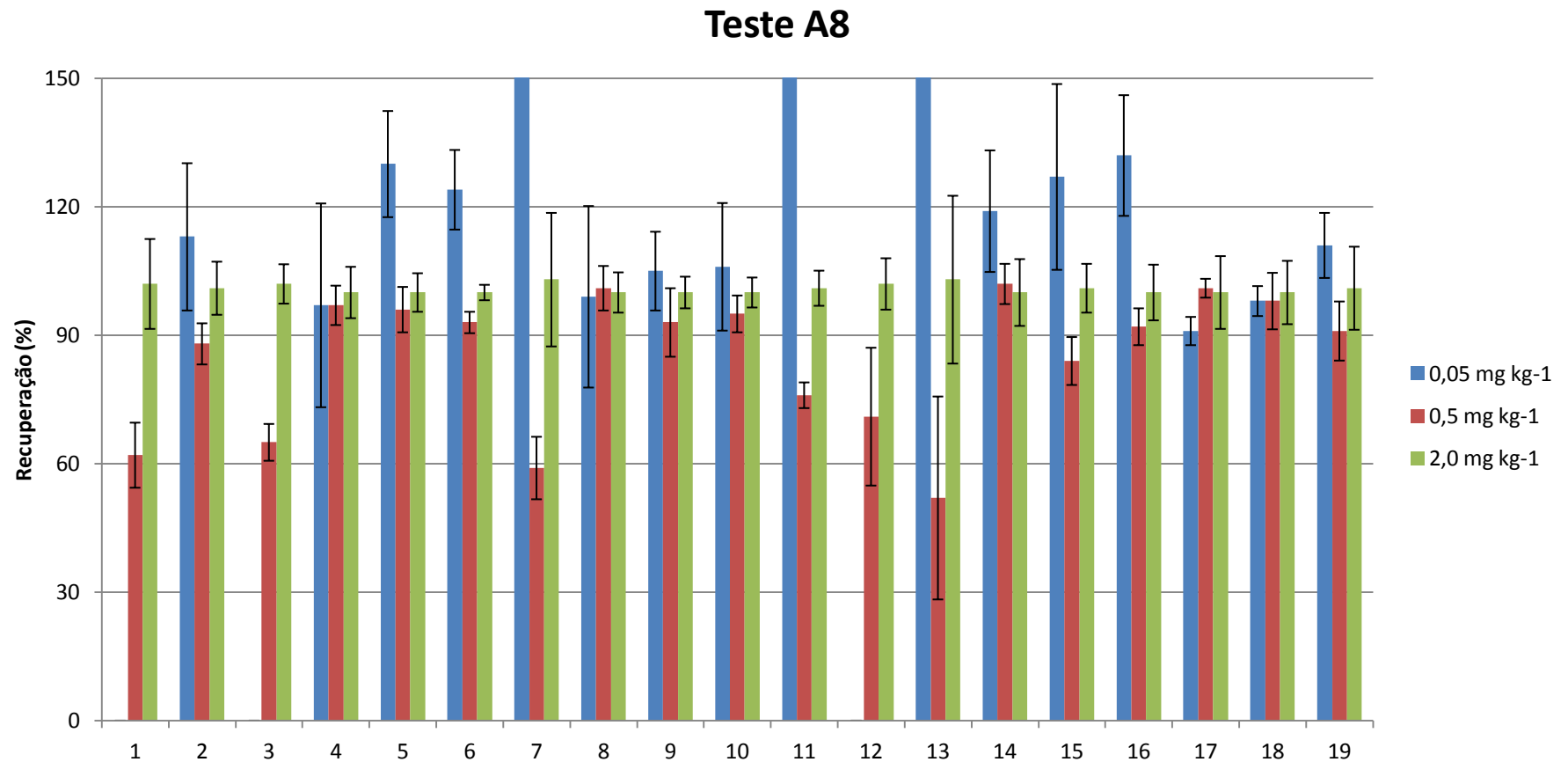
1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 19: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A3



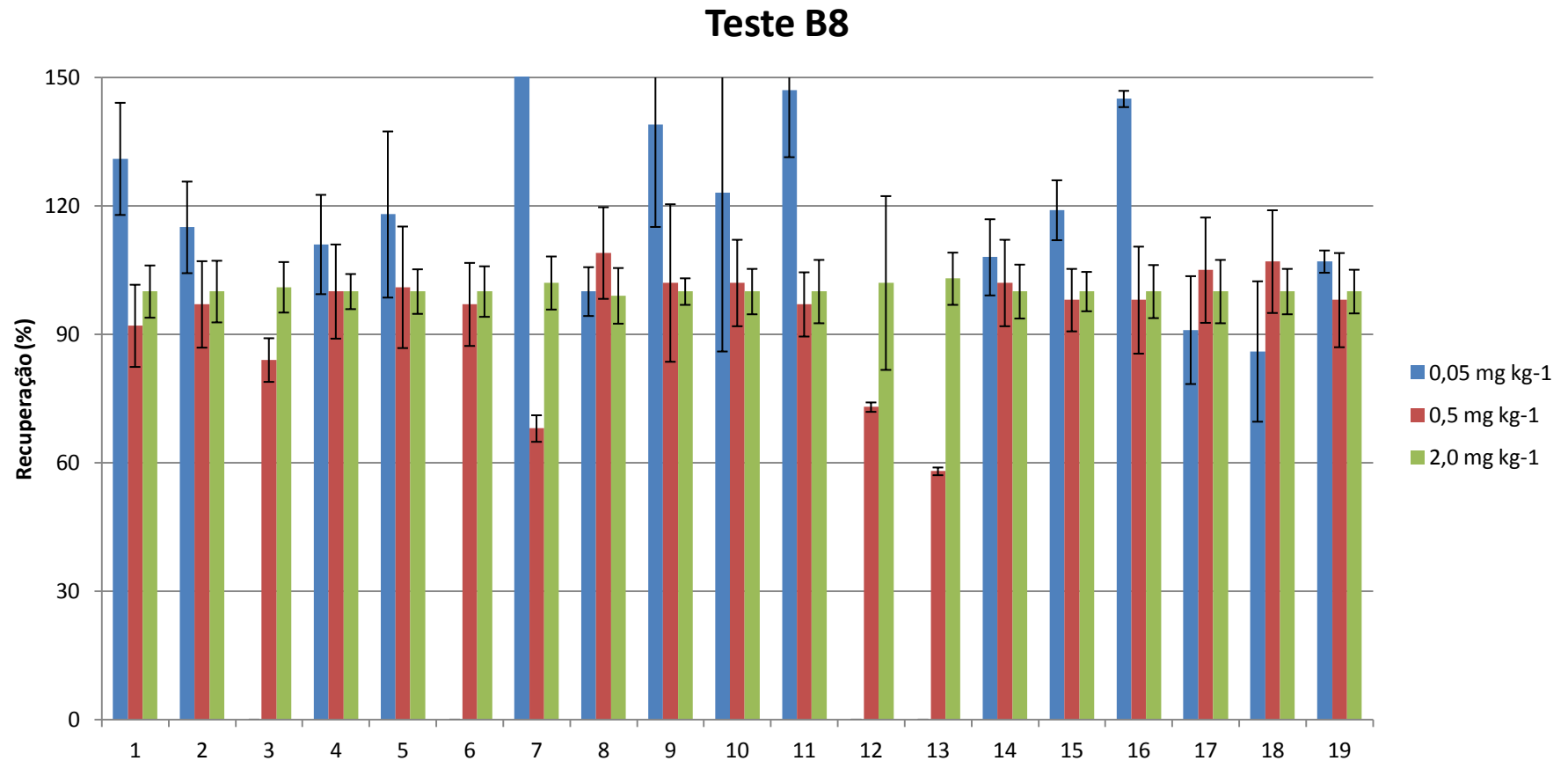
1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 20: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B3



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 21: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste A8



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Buprofenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi

Figura 22: Gráfico representativo das recuperações dos agrotóxicos para o teste B8

4.2.1.4 A definição do teste escolhido para a etapa de limpeza

Até então, os melhores testes são B1 (PSA) e B7 (Florisil), o que podem ser facilmente observados na figura 23 e 24, que apresenta a porcentagem de agrotóxicos recuperados nos dois primeiros níveis de fortificação, utilizando tamponamento ácido (QuEChERS acetato) ou não (QuEChERS) nos nove testes. Comparando estes com os testes com alumina (A9, B9) observa-se que alumina não se configura com um bom sorvente para esse tipo de análise, provavelmente devido às características básicas deste que não vão ao encontro da necessidade de tamponamento ácido para alguns analitos, como descrito por Anastassiades (2003a).

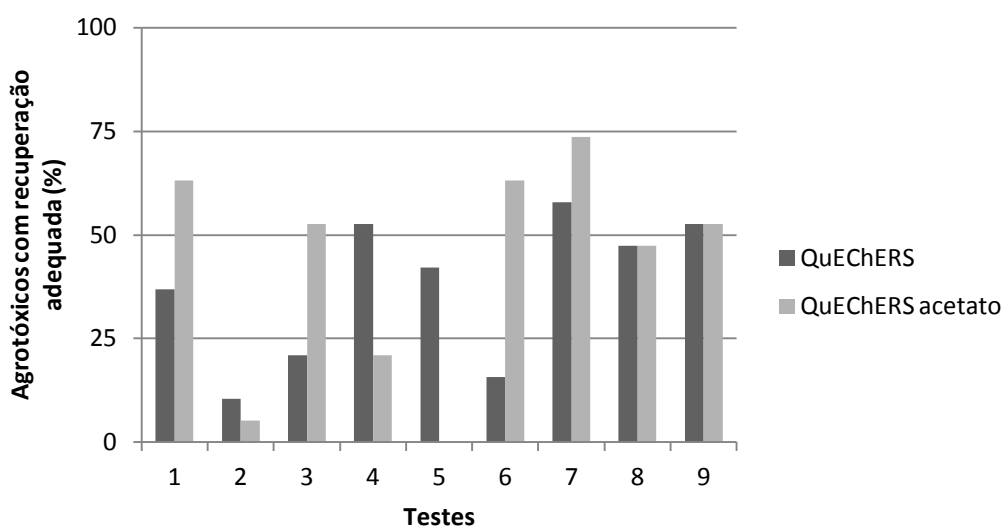


Figura 23: Percentual de agrotóxicos com recuperação entre 70 e 120% na concentração de 0,05 mg kg⁻¹

Os testes B1 e B7 tiveram resultados muito parecidos. Em B1 não houve recuperação para dois compostos, no primeiro nível de fortificação, que são triadimefom e tebuconazol, enquanto que, em B7 apenas triadimefom não foi recuperado. Em B1, no primeiro nível de fortificação, cinco compostos ficaram fora dos limites de recuperação: metalaxil, miclobutanil, endossulfan sulfato, epoxiconazol e etofemproxi. Já para B7 quatro compostos

ficaram fora desses limites: miclobutanil, endossulfan beta, tebuconazol e epoxiconazol. Portanto observa-se que o teste com Florisil sobressai-se ligeiramente ao teste com PSA, configurando-se como o melhor teste.

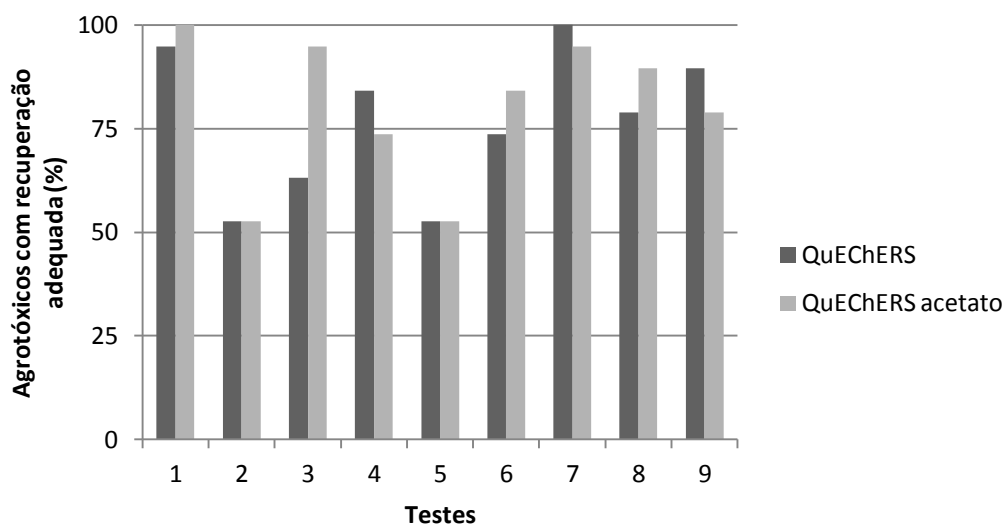


Figura 24: Percentual de agrotóxicos com recuperação entre 70 e 120% na concentração de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$.

4.2.1.5 Planejamento fatorial no auxílio da escolha do melhor teste

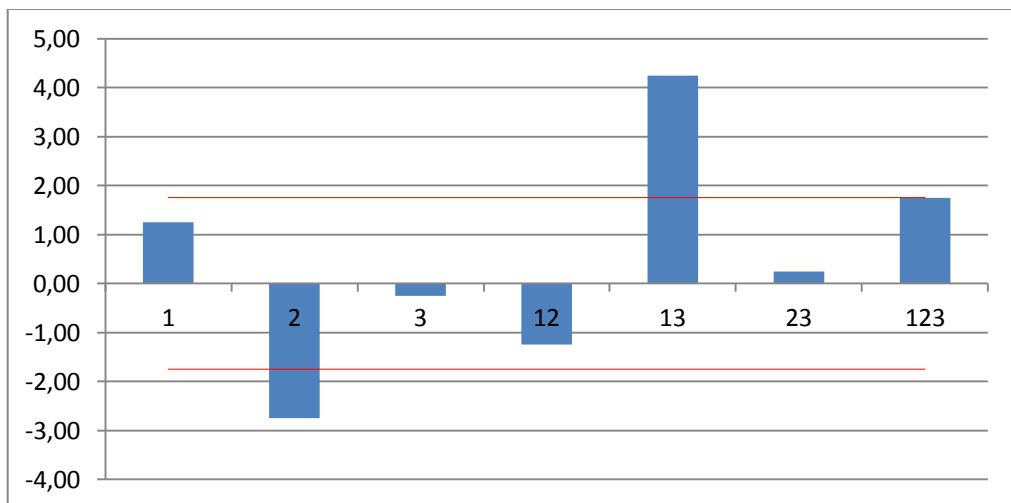
Para auxiliar na escolha do teste da etapa de limpeza um planejamento fatorial 2^3 foi realizado comparando experimentos realizados com PSA e C18. A tabela 11 apresenta os ensaios realizados e os fatores estudados.

A figura 25 apresenta os resultados em relação ao número de agrotóxicos com recuperação entre 70 e 120% no primeiro nível de fortificação. Observa-se que o único teste, entre os avaliados no planejamento fatorial, em que há resultados significativamente positivos é o teste “13” em que é utilizada a combinação QuEChERS acetato e PSA na etapa de limpeza.

Tabela 11: Fatores utilizados para o planejamento fatorial 2^3

Fatores		(-)	(+)
1	Quechers	Original	Acetato
2	C18	Não	Sim
3	PSA	Não	Sim

Resposta: Número de agrotóxicos				
Ensaio	1	2	3	Resposta
1	-	-	-	10
2	+	-	-	10
3	-	+	-	10
4	+	+	-	4
5	-	-	+	7
6	+	-	+	12
7	-	+	+	4
8	+	+	+	10

Figura 25: Resultados dos efeitos do planejamento fatorial 2^3

O teste com PSA foi então comparado com o teste com Florisil e o cálculo dos efeitos foram realizados conforme descrito por Bruns (2010). A equação 5 apresenta o cálculo do efeito do PSA e a equação 6 o cálculo do efeito do Florisil, sendo que “y” corresponde aos experimentos realizados apresentados na tabela 12, onde o fator resposta é em relação a porcentagem de agrotóxicos com recuperação na faixa de 70 a 120%.

Tabela 12: Planejamento fatorial 2^2 comparando Florisil com PSA

Ensaio	PSA	Florisil	Resposta (%)
1	Não	Não	52,6
2	Sim	Não	63,2
3	Não	Sim	73,7
4	Sim	Sim	47,4

$$Efeito\ PSA = \left(\frac{y_2+y_4}{2}\right) - \left(\frac{y_1+y_3}{2}\right) \quad (Eq. 5)$$

$$Efeito\ PSA = \left(\frac{63,2 + 47,4}{2}\right) - \left(\frac{52,6 + 73,7}{2}\right) = -7,85\%$$

$$Efeito\ Florisil = \left(\frac{y_3+y_4}{2}\right) - \left(\frac{y_1+y_2}{2}\right) \quad (Eq. 6)$$

$$Efeito\ Florisil = \left(\frac{73,7 + 47,4}{2}\right) - \left(\frac{52,6 + 63,2}{2}\right) = 2,65\%$$

Como apresentam as equações 5 e 6, PSA teve efeito negativo de 7,85% em relação ao Florisil, enquanto que Florisil teve efeito positivo de 2,65%. Portanto, corroborando o descrito no item anterior, o teste de limpeza com Florisil obteve o melhor desempenho e, por isso, foi incluído na metodologia do preparo de amostra.

A figura 26 apresenta uma representação geométrica dos efeitos de Florisil e PSA, nota-se que há aumento do percentual de recuperação de agrotóxicos quando há uso de Florisil ou PSA, mas que esse aumento é mais significativo ao usar Florisil. Porém, observa-se que ao se utilizar os dois sorventes em conjunto há uma diminuição na recuperação dos compostos.

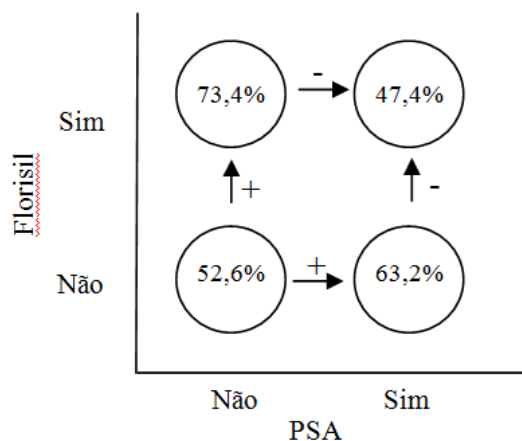


Figura 26: Porcentagens de recuperações usando Florisil e PSA apresentadas geometricamente

4.3 Avaliação da etapa de concentração do extrato

Outro ponto a ser avaliado é a possibilidade da inserção de uma etapa de concentração do extrato, com o objetivo de obtenção de melhores LODs e LOQs. Com isso, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um concentrador a 35 °C sob circulação forçada de ar. Como tolueno confere maior estabilidade a soluções padrão de agrotóxico (MAŠTOVSKÁ, 2004), 100 µL deste solvente foram adicionados previamente à concentração do extrato. Terminada esta etapa o extrato concentrado foi, então, avolumado a 200 µL com tolueno. O compressor de ar utilizado era isento de óleo, com filtros na entrada do ar que garantiam a ausência de partículas.

Com a utilização da troca de acetonitrila por tolueno observou-se a formação de uma mistura de duas fases, provavelmente ocasionada por constituintes com características mais polares insolúveis em tolueno, o que prejudicou na recuperação de alguns agrotóxicos. Por esse motivo a troca de solventes na etapa de concentração não fez parte do desenvolvimento do método e esta etapa prosseguiu com o uso de acetonitrila.

Testes de recuperação, em triplicata e em três níveis, foram realizados para verificar se a etapa de concentração do extrato era viável, uma vez que esta pode acarretar em grandes perdas dos compostos de interesse por evaporação ou degradação. Como a viabilidade desta etapa foi constatada, o método foi definido e é apresentado na figura 27.

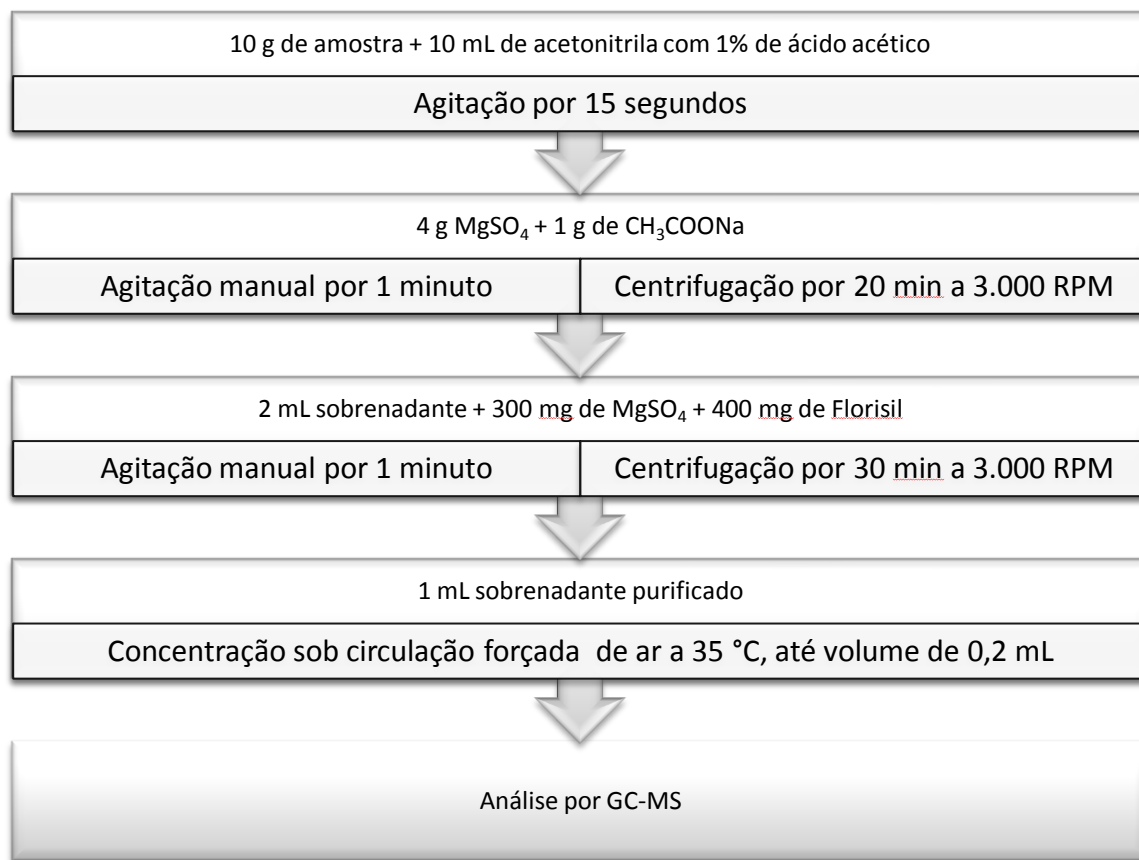


Figura 27: Esquema geral do método proposto

A figura 28 apresenta o cromatograma do branco da matriz, onde observa-se os picos do quintozeno e da cafeína. A figura 29 apresenta o cromatograma do ponto 7 da curva de calibração na matriz com a identificação de todos os analitos estudados. As condições cromatográficas utilizadas em ambas análises estão descritas na tabela 9.

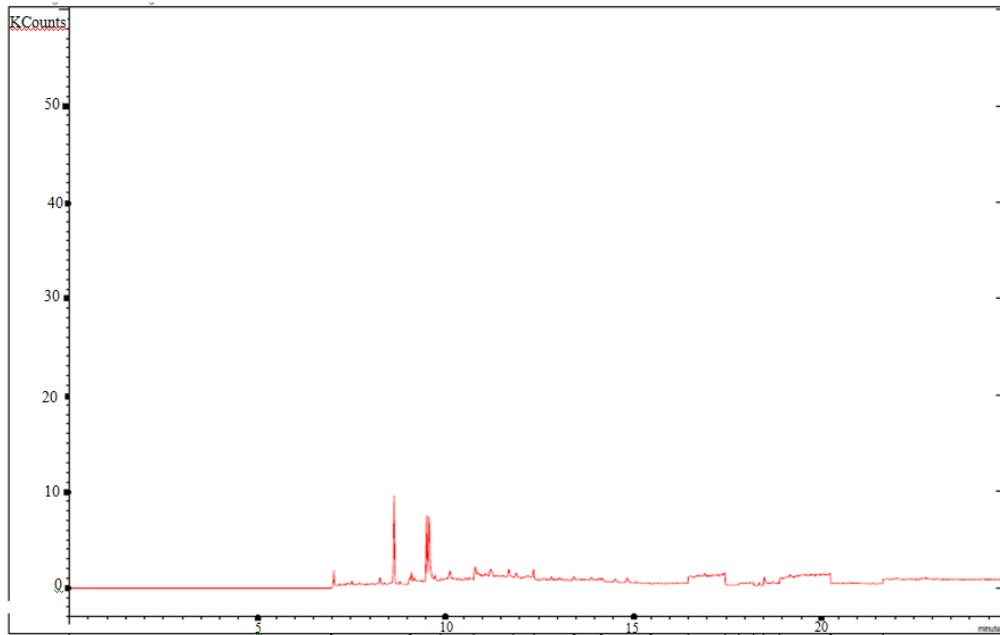
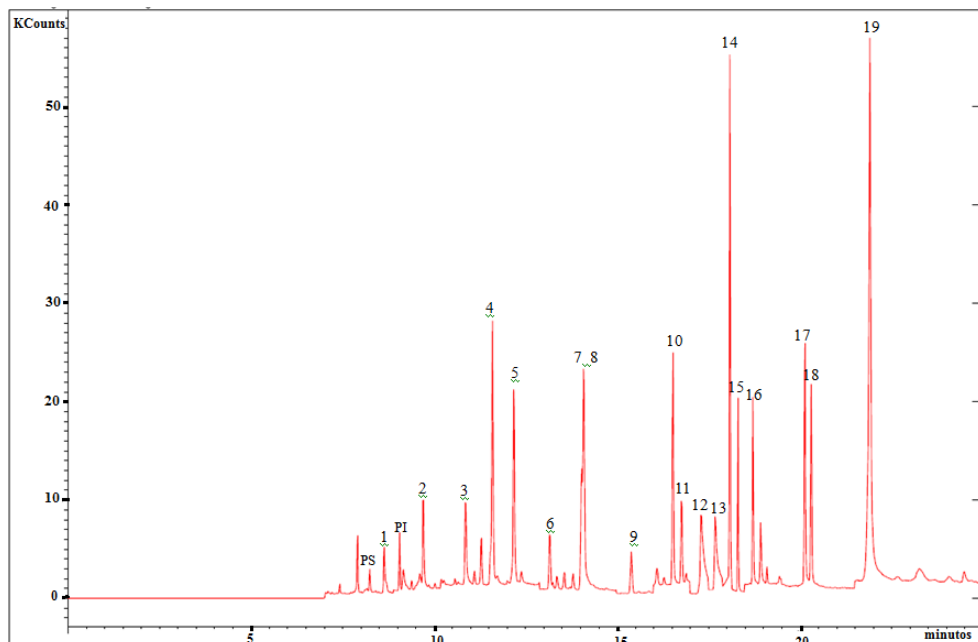


Figura 28: Cromatograma no modo SIS do branco da matriz da amostra.



1- Clorotalonil, 2- Metalaxil, 3- Triadimefom, 4- Ciprodinil, 5- Procimidona, 6- Endossulfan alfa, 7- Miclobutanil, 8- Bupropenzina, 9- Endossulfan beta, 10- Trifloxistrobina, 11- Endossulfan sulfato, 12- Tebuconazol, 13- Epoxiconazol, 14- Bifentrina, 15- Fempropatrina, 16- Tetradifona, 17- Permetrina cis, 18- Permetrina trans, 19- Etofemproxi, PS- Padrão de controle (quintozeno), PI- Padrão interno (caféina)

Figura 29: Cromatograma no modo SIS dos analitos de interesse determinados na matriz da amostra.

4.4 Validação do método

Os analitos foram divididos em 4 grupos, dependendo do ponto inicial da curva de calibração. Pertencem ao grupo 1: clorotalonil, metalaxil, endossulfan sulfato, bifentrina, permetrina cis e permetrina trans. Grupo 2: tetradifona, etofemproxi e fempropatrina. Grupo 3: triadimefom, procimidona, endossulfan alfa, endossulfan beta e buprofenzina. Grupo 4: miclobutanil, triflaxistrabina, tebuconazol, epoxiconazol. Para os compostos do grupo 1 a curva analítica foi preparada nas concentrações de: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,30; 0,60 e 1,0 mg L⁻¹. Já, para os compostos 2 a curva analítica foi preparada nas concentrações de: 0,04; 0,08; 0,16; 0,30; 0,60 e 1,0 mg L⁻¹. Para os compostos do grupo 3 a curva analítica foi preparada nas concentrações de: 0,08; 0,16; 0,30; 0,60 e 1,0 mg L⁻¹. Para os compostos do grupo 4, que obtiveram piores respostas cromatográficas a curva analítica foi preparada nas concentrações de: 0,16; 0,32; 0,60 1,2 e 2,0 mg L⁻¹. A tabela 13 apresenta a linearidade e a faixa linear para os agrotóxicos estudados. O coeficiente de correlação é satisfatório para os analitos estudados, com exceção de epoxiconazol que teve r² abaixo de 0,98.

A sensibilidade do método é observada pela inclinação da curva de calibração, ou seja, pelo coeficiente “a” da curva. Através da tabela 13 observa-se que o analito que apresenta maior sensibilidade por este método é a etofemproxi, enquanto que o endossulfan alfa é o que apresenta menor sensibilidade.

Tabela 13: Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos na variedade Isabel

Grupo	Agrotóxicos	Faixa Linear (mgkg ⁻¹)	r ²	Equação da reta
1	Bifentrina	0,02 – 1,0	0,99052	y = 1,4724.x + 0,0732
	Ciprodinil	0,02 – 1,0	0,98383	y = 0,9901.x + 0,0023
	Clorotalonil	0,02 – 1,0	0,99190	y = 0,1305.x + 0,0122
	Endossulfan sulfato	0,02 – 1,0	0,99374	y = 0,0976.x + 0,0078
	Metalaxil	0,02 – 1,0	0,99057	y = 0,3461.x + 0,0027
	Permetrina cis	0,02 – 1,0	0,99410	y = 0,9851.x + 0,0471
	Permetrina trans	0,02 – 1,0	0,99409	y = 0,7408.x + 0,0336

	Etofenproxi	0,04 – 1,0	0,98835	$y = 2,6649.x + 1,0933$
2	Fempropatrina	0,04 – 1,0	0,98157	$y = 0,3082.x + 0,0367$
	Tetradifona	0,04 – 1,0	0,99249	$y = 0,2462.x + 0,0260$
	Bupropenzina	0,08 – 1,0	0,98635	$y = 0,4351.x + 0,0438$
	Endossulfan alfa	0,08 – 1,0	0,99400	$y = 0,0414.x + 0,0013$
3	Endossulfan beta	0,08 – 1,0	0,98798	$y = 0,0841.x + 0,0038$
	Procimidona	0,08 – 1,0	0,99120	$y = 0,3555.x + 0,0352$
	Triadimefon	0,08 – 1,0	0,98361	$y = 0,2846.x - 0,0076$
	Epoxiconazol	0,16 – 2,0	0,97761	$y = 0,2049.x + 0,0350$
4	Miclobutanil	0,16 – 2,0	0,98330	$y = 0,3749.x - 0,0503$
	Tebuconazol	0,16 – 2,0	0,98393	$y = 0,2018.x - 0,0548$
	Trifloxistrobina	0,16 – 2,0	0,99374	$y = 0,2401.x + 0,0166$

Os limites de detecção e de quantificação do método e do instrumento são apresentados na tabela 14. Os valores são adequados à análise de rotina uma vez que os limites de detecção do método encontram-se abaixo dos LMRs estabelecidos pelo MAPA, *Codex Alimentarius* e União Europeia, como podem ser vistos nessa mesma tabela.

Bupropenzina, epoxiconazol e trifloxistrobina são agrotóxicos não permitidos para a uva e encontram-se acima do Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) como orienta a Instrução Normativa do MAPA Nº 27, de 11 de dezembro de 2012, que define os LMRs tolerados para fins de monitoramento em diversas culturas:

Quando se tratar de substância banida, proibida ou de uso não autorizado para a cultura analisada, o Limite Mínimo de Desempenho Requerido (LMDR) será de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo que o Limite Referência para a Tomada da Ação Regulatória será igual ou menor a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo considerado o respectivo Limite de Detecção do Método.

Tabela 14: Limites de detecção e de quantificação para os analitos na variedade Isabel

Grupo	Agrotóxicos	LODm (mg kg ⁻¹)	LOQm (mg kg ⁻¹)	LODi (mg kg ⁻¹)	LOQi (mg kg ⁻¹)	LMR		
						MAPA* (mg kg ⁻¹)	Codex** (mg kg ⁻¹)	EU*** (mg kg ⁻¹)
1	Bifentrina	0,005	0,015	0,025	0,075	0,1	-	0,2
	Ciprodinil	0,005	0,015	0,025	0,075	NPC	3,0	3,0
	Clorotalonil	0,005	0,015	0,025	0,075	5,0	3,0	3,0
	Endossulfan sulfato ^(a)	0,005	0,015	0,025	0,075	NPC	-	0,05
	Metalaxil	0,005	0,015	0,025	0,075	1,0	1,0	2,0
	Permetrina cis ^(b)	0,005	0,015	0,025	0,075	0,05	2,0	0,05
	Permetrina trans ^(b)	0,005	0,015	0,025	0,075			
2	Etofenproxi	0,01	0,04	0,05	0,2	NPC	-	5,0
	Fempropatrina	0,01	0,04	0,05	0,2	0,01	5,0	0,01
	Tetradifona	0,01	0,04	0,05	0,2	NPC	-	0,01
	Buprofenzina	0,02	0,07	0,1	0,35	NPC	1,0	1,0
3	Endossulfan alfa ^(a)	0,02	0,07	0,1	0,35			
	Endossulfan beta ^(a)	0,02	0,07	0,1	0,35			
	Procimidona	0,02	0,07	0,1	0,35	5,0	-	0,01
4	Triadimefon	0,02	0,07	0,1	0,35	2,0	-	2,0 ^(c)
	Epoxiconazol	0,05	0,15	0,25	0,75	NPC	-	0,05
	Miclobutanil	0,05	0,15	0,25	0,75	0,5	1,0	1,0
	Tebuconazol	0,05	0,15	0,25	0,75	2,0	6,0	2,0
	Trifloxistrobina	0,05	0,15	0,25	0,75	NPC	3,0	5,0

FONTE: *BRASIL – MAPA/IN n°27/2012; **CODEX ALIMENTARIUS, Pesticide Residues em Food and Feed; ***EU, Pesticides database
 NPC: Não Permetido para a Cultura
 (a) soma de endossulfan alfa, beta e o metabólito sulfato (b) soma de permetrina cis e trans
 (c) soma de triadimefom e triadimenol

Nas tabelas 15 e 16 são apresentados os valores de recuperação e RSD para a repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente. Como descrito no item 3.9.3 os níveis de fortificação utilizados foram: para os analitos do grupo 1 e 2: 0,04; 0,30 e 1,0 mgkg⁻¹, para os analitos do grupo 3: 0,08; 0,30 e 1,0 mgkg⁻¹, e para os analitos do grupo 4: 0,16; 0,60 e 2,0 mgkg⁻¹. Observa-se que a maioria dos analitos encontram-se dentro da faixa de recuperação de 70 a 120% com RSD menor que 20%. As exceções são para trifloxistrobina nas fortificações de 0,60 e 2,0 mgkg⁻¹, tebuconazol no nível de fortificação de 0,16 mgkg⁻¹, e tetradifona também no nível de fortificação 0,16 mgkg⁻¹. Os valores fora da faixa de 70 e 120% estão grafados na tabela.

Tabela 15: Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método na variedade Isabel

Agrotóxicos	Primeiro nível de fortificação*		Segundo nível de fortificação**		Terceiro nível de fortificação***	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
Clorotalonil	87	7,7	75	16,8	91	14,6
Metalaxil	98	17,6	86	7,1	105	14,4
Triadimefom	112	5,1	82	14,6	98	9,1
Cyprodinil	106	6,8	97	7,6	107	8,0
Procimidona	107	8,2	88	1,3	102	9,7
Endossulfan alfa	102	12,9	88	11,4	107	18,0
Miclobutanil	89	19,7	102	6,9	111	6,3
Buprofenzina	107	8,4	95	3,6	103	9,3
Endossulfan beta	105	10,4	98	3,6	102	10,8
Trifloxistrobina	119	8,6	135	3,9	152	7,2
Endossulfan sulfato	103	9,2	77	1,6	97	13,7
Tebuconazol	119	7,2	115	4,1	90	14,1
Epoxiconazol	108	18,1	117	7,9	191	17,4

Bifentrina	105	7,1	86	5,2	97	9,8
Fempropatrina	107	1,8	86	3,4	98	11,8
Tetradifona	97	18,7	83	10,3	105	12,7
Permetrina cis	104	7,7	89	5,4	99	10,9
Permetrina trans	99	9,7	90	3,6	97	12,4
Etofemproxi	100	5,7	86	7,5	99	13,1

Tabela 16: Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método na variedade Isabel

Agrotóxicos	Primeiro nível de fortificação		Segundo nível de fortificação		Terceiro nível de fortificação	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
Clorotalonil	83	13,7	71	12,01	79	0,4
Metalaxil	105	18,7	77	11,1	92	8,5
Triadimefom	105	12,8	84	18,3	92	9,6
Cyprodinil	102	5,4	103	6,4	106	4,9
Procimidona	119	8,0	102	11,2	104	9,2
Endossulfan alfa	106	4,4	104	13,2	108	11,2
Miclobutanil	72	19	89	13,83	118	6,4
Buprofenzina	107	1,5	104	8,8	108	10,6
Endossulfan beta	111	4,1	98	14,3	105	1,4
Triflaxistrabina	98	8,8	163	18,1	165	13,8
Endossulfan sulfato	100	4,8	88	19,6	97	9,2
Tebuconazol	133	15,7	117	14,0	87	19,0
Epoconazol	111	19,1	118	8,3	110	14,0
Bifentrina	117	7,7	101	19,5	107	11,8
Fempropatrina	107	10,8	101	16,2	107	12,4
Tetradifona	208	31,2	88	15,2	107	14,3
Permetrina cis	108	4,2	101	7,5	103	9,1
Permetrina trans	114	5,1	103	15,0	105	9,6
Etofemproxi	101	14,7	86	5,8	96	10,4

4.5 Avaliação do efeito matriz

A avaliação do efeito matriz deu-se por comparação da inclinação das curvas de calibração na matriz e no solvente. A tabela 17 apresenta os valores de efeito matriz para os agrotóxicos estudados. Pode-se notar que a matriz exerce efeito positivo no resultado da análise, aumentando o sinal cromatográfico e a sensibilidade para todos analitos. Dessa maneira, observa-se que é de extrema importância a utilização da calibração por suposição da matriz durante a análise.

Em um estudo realizado por Walorczyk e colaboradores (2011) foi investigada a influência da matriz sendo que, o objetivo foi avaliar se os padrões de agrotóxicos preparados em solvente puro poderiam ser usados para calibrar o sistema cromatográfico em caso de indisponibilidade de matriz isenta agrotóxicos. Mas observaram que a curva de calibração feita na matriz fornecia resultados mais precisos, com menor desvio padrão.

Tabela 17: Avaliação do efeito matriz do método

Agrotóxico	Efeito matriz (%)
Clorotalonil	106
Metalaxil	341
Triadimefom	765
Ciprodinil	317
Procimidona	175
Endossulfan alfa	237
Miclobutanil	936
Buprofenzina	242
Endossulfan beta	178
Triflaxistrabina	321
Endossulfan sulfato	154
Tebuconazol	1228
Epoxiconazol	836
Bifentrina	283
Fempropatrina	241
Tetradifona	266
Permetrina cis	351
Permetrina trans	405
Etofenprox	625

A figura 30 compara as inclinações das curvas obtidas no solvente e na matriz para o composto metalaxil. Observa-se o aumento de sensibilidade quando é usada a curva na matriz, pois mais sensível é o método quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação. (INMETRO, 2010).

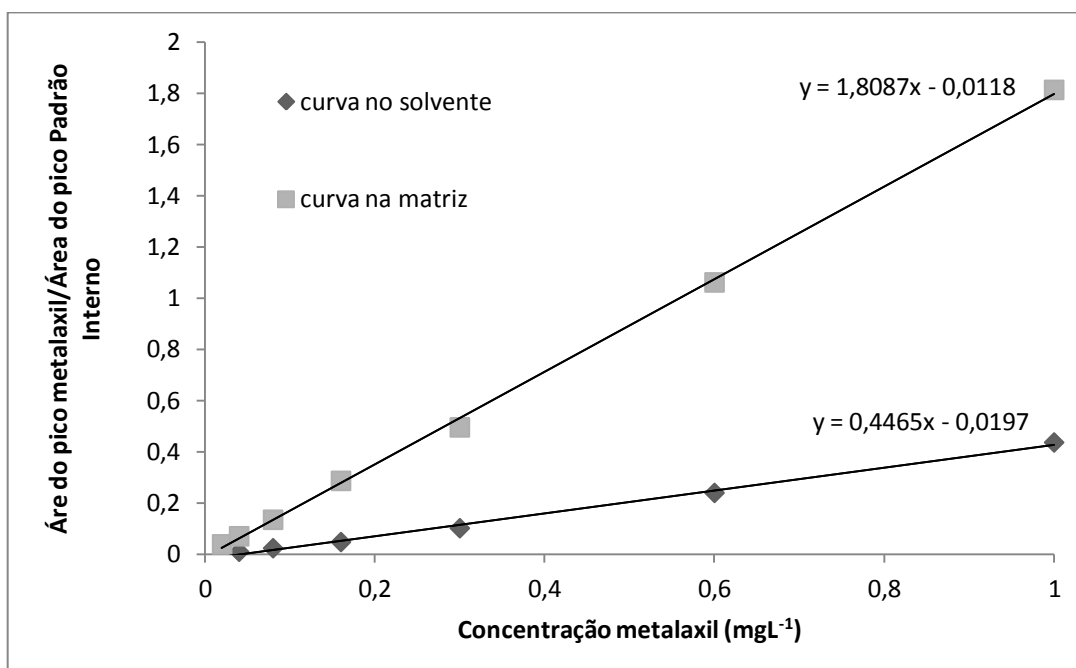


Figura 30: Inclinações das curvas obtidas no solvente e na matriz para o composto metalaxil.

Em um estudo realizado por Anastassiades e colaboradores (2003b), foi observado que compostos que continham múltiplos grupos hidroxila, tais como açúcares e derivados do açúcar, eram os que mais se adequavam como uso de analitos protetores. O alto efeito matriz observado, provavelmente é devido aos açúcares presentes na uva, que nas cultivares de *Vitis vinifera* correspondem a 12 a 27% ou mais do peso das uvas maduras e são, principalmente, glicose e frutose (DAUDT, 2001). Esses açúcares podem não ser totalmente removidos no preparo da amostra, mas resultam em melhoria significativa na análise devido ao aumento da sensibilidade.

4.6 Análise de amostras reais

Foram analisadas duas amostras adquiridas diretamente com um produtor rural de uva, da variedade Isabel. As amostras, forma lavadas com água corrente, processadas (casca, polpa e sementes) em liquidificador e armazenadas em freezer até o momento da análise. Os resultados são apresentados na tabela 18.

Tabela 18: Resíduos de agrotóxicos encontrados em amostras reais

	Amostra 1 (mg kg ⁻¹)	Amoatra 2 (mg kg ⁻¹)	LMR		
			MAPA (mg kg ⁻¹)	<i>Codex Alimentarius</i> (mg kg ⁻¹)	EU (mg kg ⁻¹)
Ciprodinil	0,018	0,030	NPC	3	5

As amostras apresentaram resíduo de ciprodinil, fungicida usado no combate às seguintes pragas: Mancha-de-Alternaria, Mancha-púrpura, Pinta-preta, Queima-das-folhas, Sarna e Sarna-da-macieira (SYNGENTA, 2012), de uso Não Permitido para a Cultura da uva no Brasil, mas permitido para as culturas de batata, cebola, maçã e tomate. A quantificação desse agrotóxico pode ser devido à contaminação cruzada, já que as amostras são provenientes de uma pequena propriedade rural que produz, além da uva, outros produtos primários para subsistência.

5 CONCLUSÕES

O método de preparo de amostra desenvolvido neste trabalho é uma alternativa ao QuEChERS original e às suas variações acetato e citrato, fazendo uso de um sorvente normalmente não empregado e considerado pouco hábil para este tipo de análise, o Florisil. Este sorvente sobressaiu-se inclusive ao PSA, apresentando melhores percentuais de recuperação dos compostos. O Florisil também se mostrou eficiente na remoção da cor do extrato, partindo de um roxo escuro para amarelo claro após a etapa de purificação. A utilização de 400 mg de Florisil na etapa de limpeza do preparo de amostra, confere ao método menor probabilidade de erro, uma vez que pequenas variações na pesagem influenciam proporcionalmente menos que ao se pesar 50 mg, como no método que utiliza PSA.

A etapa de concentração do extrato não resultou em índices de recuperação mais baixos e pôde ser adicionada ao método, porém sem a troca de solventes. Esta etapa foi necessária para que melhores limites de detecção e de quantificação fossem obtidos.

A eficiência do método foi comprovada através da validação, apresentando limites de detecção abaixo dos Limites Máximos de Resíduos permitidos pelos órgãos reguladores e recuperações entre 70 e 120% com RSD menor que 20%, para a maioria dos agrotóxicos estudados, com exceção para trifloxistrobina, tebuconazol e tetradifona. A utilização da calibração por suposição da matriz é de extrema importância, uma vez que foi observado que houve grande influência positiva da matriz na realização das análises, aumentando o sinal cromatográfico de todos os analitos estudados, sem o que levaria a resultados incorretos, superestimando as concentrações em amostras reais.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Aplicação e verificação da eficiência do método validado a outras variedades de uva, avaliando se o efeito matriz é reprodutível nas diferentes variedades.

Ampliação do número de agrotóxicos a serem determinados na uva utilizando o método validado.

Estudos com outros materiais sorventes para a etapa de limpeza, buscando reduzir os custos da análise, sem comprometer a qualidade.

Aplicação do método validado para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em uva.

REFERÊNCIAS

AGÜÍ, M. L., CAMPAÑA, A. M. G., GRACIA, L. G., BLANCO, C. C. Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. **Talanta**, v. 93, p. 193-199, mai. 2012.

ALMEIDA, C., ROSÁRIO, A. P., SERODIO, P. NOGUERIA, J. M. F. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 95, p. 69-75, dez. 2004.

AMVRAZI, E. G., TSIROPOULOS, N. G. Chemometric study and optimization of extraction parameters in single-drop microextraction for the determination of multiclass pesticide residues in grapes and apples by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7630-7638, set. 2009.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., STAJBAHER, D., SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, nº 2, p.412-431 2003a.

ANASTASSIADES, M., MASTOVSKÁ, K., LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 163-184, fev. 2003b.

ANVISA Nota Técnica – Resultados PARA 2008, 2009. Disponível em (a): <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>> Acesso em: 10 out. 2011.

ANVISA Relatório de Atividades de 2009 – PARA, 2010. Disponível em (b): <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>> Acesso em: 10 out. 2011.

ANVISA Relatório de Atividades de 2010 – PARA, 2011. Disponível em (c): <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>> Acesso em: 10 out. 2011.

ANVISA. Resolução Nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re Acesso em 12 nov. 2011.

BANERJEE K., OULKAR D. P., DASGUPTA S., PATIL S. B., PATIL S. H., SAVANT R., ADSULE P. G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides

in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 98-109, out. 2007.

BANERJEE K., PATIL S. H., DASGUPTA S., OULKAR D. P., PATIL S. B., SAVANT R., ADSULE P. G. Optimization of separation and detection conditions for the multiresidue analysis of pesticides in grapes by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 350-357, mar. 2008.

BOLAÑOS P. P., GONZÁLEZ R. R., FRENICH A. G., VIDAL J. L. M., Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 16-24, ago. 2008.

BRAGANÇA, I., PLÁCIDO, A., PAÍGA, P., DOMINGUES, V. F., MATOS C. D. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. **Science of the Total Environment**, v. 433, p. 281-289, set. 2012.

BRASIL, MAPA, Instrução Normativa Nº 1, de 4 de janeiro de 2013. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%20de%20Resultados%20ano%20safra%202011-2012%20.pdf Acesso em 04 jun. 2013.

BRASIL, MAPA, Instrução Normativa Nº 27, de 11 de dezembro de 2012. Define, para as culturas agrícolas de (...) no ano safra 2012/2013, os limites máximos de resíduos e de contaminantes tolerados para fins de monitoramentos de agrotóxicos, bem como os tipos de análises e número de amostras a serem coletados, e respectivas legendas, na forma dos Anexos I, II, III, IV, V e VI à presente Instrução Normativa. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/Ano%20safra%202012%20-%202013.pdf Acesso em 03 jun. 2013.

BRASIL. Decreto 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm Acesso em: 12 nov. 2012.

BRASIL. Lei Nº. 7.802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm Acesso em: 12 nov. 2011.

BRMASS, Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas. Espectrometria de Massas: princípios e aplicações. Livro eletrônico, disponível em: <http://www.espectrometriademassas.com.br/> Acesso em: 05 jul. 2013.

BRASIL. Portaria Normativa IBAMA Nº 84, de 15 de outubro de 1996. Brasília, DF. Disponível em: http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf Acesso em: 12 nov. 2011.

BRUNS, R. E., NETO, B. B., SCARMINO, I. S. **Como fazer experimentos**. Brasil, 2010. 414p.

CABRERA, L. C. C. et. al. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 227, ago. 2012.

CAPRIOTTI, A. L., CAVALIERE, C., LAGANÀ, A., PIOVESANA, S., SAMPERI, R. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry** v. 43, p 53-66, fev. 2013.

CARPINTEIRO I., RAMIL M., RODRÍGUEZ I., CELA R. Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, V. 1217, p. 7484-7492, out. 2010.

CERVERA, M. I., PORTOLÉS, T., PITARCH, E., BELTRÁN, J., HERNÁNDEZ, F. Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography**, v. 1244, p. 168-177, jun. 2012.

CHIARADIA M. C., COLLINS C. H., JARDIM I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à cromatografia de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, fev. 2008.

CODEX ALIMENTARIUS, **Pesticide Residues em Food and Feed**. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/details.html?id=113> Acesso em 03 jun. 2013.

CUNHA S. C., FERNANDES J. O., ALVES A., OLIVEIRA M.B.P.P. Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 119-126, 2009.

CURBELO, M. A. G., BORGES, J. H., PÉREZ, L. M. R., DELGADO, M. A. R. Insecticides extraction from banana leaves using a modified QuEChERS method. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1083-1090, abr. 2011.

DASGUPTA S., BANERJEE K., PATIL S. H., GHASTE M., DHUMAL K. N., ADSULE P.G. Optimization of two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for separation and estimation of the residues of 160 pesticides and 25 persistent organic pollutants in grape and wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3881-3889, abr. 2010.

DAUT, C. E., SIMON, J. A. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares do rio grande do sul. **Ciência Rural**, v. 31, ago.2001.

DELGADO, M. J. S., BARROSO, S. R., TOSTATO, G. T. F., DÍEZ, L. M. P., Stability studies of carbamate pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen–phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 287-296, jul. 2001.

ECONOMOU A., BOTISTI H., ANTONIOU S., TSIPI D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2009, 5856-5867, jun. 2009.

EMÍDIO, E. S. **Desenvolvimento, validação e aplicação de microextração em fase sólida e microextração em fase líquida para determinação de canabinóides em cabelo humano por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo tandem**. 2010, 144 f. Dissertação (Mestrado em química) Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão.

EU, **Pesticides database**. Disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=commodity.resultat Acesso em 03 jun. 2013

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Summary of world food and agriculture statistics**. Roma, 2010. Disponível em: http://typo3.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/documents/Summary_of_agricultural_statistics/Summary_of_world_and_agricultural_statistics_rev11oct2010_.pdf Acesso em 19 mar. 2013.

FAOSTAT. GLOSSARY. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: http://faostat3.fao.org/home/index.html#METADATA_GLOSSARY Acesso em 15 mai. 2012.

FERREIRA, I., FERNANDES, J. O., CUNHA, S. C. Optimization and validation of a method based in a QuEChERS procedure and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of multi-mycotoxins in popcorn. **Food Control**, v. 27, p. 188-193, set. 2012.

FILHO, A. M., SANTOSA, F. N., PEREIRA, P., A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346-354, abr. 2010.

FLORES, A. V., RIBEIRO, J. N., NEVES, A. A., QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 3, dez. 2004.

FRENICH, A. G., GONZÁLEZ, R. R., PÉREZ, M. L. G., VIDAL, J. L. M. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4349-4356, jul. 2011.

GARBI, A., SAKKAS V., FIAMENGOS, Y. C., STALIKAS, C. D., AALBANIS, T. Sensitive determination of pesticides residues in wine samples with the aid of single-drop microextraction and response surface methodology. **Talanta**, v. 82, p. 1286-1291, jul. 2010.

GARRIDO, L. R.. Produção Integrada de Frutas. In: **EMBRAPA**, Bento Gonçalves, 2010. Disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/prodint.html> Acesso em: 14 nov. 2011.

GUERRA, C. C. et.al. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. In: **EMBRAPA**, Bento Gonçalves, 2009. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf> Acesso em: 18 jan. 2012.

IMMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008, 2010. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratorios/calibEnsaio.asp> Acesso em: 12 nov. 2011.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. **Produção Integrada de Frutas**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/qualidade/prodFrutas.asp>. Acesso em 04 jun. 2013.

JEONG, I. S., KWAK, B. M., AHN, J. H., JEONG, S. H. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 133, p. 473-481, jul. 2012.

KEEAGAN, J. *et. Al.* Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 654, p. 111-119, nov. 2009.

KOESUKWIWAT, U., LEHOTAY, S. J., MIAO, S., LEEPIPATPIBOON, N. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6692-6703, out. 2010

KOLBERG D. I., PRESTES O.D., ADAIME M. B., ZANELLA R. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1436-1442, abr.2011.

LAMY, A. C. Participação Brasileira no Comitê de Resíduos de Pesticidas do Codex Alimentarius, 29ª Reunião Ordinária, In: MAPA, Brasília, DF, 2011. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Fruticultura/29RO/App_Coex.pdf Acesso em 14 nov. 2011.

LAMY, A. C. Codex Alimentarius e a participação brasileira no Comitê de Resíduos de Pesticidas, 22ª Reunião Ordinária, In: MAPA, Brasília, DF, 2010. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Hortalicas/22_reuniao/CODE_X.pdf. Acesso em 14 nov. 2011.

LAZZAROTTO, J. J., FIORAVANÇO, J. C. Tendências e sazonalidades nas exportações brasileiras de uva de mesa. **Informações econômicas**, São Paulo, v. 43, n. 1, jan/fev, 2013. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/ie/2013/tec4-0113.pdf> Acesso em: 15 mar. 2013.

LEHOTAY S.J., MASTOVSKA K., LIGHTFIELD A.R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 88, p. 615, 2005.

LEHOTAY S. J., SON K. A., KWON H., KOESUKWIWAT U., FU W., MASTOVSKA K., HOH E., LEEPIPATPIBOON N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548-2560, jan. 2010.

LI J., ZHANG, H. F., SHI Y. P. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh grape by hollow fibre sorptive extraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 127, p 784-790, jan. 2011.

LIMA, J. P. M. **Interação de pesticidas da família dos carbamatos com ácidos fúlvicos**. 2001. 154 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, 2001.

LOMBARDI, A. P. Z. **Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de *Cercospora coffeicola***. 2002, 141 f. Dissertação (Mestre em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2002.

LÓPEZ, B. G., REYES, J. F. G., LOZANO A., ALBA, A. R. F., DÍAZ, A. M. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6022-6035, set. 2010.

LU, D. et al. Simultaneous determination of 45 pesticides in fruit and vegetable using an improved QuEChERS method and on-line gel permeation chromatography–gas chromatography/mass spectrometer. **Journal of Chromatography A**, v. 895-896, p. 17-24, mai. 2012.

LUIZ, M. M. A., VIDAL, J. L. M., GONZÁLEZ, R. R., FRENICH, A. G. Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2171-2180, jun. 2012.

MAPAa. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Uva**. Brasília. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>. Acesso em: 15 mar. 2013.

MAPAb. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Resíduos e contaminantes**. Brasília. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/qualidade-seguranca-alimentos-bebidas/alimentos/residuos-e-contaminantes>. Acesso em 04 jun. 2013.

MARCHIS, D., FERRO, G.L., BRIZIO P., SQUADRONE S., ABETE, M. C. Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. **Food Control**, v. 25, p. 270-273, mai. 2012.

MARÇO, P.H., POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para a identificação de antocianinas. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, abr. 2008.

MARTINS, M. L. **Determinação de pesticidas e compostos relacionados em água de superfície e efluente industrial empregando extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2004. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MAŠTOVSKÁ, K., LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, jun. 2004.

MELO, A., CUNHA, S. C., MANSILHA, C., AGUIARC, A., PINHO, O., FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1071-1077, dez. 2012.

MIAO, Q., KONG, W., YANG, S. YANG, M. Rapid analysis of multi-pesticide residues in lotus seeds by a modified QuEChERS-based extraction and GC-ECD. **Chemosphere**, v. 91, p. 955-962, mai. 2013.

MIELE, A. et al. Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado. In: **EMBRAPA, SISTEMAS DE PRODUÇÃO 2**, Bento Gonçalves, 2003 (a). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/autores.htm> Acesso em: 14 nov. 2011.

MIELE, A. et al. Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado. In: **EMBRAPA, SISTEMAS DE PRODUÇÃO 4**. Bento Gonçalves, 2003 (b). Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/autores.htm> Acesso em: 14 nov. 2011.

MORAGAS, W. M., SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de geografia**, v. 3, p. 26-40, set. 2003.

MUSSATO, S. I., ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de silitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 94, jan. 2004.

NACHTIGAL, J. C., CAMARGO, U. A. Sistema de Produção de Uva de Mesa no Norte do Paraná. **EMBRAPA, Sistemas de Produção 10**, Bento Gonçalves, 2005. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteParana/index.htm> Acesso em 28 mar. 2013

ORSO, D. **Determinação de resíduos de agrotóxicos em mel empregando método QuEChERS modificado e GC-ECD**. 2011, 118 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

PATIL S. H., et.al. Multiresidue analysis of 83 pesticides and 12 dioxin-like polychlorinated biphenyls in wine by gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2307-2319, jan, 2009.

PEDROSO M. P., GODOY L. A. F., FIDÉLIS C. H. V., FERREIRA E. C., POPPI R. J., AUGUSTO F. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC). **Química Nova**, v. 32, p. 421-430, jan. 2009.

PÉREZ L. M. R., BORGES J. H., DELGADO M. A. R. Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape,

orange and pineapple fruit juices. **Journal of Chromatography A**, V. 1211, P. 33-42, out. 2008a.

PÉREZ, L. M. R., BORGES, J. H., MIQUEL, T. M. B., DELGADO M. A. R.; Solid-phase microextraction and sample stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines. **Food Chemistry**, v. 111, p. 764-770, abr, 2008b.

PLÖSSL, F. GIERA, M., BRACHER, F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 19-26, nov. 2006.

PRESTES O. D., et.al. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v 32, p1620-1634, jul. 2009.

PRESTES, O. D. **Desenvolvimento e validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em arroz polido utilizando método QuEChERS modificado, clean-up dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 51, mar. 2011.

RIBANI, M., et. al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, jun, 2004.

RIBAS, P. P., MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e ensino. **Revista Liberato**, v. 10, p. 149-158, dez. 2009.

RITSCEL, P.; SEBBEN, S. S. **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64 p.

RODRÍGUEZ, R. M. G., GRANDE, B. C., GÁNDARA, J. S. Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6033-6042, jun, 2009.

ROUVIÈRE, F., BULETÉ, A., OLIVÉ, C. C., ARNAUDGUILHEM, C. Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. **Talanta**, v. 93, p. 336-344, mai. 2012.

SALTON, A. A. Manual de produção de uvas de alta qualidade. In: **UVIBRA**, Bento Gonçalves, 2008. Disponível em: http://www.uvibra.com.br/comite_tecnico.html Acesso em 20 jan. 2012.

SANCHES, S. M. SILVA, C. H. T. P., CAMPOS, S. X. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Ecotoxilogia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, dez. 2003.

SANTOS, G. C.; MONTEIRO, M. Sistema orgânico na produção de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v 15, n.1, p. 73-86, 2004

SANTOS, V. M. R., DONNICI, C. L., DACOSTA, J.B. N., CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, p. 159-170, 2007.

SASSINE, A. **Determinação de pesticidas piretróides em leite bovino por meio da cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas de armadilha de iônica – GC/ITMS (“Ion Trap”).** 2002. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (autarquia associada à Universidade de São Paulo). São Paulo.

SATO, A. J. et al. Características físico-químicas e produtivas das uvas ‘Isabel’ e ‘BRS-Rúbea’ sobre diferentes porta-enxertos na região norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 553-556, jun. 2008.

SINHA, S. N., RAO, M. V. V., VASUDEV, K., ODETOKUN, M. A liquid chromatography mass spectrometry-based method to measure organophosphorous insecticide, herbicide and non-organophosphorous pesticide in grape and apple samples. **Food Control**, v. 25, p. 636-646, jun. 2012.

SIRHAN, A. Y., TAN, G. H., WONG, R. C. S. Method validation in the determination of aflatoxins in noodle samples using the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) and high performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC–FLD). **Food Control**, v. 22, p. 1807-1813, dez. 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Principles of Instrumental Analysis. USA, 850p. Editora: Bookman 6ª Edição, 2009.

SOARES, L. P. Curso Básico de Instrumentação para analistas de alimentos e fármacos. Barueri, SP, 2006, 338p.

SOLEAS, G., YAN, J., HOMA, K., GOLDBERG, D. M. Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 205-212, 2000.

SOUZA, A. V.; LIMA, G. P. P.; VIEITES R. L. Avaliação nutricional de diferentes variedades de uva (*Vitis* sp). **Naturalia**, v. 33, p. 100-109, 2010.

SOUZA, R.T. In: Uso de equipamentos de proteção individual na pulverização de videiras. In: **EMBRAPA, Circular N°67.** Bento Gonçalves, 2006. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir067.pdf> Acesso em: 12 nov. 2011.

STUBBINS, G., BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of

veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, p.68-78, abr. 2009.

SYMIGTON, S. B., FRISBIE, R. K., CLARK, J. M. Characterization of 11 commercial pyrethroids on the functional attributes of rat brain synaptosomes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, p. 61-69, jun. 2008.

SYNGENTA. Guia de Produtos – Junho de 2012. Disponível em: <http://www.servicos.syngenta.com.br/produtos/ProductDetails.aspx?idProduct=77> Acesso em jun. 2013.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227, jul, 2001.

WALORCZYK, S., DROŹDŹYNSKI D., GNUSOWSKI B. Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 1865-1870, set. 2011.

WANG, J., DU, Z., YU, W., QU, S. Detection of seven pesticides in cucumbers using hollow fibre-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, p. 10-17, jul. 2012.

WILKOWSKA, A., BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803-812, abr. 2011.

YANG, X., ZHANG, H., LIU, Y., WANG, J., ZHANG, Y.C., DONG, A. J., ZHAO, H. T., SUN, C. H., CUI, J. Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC–MS. **Food Chemistry**, v. 127, p. 855-865, jul.2011.

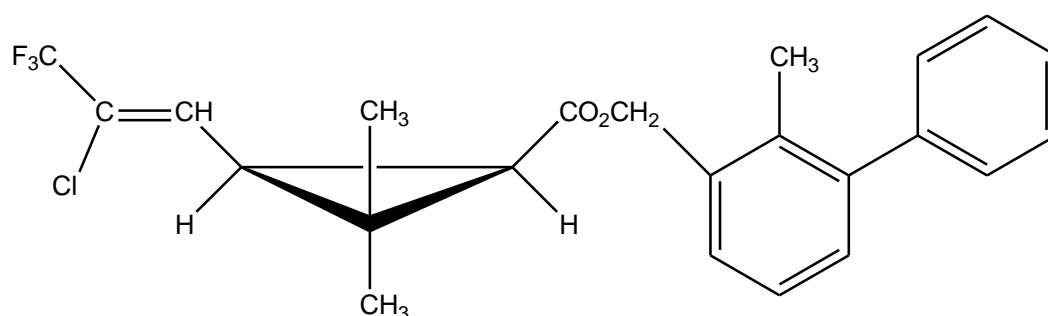
ZHAO, P. et al. Multi-walled carbon nanotubes as alternative reversed-dispersive solid phase extraction materials in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS method. **Journal of Chromatography A**, v. 1225, p. 17-25, fev, 2012.

Anexo 1 – Estrutura química e nomenclatura oficial dos agrotóxicos estudados

Bifentrina

Nomenclatura oficial: 2-methylbiphenyl-3-ylmethyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate

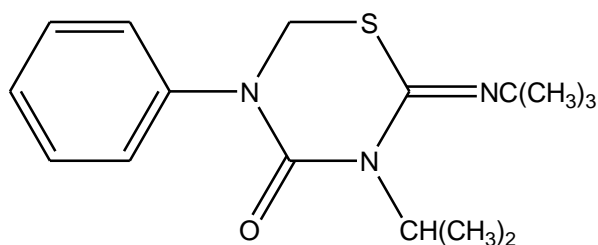
Estrutura química:



Buprofenzina

Nomenclatura oficial: 2-tert-butylimino-3-isopropyl-5-phenyl-1,3,5-thiadiazinan-4-one

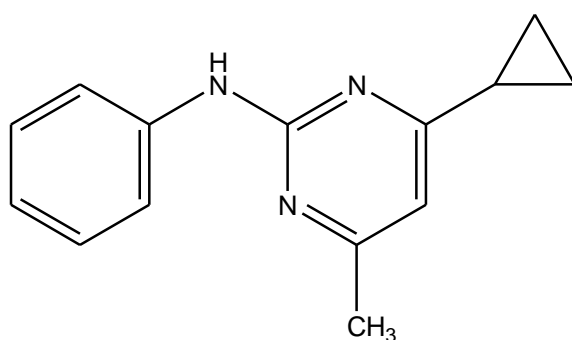
Estrutura química:



Ciprodinil

Nomenclatura oficial: 4-cyclopropyl-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine

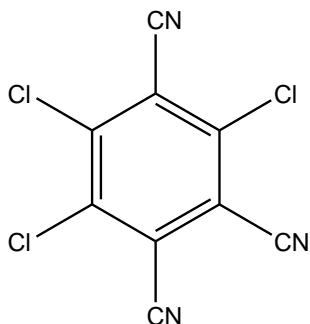
Estrutura química:



Clorotalonil

Nomenclatura oficial: 4-bromo-2-(4-chlorophenyl)-1-ethoxymethyl-5-(trifluoromethyl)pyrrole-3-carbonitrile

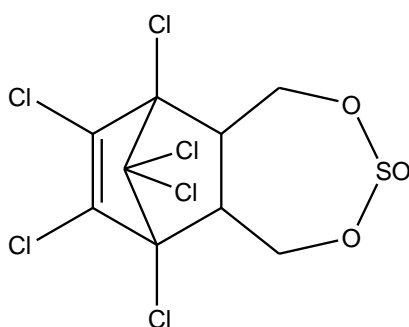
Estrutura química:



Endossulfan

Nomenclatura oficial: (1,4,5,6,7,7-hexachloro-8,9,10-trinorborn-5-en-2,3-ylenebis methylene) sulfite

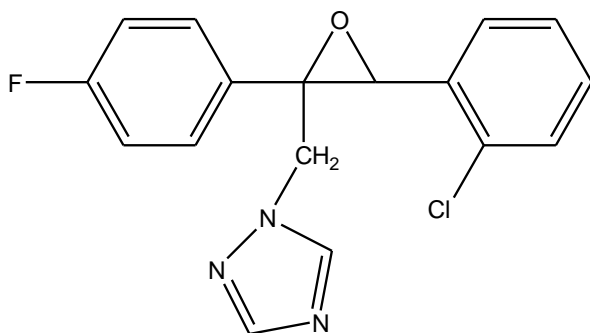
Estrutura química:



Epoxiconazol

Nomenclatura oficial: (2RS,3SR)-1-[3-(2-chlorophenyl)-2,3-epoxy-2-(4-fluorophenyl)propyl]-1H-1,2,4-triazole

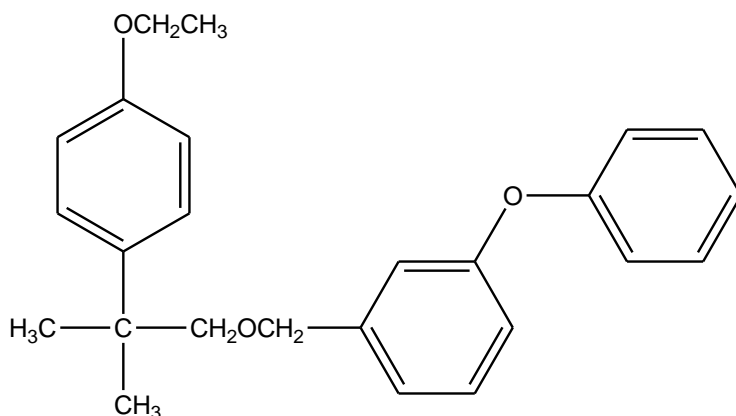
Estrutura química:



Etofenproxi

Nomenclatura oficial: 2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxy benzyl ether

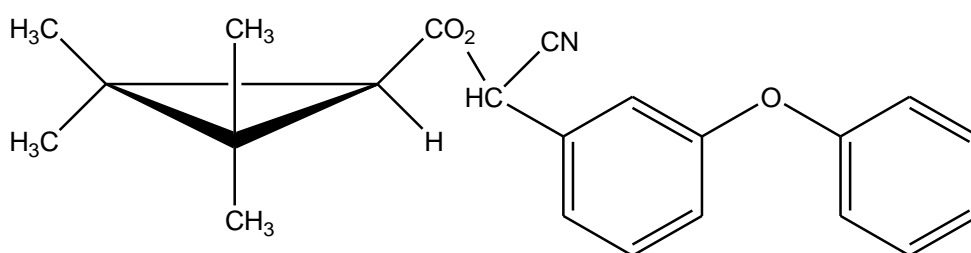
Estrutura química:



Fempropatrina

Nomenclatura oficial: (RS)-alfa-cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxylate

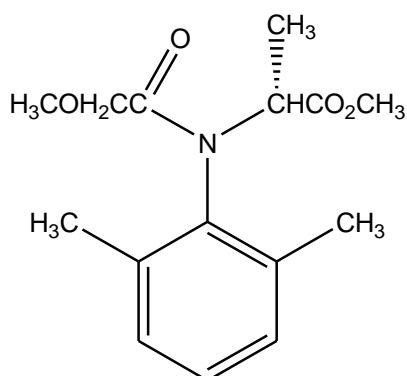
Estrutura química:



Metalaxil

Nomenclatura oficial: methyl N-methoxyacetyl-N-2,6-xylyl-D-alaninate

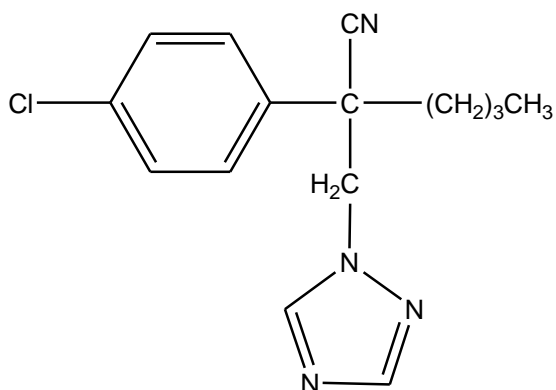
Estrutura química:



Miclobutanil

Nomenclatura oficial: 2-p-chlorophenyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)hexanenitrile

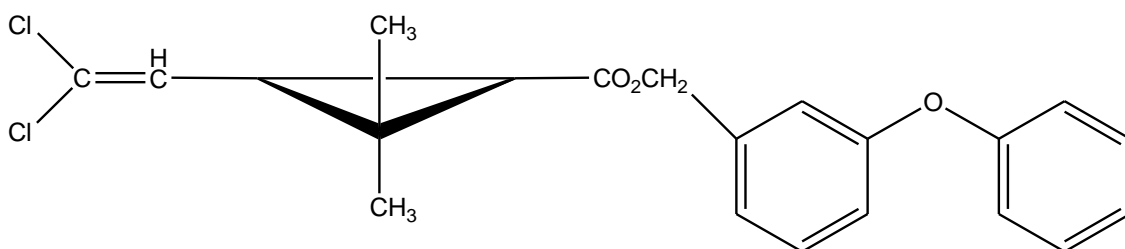
Estrutura química:



Permetrina

Nomenclatura oficial: 3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclo

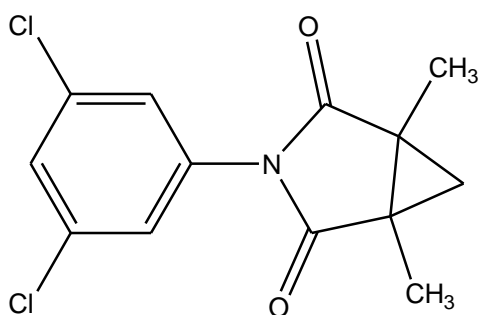
Estructura química:



Procimidona

Nomenclatura oficial: N-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide

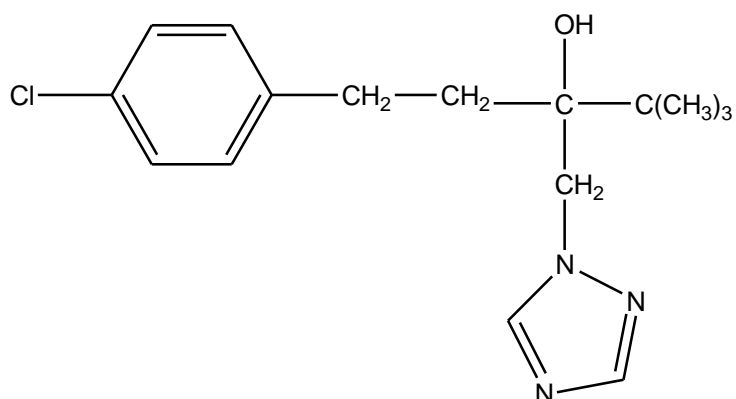
Estructura química:



Tebuconazol

Nomenclatura oficial: (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol

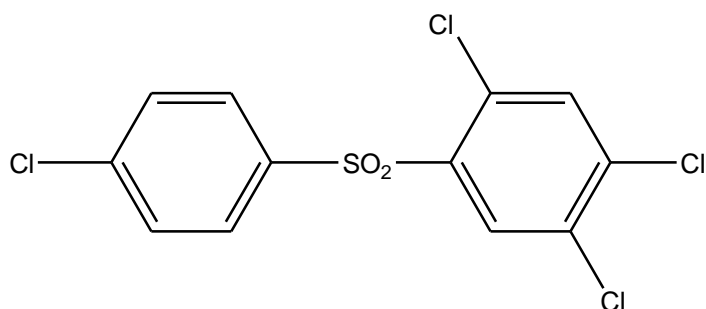
Estructura química:



Tetradifona

Nomenclatura oficial: 4-chlorophenyl 2,4,5-trichlorophenyl sulfone

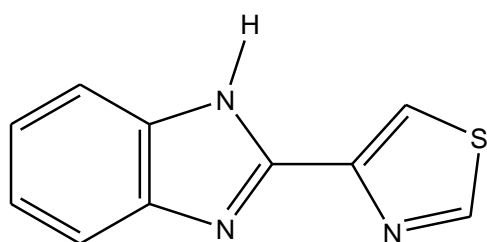
Estrutura química:



Tiabendazol

Nomenclatura oficial: 2-(thiazol-4-yl)benzimidazole

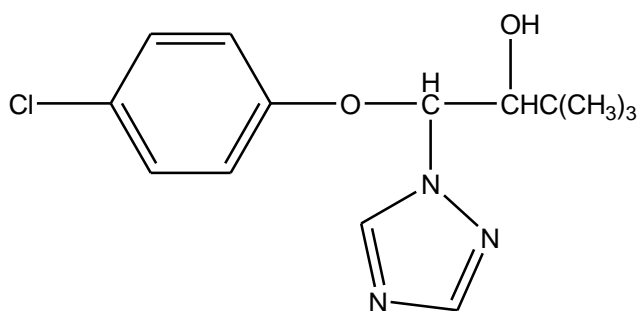
Estrutura química:



Triadimenol

Nomenclatura oficial: (1RS,2RS;1RS,2SR)-1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol

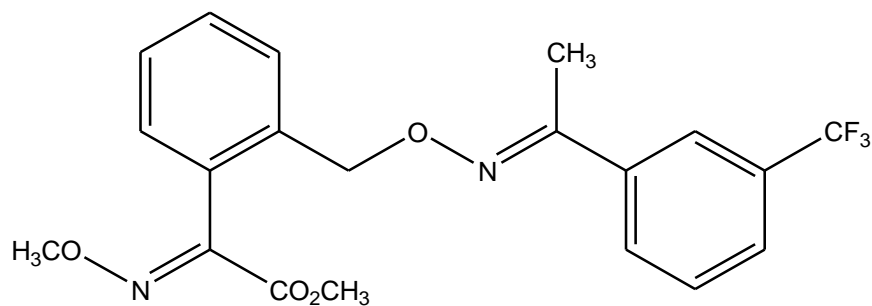
Estrutura química:



Trifloxistrobina

Nomenclatura oficial: methyl(E)-methoxyimino-{(E)-[1-(4-trifluoromethyl)ethylideneaminoxy]-otolyl}acetate

Estrutura química:



Anexo 2 – Recuperações médias obtidas para os agrotóxicos estudados e seus respectivos RSD

	A1					
	0,05 mg kg ⁻¹		0,5 mg kg ⁻¹		2,0 mg kg ⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	153	2,0	83	13,1	101	22,9
METALAXIL	162	1,0	74	13,4	102	11,5
TRIADIMEFOM	ND	-	83	8,2	101	23,0
CIPRODINIL	116	2,0	90	4,6	101	7,2
PROCIMIDONA	105	13,8	106	8,0	100	7,8
ENDOSSULFAN ALFA	104	17,8	100	7,9	100	9,4
MICLOBUTANIL	205	0,2	68	14,7	102	13,7
BUPROFENZINA	101	18,7	97	3,5	100	8,7
ENDOSSULFAN BETA	116	3,1	105	8,1	100	8,8
TRIFLAXISTRABINA	141	1,9	80	3,0	101	10,8
ENDOSSULFAN SULFATO	151	0,2	84	13,0	101	27,0
TEBUCONAZOL	ND	-	71	6,9	102	13,9
EPOXICONAZOL	ND	-	76	5,0	102	14,0
BIFENTRINA	104	12,5	97	4,5	100	8,8
FEMPROPATRINA	ND	-	87	16,7	101	20,5
TETRADIFONA	115	3,0	94	5,3	100	12,6
PERMETRINA CIS	144	10,9	80	3,8	101	10,1
PERMETRINA TRANS	153	3,3	77	4,4	101	10,8
ETOFEMPROXI	172	0,5	71	6,1	102	12,2
	B1					
	0,05 mg kg ⁻¹		0,5 mg kg ⁻¹		2,0 mg kg ⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	93	4,9	104	8,9	100	6,9
METALAXIL	148	10,5	82	11,9	101	9,3
TRIADIMEFOM	ND	-	87	5,3	101	8,0
CIPRODINIL	93	7,3	100	9,2	100	5,0
PROCIMIDONA	74	8,6	115	14,4	99	6,2
ENDOSSULFAN ALFA	95	18,2	103	10,5	100	2,4
MICLOBUTANIL	162	19,9	80	15,1	101	11,0
BUPROFENZINA	75	4,8	107	11,6	100	8,4
ENDOSSULFAN BETA	81	36,1	106	5,4	100	11,3
TRIFLAXISTRABINA	91	27,5	100	10,7	100	10,4
ENDOSSULFAN SULFATO	64	22,5	109	11,7	99	0,6
TEBUCONAZOL	ND	-	91	12,0	101	5,7
EPOXICONAZOL	165	9,2	81	9,0	101	15,3
BIFENTRINA	71	5,7	108	13,0	100	11,4
FEMPROPATRINA	78	38,0	101	6,6	96	4,9
TETRADIFONA	97	9,2	104	10,0	100	5,5
PERMETRINA CIS	115	26,5	89	5,6	101	6,8
PERMETRINA TRANS	110	9,1	90	6,7	101	7,7

ETOFEMPROXI	143	1,3	80	1,9	101	5,8
	A2					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	ND	-	43	49,1	104	16,1
METALAXIL	135	11,3	85	4,8	101	6,2
TRIADIMEFOM	ND	-	73	5,0	102	2,4
CIPRODINIL	ND	-	65	8,0	102	21,9
PROCIMIDONA	101	10,1	99	3,3	100	6,8
ENDOSSULFAN ALFA	139	9,3	91	3,1	101	8,8
MICLOBUTANIL	173	1,1	71	16,5	102	9,3
BUPROFENZINA	102	9,8	100	2,2	100	7,5
ENDOSSULFAN BETA	153	2,4	81	8,2	101	16,4
TRIFLAXISTRABINA	145	8,8	82	8,3	101	2,8
ENDOSSULFAN SULFATO	ND	-	57	34,2	103	5,4
TEBUCONAZOL	ND	-	63	6,9	102	6,5
EPOXICONAZOL	ND	-	52	17,0	103	17,7
BIFENTRINA	145	9,1	83	1,0	101	6,5
FEMPROPATRINA	ND	-	55	32,7	103	8,2
TETRADIFONA	167	8,5	79	1,6	101	11,1
PERMETRINA CIS	186	6,8	69	1,8	102	10,0
PERMETRINA TRANS	198	5,4	65	1,5	102	9,5
ETOFEMPROXI	224	4,5	58	2,2	103	16,0
	B2					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	ND	-	66	8,4	102	30,9
METALAXIL	140	9,7	85	7,0	101	3,8
TRIADIMEFOM	ND	-	65	12,8	102	9,8
CIPRODINIL	ND	-	58	13,2	103	10,0
PROCIMIDONA	121	10,8	92	9,6	100	2,4
ENDOSSULFAN ALFA	149	19,9	84	2,6	101	2,0
MICLOBUTANIL	210	8,2	64	4,6	102	17,8
BUPROFENZINA	112	3,4	95	5,0	100	3,4
ENDOSSULFAN BETA	148	7,6	85	4,7	101	3,2
TRIFLAXISTRABINA	139	11,7	84	6,1	101	4,1
ENDOSSULFAN SULFATO	148	18,5	86	3,6	101	27,1
TEBUCONAZOL	ND	-	50	40,9	103	4,4
EPOXICONAZOL	ND	-	47	3,6	103	4,5
BIFENTRINA	156	7,1	78	10,0	101	2,2
FEMPROPATRINA	173	8,9	72	7,7	102	6,8
TETRADIFONA	181	3,3	75	13,5	102	4,6
PERMETRINA CIS	224	5,5	57	11,0	103	5,4
PERMETRINA TRANS	224	2,4	56	12,4	103	4,6
ETOFEMPROXI	ND	-	43	20,4	103	8,7

A3						
	0,05 mg kg ⁻¹		0,5 mg kg ⁻¹		2,0 mg kg ⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	ND	-	67	24,7	102	18,0
METALAXIL	148	7,5	79	6,0	101	5,4
TRIADIMEFOM	ND	-	66	7,4	102	10,4
CIPRODINIL	111	5,7	93	3,6	100	8,8
PROCIMIDONA	136	7,4	101	1,4	100	5,0
ENDOSSULFAN ALFA	132	11,5	89	5,3	101	6,7
MICLOBUTANIL	181	2,9	69	11,6	102	26,2
BUPROFENZINA	92	7,6	101	3,1	100	5,6
ENDOSSULFAN BETA	108	3,0	90	4,3	101	8,9
TRIFLAXISTRABINA	144	7,7	79	8,4	101	9,9
ENDOSSULFAN SULFATO	ND	-	63	12,6	102	16,9
TEBUCONAZOL	ND	-	69	4,4	102	9,0
EPOXICONAZOL	ND	-	65	16,9	102	6,7
BIFENTRINA	110	9,7	92	5,5	100	7,8
FEMPROPATRINA	ND	-	60	18,6	102	19,4
TETRADIFONA	126	8,6	92	3,9	100	7,6
PERMETRINA CIS	157	2,9	77	2,5	101	9,9
PERMETRINA TRANS	155	3,2	76	5,5	101	10,0
ETOFEMPROXI	164	1,9	72	7,5	102	9,3
B3						
	0,05 mg kg ⁻¹		0,5 mg kg ⁻¹		2,0 mg kg ⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	102	29,1	100	7,4	100	1,6
METALAXIL	120	16,2	91	2,0	101	2,5
TRIADIMEFOM	ND	-	80	2,2	101	0,4
CIPRODINIL	103	24,7	98	3,0	100	2,9
PROCIMIDONA	113	32,8	105	3,5	100	1,7
ENDOSSULFAN ALFA	126	13,2	95	4,4	100	2,1
MICLOBUTANIL	149	12,9	78	13,0	101	12,0
BUPROFENZINA	78	38,5	108	3,7	100	3,4
ENDOSSULFAN BETA	94	41,7	106	0,9	100	2,7
TRIFLAXISTRABINA	105	22,6	97	4,3	100	2,2
ENDOSSULFAN SULFATO	115	32,7	95	4,5	100	3,8
TEBUCONAZOL	205	12,7	73	8,2	102	7,2
EPOXICONAZOL	ND	-	62	12,3	102	12,6
BIFENTRINA	97	23,9	101	1,9	100	4,2
FEMPROPATRINA	102	20,1	98	2,6	100	3,3
TETRADIFONA	107	25,1	100	1,4	100	2,8
PERMETRINA CIS	139	5,1	85	3,1	101	2,2
PERMETRINA TRANS	129	7,8	86	4,9	101	2,8
ETOFEMPROXI	166	3,6	73	26,4	102	6,9
A4						

	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
CLOROTALONIL	ND	-	66	22,4	102	19,9
METALAXIL	108	3,0	92	7,5	100	6,4
TRIADIMEFOM	ND	-	64	19,8	102	9,6
CIPRODINIL	ND	-	60	32,2	102	21,0
PROCIMIDONA	101	4,7	103	2,5	100	2,6
ENDOSSULFAN ALFA	98	10,7	98	3,8	100	1,9
MICLOBUTANIL	203	6,5	64	15,1	102	9,4
BUPROFENZINA	87	3,1	102	0,3	100	1,5
ENDOSSULFAN BETA	93	9,1	97	8,3	100	2,5
TRIFLAXISTRABINA	110	2,4	91	7,9	101	4,5
ENDOSSULFAN SULFATO	114	18,4	88	17,5	101	3,1
TEBUCONAZOL	ND	-	65	9,6	102	13,2
EPOXICONAZOL	ND	-	51	16,2	103	30,4
BIFENTRINA	106	3,2	94	3,7	100	0,4
FEMPROPATRINA	138	6,5	79	16,6	101	3,2
TETRADIFONA	128	6,6	89	6,8	101	0,6
PERMETRINA CIS	178	3,0	70	10,9	102	7,0
PERMETRINA TRANS	179	3,8	68	8,9	102	4,3
ETOFEMPROXI	245	0,1	52	12,4	103	7,4
	B5					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	ND	-	59	11,4	102	9,9
METALAXIL	137	19,4	87	1,0	101	4,5
TRIADIMEFOM	ND	-	64	25,2	102	0,9
CIPRODINIL	205	5,7	63	12,0	102	5,4
PROCIMIDONA	132	18,7	92	4,1	100	2,8
ENDOSSULFAN ALFA	158	8,3	84	8,3	101	3,4
MICLOBUTANIL	220	13,7	62	23,6	102	5,8
BUPROFENZINA	126	15,1	93	4,8	100	2,7
ENDOSSULFAN BETA	133	26,7	88	8,6	101	5,0
TRIFLAXISTRABINA	147	23,5	82	4,6	101	2,3
ENDOSSULFAN SULFATO	183	15,2	76	11,4	101	3,4
TEBUCONAZOL	ND	-	68	15,9	102	15,9
EPOXICONAZOL	ND	-	48	17,5	103	8,7
BIFENTRINA	165	10,9	78	4,7	101	2,4
FEMPROPATRINA	165	15,6	76	6,2	101	4,1
TETRADIFONA	166	27,4	78	6,0	101	2,5
PERMETRINA CIS	222	6,0	59	11,4	102	2,9
PERMETRINA TRANS	223	9,5	60	11,1	102	3,1
ETOFEMPROXI	ND	-	46	5,5	103	9,7
	A6					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	160	6,0	78	5,5	101	3,7

METALAXIL	195	2,1	67	60,1	102	2,4	
TRIADIMEFOM	ND	-	65	13,9	102	7,7	
CIPRODINIL	123	4,9	90	2,3	101	0,7	
PROCIMIDONA	104	7,4	108	4,1	99	2,4	
ENDOSSULFAN ALFA	147	6,2	87	2,2	101	4,5	
MICLOBUTANIL	200	3,6	64	5,3	102	3,8	
BUPROFENZINA	126	7,7	92	5,5	100	2,6	
ENDOSSULFAN BETA	127	14,5	93	2,9	100	3,6	
TRIFLAXISTRABINA	146	9,9	88	2,4	101	1,4	
ENDOSSULFAN SULFATO	130	3,7	87	6,0	101	4,5	
TEBUCONAZOL	ND	-	63	41,7	102	14,6	
EPOXICONAZOL	236	1,2	59	21,6	103	11,8	
BIFENTRINA	119	2,5	97	1,6	100	5,6	
FEMPROPATRINA	115	13,3	92	5,6	100	4,0	
TETRADIFONA	124	3,7	94	0,4	100	2,8	
PERMETRINA CIS	128	5,6	89	1,8	101	2,9	
PERMETRINA TRANS	122	8,9	89	2,5	101	4,9	
ETOFEMPROXI	135	0,7	81	7,2	101	5,6	
	B6						
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹		
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	
CLOROTALONIL	108	19,5	110	5,3	99	8,8	
METALAXIL	119	4,6	95	4,8	100	3,2	
TRIADIMEFOM	ND	-	78	5,8	101	3,7	
CIPRODINIL	103	5,3	100	2,3	100	4,4	
PROCIMIDONA	108	14,1	105	5,2	100	3,6	
ENDOSSULFAN ALFA	147	18,8	96	9,1	100	2,0	
MICLOBUTANIL	ND	-	69	10,0	102	18,3	
BUPROFENZINA	105	16,6	103	3,7	100	1,3	
ENDOSSULFAN BETA	124	2,8	102	3,9	100	4,3	
TRIFLAXISTRABINA	115	22,8	99	3,5	100	1,5	
ENDOSSULFAN SULFATO	122	0,7	100	3,9	100	9,2	
TEBUCONAZOL	ND	-	64	4,0	102	18,8	
EPOXICONAZOL	ND	-	64	36,6	102	9,0	
BIFENTRINA	95	11,9	104	3,7	100	2,7	
FEMPROPATRINA	90	4,7	105	2,0	100	4,2	
TETRADIFONA	114	9,2	99	0,6	100	5,4	
PERMETRINA CIS	103	3,6	99	2,3	100	4,5	
PERMETRINA TRANS	98	3,4	100	3,5	100	2,7	
ETOFEMPROXI	118	5,7	92	6,3	101	2,9	
	A7						
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹		
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	
CLOROTALONIL	ND	-	71	13,7	102	16,9	
METALAXIL	99	23,1	97	7,2	100	4,0	
TRIADIMEFOM	ND	-	71	12,8	102	4,6	

CIPRODINIL	106	3,9	101	7,8	100	4,9
PROCIMIDONA	111	19,4	113	6,9	99	2,4
ENDOSSULFAN ALFA	108	6,9	101	3,3	100	3,2
MICLOBUTANIL	186	4,2	71	6,0	102	3,3
BUPROFENZINA	74	10,7	114	8,8	99	2,4
ENDOSSULFAN BETA	80	62,6	105	6,1	100	1,1
TRIFLAXISTRABINA	92	47,8	101	7,0	100	5,0
ENDOSSULFAN SULFATO	ND	-	74	17,1	102	9,1
TEBUCONAZOL	190	5,0	78	0,8	101	13,0
EPOXICONAZOL	201	17,1	71	22,8	102	7,4
BIFENTRINA	124	20,1	105	6,1	100	3,2
FEMPROPATRINA	ND	-	95	10,6	100	6,8
TETRADIFONA	107	6,5	104	8,1	100	5,1
PERMETRINA CIS	99	18,0	100	6,2	100	3,6
PERMETRINA TRANS	99	16,8	98	6,9	100	3,2
ETOFEMPROXI	94	10,1	96	7,8	100	0,5
	B7					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	112	35,4	101	2,5	100	5,9
METALAXIL	97	26,1	101	3,6	100	2,9
TRIADIMEFOM	ND	-	85	7,7	101	2,4
CIPRODINIL	98	20,2	104	4,9	100	3,3
PROCIMIDONA	97	26,9	113	7,9	99	2,6
ENDOSSULFAN ALFA	111	15,8	98	1,1	100	0,8
MICLOBUTANIL	182	4,8	72	21,2	102	9,2
BUPROFENZINA	75	50,2	113	4,6	99	4,3
ENDOSSULFAN BETA	56	67,4	110	7,0	99	2,2
TRIFLAXISTRABINA	94	29,5	108	5,2	100	1,6
ENDOSSULFAN SULFATO	111	32,1	100	4,5	100	4,7
TEBUCONAZOL	192	24,6	75	8,1	102	11,3
EPOXICONAZOL	209	3,5	66	15,0	102	8,4
BIFENTRINA	80	21,3	111	5,3	99	1,9
FEMPROPATRINA	89	18,9	106	4,7	100	5,6
TETRADIFONA	97	14,4	106	5,5	100	2,7
PERMETRINA CIS	99	15,1	102	3,6	100	2,8
PERMETRINA TRANS	102	20,1	100	7,3	100	1,8
ETOFEMPROXI	100	8,3	97	8,2	100	5,3
	A8					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	ND	-	62	7,6	102	10,5
METALAXIL	113	17,2	88	4,8	101	6,2
TRIADIMEFOM	ND	-	65	4,3	102	4,6
CIPRODINIL	97	23,8	97	4,6	100	6,0
PROCIMIDONA	130	12,4	96	5,3	100	4,5

ENDOSSULFAN ALFA	124	9,3	93	2,5	100	1,8
MICLOBUTANIL	216	3,8	59	7,3	103	15,6
BUPROFENZINA	99	21,2	101	5,2	100	4,7
ENDOSSULFAN BETA	105	9,2	93	8,0	100	3,7
TRIFLAXISTRABINA	106	14,9	95	4,3	100	3,5
ENDOSSULFAN SULFATO	172	7,0	76	3,0	101	4,1
TEBUCONAZOL	ND	-	71	16,1	102	6,0
EPOXICONAZOL	254	9,9	52	23,7	103	19,6
BIFENTRINA	119	14,2	102	4,7	100	7,8
FEMPROPATRINA	127	21,7	84	5,6	101	5,7
TETRADIFONA	132	14,1	92	4,3	100	6,5
PERMETRINA CIS	91	3,3	101	2,2	100	8,5
PERMETRINA TRANS	98	3,5	98	6,6	100	7,4
ETOFEMPROXI	111	7,6	91	6,9	101	9,7
	B8					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	131	13,1	92	9,6	100	6,1
METALAXIL	115	10,7	97	10,1	100	7,2
TRIADIMEFOM	ND	-	84	5,1	101	5,9
CIPRODINIL	111	11,6	100	11,0	100	4,1
PROCIMIDONA	118	19,4	101	14,2	100	5,2
ENDOSSULFAN ALFA	ND	-	97	9,7	100	5,9
MICLOBUTANIL	192	1,5	68	3,1	102	6,2
BUPROFENZINA	100	5,7	109	10,7	99	6,5
ENDOSSULFAN BETA	139	23,9	102	18,4	100	3,1
TRIFLAXISTRABINA	123	37,0	102	10,1	100	5,3
ENDOSSULFAN SULFATO	147	15,6	97	7,5	100	7,4
TEBUCONAZOL	ND	-	73	1,1	102	20,3
EPOXICONAZOL	ND	-	58	0,9	103	6,1
BIFENTRINA	108	8,9	102	10,1	100	6,3
FEMPROPATRINA	119	7,0	98	7,3	100	4,6
TETRADIFONA	145	1,9	98	12,5	100	6,2
PERMETRINA CIS	91	12,6	105	12,3	100	7,4
PERMETRINA TRANS	86	16,4	107	12,0	100	5,3
ETOFEMPROXI	107	2,6	98	11,0	100	5,1
	A9					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	ND	-	70	6,4	102	8,0
METALAXIL	95	1,8	104	4,3	100	2,5
TRIADIMEFOM	ND	-	92	6,1	101	2,8
CIPRODINIL	91	6,0	103	2,4	100	5,1
PROCIMIDONA	118	5,2	100	6,7	100	2,2
ENDOSSULFAN ALFA	114	6,0	100	7,3	100	6,2
MICLOBUTANIL	ND	-	63	4,2	102	6,6

BUPROFENZINA	94	10,6	105	4,8	100	2,9
ENDOSSULFAN BETA	126	38,7	100	6,4	100	3,4
TRIFLAXISTRABINA	93	26,8	110	4,6	99	3,4
ENDOSSULFAN SULFATO	ND	-	80	6,4	101	7,0
TEBUCONAZOL	ND	-	81	4,0	101	14,7
EPOXICONAZOL	ND	-	64	8,1	102	5,1
BIFENTRINA	122	1,4	114	6,0	99	5,5
FEMPROPATRINA	69	66,8	97	3,0	100	6,9
TETRADIFONA	105	11,8	102	6,8	100	3,7
PERMETRINA CIS	76	7,7	109	6,2	99	3,6
PERMETRINA TRANS	74	11,8	108	4,4	99	2,6
ETOFEMPROXI	88	5,6	102	1,3	100	4,5
	B9					
	0,05 mg kg⁻¹		0,5 mg kg⁻¹		2,0 mg kg⁻¹	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
CLOROTALONIL	130	8,6	92	4,8	100	18,4
METALAXIL	90	23,6	105	3,7	100	17,9
TRIADIMEFOM	ND	-			103	7,1
CIPRODINIL	100	12,1	104	4,2	100	21,2
PROCIMIDONA	106	9,7	104	3,1	100	21,3
ENDOSSULFAN ALFA	ND	-	98	2,7	100	18,3
MICLOBUTANIL	ND	-	68	16,0	102	15,8
BUPROFENZINA	84	23,5	107	2,0	100	18,6
ENDOSSULFAN BETA	ND	-	109	2,1	100	20,9
TRIFLAXISTRABINA	122	29,4	104	7,5	100	20,6
ENDOSSULFAN SULFATO	ND	-	95	4,3	100	20,0
TEBUCONAZOL	ND	-	52	21,9	103	26,5
EPOXICONAZOL	ND	-	70	5,3	102	23,3
BIFENTRINA	105	11,1	104	1,8	100	21,1
FEMPROPATRINA	102	16,0	103	2,7	100	20,8
TETRADIFONA	111	16,2	100	11,8	100	21,7
PERMETRINA CIS	95	15,9	106	0,8	100	22,0
PERMETRINA TRANS	89	12,6	108	2,8	100	20,7
ETOFEMPROXI	109	3,7	97	3,7	100	22,1