

**CARLOS EDUARDO DOS SANTOS SOARES**

**EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA  
E SEU EMPREGO NA ANÁLISE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM  
UVA E DERIVADOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agroquímica, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011**

# CARLOS EDUARDO DOS SANTOS SOARES

## EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO A BAIXA TEMPERATURA E SEU EMPREGO NA ANÁLISE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM UVA E DERIVADOS

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Agroquímica, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de fevereiro de 2011

---

Prof. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
(Co-orientadora)

---

Prof. Daniele Cristiane Menezes

---

Prof. Regina Célia Santos Mendonça

---

Prof. Carlos Roberto Bellato

---

Prof. Antônio Augusto Neves  
(Orientador)

*“Eu sou a videira, vós os ramos.  
Quem permanece em mim e Eu nele,  
Esse dá muitos frutos,  
Porque sem mim nada podeis fazer.”*

*Jo 15,5*

*A Deus,  
Aos meus pais José e Terezinha,  
Aos meus irmãos Cláudio e Camilo,  
A Patrícia,*

*Pelo amor e apoio incondicionais,  
dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram com a realização do presente estudo.

A Deus, que em todos os momentos me sustentou e me deu forças para continuar pois sem Ele nada teria sido realizado.

A meus pais, José e Terezinha, que me incentivaram e amaram de forma incondicional. Obrigado por tudo.

Aos meus irmãos Cláudio e Camilo, minha cunhada Marisa e meus sobrinhos Matheus e Daniel pelo carinho e incentivo.

A minha namorada Patrícia por me amar e em todos os momentos me apoiar e me dar forças para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Química, que contribuiu para a realização deste trabalho.

A CAPES/REUNI pela concessão da bolsa de estudos.

Em especial, aos professores Antônio Augusto Neves e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pelos ensinamentos transmitidos, incentivo, pela dedicada orientação e, sobretudo, pela amizade sincera.

Ao Ricardo, pela disposição em me ajudar e por tornar o ambiente de trabalho um local agradável e descontraído.

Aos amigos, Bruno Henrique, Franck, Herbert, Lidiane, Lívio, e tantos outros que estiveram presentes nesta fase da minha vida.

A todos os amigos do laboratório de química analítica - LAQUA: Adley, Adrianna, Alessandra, Anna Isabel, Armanda, Bárbara Diniz, Bárbara Sábato, Bruno, Carol, Cláudia, Elenice, Elisa, Fernanda, Flaviane, Guilherme, Iara, Juliana, Laercio, Lívia, Luciana, Luiz Manoel, Nayara, Renata, Romenique Simone Goulart, Simone Mairink, Soraia e Tamires, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

CARLOS EDUARDO DOS SANTOS SOARES, filho de José Soares da Silva e Terezinha Maria dos Santos Silva, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 11 de junho de 1983.

Em março de 2004, iniciou o curso de Graduação em Química pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como bacharel e licenciado em janeiro de 2009. Em março deste mesmo ano, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2011.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xii
RESUMO .....	xviii
ABSTRACT .....	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1- Agrotóxicos .....	3
2.2- Classificação dos agrotóxicos .....	5
2.3- Resíduos de agrotóxicos e o meio ambiente .....	11
2.4- Características da cultura de uva .....	12
2.4.1- O cultivo de uva no Brasil .....	15
2.4.2 - Controle de pragas no cultivo da uva .....	16
2.5- Agrotóxicos escolhidos para estudo .....	21
2.6- Técnicas de extração de multirresíduos .....	22
2.7- Técnicas de análise multirresíduo .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
Objetivos gerais .....	26
Objetivos específicos .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1. Preparo de soluções-padrão .....	27
4.2. Amostras de uva .....	27
4.3. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) .....	28
4.3.1. Preparo e fortificação das amostras de uva .....	28
4.3.2. Extração dos agrotóxicos em uva .....	28
4.4. Otimização da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura ...	29
4.4.1. Avaliação da mistura extratora ideal .....	30
4.4.2. Avaliação do tipo de homogeneização da amostra com a mistura extratora .....	32
4.4.3. Avaliação do tempo de homogeneização da amostra com a mistura extratora .....	33
4.4.4. Avaliação do efeito da força iônica .....	33
4.4.5. Avaliação do efeito do pH .....	33
4.4.6. Avaliação do tempo de congelamento das amostras .....	34
4.5. Análise cromatográfica .....	34

4.6. Validação do método analítico .....	35
4.6.1. Seletividade .....	35
4.6.2. Linearidade de resposta do método.....	36
4.6.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método .....	37
4.6.4. Exatidão.....	37
4.6.5. Precisão.....	37
4.6.5.1. Repetitividade.....	37
4.6.5.2. Precisão intermediária.....	38
4.7. Influência do efeito de matriz dos componentes da uva na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa.....	38
4.8. Aplicação da técnica ESL-PBT otimizada em amostras de uva .....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
5.1. Análise cromatográfica.....	40
5.2. Otimização da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura ...	41
5.2.1. Avaliação da mistura extratora ideal .....	41
5.2.2. Avaliação do tipo de homogeneização da amostra com a mistura extratora .....	43
5.2.3. Avaliação do tempo de homogeneização da amostra com a mistura extratora .....	44
5.2.4. Avaliação do efeito da força iônica .....	45
5.2.5. Avaliação do efeito do pH.....	52
5.2.6. Avaliação do tempo de congelamento das amostras.....	54
5.2.7. Escolha do padrão interno.....	54
5.3. Metodologia otimizada .....	49
5.4. Validação do método analítico .....	50
5.4.1. Considerações sobre validação .....	50
5.4.2. Seletividade .....	50
5.4.3. Linearidade de resposta do método.....	51
5.4.4. Limite de detecção e limite de quantificação .....	58
5.4.5. Exatidão.....	60
5.4.6. Precisão.....	63
5.4.6.1. Repetitividade.....	63
5.4.6.2. Precisão intermediária.....	64
5.5. Influência dos componentes da uva na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa .....	65
5.5.1. Superposição de matriz.....	66
5.6 Aplicação da técnica ESL-PBT otimizada em amostras de uva e suco de uva industrializados .....	77
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AchE;Ec 3.1.1.7- Acetilcolesterase

AGROFIT - Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPA- Boas práticas agrícolas

CG-DCE - Cromatógrafo a Gás com Detector por Captura de Elétrons

CG-MS- Cromatógrafo a Gás acoplado ao espectrometro de massa

CV - Coeficiente de Variação

DDT- [1,1,1-tricloro-2-bis-(pclorofenila)-etano

DMFS - Dispersão de Matriz em Fase Sólida

DV - Desvio-Padrão

ECD- Detector por captura de elétrons

EFS - Extração em Fase Sólida

ELL - Extração Líquido-Líquido

ELL-PBT - Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESL - Extração Sólido-Líquido

ESL-PBT - Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA- Ingestão Diária Aceitável

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LAQUA - Laboratório de Química Analítica

LD - Limite de Detecção

LMR - Limite Máximo de Resíduo

LQ - Limite de Quantificação

MEFS - Microextração em Fase Sólida

MMQO- Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

NA- Não Autorizado

ND- Não Detectado

OPM- Oscilações por minuto

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PBT- Partição a Baixa Temperatura

pH- Potencial hidrogênico

PIS- Partição Induzida por Sal

$R^2$  - Coeficiente de Correlação

R % - Porcentagem de Recuperação

$t_R$  - Tempo de Retenção

UFV- Universidade Federal de Viçosa

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01.** Composição nutricional da polpa de uva

**Tabela 02.** Compostos escolhidos para estudo

**Tabela 03.** Valores máximos permitidos para os agrotóxicos estudados para a cultura da uva

**Tabela 04.** Parâmetros avaliados durante a otimização da técnica ESL-PBT para amostras de uva e os níveis avaliados

**Tabela 05.** Composição das misturas extratoras sem acetonitrila empregadas em amostras de uvas fortificadas

**Tabela 06.** Composição das misturas extratoras empregadas usando baixo volume de acetonitrila em amostras de uvas fortificadas

**Tabela 07.** Composição das misturas extratoras propostas por Costa (2010), empregadas em amostras de uvas fortificadas

**Tabela 08.** Concentrações dos analitos para avaliar o efeito de matriz

**Tabela 09.** Relação das amostras de uva analisadas por mercado

**Tabela 10.** Equações de regressão linear e os coeficientes de correlação para os doze agrotóxicos.

**Tabela 11.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método de ESL-PBT para os agrotóxicos estudados em uva

**Tabela 12.** Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de uva fortificada com os agrotóxicos em três níveis de concentrações diferentes

**Tabela 13.** Razão de área dos analitos/ PI e coeficientes de variação (CV) obtidos para análise dos sete extratos obtidos de amostras de uva fortificadas com os agrotóxicos

**Tabela 14.** Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de uva fortificada com os agrotóxicos, em três dias diferentes

**Tabela 15.** Amostras de uva contaminadas pelos agrotóxicos estudados

**Tabela 16.** Amostras de suco de uva industrializado contaminadas

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01.** Estrutura química das s-triazinas.

**Figura 02.** Estrutura química dos piretróides.

**Figura 03.** Variedades com sementes Itália (A), Red Globe (B), Benitaka (C) e Brasil (D) e variedades de uva sem sementes Superior Seedless (Festival) (E), Crimson Seedless (F), Thompson Seedless (G), Catalunha (H), Perlette (I) e Vênus (J).

**Figura 04.** Danos provocados em videiras por *Tripes*

**Figura 05.** Sintomas do ataque de ácaro-branco em folhas de videira

**Figura 06.** Sintomas do ataque de ácaro-rajado em folhas de videira.

**Figura. 07.** Danos de mosca branca em folhas de videira.

**Figura 08.** Danos causados pela larva da *Paramadarus Complexus* em folhas da videira

**Figura 09.** (A) Cromatograma da solução-padrão dos agrotóxicos (B) cromatograma de extrato obtido de amostra de uva fortificada e submetida à técnica ESL-PBT (1- Clorotalonil  $t_R = 4,98$ ; 2- Parationa Métilica  $t_R = 5,40$ ; 3- Clorpirifós  $t_R = 6,07$ ; 4-Tiametoxam  $t_R = 6,33$ ; 5- Procimidona  $t_R = 6,83$ ; 6 - Endossulfam  $t_R = 7,17$ ; 7- Ciproconazol  $t_R = 7,90$ ; 8- Endossulfam  $t_R = 7,99$ ; 9-Iprodiona  $t_R = 8,17$ ; 10-Bifentrina  $t_R = 9,86$ ; 11 e 12 - Lambda-cialotrina  $t_R = 10,79/11,05$ ; 13, 14 e 15 – Cipermetrina  $t_R = 13,02/13,13/13,20$ ; 16 e 17 –Deltametrina  $t_R = 14,45/14,67$ ; 18- Azoxistrobina  $t_R = 14,98$ ).

**Figura 10.** Influência da polaridade da mistura extratora usando o método de ESL-PBT na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em amostras de uva.

**Figura 11.** Influência do modo homogeneização no método de ESL-PBT na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em amostras de uva.

**Figura 12.** Influência do tempo de homogeneização na extração ESL-PBT na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em amostras de uva.

**Figura 13.** Influência da adição de sal na extração ESL-PBT na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em amostras de uva.

**Figura 14.** Influência do pH na porcentagem de extração dos agrotóxicos em amostras de uva.

**Figura 15.** Influência do tempo de congelamento na ESL-PBT na porcentagem de extração dos agrotóxicos em amostras de uva.

**Figura 16.** Cromatograma de um extrato obtido pela ESL-PBT de uma amostra de uva isenta de agrotóxico (preto) comparado com o do padrão em acetoneitrila (rosa) (1- Clorotalonil  $t_R = 4,98$ ; 2- Parationa Métilica  $t_R = 5,40$ ; 3- Clorpirifós  $t_R = 6,07$ ; 4-Tiametoxam  $t_R = 6,33$ ; 5- Procimidona  $t_R = 6,83$ ; 6 - Endossulfam  $t_R = 7,17$ ; 7- Ciproconazol  $t_R = 7,90$ ; 8- Endossulfam  $t_R = 7,99$ ; 9-Iprodiona  $t_R = 8,17$ ; 10-Bifentrina  $t_R = 9,86$ ; 11 e 12 - Lambda-cialotrina  $t_R = 10,79/11,05$ ; 13,14 e 15 - Cipermetrina  $t_R = 13,02/13,13/13,20$ ; 16 e 17 -Deltametrina  $t_R = 14,45/14,67$ ; 18- Azoxistrobina  $t_R = 14,98$ ).

**Figura 17.** Gráficos de resíduos para o ajuste polinomial (a) e resíduos para o ajuste linear (b) para o clorotalonil.

**Figura 18.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do clorotalonil em acetoneitrila.

**Figura 19.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do clorpirifós em acetoneitrila.

**Figura 20.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do tiametoxam em acetonitrila.

**Figura 21.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da procimidona em acetonitrila.

**Figura 22.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do endossulfam em acetonitrila .

**Figura 23.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do ciproconazol em acetonitrila.

**Figura 24.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do clorotalonil em acetonitrila.

**Figura 25.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da bifentrina em acetonitrila.

**Figura 26.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da lambda-cialotrina em acetonitrila.

**Figura 27.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da cipermetrina em acetonitrila.

**Figura 28.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da deltametrina em acetonitrila .

**Figura 29.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do clorotalonil em acetonitrila.

**Figura 30.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de clorotalonil preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 31.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão

de clorpirifós preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 32.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de cipermetrina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 33.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de bifentrina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 34.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de lambda-cialotrina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 35.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de iprodiona preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 36.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de procimidona preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 37.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de ciproconazol preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 38.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de deltametrina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 39.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de endossulfam preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 40.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de tiametoxam preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 41.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de azoxistrobina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

**Figura 42.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do clorotalonil quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 43.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do clorpirifós quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 44.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da cipermetrina quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 45.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da bifentrina quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 46.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da lambda-cialotrina quando preparado orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT em extratos de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 47.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da iprodiona quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 48.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da procimidona quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo

método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 49.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do ciproconazol quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 50.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do endossulfam quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 51.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do tiametoxam quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 52.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da deltametrina quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

**Figura 53.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da azoxistrobina quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

## RESUMO

SOARES, Carlos Eduardo dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura e seu emprego na análise multirresíduos de agrotóxicos em uva e derivados.** Orientador: Antônio Augusto Neves. Coorientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Reinaldo Francisco Téofilo.

O objetivo deste trabalho, tendo em vista o grande número de amostras insatisfatórias segundo relatórios do PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos), foi otimizar e validar a técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para análise multirresíduo em amostras de uva, por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE). Para tal avaliou-se os fatores que influenciam na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos, e proporcionam condições ideais de análise. O método foi validado determinando-se a seletividade, a linearidade de resposta do método, o limite de detecção, o limite de quantificação, a exatidão e a precisão. Os resultados obtidos mostraram que a técnica ESL-PBT é eficiente para análise dos agrotóxicos em uva. Os limites de detecção ( $0,0006$  a  $0,0150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e quantificação ( $0,0020$  a  $0,0495 \text{ mg kg}^{-1}$ ) encontrados foram menores que os limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pela legislação. A técnica otimizada e validada foi aplicada a amostras de uva e suco de uva industrializado, sendo encontrada contaminação por clorpirifós e cipermetrina em duas das onze amostras de uva e por clorpirifós em seis das nove amostras de suco industrializados. Além disso, estudou-se a influência dos componentes da uva na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa, empregando o método de adição de padrão. Os resultados mostraram que co-extrativos da matriz afetam significativamente a quantificação dos agrotóxicos em estudo e para cada composto observou-se um comportamento distinto em relação ao tal efeito.

## ABSTRACT

SOARES, Carlos Eduardo dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Solid-liquid extraction with partition at low temperature and its use in multiresidue analysis of pesticides in grapes and its derivatives.** Adviser: Antônio Augusto Neves. Co-Advisers: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Reinaldo Francisco Téofilo.

The objectives of this work were to optimize and validate the solid-liquid extraction technique with partition at low temperature (ESL-PBT) for multiresidue analysis of samples of grapes by gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD). During the optimization procedure of solid-liquid extraction technique with partition at low temperature, factors that influence the percent recovery of pesticides, and provide ideal conditions for analysis, were evaluated. The method was validated by determination of the selectivity, linearity of response and the method, limit of detection, limit of quantification, accuracy and precision. The results showed that the ESL-PBT technique is effective for analysis of pesticides in grapes. The detection limits (0.0006 to 0.0150 mg kg<sup>-1</sup>) and quantification (0.0020 to 0.0495 mg kg<sup>-1</sup>) Found were lower than the maximum residue limits (MRL) established by legislation. The optimized and validated technique was applied to samples of grapes and grape juice industrialized, and contamination was found in two of the eleven samples of grapes and in six of nine industrialized juice samples. Furthermore, the influence of the components of the grape in the quantification of pesticides by gas chromatography was studied, employing the method of superposition of the matrix (matrix-matched). The results showed that co-extractives of the matrix affect significantly the quantification of pesticides in the study and that for each compound there was a distinct behavior in relation to such effect.

## 1-INTRODUÇÃO

Fatores limitantes da produção de alimentos são, entre outros, as pragas, doenças e ervas invasoras. Isto é mais impactante em agroecossistemas que apresentam desequilíbrio ambiental. No controle dessas pragas, doenças e plantas invasoras o manejo mais indicado é a utilização de defensivos agrícolas. Estes são utilizados com o objetivo de aumentar a quantidade e a qualidade de produtos alimentícios, seja de origem animal ou vegetal.

Atualmente, o uso de produtos químicos na agricultura tem se tornado motivo de preocupação por parte de ambientalistas e de profissionais ligados à saúde, uma vez que resíduos destes produtos podem causar sérios danos a diversos nichos ambientais: meio biótico (flora, fauna e micro-organismos), abiótico (solo, água e ar) e antrópico (ser humano).

Não se pode negar que esses produtos possibilitaram o aumento da produtividade agrícola e têm auxiliado no controle de vetores de diversas doenças, entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente. Além do impacto ambiental causado, o uso indiscriminado dos defensivos causa a contaminação dos alimentos, em níveis, passíveis de danos à saúde do consumidor. Com isso, a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos tem sido uma prioridade nas pesquisas realizadas atualmente, a fim de começar uma avaliação extensiva da qualidade do alimento e evitar possíveis riscos à saúde humana.

De acordo com esta premissa, órgãos competentes implantaram o programa nacional de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), o que possibilita avaliar a qualidade e a segurança dos alimentos consumidos pela população, caracterizar as fontes de contaminação, proporcionar uma avaliação quanto ao uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos e estimular a adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA) para as diversas culturas desenvolvidas em nosso país.

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

sendo conhecida desde a antiguidade. Entre as 10 mil variedades de uvas adaptadas aos vários tipos de clima e solo, as uvas frescas mais consumidas pelos brasileiros ou são da espécie *Vitis vinifera L.*, variedades Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Centenial, etc. ou da espécie *Vitis labrusca L.*, variedades Niágara, Isabel ou ainda podem ser híbridas das 2 espécies como a variedade Kyoto . Doenças causadas por fungos, insetos, ácaros que afetam a videira, se constituem em um dos mais sérios problemas que o vinicultor se defronta, sendo muitas vezes, responsáveis pelo insucesso da cultura, sendo seu tratamento dependente da variedade em que está sendo cultivada.

Segundo relatórios apresentados pela agência nacional de vigilância (ANVISA) para o programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) tanto em 2008 quanto em 2009, anos que a cultura da uva foi monitorada pelo programa, a mesma esteve entre os mais elevados índices de amostras irregulares.

O Laqua, Laboratório de Química Analítica da UFV, vem nos últimos anos desenvolvendo e adaptando técnicas de extração e análise de defensivos em diferentes matrizes, como leite, solo e água, batatas e abacaxi.

No desenvolvimento deste trabalho pretendeu-se adaptar a técnica de extração sólido-líquido e extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura para um grupo de 12 princípios ativos (clorotalonil, clorpirifós, tiametoxam, endossulfam, ciproconazol, iprodiona, bifentrina, lambda-cialotrina, cipermetrina, deltametrina e azoxistrobina) em amostras de uva e de suco de uva.

## 2-REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Agrotóxicos

A agricultura moderna é caracterizada pelo uso de novas técnicas e modernos equipamentos, pelo aumento do número de pesquisas agronômicas e uso de um grande número de insumos (STOPPELLI e MAGALHÃES, 2005).

Destas tecnologias o uso de agrotóxicos é uma das mais preocupantes pois podem deixar resíduos alterando a qualidade dos alimentos.

Existem registros de diferentes substâncias utilizadas como pesticidas desde a antiguidade, tal como o piretro de origem natural. O uso moderno de pesticidas é datado do século XIX, onde substâncias inorgânicas como aceto arsenito de sódio, conhecido como “*verde Paris*”, fluoreto de cálcio, fluorsilicato de cálcio, arseniato de sódio, arsênio branco, entre outras, foram intensamente empregadas (KLASSEN, 1989). A partir da década de 30, a necessidade de aumento da produção agrícola e, principalmente, a diversidade de culturas impuseram a utilização de outras substâncias com melhor poder pesticida. Um grande número de substâncias foi formulado especialmente para uso na agricultura, no entanto, o fator determinante para o aumento na produção de pesticidas foi a descoberta do DDT [1,1,1-tricloro-2-bis-(pclorofenila)- etano], um organoclorado com alto poder inseticida que foi desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial (1939).

Uma variedade de substâncias é utilizada atualmente para eliminar ou controlar espécies animais e vegetais que afetam negativamente as culturas agrícolas. O uso dessas substâncias é maior no controle de doenças, ervas invasoras e pragas, e por isso são nomeadas muitas vezes de defensivos agrícolas.

Outros termos como pesticida, que vem da tradução da palavra do inglês *pesticide*, e praguicida são usados. Ambos exprimem a idéia equivocada de efeito apenas nos agentes patogênicos e ocultam o lado dos riscos negativos

para o ambiente e para a saúde humana. Fazem referência a um efeito seletivo, que não é real, como se houvesse controle do alvo a que se destina o produto, quando na verdade podem agir também em outros organismos vivos, incluindo o ser humano, e produzir efeitos indesejáveis. Outra palavra, bem menos utilizada, é “biocida”, que significa “matar a vida” (MORAGAS e SCHNEIDER, 2003).

No campo, os compostos utilizados na agricultura são comumente chamados de “veneno” ou “remédio”. O termo “veneno” é atribuído pelos próprios trabalhadores rurais, que durante anos vêm observando efeitos nocivos destes compostos químicos à saúde animal e humana. Já “remédio” é o termo utilizado por vendedores e técnicos ligados à indústria química, na tentativa de passar a idéia que esses compostos são “remédio” para a planta (COSTA, 2010).

Na década de 80, movimentos profissionais e sociais, reconhecendo os danos desses produtos químicos, iniciaram uma mobilização nacional, para que no Brasil se adotasse a palavra agrotóxico como denominação dessas substâncias, com objetivo de recuperar a noção de veneno e de perigo frente ao uso, bem como a necessidade de cuidado e proteção (BEDOR, 2008). Sendo assim, foi introduzida pelas legislações estaduais e federal, a denominação de agrotóxico para definir as substâncias usadas para eliminar formas de vida vegetal ou animal, consideradas indesejáveis nas culturas agrícolas, na pecuária, na saúde pública e no controle de vetores de doenças transmissíveis (LARA e BATISTA, 1992).

No Brasil a Lei nº. 7.802/1989, regulamentada por meio do decreto 4.074 de 4 de janeiro de 2002, artigo 2º, inciso I, define agrotóxico como produtos e componentes de processos físicos, químicos e biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, ambientes urbanos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Inclui também substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Essa definição exclui fertilizantes e químicos administrados a animais para estimular crescimento ou modificar comportamento reprodutivo (BRASIL, 1989).

Existem cerca de 600 princípios ativos, utilizados na formulação de pesticidas, registrados para uso específico na agricultura. Destes, 350 contribuem com 98% dos pesticidas mais utilizados, sendo que 80% deles são rotineiramente usados na agricultura em países da América do Sul, tal como no Brasil (RICHARDSON *et al.*, 1998).

A utilização de produtos químicos para controlar pragas, doenças e ervas daninha possibilitaram ao ser humano aumentar a produção de alimentos em quantidade e qualidade. Estes produtos foram por muito tempo utilizado de forma indiscriminada até surgirem preocupações com os impactos ambientais causados pelo seu uso inadequado (BARBOSA, 2004).

O comportamento dos agrotóxicos é dependente das condições do compartimento em que se encontra (solo, água, ar) de suas propriedades físicas, químicas e até mesmo dos métodos de aplicação (NAVARRO *et al.*, 2004).

Muitos desses praguicidas sofrem alterações na estrutura química durante o período que permanecem nos vegetais em que foram aplicados, ou mesmo na água para a qual foram carregados ou no solo em que foram absorvidos e estes metabólitos ou produtos de degradação são ingeridos juntos com os alimentos ou com a água, acarretando problemas de saúde em indivíduos que entrarem em contato com tais fontes de contaminação (LIMA *et al.*, 2001).

## **2.2- Classificação dos agrotóxicos**

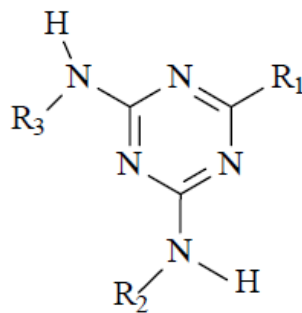
A classificação dos agrotóxicos pode ser feita levando em consideração diferentes características. A classificação mais comum leva em consideração a finalidade de uso. Destacam-se, nessa classificação os acaricidas, escorpionicidas, moluscocidas, nematicidas, rodenticidas, vampiricidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, entre outros.

Outra classificação de agrotóxicos seria quanto a sua classe química como, por exemplo: triazinas, carbamatos, organoclorados, organofosforados, piretroídes, neonicotinoides, triazois entre outros.

### 2.2.1-Triazinas

Em 1952, na Suíça, J. R. Geigy sintetizou e iniciou estudos com derivados de triazinas, na possibilidade de uso destes compostos como herbicidas. Em 1955, as propriedades herbicidas destes compostos foram registradas, sendo as triazinas inseridas no mercado (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005).

Mais de 30 % dos herbicidas utilizados na agricultura são do grupo químico das triazinas (CABRAL *et al.*, 2003), que são derivados nitrogenados heterocíclicos. A maioria das triazinas são simétricas, ou seja, possuem anel heterocíclico de seis membros, com átomos de nitrogênio localizados simetricamente, e os substituintes localizados nas posições 2, 4 e 6. Esses compostos são chamados de s-triazinas (ARCHANGELO, 2003). A estrutura química destas triazinas é mostrada na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura química das s-triazinas.

O seu uso comercial foi iniciado na década de 1960 e, desde então, a atrazina é um herbicida de grande uso mundial, devido ao extenso espectro de aplicação, principalmente no controle de folhas largas (SOLOMON *et al.*, 1996). Estes herbicidas são derivados simétricos clorados da triazina, que é o produto da polimerização do cloro de cianogênio na presença de cloreto de alumínio anidro como catalisador (MACEDO, 2002). Os estudos sobre herbicidas (atrazina e simazina) têm importância devido à presença destes pesticidas em solos e águas de superfície e por suas características de alta persistência e forte solubilidade, constituindo-se, assim, grande preocupação ao meio ambiente (CAI *et al.*, 2004).

### 2.2.2-Carbamatos

Os pesticidas n-metilcarbamatos são inseticidas alternativos da família dos organoclorados que nos últimos anos têm aumentado o seu uso devido à polaridade, labilidade, baixa persistência no meio ambiente (DELGADO *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2003).

Segundo Guerra *et al.* (2001), os carbamatos, compostos derivados do ácido carbâmico, merecem destaque por apresentarem vantagens em relação aos demais inseticidas, devido às seguintes características: são hidrofílicos e rapidamente degradáveis, principalmente os sistêmicos; são quimicamente instáveis e não persistentes, entre outras. No entanto, são em sua maioria muito tóxicos, especialmente ao sistema nervoso central.

Os carbamatos são um grupo de compostos com estrutura geral  $R_1OCONR_2R_3$ , com a introdução de diferentes substituintes (DELGADO *et al.*, 2001). Dentre os inúmeros carbamatos os mais usados mundialmente são aldicarbe, aldicarbe sulfona, aldicarbe sulfóxido, carbaril, carbofuran, metomil, metiocarbe, oxamil, pirimicarbe e propoxur (GOTO *et al.*, 2006). Os carbamatos em geral e seus produtos de transformação são de natureza polar e termicamente lábeis; estas propriedades limitam o uso de técnica de cromatografia gasosa para sua quantificação (JEONG *et al.*, 1999; DELGADO *et al.*, 2001).

### 2.2.3- Organoclorados

Os organoclorados pertencem ao grupo pioneiro dos praguicidas sintéticos apresenta baixa solubilidade em água, baixa volatilidade a temperatura ambiente, moderada a alta toxicidade para mamíferos, e alta persistência no ambiente (SILVA *et al.*, 2008). Além disso, a degradação dos organoclorados leva a formação de metabólitos também persistentes e de efeitos muito nocivos (LARA e BATISTA, 1992).

No Brasil, os inseticidas organoclorados foram amplamente utilizados na década de 60, porém sua elevada persistência no ambiente, que era considerada grande vantagem para sua utilização na agricultura e saúde pública, naquele momento começou a ser vista como sério problema ecológico,

devido à contaminação de grande parte do ecossistema. A natureza nociva de alguns organoclorados tem sido reconhecida há mais de 30 anos. No Brasil, estes compostos foram proibidos na década de 80, porém, ainda são encontrados resíduos desses agrotóxicos no ambiente (FLORES *et al.*, 2004). Muitos agrotóxicos dessa classe tiveram seu uso proibido devido a possibilidade de suas formulas favorecerem a formação de tumores cancerígenos ou causarem vários outros problemas a saúde humana (GALLI *et al.*, 2006).

Compostos dessa classe de agrotóxicos apresentam efeito cancerígeno, mutagênico e neurotóxicos. Tem ação estimulante sobre as enzimas metabolizantes de drogas. Ao penetrarem no organismo, têm efeito cumulativo e concentram-se nos tecidos adiposos, especialmente no abdômen, cérebro e fígado. A eliminação se faz pela urina, cabendo destacar também a eliminação pelo leite materno (SUCEN, 2010).

#### **2.2.4 Organofosforados**

Os compostos pertencentes ao grupo químico dos organofosforados são mais tóxicos que os compostos clorados, mas por não serem bioacumuladores, proporcionam menos danos ao meio ambiente (WESSELING *et al.*, 2005).

Os pesticidas organofosforados atuam inibindo as colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase (AChE; EC3.1.1.7), aumentando o nível de acetilcolina nas sinapses. Em mamíferos, estes efeitos caracterizam-se principalmente por lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes de broncoconstricção, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, bem como de depressão do sistema nervoso central, sendo as principais causas de morbidade e mortalidade por tais produtos (CAVALIERE, 1996).

#### **2.2.5 Piretróides**

Atualmente, as indústrias agroquímicas vêm trabalhando na síntese e formulação de moléculas que sofram degradação, desaparecendo no ambiente em pouco tempo. Assim, os piretróides tiveram seu uso difundido como

alternativa aos organoclorados, muito persistentes no ambiente, e aos carbamatos e organofosforados, que são muito tóxicos (SANTOS *et al.*, 2007).

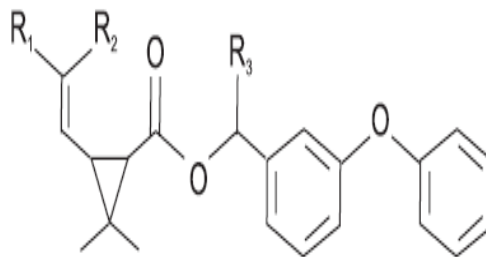
Os piretróides são inseticidas sintéticos, derivados das piretrinas. A piretrina, componente ativo extraído das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium*, tem sido utilizada há mais de dois séculos no controle de inúmeras espécies de insetos (VALENTINE, 1990).

Os inseticidas piretróides surgiram no início dos anos 80 como uma alternativa àqueles de maior potencial tóxico, já que apresentam baixa toxicidade aguda em mamíferos, não se acumulam nos tecidos adiposos e não são persistentes no ambiente. Os piretróides são utilizados como domissanitários e em programas de saúde pública no combate de insetos vetores de doenças (SANTOS *et al.*, 2007).

Estes compostos são atualmente os inseticidas mais utilizados, pois apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental e são eficientes contra um grande número de insetos. Além disso, é necessária a aplicação de baixa quantidade desses para exercerem sua ação.

Os piretróides são neurotoxinas que atuam na transmissão dos impulsos nervosos dos insetos, interferindo no fluxo normal dos íons sódio responsável por estes estímulos (SODERLUND *et al.*, 2002).

A fórmula estrutural dos piretróides é mostrada na Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura química dos piretróides.

A determinação de resíduos de piretróides em alimentos e no ambiente tem sido exigida por consumidores, produtores e autoridades de vigilância sanitária e tornou-se uma prática essencial no controle da qualidade dos alimentos.

### 2.2.6 Neonicotinoides

A descoberta dos inseticidas do grupo neonicotinoides foi um marco no controle químico, pois representa o principal grupo de inseticida lançado nas três últimas décadas e tem sido o que mais cresceu no mercado desde a descoberta dos piretróides (CARVALHO, 2008). Esse grupo químico engloba inseticidas muito utilizados em diversas culturas devido a sua grande aplicabilidade.

Os compostos pertencentes a essa classe tiveram origem de moléculas de nicotina, sendo que em 1972, a ação inseticida deles foi demonstrada.

São compostos muito pouco tóxicos devido à sua grande seletividade para os receptores nicotínicos, mas apresentam alguns problemas para outros seres vivos, sendo que muitos deles são carcinogênicos em humanos.

Os neonicotinoides apresentam ação sistêmica, e estão registrados em vários países, inclusive no Brasil, para o controle de insetos-praga sugadores e mastigadores. Em geral, são razoavelmente solúveis em água, biodegradáveis e seletivos (EMBRAPA, 2010).

Os neonicotinoides imitam a acetilcolina, um neurotransmissor excitatório dos insetos, competindo com estes pelos seus receptores. Ao contrário da ligação natural da acetilcolina com seu receptor, a ligação entre o neonicotinoide e o receptor é persistente e insensível à ação da enzima acetilcolinesterase. A ativação dos receptores da acetilcolina é prolongada de forma anormal, ocasionando transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos, e conseqüente convulsões e morte (MORAES *et al.*, 2006).

### 2.2.7 Triazóis

Os triazóis são classificados como inibidores da síntese de esterol (SBI: “sterol biosynthesis inhibitors”) e representa um marco no desenvolvimento dos defensivos agrícolas sendo um dos mais modernos e importantes grupo de fungicidas atualmente em uso. Tal importância é atribuída a características especiais como: elevada ação inibitória sobre a formação de componentes da membrana celular, rápida absorção e translocação pela planta, eficiência em doses pequenas, ação curativa, efeito residual prolongado, amplo espectro de

ação, flexibilidade para tratamento de sementes, da parte aérea e via sistema radicular e moderado risco de resistência (SARTORI, 2007).

Quanto ao modo de ação, os triazóis podem atuar como protetores ou como curativos. No primeiro caso, a ação tóxica é exercida sobre a germinação de esporos, na formação do tubo germinativo e no apressório. Porém, a inibição é apenas parcial, de modo que pode ocorrer a penetração do patógeno nos tecidos tratados. No segundo caso, o desenvolvimento do haustório e/ou crescimento micelial no interior dos tecidos são inibidos pela presença do fungicida (SARTORI, 2007).

### **2.3- Resíduos de agrotóxicos e o meio ambiente**

O crescimento da demanda mundial por alimentos provoca o aumento na utilização de agrotóxicos nas lavouras no controle de doenças, ervas invasoras e pragas. Como consequência, surgiu o problema relacionado à exposição humana a estas substâncias, que pode ser decorrente tanto do consumo de alimentos contaminados, quanto do contato direto, no caso dos trabalhadores rurais e/ou manipuladores, ou ainda ao contato indireto, como no caso de populações que são atingidas por resíduos de agrotóxicos levados pela ação dos ventos durante sua aplicação.

No entanto, a tendência no mundo atual é a busca de compostos mais específicos, menos persistentes e tóxicos para o ambiente. Assim, associado ao uso destes produtos, o monitoramento deles no meio ambiente é de suma importância, especialmente para garantir a qualidade dos alimentos que chegam ao consumidor.

Com o propósito de controlar o uso inadequado de agrotóxicos e a concentração de resíduos desses compostos nos alimentos, órgãos internacionais e nacionais estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para vários agrotóxicos, em diferentes culturas. O termo “limite máximo de resíduos” é entendido como a máxima concentração de resíduos de agrotóxicos que pode estar presente nos alimentos, consumidos pela população, sem prejudicar a saúde humana. Em âmbito internacional, esses limites são estabelecidos pela Comissão do Codex Alimentarius e pela União Européia. Em âmbito nacional, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) é o órgão regulador responsável pela avaliação

toxicológica dos agrotóxicos (IMOTO, 2004).

A' ANVISA em 2001 desenvolveu o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), envolvendo diversas regiões do país e instituições de pesquisas, devido à preocupação crescente da presença de resíduos em alimentos, muitas vezes potencialmente carcinogênicos.

#### **2.4- Características da cultura de uva**

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

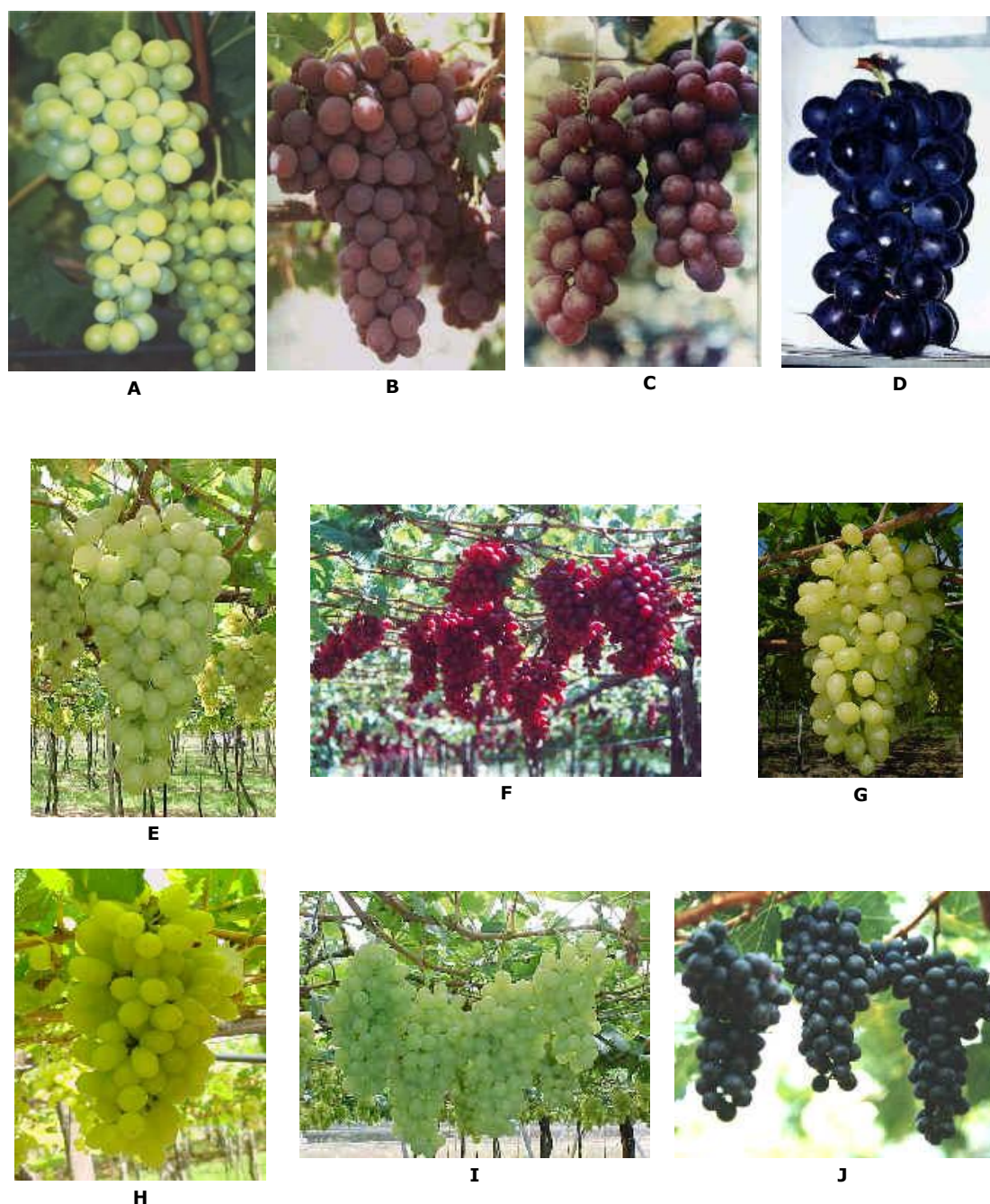
Há cerca de 10 mil variedades de diferentes uvas, adaptadas a vários tipos de solo e de clima, o que possibilita o seu cultivo em quase todas as regiões do mundo. Sendo frutas bastante sensíveis às condições do solo e do clima em que se desenvolvem, podendo por conseqüência se distinguirem segundo o sabor, a acidez, a doçura, o formato, a coloração e a resistência da casca, o tamanho, a quantidade de sementes a forma e o formato dos cachos. (RHODEN, 2005).

A uva é considerada um alimento tonificante, alcalinizante, anti-reumático, depurativo, diurético, laxante, tônico para o sistema nervoso. É um fruto rico em carboidratos, porém com pouca vitamina C e do complexo B. A composição nutricional desse fruto é apresentada na tabela 01 (RHODEN, 2005).

**Tabela 01** – Composição nutricional da polpa de uva

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

As uvas de mesa devem apresentar características apreciadas para o consumo “in natura”. Os cachos devem ser atraentes, com sabor agradável e apresentar-se resistentes ao transporte e ao manuseio e com boa conservação pós-colheita. A forma ideal do cacho é cônica, especialmente para o mercado externo, com tamanho médio de 15 a 20 cm e peso superior a 300 gramas, devendo ser os cachos cheios, mas não compactos. A polpa deve ser firme, com película e engajo resistentes. A ausência de sementes é uma característica desejada para o consumo “in natura”. A cor das bagas pode ser verde, verde-amarelada ou âmbar, vermelha ou preta, sendo esse um aspecto importante na comercialização. É importante que as bagas apresentem cor intensa, brilhante e uniforme. O sabor da polpa é determinado pela classe e pela qualidade das substâncias voláteis que estejam presentes e pode ser agrupado em quatro tipos: neutro, especial, foxado e moscatel. As uvas podem ainda ser doces ou ácidas, de acordo com a relação existente entre açúcares e ácidos e podem ser mais ou menos adstringentes, dependendo dos teores de tanino (EMBRAPA, 2010). A figura 03 exemplifica algumas das variedades de uva existentes.



**Figura 03-** Variedades com sementes Itália (A), Red Globe (B), Benitaka (C) e Brasil (D) e variedades de uva sem sementes Superior Seedless (Festival) (E), Crimson Seedless (F), Thompson Seedless (G), Catalunha (H), Perlette (I) e Vênus (J).

#### 2.4.1- O cultivo da uva no Brasil

O cultivo da videira no Brasil teve início por volta do ano de 1535, na Capitania de São Vicente, trazida por colonizadores portugueses, mas somente adquiriu importância econômica com o advento da imigração italiana, que se estabeleceu no final do século XIX. Atualmente somando pouco mais de

60.000 ha, a cultura da videira encontra-se em quatorze estados brasileiros, constituindo-se na base de sustentação agro-industrial de algumas regiões, não somente pela produção de uvas de mesa, mas também matéria prima de vinhos e alguns derivados. As uvas frescas mais consumidas pelos brasileiros ou são da espécie *Vitis vinifera* L., variedades Itália, Rubi, Benitaka, Brasil, Centenial, etc. ou da espécie *Vitis labrusca* L., variedades Niágara, Isabel ou ainda podem ser híbridas das 2 espécies como a variedade Kyoto (RHODEN, 2005).

A área plantada com videira no Brasil, segundo os dados IBGE (2008), era de 89.946 hectares, sendo o Rio Grande do Sul, principal produtor, possui área de 49.816 hectares, que representa 60,31% da área total do país. No estado gaúcho em torno de 90% da produção destina-se à agroindústria para produção de vinhos, suco e outros derivados (EMBRAPA, 2010).

Muito embora a região Sul apresenta-se como a maior produtora de uva do país, vale ressaltar que a uva produzida nessa região destina-se, principalmente, à produção de vinho, enquanto nas regiões Sudeste e Nordeste predominam a produção de uvas de mesa.

A produção de uva no Nordeste do Brasil concentra-se principalmente na região do submédio São Francisco, localizada nos sertões pernambucano e baiano. Favorecida pela potencialidade dos recursos naturais e pelos investimentos públicos e privados nos projetos de irrigação, esta região está obtendo uma grande expansão no plantio e na produção de uvas finas de mesa.

A viticultura na região semi-árida, em particular no submédio São Francisco, se destaca no cenário nacional, não apenas pela expansão da área cultivada e do volume de produção, mas principalmente pelos altos rendimentos alcançados e na qualidade da uva produzida. Seguindo as tendências de consumo do mercado mundial de suprimento de frutas frescas, a região inclina-se, atualmente, para produção de uvas sem sementes, assim como para a adoção de normas de controle de segurança alimentar conforme sistemas definidos pelas legislações nacionais e internacionais (EMBRAPA, 2010).

## 2.4.2 - Controle de pragas no cultivo da uva

As várias doenças causadas por fungos, insetos e ácaros que afetam a cultura da videira, constituem em um dos mais sérios problemas que o viticultor se defronta, sendo muitas vezes, responsáveis pelo insucesso da cultura. O tratamento fitossanitário varia em função da variedade que está sendo cultivada, não só no que diz respeito ao número de pulverizações que devem ser feitas, mas também quanto aos tipos de fungicidas, inseticidas e acaricidas que devem ser aplicados, para controle das diferentes doenças a que ela está sujeita.

O adulto da tripes (*S. rubrocinctus*) tem coloração em geral preta ou marrom escuro. Em função do seu ataque intenso ocorre a “queima” e queda das folhas, podendo haver uma desfolha parcial ou total da planta.

O adulto de *Frankliniella sp.* possui coloração que varia do amarelo-claro a marrom-escuro. Os maiores danos ocorrem durante a floração. Nos frutos, no local de postura, ocorre um secamento e morte das células formando uma lesão necrosada em forma de Y (figura 04) tornando-os imprestáveis para comercialização (EMBRAPA, 2010).

Apesar da importância dessa praga, ainda não existem inseticidas registrados para o seu controle na cultura da videira.



**Figura 04** - Danos provocados por tripés em videira. (FONTE: EMBRAPA)

O ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*) constituindo-se uma das principais pragas da videira, na região do submédio do Vale do São Francisco (FERREIRA, 2005; HAJI *et al.*, 2001a).

O ataque desta praga é caracterizado pela coloração verde brilhante e pelo encarquilhamento das folhas, assemelhando-se aos sintomas de virose como mostrado na figura 05. O seu ataque pode ser observado em folhas de

todas as idades, contudo as maiores concentrações são observadas em folhas novas. Altas infestações podem resultar em perdas significativas à produtividade e qualidade da uva, devido, principalmente, à paralisação do crescimento ou atrofiamento dos ramos (OLIVEIRA & MOREIRA, 2010).



**Figura 05** - Sintomas do ataque de ácaro-branco em folhas de videira  
FONTE: EMBRAPA

O ácaro rajado (*tetranychus urticae*) tece teias na face dorsal da folha, de modo que, uma vez a postura feita, os ovos ficam protegidos, característica esta, específica da família *Tetranychidae*. (GALLO *et al.*, 2002).

As condições climáticas predominantes na região do submédio do Vale do São Francisco favorecem o desenvolvimento deste ácaro durante todo o ano, principalmente durante o segundo semestre, quando a temperatura mostra-se mais elevada (OLIVEIRA & MOREIRA, 2010).

Os sintomas do seu ataque são observados na face ventral das folhas da videira e caracterizados por manchas avermelhadas, podendo tornar-se necrosadas e/ou secar totalmente. O ataque pode ocorrer em folhas de qualquer idade, sendo preferencialmente observado nas folhas mais jovens. No caso da ocorrência de populações elevadas, esse ácaro pode comprometer, de maneira significativa, o desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, a sua produtividade (OLIVEIRA & MOREIRA, 2010).

A figura 06 mostra o sintoma do ataque do ácaro-rajado em folhas de videira.



**Figura 06** - Sintomas do ataque do ácaro-rajado em folhas de videira (FONTE: EMBRAPA)

O controle químico tanto para o ácaro branco quanto para o ácaro rajado deve ser realizado quando atingir o nível de ação, utilizando-se acaricidas registrados para o controle em videira como, por exemplo, a bifentrina.

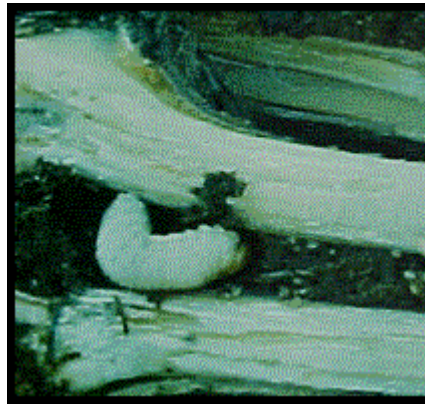
O dano observado na videira pela ação da mosca branca (*Bemisia argentifolii*), até o momento foi a presença de substâncias açucaradas nas folhas e nos frutos (Figura 07), tendo como consequência a redução do processo fotossintético das plantas e alteração na qualidade dos frutos (EMBRAPA, 2010).



**Figura 07** - Danos de mosca branca em folhas de videira (FONTE: EMBRAPA)

A lagarta (*Eumorpha vitis*), conhecida vulgarmente como mandarová da videira, danifica as plantas provocando desfolhamento (GALLO *et al.*, 1998; ZUCCHI *et al.*, 1993). Para o combate dessa praga podem ser usados inseticidas das mais diversas classes autorizados para a cultura como tiametoxam, bifentrina e lamda cialotrina.

A figura 08 mostra a larva e os danos causados por ela em folhas de videira.



**Figura 08** – Danos causados pela larva da *Paramadarus Complexus* em folhas da videira (FONTE: EMBRAPA)

Devido à vulnerabilidade da cultura da uva em relação as mais variadas pragas a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autoriza a utilização alguns princípios ativos na cultura e estabelece limites máximos para os mesmos dentre eles destacam-se piretróides (bifentrina, lambda-cialotrina), traizois (triadimenol, difeconazol, ciproconazol), neonicotinóide (tiametoxam, imidacloprido) entre outros.

Esses valores são controlados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) que foi iniciado em 2001 pela ANVISA com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos in natura que chegam à mesa do consumidor, fortalecendo a capacidade do Governo em atender a inocuidade alimentar, evitando assim, possíveis agravos à saúde da população.

No entanto a cultura da uva foi monitorada pela primeira vez somente no ano de 2008 e cerca de 30 % apresentaram ingredientes ativos de agrotóxicos acima do Limite Máximo de Resíduos (LMR) permitidos ou resíduos não autorizados para a cultura. No ano de 2009 esse índice elevou-se para cerca de 56 % de amostras irregulares.

O LMR leva em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA), que vem a ser a quantidade máxima que, ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde (GORENSTEIN, 2003).

No caso dos resultados obtidos em 2008 para a cultura da uva a maior parte da amostragem apresentava contaminação por princípios ativos de agrotóxicos não autorizados pela ANVISA, tais como acefato, cipermetrina, deltametrina, endossulfam entre outros daí a necessidade de incluí-los na

análise multiresíduos.

Em 2009 também se constatou que a maior parte das amostras apresentou princípios ativos não autorizados para a cultura sendo que neste ano ela ficou em segundo lugar dentre as amostras que apresentaram irregularidades perdendo apenas para o pimentão.

## **2.5- Agrotóxicos escolhido para estudo**

Com base na vulnerabilidade da cultura da videira foi escolhido um conjunto de doze agrotóxicos sendo que quatro (endossulfam, clorpirifós, cipermetrina e deltametrina) não são autorizados para a cultura, porém foram encontrados nas amostras segundo os relatórios do PARA 2008 e 2009. E os outros oito (clorotalonil, tiametoxam, procimidona, ciproconazol, iprodiona, bifentrina, lambda-cialotrina e azoxistrobina) autorizados para a cultura da videira sendo que a bifentrina foi encontrada em amostras acima dos limites máximos permitidos.

A tabela 02 apresenta a fórmula estrutural, o grupo químico, a classe e a massa molar dos compostos escolhidos para estudo.

**Tabela 02-** Compostos escolhidos para estudo

Composto	Fórmula estrutural	Grupo Químico	Classe	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )
Clorotalonil (chlorothalonil)		Isoftalonitrila	Fungicida	265,91
Clorpirifós (chlorpyrifos)		Organofosforado	Inseticida, formicida e acaricida	350.89
Tiametoxam (thiamethoxam)		Neonicotinóide	Inseticida	291.71
Procimidona (procymidone)		Dicarboximida	Fungicida	284.14
Endossulfam (endosulfan)		Clorociclodieno	Acaricida, inseticida e formicida	406.93
Ciproconazol (cyproconazole)		Triazol	Fungicida	291,78
Iprodiona (iprodione)		Dicarboximida	Fungicida	330.17
Bifentrina (bifenthrin)		Piretróide	Inseticida, formicida e acaricida	422.88
Lambda-cialotrina (lambda-cyhalothrin)		Piretróide	Inseticida	449.85
Cipermetrina (cypermethrin)		Piretróide	Inseticida e formicida	416.3
Deltametrina (deltamethrin)		Piretróide	Inseticida e formicida	505.2
Azoxistrobina (azoxystrobin)		Estrobilurina	Fungicida	403,4

Tendo em vista as boas práticas agrícolas valores máximos permitidos são estabelecidos. A tabela 03 apresenta os valores máximos permitidos dos agrotóxicos estudados para a cultura da uva em alguns países e regiões:

**Tabela 03-** Valores máximos permitidos para os diferentes agrotóxicos usados na cultura da uva em diferentes países e regiões

Princípio ativo	Valores Máximos Permitidos (mg Kg <sup>-1</sup> )					
	Brasil	Estados Unidos	Japão	Europa	Canadá	Rússia
Clorotalonil	5	SR	0,5	3	SR	0,15
Clorpirifós	NA	*	*	*	*	*
Tiametoxan	0,02	0,2	5	NA	SR	SR
Procimidona	5	5	5	0,02	5	0,5
Endossulfan						
Ciproconazol	0,1	SR	0,2	0,2	SR	0,1
Iprodiona	1	60	25	10	10	0,4
Bifentrina	0,1	0,2	2	0,2	0,2	SR
Lambda-cialotrina	0,1	NA	NA	NA	0,03	SR
Cipermetrina	NA	*	*	*	*	*
Deltametrina	NA	*	*	*	*	*
Azoxistrobina	0,5	1	10	2	3	0,2

SR-sem registro

NA- não autorizado

ND- não definido

\*Registro não encontrado

Fonte: Agrofit

## 2.6- Técnicas de extração de multirresíduos

Os resíduos de agrotóxicos são amplamente encontrados em nosso ambiente, incluindo os compartimentos aquáticos e terrestres, além de serem detectados nos alimentos.

Para efeito de controle e regulamentação, surgiu a necessidade de se analisar esses resíduos de agrotóxicos em alimentos. Contudo, problemas analíticos complexos foram evidenciados, devido a uma variedade de substâncias estruturalmente diferentes a serem analisadas.

Diversos métodos são usados para identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos. Estes métodos exigem uma técnica de extração do analito da matriz, *clean up* dos extratos para remoção de impurezas, e em alguns casos, pré-concentração dos mesmos, para posterior análise instrumental (KAIPPER *et al.*, 2001).

Os métodos mais usados para determinação de resíduos de agrotóxicos

em alimentos, geralmente empregam: extração líquido-líquido (ELL), extração sólido-líquido (ESL), extração em fase sólida (EFS) e extração com fluido supercrítico (GOBO *et al.*, 2004).

Uma nova técnica de extração e pré-concentração, a partir de 1990, denominada microextração em fase sólida (MEFS), foi aplicada na extração de diversos grupos de analitos voláteis e semivoláteis em matrizes, como água, ar, solo e alimentos (SILVA *et al.*, 1999). Esta técnica de extração apresenta vantagens tais como a simplicidade da amostragem, baixo custo, a não utilização de solventes, fácil automação e reutilização da fibra.

No entanto, atualmente as técnicas para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais evoluíram significativamente em termos de simplificação e melhoria de extração e purificação das amostras. Neste cenário, as técnicas extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) tem relevado bons resultados na extração de agrotóxicos em matrizes sólidas, devido à possibilidade de se realizar simultaneamente a extração de agrotóxicos e o *clean up* dos extratos.

Em 2003, Goulart desenvolveu uma metodologia simples para análise de piretróides em leite sem etapas de *clean up*, denominada extração líquido-líquido e purificação por precipitação a baixa temperatura. A taxa e recuperação para estes compostos foram altas, comprovando que essa técnica é eficiente.

A partir de então a metodologia proposta foi adaptada para as mais diversas matrizes como extração de piretróides em amostras de água e solo, análise simultânea dos inseticidas em batatas e de agrotóxicos em maçã e abacaxi.

O método consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator, miscível em água, menos denso que ela e que se mantenha líquido a -20 °C. Posteriormente, a mistura, constituída de amostra e mistura extratora é agitada e levada ao freezer por um período mínimo de seis horas. Nesta etapa, a fase aquosa junto com a amostra congela, ficando na parte inferior, e a fase sobrenadante, contendo o solvente e os agrotóxicos extraídos, é separada e filtrada, utilizando sulfato de sódio anidro para eliminar possível presença residual de água. Finalmente, a amostra é analisada por cromatografia gasosa.

A técnica de extração por dispersão da matriz em fase sólida envolve o uso de um suporte sólido, geralmente contendo uma fase quimicamente ligada, como um abrasivo para produzir ruptura na arquitetura da amostra, facilitando o processo de extração. A amostra sofre dispersão na superfície do material suporte, fase quimicamente ligada, formando uma nova fase mista, o que proporciona o isolamento de analitos presentes em várias matrizes (LANÇAS, 2004).

A principal vantagem desta técnica é o baixo consumo de amostra, solvente e adsorvente. Além disso, os processos de extração dos agrotóxicos e *clean up* dos extratos ocorrerem simultaneamente.

Em 2003, Anastassiades *et al.*, com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multiresíduos de extração introduziram um novo procedimento para extração multiresíduo denominado *quenchers*. Que apresenta as vantagens de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. É interessante destacar que devido a simplicidade das etapas ele pode ser aplicado em qualquer laboratório.

Em 1996 Jeannot *et al* desenvolveram um método que utilizava apenas uma gota de solvente extrator para extração de compostos orgânicos em água para posterior análise por cromatografia gasosa. Desde então a micro extração em gota única (SDME) tem sido muito aplicada como procedimento de extração.

A metodologia consiste em utilizar uma gota de solvente imiscível na fase aquosa, essa gota é suspensa na ponta de uma agulha e a agulha modo ser inserida diretamente na amostra contendo os analitos ou inserida na região superior a amostra (modo *headspace*) (JEANNOT, 1996).

Assim, a aplicação de técnicas que permitam a extração simultânea de resíduos de agrotóxicos com uma menor demanda de solvente e com um número reduzido de etapas de preparação e purificação de amostras complexas, tais como a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura deve ser investigada em diversas matrizes.

## **2.7-Técnicas de análise multiresíduo**

Ao analisar uma amostra, frequentemente, têm-se uma mistura de vários componentes em uma matriz complexa. Para amostras que contenham

componentes desconhecidos eles precisam ser separados dos demais, de modo que cada componente individual possa ser identificado e até mesmo quantificado por um determinado método analítico (SILVA, 2008).

Os componentes dessa mistura podem ser separados utilizando as diferenças nas propriedades físicas e químicas dos componentes individuais (SILVA, 2008).

Nas análises multiresíduos de agrotóxicos em alimentos, tradicionalmente, a cromatografia gasosa (CG) ou a cromatografia líquida têm sido as técnicas analíticas escolhidas, devido a suas excelentes características de separação cromatográfica e sensibilidade (SILVA, 2008).

A cromatografia está baseada na partição dos analitos entre uma fase móvel e uma fase estacionária. A distribuição, exclusão, partição ou adsorção seletiva dos componentes é um processo de equilíbrio dinâmico e as moléculas dos analitos ora estão retidas na fase estacionária, ora deslocando-se com a fase móvel (FRINHANI, 2005).

A cromatografia gasosa é utilizada para a separação de amostras gasosas, líquidas voláteis e termicamente estáveis; substâncias solúveis em água ou solventes orgânicos; com baixo peso molecular (2 a 800) (FRINHANI, 2005)

O sistema de detecção utilizado em análise de resíduos em alimentos depende do tipo de substância a ser analisada, ou seja, quais elementos estão presentes nos ingredientes ativos dos agrotóxicos (SILVA, 2008).

O detector por captura de elétrons (ECD) explora o fenômeno da recombinação, baseando-se na captura de elétrons pelos compostos que têm afinidade por elétrons livres, o detector mede a diminuição da corrente elétrica resultante do processo de detecção (FRINHANI, 2005).

## 3-OBJETIVOS

### Objetivos gerais

- Adaptar a técnica de extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura (ESL-PBT) e a de extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (ELL-PBT) para a extração e análise dos princípios ativos azoxistrobina, bifentrina, ciproconazol, iprodiona, clorotalonil, lambda-cialotrina, tiametoxam, procimidona, cipermetrina, deltametrina, endossulfam e clorpirifós em uva e suco de uva industrializado.

### Objetivos específicos

- Otimizar a técnica ESL-PBT para os princípios ativos, avaliando-se parâmetros tais como, solvente extrator, proporções entre os solventes extratores, massa da amostra, tempo de fortificação das amostras, tempo de agitação, tipo de agitação, tempo de congelamento das amostras, pH das amostras, efeito da força iônica.
- Validar a técnica ESL-PBT para os analitos, determinando os parâmetros: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intermediária e exatidão.
- Quantificar os princípios ativos de interesse em amostras de uva e suco de uva industrializado.
- Correlacionar os níveis de resíduos encontrados com os limites de tolerância estabelecidos pela legislação para os agrotóxicos autorizados.

## 4-MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Preparo de soluções-padrão

Soluções-padrão estoque de cada agrotóxico estudado, na concentração de  $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ , foram preparadas pela solubilização de padrões de clorotalonil (99,3 % m/m), clorpirifós (99,0 % m/m), thiamethoxam (99,7 % m/m), Procimidona (99,9 % m/m), endossulfam (73,2 % m/m), ciproconazol (99,8 % m/m), Iprodiona (99,3 % m/m), Bifentrina (92,2 % m/m), lambda-cialotrina (86,5 % m/m), cipermetrina (92,4 % m/m), deltametrina (99,7 % m/m) e azoxistrobina (99,9 % m/m) obtidos da Sigma-Aldrich, em acetonitrila da Vetec/HPLC. Preparou-se soluções nas seguintes concentrações: tiametoxam e ciproconazol na concentração de  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ , Iprodiona e azoxistrobina na concentração de  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ , endossulfam, bifentrina, clorpirifós, procimidona e clorotalonil na concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , foi preparada a partir da diluição das soluções-padrão estoque, em acetonitrila.

Usou-se como padrão interno uma solução ( $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) de parationa metilica (99,0 % m/m), obtida da Vetec acetonitrila. A partir da diluição da solução-padrão estoque foi preparada uma solução de trabalho na concentração  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , com o mesmo solvente.

Estas soluções foram armazenadas em geladeira à temperatura de aproximadamente  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2. Amostras de uva

Para a realização da otimização e validação da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) foram utilizadas amostras de uva isentas de agrotóxicos.

Foram preparados brancos de cada amostra de uva para confirmar a ausência dos agrotóxicos através da injeção no cromatógrafo gasoso com detector por captura de elétrons e comparação dos tempos de retenção dos agrotóxicos.

### **4.3. Extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT)**

#### **4.3.1. Preparo e fortificação das amostras de uva**

A uva sem semente foi triturada em um multiprocessador doméstico até total homogeneização. Em seguida, em frascos de vidro de 22,0 mL de capacidade, foram adicionadas 3,0000 g de polpa de uva, medida em balança analítica (Sartorius BP 2215), sendo esta fortificada com 80,0 µL da solução de trabalho contendo os doze agrotóxicos. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por aproximadamente 3 horas em recipiente aberto, para que houvesse maior interação dos agrotóxicos com a amostra e para a evaporação do solvente. Posteriormente, estas amostras foram submetidas aos procedimentos de extração dos doze agrotóxicos estudados.

#### **4.3.2. Extração dos agrotóxicos em uva**

O método de extração consiste em linhas gerais, colocar 3,0000 g de amostra de uva foram colocadas em contato com um volume de mistura extratora na proporção de aproximadamente 1:2 fase água/fase orgânica. A mistura é homogeneizada e colocada no freezer a -20 °C por um tempo não inferior a 3 horas e não superior a 24 horas. Após a separação de fases pelo congelamento da polpa e da fase aquosa, o sobrenadante contendo os solventes orgânicos e os analitos de interesse é passado por um funil de vidro contendo cerca de 2,0 g de sulfato de sódio anidro (Vetec). Desse extrato 1,5 mL é coletado em um vial e adicionado 15 µL do padrão interno. O volume de fase orgânica coletado após a filtração foi sempre igual a 8,0 mL.

Os extratos foram analisados utilizado cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2014) com detector por captura de elétrons (CG-DCE) localizado no laboratório de química analítica (LAQUA) pertencente à Universidade Federal de Viçosa, e as concentrações dos agrotóxicos foram determinadas pela

utilização do método de padronização interna.

#### **4.4. Otimização da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura**

A otimização da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura foi adaptada das técnicas para extração de deltametrina e cipermetrina em leite (GOULART, 2003) da técnica para extração de clorpirifós, cipermetrina,  $\lambda$ -cialotrina e deltametrina em tomate (PINHO, 2007) e para a extração de atrazina, thiamethoxam, triadimenol e deltametrina em amostras de abacaxi (COSTA, 2010).

Os fatores que foram avaliados para otimizar a técnica ESL-PBT em amostras de uva, são mistura extratora, força iônica, pH, tipo de agitação, tempo de agitação, tempo de congelamento. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A tabela 04 são discriminados os parâmetros estudados durante a otimização da técnica ESL-PBT para amostras de uva, assim como os níveis avaliados.

**Tabela 04-** Parâmetros avaliados durante a otimização da técnica ESL-PBT para amostras de uva e os níveis avaliados

Parametro	Descrição
Mistura extratora	Acetona: Acetato de etila: Água; Acetona: Água; Acetona: Éter etílico: Água; Hexano: Diclorometano; Acetato de etila: Água: Metanol; Acetato de etila: Hexano; Acetato de etila: Água: Etanol; Acetonitrila: Água: Acetona; Acetonitrila: Acetato de Etila: Água: Acetona; Acetonitrila:Água: Acetato de Etila; Acetonitrila: Acetato de Etila: Água: Acetona: Diclorometano; Acetonitrila: Água
Adição de sal (NaCl)	0,000 molL <sup>-1</sup> ; 0,025 molL <sup>-1</sup> 0,050 molL <sup>-1</sup> ; 0,075 molL <sup>-1</sup> 0,100 molL <sup>-1</sup> ; 0,200 molL <sup>-1</sup>
pH	pH = 1,65 pH = 4,69 pH= 10 ,69
Homogeneização	Mesa agitadora; Vortex; Ultrassonicador; Agitador vertical
Tempo de agitação	0 min; 5 min; 10 min; 15 min; 20 min
Tempo de congelamento	3 h; 6 h; 18 h; 24 h

#### 4.4.1. Avaliação da mistura extratora ideal

Para a ESL-PBT dos agrotóxicos de interesse em uva foram avaliadas diversas misturas de solventes, constituídas dos mais diversos tipos de solventes orgânicos como mostrado nas tabelas 05, 06 e 07, tendo o objetivo de avaliar a taxa de recuperação dos princípios ativos a partir das modificações

da polaridade da mistura extratora. No primeiro momento verificou-se a possibilidade de substituir a acetonitrila uma vez que em função da crise mundial a mesma tornou-se inviável financeiramente. Posteriormente tentou reduzir o volume usado de acetonitrila.

O volume total das misturas extratoras adicionadas às amostras de uva fortificadas de acordo com o item 1.1.3.1 foi sempre igual a 8,0 mL. A composição das misturas extratoras avaliadas foram divididas em 3 grupos sendo o primeiro sem o uso de acetonitrila (tabela 05), o segundo com um volume reduzido de acetonitrila (tabela 06) e o terceiro usando as misturas propostas por Costa (2010) tabela 07.

**Tabela 05.** Composição das misturas extratoras sem acetonitrila empregadas em amostras de uvas fortificadas

Mistura extratora	Volumes da mistura extratora (mL)							
	Acetona	Água	Acetato de etila	Hexano	Éter etílico	Diclorometano	Etanol	Metanol
1	7,5	1,5	0,5	-	-	-	-	-
2	7,0	1,5	1,0	-	-	-	-	-
3	6,5	1,5	1,5	-	-	-	-	-
4	6,0	1,5	2,0	-	-	-	-	-
5	7,5	1,5	-	-	0,5	-	-	-
6	7,0	1,5	-	-	1,0	-	-	-
7	6,5	1,5	-	-	1,5	-	-	-
8	-	2,0	-	5,1	-	0,9	-	-
9	-	3,0	3,0	-	-	-	-	2,0
10	-	3,0	3,0	-	-	-	2,0	-
11	-	1,0	0,8	6,2	-	-	-	-
12	-	1,0	1,6	5,4	-	-	-	-

**Tabela 06.** Composição das misturas extratoras empregadas usando baixo volume de acetonitrila em amostras de uva fortificadas

Mistura extratora	Volumes adicionados (mL)				
	Acetonitrila	Água	Acetato de etila	Diclorometano	Acetona
1	2,0	2,0	-	-	2,0
2	1,5	2,0	-	-	2,5
3	1,0	2,0	-	-	3,0
4	2,5	2,0	-	-	1,5
5	3,0	2,0	-	-	1,0
6	1,0	2,0	1,0	-	2,0
7	1,5	2,0	0,5	-	2,0
8	2,0	2,0	-	0,050	2,0
9	1,0	2,0	2,0	0,050	-
10	1,0	2,0	0,5	-	2,5
11	0,5	2,0	0,5	-	3,0
12	1,0	2,0	-	0,050	3,0
13	0,50	2,0	-	0,050	3,5
14	1,5	2,0	0,5	0,050	2,0
15	1,0	2,0	0,5	0,050	2,5
16	0,5	2,0	0,5	0,050	3,0

**Tabela 07.** Composição das misturas extratoras propostas por Costa (2010), empregadas em amostras de uvas fortificadas

Mistura extratora	Volumes adicionados (mL)		
	Acetonitrila	Água	Acetato de etila
1	5,5	3,0	1,5
2	6,5	1,0	1,5
3	8,0	1,0	-

Nessa avaliação foi levado em consideração além da mistura que apresentou melhores porcentagens de recuperação para a maioria dos compostos, as características principais do método que é a formação de fase única com a solução aquosa e a separação dessas fases com o abaixamento da temperatura.

#### 4.4.2. Avaliação do tipo de homogeneização da amostra com a mistura extratora

Avaliou-se a influência do tipo de homogeneização de amostras de uva

com a mistura extratora na eficiência de extração dos agrotóxicos avaliados. Foram estudadas as seguintes formas de homogeneização: agitação mecânica em mesa agitadora a 25 °C e 200 oscilações por minuto, ultra-som (Unique), vortex (Certomat), e agitador vertical da marca Marconi. Seguiu-se o método proposto no item 1.1.3.2, fixando-se a seguinte mistura extratora 6,5 mL de acetonitrila, 1,5 mL de acetato de etila e 1,0 mL de água.

#### **4.4.3. Avaliação do tempo de homogeneização da amostra com a mistura extratora**

Seguindo o método proposto no item 1.1.3.2 avaliou-se a influência do tempo de homogeneização de amostras de uva com a mistura extratora na eficiência de extração dos agrotóxicos avaliados mantendo a mesa agitadora como modo de agitação.

Foram avaliados os seguintes tempos de agitação 0 min, 5 min, 10 min, 15 min e 20 min.

#### **4.4.4. Avaliação do efeito da força iônica**

O efeito do aumento da força iônica pela adição de NaCl, na eficiência de extração dos agrotóxicos estudados em amostras de uva foi avaliado usando a metodologia proposta no item no item 1.1.3.2, utilizando a mistura extratora, 6,5 mL de acetonitrila, 1,5 mL de acetato de etila e 1,0 mL de água, o modo de homogeneização mesa agitadora e o tempo de homogeneização de 15 minutos. Para avaliar esse parâmetro a água adicionada à amostra foi substituída por soluções de cloreto de sódio (Isofar) nas concentrações de 0,025; 0,050; 0,075; 0,100; 0,200 mol L<sup>-1</sup>, aumentando-se assim a força iônica do meio.

#### **4.4.5. Avaliação do efeito do pH**

O efeito da alteração do pH das amostras de uva foram avaliados usando a metodologia proposta no item 1.1.3.2, usando a mistura extratora constituída por 6,5 mL de acetonitrila, 1,5 mL de acetato de etila e 1,0 mL de água, o modo de homogeneização mesa agitadora e o tempo de homogeneização de 15 minutos e sem alteração da força iônica. Os valores de

pH avaliados foram 1,65; 4,56 e 10,69.

A avaliação desse parâmetro foi realizada substituindo o volume de água adicionada à amostra por soluções de HCl ( 0,5 mol L<sup>-1</sup>) e NaOH ( 0,5 mol L<sup>-1</sup>).

#### **4.4.6. Avaliação do tempo de congelamento das amostras**

O tempo que as amostras de uva permaneceram no freezer (-20 °C) após metodologia de extração proposta no item 1.1.3.2 fixando a mistura extratora constituída por 6,5 mL de acetonitrila, 1,5 mL de acetato de etila e 1,0 mL de água, o modo de homogeneização mesa agitadora e o tempo de homogeneização de 15 minutos e sem alteração da força iônica e do pH Avaliaram-se os tempos de 3, 6, 18 e 24 horas.

#### **4.4.7 Escolha do padrão interno**

A escolha do padrão interno foi realizada de acordo com Ribani, 2004 sendo que a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção 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.

#### **4.5. Análise cromatográfica**

As análises qualitativas e quantitativas dos doze princípios ativos avaliados foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2014, com detector por captura de elétrons (DCE), equipado com auto-injetor AOC-20i.

As condições cromatográficas otimizadas para as análises foram, programação de aquecimento da coluna cromatográfica, temperaturas do injetor e do detector, modo de injeção, e vazão do gás de arraste.

As determinações foram realizadas visando um tempo reduzido de análise, uma boa resolução e separação dos picos dos agrotóxicos de interesse.

A seguir encontram-se descritas as condições ideais determinadas:

- Coluna capilar HP-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5 % de fenilmetilsiloxano e 95 % de dimetilsiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura de filme.
- Programação de aquecimento da coluna:  
 $150\text{ }^{\circ}\text{C} (2')$   $\xrightarrow{40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$   $210\text{ }^{\circ}\text{C} (2')$   $\xrightarrow{10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$   $250\text{ }^{\circ}\text{C} (2')$   $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}}$   $290(7')$
- Tempo total de análise: 20' 30"
- Temperatura do injetor: 280  $^{\circ}\text{C}$
- Temperatura do detector: 300  $^{\circ}\text{C}$
- Volume injetado: 1,0  $\mu\text{L}$
- Divisão de fluxo: 1:5
- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2  $\text{mL min}^{-1}$

#### 4.6. Validação do método analítico

As figuras de mérito avaliadas neste estudo para validação do método extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) em uva e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE) foram seletividade, linearidade de resposta do método, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária).

A realização dos procedimentos realizados na validação do método analítico proposto foram baseados nas orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005), do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007), no artigo sobre normas de validação publicado por Ribani *et al* (2004) e no artigo sobre validação de métodos analíticos escrito por Brito *et al* (2003) .

##### 4.6.1. Seletividade

A seletividade do método analítico foi avaliada comparando-se cromatogramas de extratos da matriz isenta dos agrotóxicos, com cromatogramas de uma solução em acetonitrila contendo os princípios ativos

de interesse. Todos os extratos foram preparados e analisados de acordo com a metodologia otimizada.

Na seletividade do método de análise avaliaram-se as condições cromatográficas que permitiram a separação de todos os picos dos agrotóxicos.

#### 4.6.2. Linearidade de resposta do método

A linearidade de resposta do método foi determinada pela injeção de extratos obtidos de amostras fortificadas em 10 concentrações distintas dos princípios ativos clorotalonil (0,83 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), clorpirifós (0,83 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), cipermetrina (0,83 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), bifentrina (0,83 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), tiametoxam (4,16 a 365,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), endossulfam (3,00 a 292,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), deltametrina (6,66 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), azoxistrobina (6,66 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), lambda-cialotrina (3,5 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), procimidona (3,5 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), iprodiona (3,5 a 581,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) submetidas à técnica de extração otimizada.

Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as razões das áreas dos analitos e do padrão interno conforme descrito com as concentrações mencionadas. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação obtido pela regressão linear destas curvas e também pela análise do gráfico de resíduos.

O método utilizado para análise de dados é o MMQO. O ajuste de uma equação de calibração pelo MMQO assume várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo: i) os resíduos são variáveis aleatórias com média zero ii) os resíduos são variáveis normalmente distribuídas iii) os resíduos são homoscedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de  $X$ ; iv) o resíduo de uma observação não é correlacionado com o resíduo em outra. Os resíduos não são apenas não correlacionados, mas independentes; e v) a relação entre  $X$  e  $Y$  é linear (DRAPER & SMITH, 1998). Algumas possíveis violações a estas premissas encontram-se na possibilidade de haver valores dispersos no conjunto de dados, dos resíduos da regressão não seguirem a distribuição normal, não apresentarem variância constante (heteroscedasticidade), não serem independentes (autocorrelação) e a função não seguir o modelo linear.

### **4.6.3. Limite de detecção e limite de quantificação do método**

O limite de detecção (LD) do método proposto foi determinado considerando o valor igual a três vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido pela injeção e análise por CG-DCE de extrato de amostra de uva isenta de agrotóxicos. O limite de quantificação (LQ) foi determinado considerando o valor igual a dez vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido pela injeção e análise por CG-DCE de extrato de amostra de uva isenta de agrotóxicos.

Extratos da matriz contaminados pelos agrotóxicos em estudo em diferentes concentrações foram injetados até ser observada a relação sinal ruídos nas proporções 3:1 para os limites de detecção e 10:1 para o limite de quantificação.

### **4.6.4. Exatidão**

Para a avaliação da exatidão do método de ESL-PBT proposto foram realizados ensaios de recuperação. Nestes os agrotóxicos foram adicionados às amostras de uva em concentrações iguais a uma, duas e dez vezes os seus limites de quantificação.

### **4.6.5. Precisão**

Por um estudo intralaboratorial avaliou-se a precisão do método, na qual foi estudada a repetitividade e a precisão intermediária.

#### **4.6.5.1. Repetitividade**

A repetitividade, de acordo com o que é recomendado pelo INMETRO (2007), foi avaliada pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos de amostras de uva fortificadas com os doze agrotóxicos, e submetidas à técnica de extração otimizada, em concentrações iguais a dez vezes o limite de quantificação de cada agrotóxico. Para tal avaliação, determinou-se os coeficientes de variação (CV) referentes à razão da área do analito/ área do padrão interno para cada agrotóxico.

#### 4.6.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em estudo, e seus respectivos coeficientes de variação, obtidos da análise dos extratos de sete amostras de uva fortificadas com os agrotóxicos estudados, e submetidas pela técnica de extração otimizada, em concentrações iguais a dez vezes o limite de quantificação de cada um, em três dias diferentes (1º, 3º e 7º dia).

#### 4.7. Influência do efeito de matriz dos componentes da uva na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa

Foi avaliada pela análise e comparação de curvas analíticas a influência dos componentes naturais da uva na resposta do detector, em que as soluções-padrão foram preparadas em solvente puro (acetonitrila) e em extrato da matriz isenta dos agrotóxicos estudados. Duas séries de soluções-padrão contendo os agrotóxicos foram preparadas em concentrações variadas para cada agrotóxico conforme descrito na tabela 08.

**Tabela 08** – Concentrações dos analitos para avaliar o efeito de matriz

Agrotóxicos	Concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$
Clorotalonil	40; 60; 80; 100; 140; 160; 180
Clorpirifós	20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180
Procimidona	40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180
Endossulfam	90; 120; 150; 180; 210; 240; 270
Ciproconazol	75; 90; 105; 120; 135; 150; 180
Iprodiona	40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180
Bifentrina	40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180
Lambda-cialotrina	40; 60; 80; 100; 140; 160; 180
Cipermetrina	40; 60; 80; 100; 140; 160; 180
Deltametrina	30; 120; 150; 210; 240; 270
Azoxistrobina	60; 90; 120; 150; 180; 210; 240; 270
Tiametoxam	30; 90; 120; 150; 180; 210; 270

Na primeira série, as soluções-padrão foram preparadas pela diluição da solução de trabalho contendo os analitos em solvente orgânico puro. Na segunda série, as soluções-padrão foram preparadas pela diluição da mesma solução de trabalho em extrato da matriz. Este extrato foi obtido a partir de amostras de uva, isentas dos princípios ativos, submetidas à técnica ESL-PBT otimizada. Todas as soluções deste ensaio foram preparadas em triplicata.

O efeito de matriz também foi avaliado pela comparação das curvas analíticas, sendo calculada a porcentagem desse efeito para cada um dos doze agrotóxicos estudados.

#### 4.8. Aplicação da técnica ESL-PBT otimizada em amostras de uva

A técnica ESL-PBT desenvolvida para determinação dos agrotóxicos otimizada e validada, foi aplicada em onze amostras de uvas de diferentes variedades procedentes de quatro mercados de hortifrutigranjeiros localizados na cidade de Viçosa, Minas Gerais, conforme apresentado na tabela 09.

**Tabela 09-** Relação das amostras de uva analisadas por mercado

Mercado	Variedades de uva
A	Itália, rubi e rosada
B	Itália, rubi e rosada
C	Itália e rubi
D	Itália, Brasil e benkata

O método otimizado e validado foi aplicado em nove amostras de suco de uva de diferentes marcas sendo sete sucos “prontos para beber” e dois de sucos concentrados. As amostras foram conservadas em freezer ou geladeira até o momento da análise.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, tomando-se cuidado especial na limpeza do material utilizado.

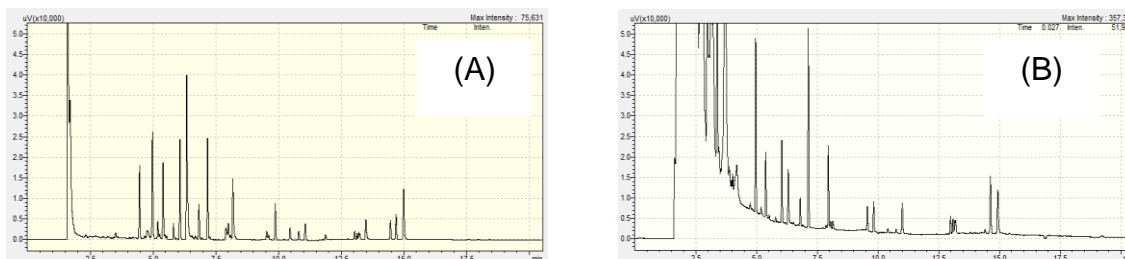
#### 4.9. Análise Estatística

Os dados obtidos para a comparação das médias foram tratadas estatisticamente pelo teste Tukey usando software apropriado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise cromatográfica

A identificação dos agrotóxicos foi realizada por comparação entre os tempos de retenção referentes aos picos em solução-padrão e em extrato de uva. Cromatogramas característicos de uma solução-padrão contendo os doze agrotóxicos e de um extrato da matriz fortificada com os mesmos são mostrados na Figura 09.



**Figura 09** (A) Cromatograma da solução-padrão dos agrotóxicos (B) cromatograma de extrato obtido de amostra de uva fortificada e submetida à técnica ESL-PBT (1- Clorotalonil  $t_R = 4,98$ ; 2- Parationa Métilica  $t_R = 5,40$ ; 3- Clorpirifós  $t_R = 6,07$ ; 4-Tiametoxam  $t_R = 6,33$ ; 5- Procimidona  $t_R = 6,83$ ; 6 - Endossulfam  $t_R = 7,17$ ; 7- Ciproconazol  $t_R = 7,90$ ; 8- Endossulfam  $t_R = 7,99$ ; 9-Iprodiona  $t_R = 8,17$ ; 10-Bifentrina  $t_R = 9,86$ ; 11 e 12 - Lambda-cialotrina  $t_R = 10,79/11,05$ ; 13, 14 e 15 – Cipermetrina  $t_R = 13,02/13,13/13,20$ ; 16 e 17 –Deltametrina  $t_R = 14,45/14,67$ ; 18- Azoxistrobina  $t_R = 14,98$ ).

As condições cromatográficas estabelecidas possibilitaram uma boa separação e resolução dos quatro princípios ativos analisados. O tempo total de análise foi de 20' 30" , que pode ser considerado curto, pelo fato de serem doze compostos presentes no extrato. Observam-se no cromatograma do extrato (cromatograma B da Figura 13), a presença de vários picos, atribuídos aos componentes da uva, próximos ao pico referente ao solvente acetonitrila, principalmente nos três primeiros minutos de análise.

A presença de picos duplos/triplos para os compostos endossulfam, lambda-cialotria, deltametrina e cipermetrina está relacionada com a conversão destes compostos em isômeros sendo que a quantificação foi realizada somando-se a áreas dos picos.

## **5.2. Otimização da técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura**

De acordo com Ribani e colaboradores (2004), 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 do método e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120 %, com precisão de até  $\pm 15$  %.

O método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) foi otimizado e validado para análise de agrotóxicos em diferentes matrizes. Verifica-se, no entanto, que para cada matriz e para cada grupo de compostos é necessário um ajuste do método para se obter as características ideais.

Nesse trabalho procurou-se adaptar o método de extração e análise de um grupo de agrotóxicos em uvas (e posteriormente em suco industrializado de uva). Os agrotóxicos selecionados para estudo foram aqueles cuja utilização é permitida na cultura e aqueles que têm sido encontrados na uva consumida “in natura”.

### **5.2.1. Avaliação da mistura extratora ideal**

Anastassiades et al. (2003) afirmam que na escolha do solvente mais adequado para a extração líquido-líquido em fase única, devem ser considerados aspectos como a miscibilidade em água e a seletividade do solvente. A miscibilidade em água está diretamente relacionada com a maior habilidade de formação de fase única e posterior formação de duas fases, seja pela adição de sais, solventes não polares, ou por abaixamento de temperatura.

Em 2007, Dardengo e Pinho, otimizaram e validaram a técnica extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura, para análise de clorpirifós,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina em batata e tomate, respectivamente. Durante seus trabalhos, observaram que a polaridade da mistura extratora influenciava na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos.

Estudo realizado por Vieira (2005) mostrou que a proporção 1:2 entre

água e acetonitrila, proporcionou melhores porcentagens de recuperação dos piretróides  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina em solo usando a técnica ESL-PBT.

Em 2010 Costa considerando que cerca de 85% do abacaxi é constituído por água utilizou 1,5 mL de água e 8,5 mL de uma mistura de acetonitrila e acetato de etila para cada 3,0000 g mantendo a relação 1:2 proposta por Vieira em 2005.

Levando em consideração que a uva é composta de aproximadamente 95% de composição sendo água optou-se por adicionar a cada 3,0000 g de polpa de uva 1,00 mL de água e 8,00 mL de solvente orgânico para que a proporção 1:2 fosse praticamente mantida.

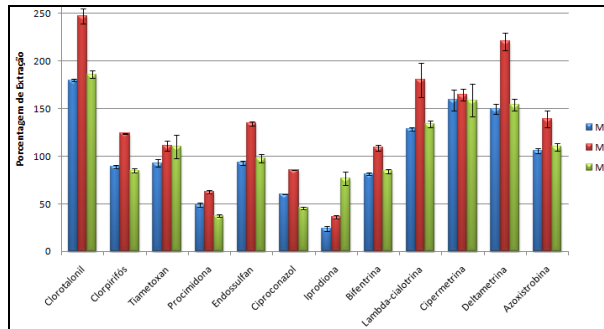
De início tentou-se substituir o uso da acetonitrila na mistura extratora devido à inviabilidade financeira da mesma. Todas as misturas extradoras que não continham acetonitrila mostraram-se ineficazes no processo devido a que não havia formação de fase única ou não se conseguia boa separação das fases durante o abaixamento da temperatura.

Estas mesmas dificuldades foram observadas quando se trabalhou com as misturas extradoras contendo diferentes proporções de acetonitrila.

Então utilizou a mistura extratora proposta por Costa 2010, sendo essa adaptada para a extração dos princípios ativos em uva mantendo a proporção 1:2 de acordo com os trabalhos de Vieira (2007).

As misturas extradoras propostas por Costa (2010) diferem na polaridade pela modificação nas proporções entre acetonitrila, água e acetato de etila como representado na tabela 07 (pag 35). Para cada 3,0000g de uva foram usadas as misturas M1, M2 e M3.

Os resultados mostrados na Figura 10 indicam que à medida que se diminui a polaridade da mistura extratora, a porcentagem de recuperação dos agrotóxicos aumenta. Ou seja, a mistura extratora menos polar, além de promover um aumento na taxa de recuperação dos compostos menos polares como a deltametrina, possibilitou também um aumento na porcentagem de extração dos compostos mais polares. Resultados semelhantes a estes foram obtidos por Pinho (2007), que empregando um planejamento de misturas extradoras, observou-se que a mistura menos polar proporcionou melhores níveis de recuperação de agrotóxicos em tomate e também por Costa (2010) para extração de agrotóxicos em abacaxi.



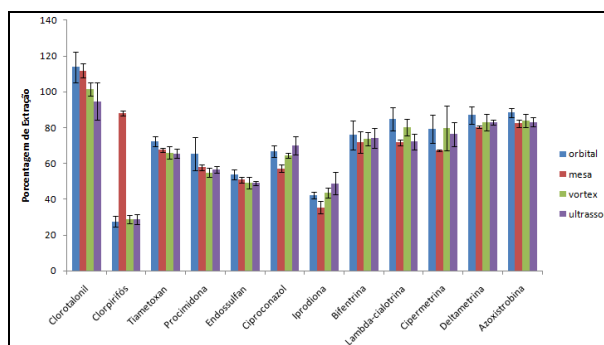
**Figura 10.** Influência da polaridade da mistura extratora na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos.

De acordo com os resultados mostrados na figura 14 e avaliando estatisticamente pelo teste tukey a 95% de probabilidade foi considerada como mistura extratora ideal a menos polar, constituída por 6,5 mL de acetonitrila, 1,0 mL de água e 1,5 mL de acetato de etila, já que proporcionou os melhores rendimentos de extração.

### 5.2.2. Avaliação do tipo de homogeneização da amostra com a mistura extratora

Uma etapa importante na extração de agrotóxicos é o contato entre a mistura extratora e a amostra. Nesta fase do experimento variou-se o tipo de agitação a fim de verificar o efeito desse parâmetro no rendimento de extração dos princípios ativos.

Na avaliação dos efeitos dessa variável, as amostras foram submetidas a quatro modos de homogeneização diferentes: mesa agitadora por 10 minutos, ultra-som por 2 minutos, e vortex por 1 minuto e agitador vertical por 10 minutos. Os resultados são apresentados na Figura 11.



**Figura 11.** Influência do modo homogeneização no método ESL-PBT na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em amostras de uva.

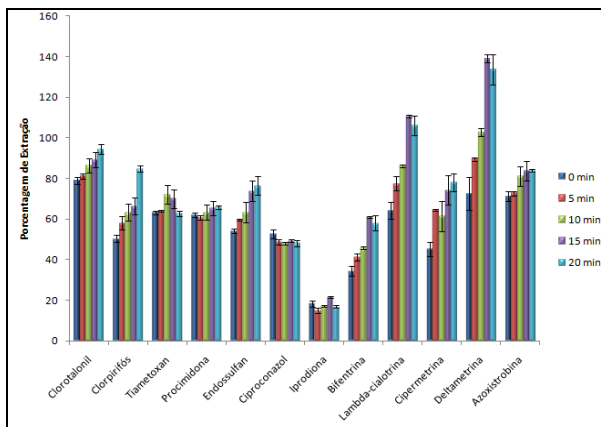
Na Figura 11. pode-se visualizar o efeito do tipo de agitação usada durante a etapa de extração na eficiência da mesma e aplicando o teste Tukey, ao nível de 95 % de probabilidade, pode-se afirmar que os modos de homogeneização proporcionam porcentagens de recuperação estatisticamente iguais para todos os compostos estudados com exceção do clorpirifós onde a mesa agitadora apresentou resultados mais satisfatório no que diz respeito a porcentagem de recuperação.

Em relação ao desvio padrão nos resultados para os ensaios avaliados com exceção da iprodiona e bifentrina a agitação em mesa agitadora produziu menores desvios-padrão.

O uso da mesa agitadora mostrou-se uma melhor alternativa para a extração porque durante a homogeneização entre mistura extratora e amostra, proporcionou melhor precisão dos resultados, altos rendimentos de extração e uma melhor freqüência analítica ao método.

### **5.2.3. Avaliação do tempo de homogeneização da amostra com a mistura extratora**

Escolhido o modo de homogeneização, avaliou-se o tempo em que a mistura extratora e a amostra de uva deveriam ficar em contato sob agitação. Para avaliar esse parâmetro as amostras foram submetidas a cinco tempos distintos de agitação em mesa agitadora a 200 oscilações por minuto (opm) a temperatura ambiente: 0; 5; 10; 15 e 20 minutos. Os resultados para esse teste é mostrado na figura 12.



**Figura 12.** Influência do tempo de homogeneização na ESL-PBT na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em amostras de uva.

De acordo com os resultados mostrados na figura 16 e aplicando o teste Tukey ao nível de 95 % de probabilidade observa-se que para os tempos inferiores a 15 minutos (0; 5 e 10 minutos) os resultados encontrados são estatisticamente iguais sendo estes inferiores aos resultados para os tempos superiores ou iguais a 15 minutos (15 e 20 minutos).

É válido ressaltar que ao nível de 95 % de probabilidade do teste Tukey para todos os compostos avaliados, exceto para o clorpirifós no qual o tempo de homogeneização igual a 20 minutos apresenta melhores resultados para a porcentagem de recuperação, para todos os outros os resultados são estatisticamente iguais.

Portanto, levando em consideração a frequência analítica do método optou-se por um tempo de agitação igual a 15 minutos em mesa agitadora.

#### 5.2.4. Avaliação do efeito da adição de sal

O particionamento de agrotóxicos entre as 2 fases depende das diferenças de polaridade das fases superior e inferior. Tipicamente, os compostos polares preferem a camada aquosa, enquanto os compostos não polares são extraídos na camada orgânica. A concentração salina e o tipo de íons utilizados produzem diferentes graus de separação das fases. Assim a

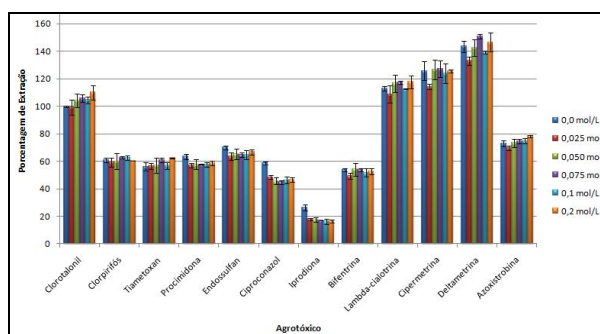
adição de sal na amostra apresenta maior influência para agrotóxicos polares (MAJORS, 2010).

Segundo Lanças (2004), na extração de agrotóxicos é aconselhável o aumento da força iônica, já que a adição de certa quantidade de sal à mistura extratora pode provocar aumento na porcentagem de recuperação, principalmente de compostos polares, já que propicia redução da solubilidade destes na matriz, facilitando sua extração para a fase orgânica.

A adição de NaCl em solução aquosa normalmente ocasiona um efeito positivo, pois ocorre solvatação dos íons pelas moléculas de água facilitando a migração dos analitos para a fase orgânica (PAWLISZIN,1997). Este efeito da adição de sal é conhecido como “salting out”, e pode ocasionar uma diminuição da solubilidade de determinados analitos na fase aquosa, o que favorece a extração. Além de melhorar a porcentagem de extração o aumento da força iônica diminui a formação de emulsão.

Entretanto um aumento considerável da força iônica pode ocasionar o rompimento da fase única na ESL-PBT, antes da etapa de congelamento da amostra, promovendo o fenômeno de partição induzida por sal (PIS) como são mostrados nos trabalhos de Rodrigues (2010).

Foram avaliados seis valores de concentração salina 0,000; 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 e 0,200 mol L<sup>-1</sup> na otimização da técnica os resultados obtidos estão mostrados na Figura 13.



**Figura 13.** Influência da adição de sal na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos no processo de extração ESL-PBT em amostras de uva.

A alteração da força iônica pela adição de solução de NaCl na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos em amostras de uva não foram significativas. Estatisticamente, ao nível de 95% de probabilidade pelo teste Tukey, o aumento da força iônica não melhora o rendimento da extração.

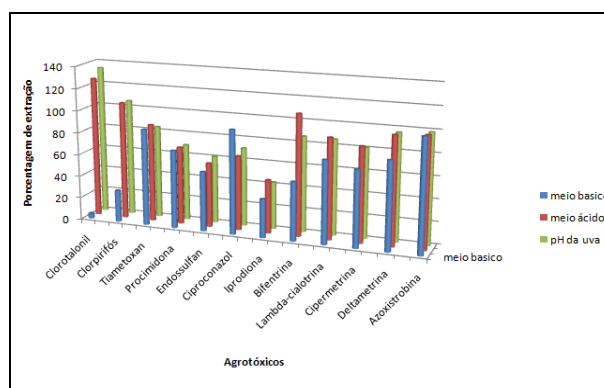
Concentrações acima de 0, 200 mol L<sup>-1</sup> foram avaliadas porém observou-se quem em tais valores a partição induzida por sal, ou a mistura extratora e amostras apresentavam dificuldades de congelamento durante a etapa de partição a baixa temperatura.

### 5.2.5. Avaliação do efeito do pH

Pesticidas tais como o clorotalonil, entre outros, são sensíveis ao pH do meio e requerem condições analíticas adequadas para evitar perdas. Em geral, os pesticidas são estáveis em pH baixo, porém alguns compostos apresentam baixos percentuais de recuperação quando em pH baixo, devido ao fato de estarem protonados e solubilizados na fase aquosa, não sendo recuperados na etapa de partição. As frutas e os vegetais apresentam um pH natural que varia entre 2,5 e 6,5. Portanto, o ajuste do pH também está relacionado à presença de coextrativos na fase orgânica, uma vez que se observa uma maior presença de gordura e ácidos graxos quando a extração é efetuada em meio ácido (PRESTES, 2009).

O pH é importante tanto para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino, como para aqueles sensíveis em meio ácido (LEHOTAY, 2005).

Na avaliação desse parâmetro foram testados 3 valores distintos de pH 1,65; 4,56 e 10,69 e os resultados estão mostrados na figura 14



**Figura 14.** Influência do pH na porcentagem de extração dos agrotóxicos em amostras de uva.

Como podemos observar pela figura 14 para todos os compostos tanto em meio ácido quanto no pH da uva sem nenhum ajuste os valores para as

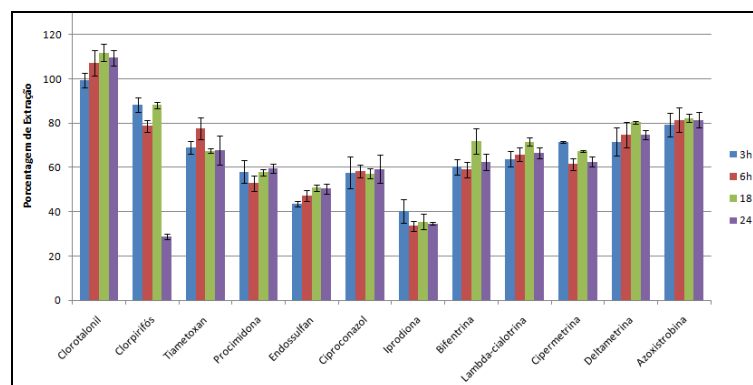
porcentagens de recuperação são estatisticamente iguais ao nível de 95% de probabilidade pelo teste Tukey e apresentam melhores resultados para todos os analitos com exceção do ciproconazol se comparado a extração realizado em meio básico.

Em meio alcalino, sob determinadas condições, o clorotalonil converte-se em 4-hidroxi-2,5,6-tricloroisoftalonitrila, justificando assim sua baixa recuperação em meio básico. Estes produtos de degradação atestam a presença dos pesticidas que lhes deram origem.

Levando todos esses fatores em consideração escolheu para a etapa de validação da metodologia proposta a utilização da amostra de uva sem nenhum ajuste de pH.

### 5.2.6. Avaliação do tempo de congelamento das amostras

O tempo que as amostras ficaram no freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi avaliado e os resultados estão mostrados na figura 15.



**Figura 15.** Influência do tempo de congelamento na porcentagem de extração dos agrotóxicos em amostras de uva.

Em conformidade com os resultados mostrados na figura 15 conclui-se que os tempos de congelamento avaliados são estatisticamente iguais ao nível de 95% de probabilidade pelo teste tukey para todos os princípios ativos estudados com exceção do clorpirifós que no tempo de 24 horas de congelamento observou-se uma redução significativa na recuperação.

Pensando na frequência analítica do método escolheu para tempo de congelamento o tempo de 3 horas em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.7. Escolha do padrão interno

Um dos principais objetivos dos métodos multirresíduo é o aumento da eficiência no laboratório e a redução das fontes de erros, minimizando a incerteza do resultado final (PRESTES, 2009). A propagação dos erros nas etapas do método ESL-PBT foi monitorada através da utilização do padrão interno parationa metílica que apresenta as vantagens de apresentar ponto de ebulição próximo aos dos analitos, não ser utilizado na cultura da uva e apresentar tempo de retenção diferente dos compostos estudados.

### 5.3. Metodologia otimizada

Propõe-se como metodologia de ESL-PBT otimizada para amostra de uva: extração de 3,0000 g de uva com 6,5 mL de acetonitrila, 1,0 mL de água e 1,5 mL de acetato de etila, seguida de agitação em mesa agitadora, a 25 °C e 200 oscilações por minuto, por 15 minutos.

Posteriormente, a mistura é deixada em freezer a aproximadamente -20 °C por no mínimo 3 horas. Decorrido o tempo estabelecido, o extrato é passado por um papel de filtro contendo 2,0000 g de sulfato de sódio anidro. A 1,5 mL do extrato são adicionados 15,0 µL de solução de parationa metílica na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Em seguida, o mesmo é armazenado em freezer, até o momento da análise cromatográfica.

A análise cromatográfica dos extratos foi feita na condição estabelecida e descrita no item 1.1.5.

A técnica ESL-PBT otimizada um consumo de pequeno volume de mistura extratora, evitando-se a necessidade de etapas de evaporação e troca de solvente. Conseqüentemente reduziram-se os riscos de contaminação e perdas de amostras, favorecendo a obtenção de altas taxas de recuperação para os compostos avaliados.

## **5.4. Validação do método analítico**

### **5.4.1. Considerações sobre validação**

A necessidade de se expor a qualidade de medições químicas, principalmente através de sua confiabilidade, está sendo cada vez mais exigida. Dados analíticos incertos podem conduzir a decisões desastrosas. Portanto, para que um método analítico gere informações seguras e interpretáveis sobre uma amostra, e se torne verdadeiramente confiável, este deve passar por uma avaliação denominada validação.

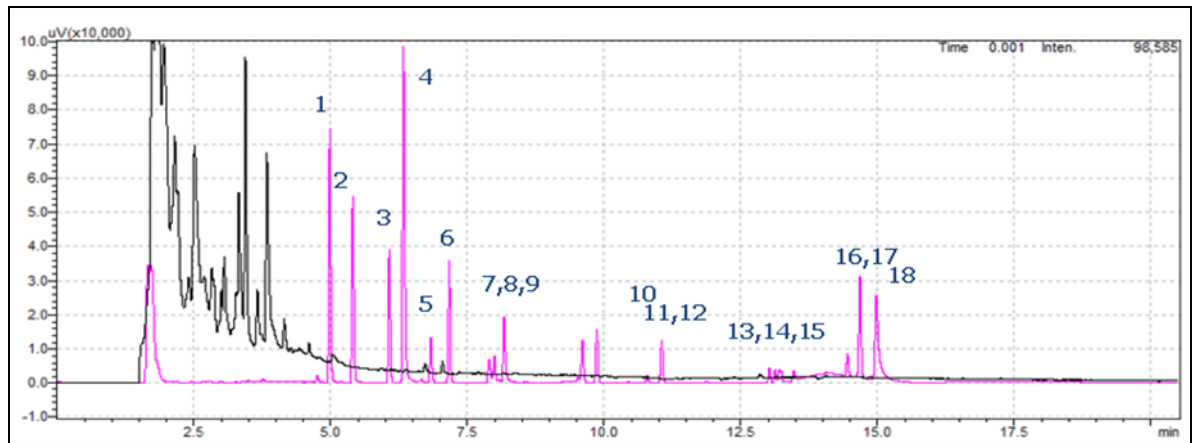
Várias definições estão descritas na literatura para validação, tratando-se, portanto, de termo não-específico. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Essa deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (BRITO, 2003).

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem Seletividade, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

### **5.4.2. Seletividade**

Para avaliar a seletividade injetou-se um padrão em solvente e um branco da matriz isenta de agrotóxicos e comparou-se a existência de picos no cromatogramas do branco da matriz no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse.

Na Figura 16 é apresentada uma superposição entre esses dois cromatogramas, sendo o cromatograma em preto do branco da matriz isenta de contaminação e o cromatograma em rosa da mistura de padrões dos analitos em acetonitrila.



**Figura 16.** Cromatograma de um extrato obtido pela ESL-PBT de uma amostra de uva isenta de agrotóxico (preto) comparado com o do padrão em acetonitrila (rosa) (1- Clorotalonil  $t_R = 4,98$ ; 2- Parationa Métilica  $t_R = 5,40$ ; 3- Clorpirifós  $t_R = 6,07$ ; 4-Tiametoxam  $t_R = 6,33$ ; 5- Procimidona  $t_R = 6,83$ ; 6 - Endossulfam  $t_R = 7,17$ ; 7- Ciproconazol  $t_R = 7,90$ ; 8- Endossulfam  $t_R = 7,99$ ; 9-Iprodiona  $t_R = 8,17$ ; 10-Bifentrina  $t_R = 9,86$ ; 11 e 12 - Lambda-cialotrina  $t_R = 10,79/11,05$ ; 13,14 e 15 – Cipermetrina  $t_R = 13,02/13,13/13,20$ ; 16 e 17 –Deltametrina  $t_R = 14,45/14,67$ ; 18- Azoxistrobina  $t_R = 14,98$ ).

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (PASCHOAL *et al.*, 2008). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas, por isso, a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação, devendo ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (RIBANI *et al.*, 2004).

Os extratos das amostras de polpa de uva, apesar da complexidade da sua composição, não apresentam interferentes nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados, tornando o método otimizado seletivo para os princípios ativos estudados.

#### 5.4.3. Linearidade de resposta do método

A linearidade de resposta de um método corresponde à capacidade do mesmo demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à

concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). Em uma análise cromatográfica esta resposta corresponde à área do pico referente a cada composto.

Através do coeficiente de correlação estima-se a qualidade da curva analítica, e conseqüentemente a linearidade de resposta do método. Se este valor for próximo a 1,00, verifica-se pequena dispersão dos pontos experimentais e que menor é a incerteza dos coeficientes. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2007) um valor acima de 0,90.

Para algumas técnicas analíticas, o modelo linear pode não ser aplicado e modelos não lineares ou polinomiais são melhores adaptados.

A linearidade de resposta do método foi determinada pela injeção e análise de extratos obtidos de amostras fortificadas em dez concentrações diferentes dos princípios ativos submetidas à técnica de extração otimizada.

Após análise cromatográfica destes extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as razões das áreas dos analitos e do padrão interno com as concentrações, obtendo-se assim as equações de reta e os coeficientes de correlação. As equações para cada composto assim como os coeficientes de correlação estão dispostos na tabela 10.

**Tabela 10-** Equações de regressão linear e os coeficientes de correlação para os doze agrotóxicos

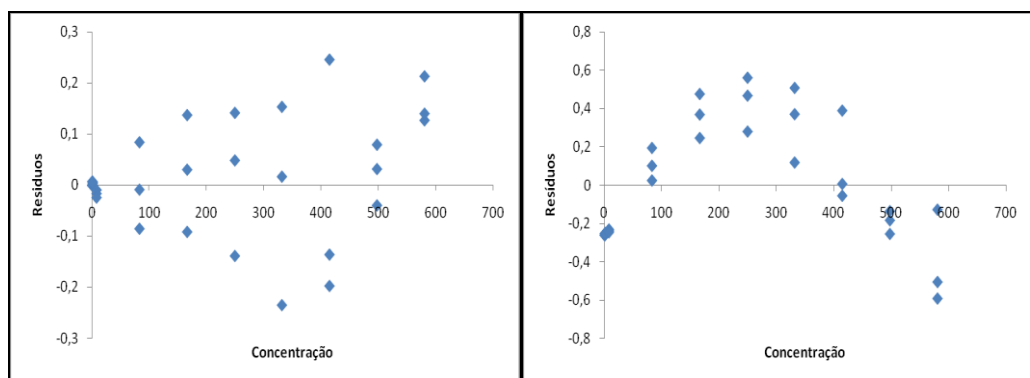
Agrotóxico	Equação	R <sup>2</sup>
Clorotalonil	$y = 0,0152x + 0,2959$	R <sup>2</sup> = 0,99
Clorpirifós	$y = 0,0058x + 0,1759$	R <sup>2</sup> = 0,99
Tiametoxam	$y = 0,0064x + 0,0365$	R <sup>2</sup> = 0,99
Procimidona	$y = 0,0019x + 0,0565$	R <sup>2</sup> = 0,98
Endossulfam	$y = 0,0305x + 0,2437$	R <sup>2</sup> = 0,99
Ciproconazol	$y = 0,0002x + 0,0018$	R <sup>2</sup> = 0,99
Iprodiona	$y = 0,0007x + 0,0141$	R <sup>2</sup> = 0,95
Bifentrina	$y = 0,003x + 0,0537$	R <sup>2</sup> = 0,99
Lambda-cialotrina	$y = 0,0047x - 0,0197$	R <sup>2</sup> = 0,99
Cipermetrina	$y = 0,0039x + 0,1443$	R <sup>2</sup> = 0,99
Deltametrina	$y = 0,0053x - 0,0179$	R <sup>2</sup> = 0,99
Azoxistrobina	$y = 0,0038x + 0,0926$	R <sup>2</sup> = 0,99

Os coeficientes de correlação encontrados foram maiores que 0,99 exceto para a procimidona e iprodiona.

Segundo Paschoal e colaboradores (2008), os valores dos coeficientes de correlação correspondentes às curvas analíticas, não são suficientes para avaliar a linearidade de um método analítico.

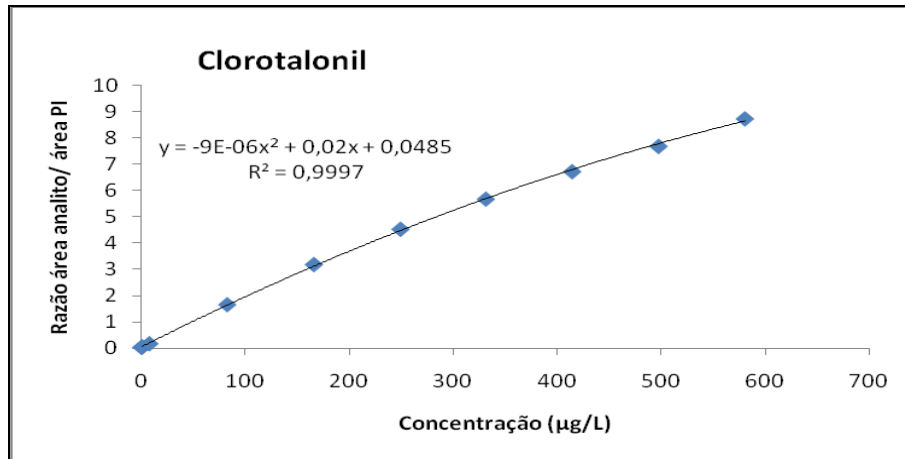
Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente. Por exemplo, uma equação polinomial pode apresentar um valor menor para a soma quadrática dos resíduos que uma equação linear, o que significaria um melhor ajuste. Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico.

A figura 17 mostra o gráfico de resíduos para o ajuste polinomial (a) e o ajuste linear (b) para o agrotóxico clorotalonil, sendo que para os demais compostos estudados observou-se comportamento semelhante.

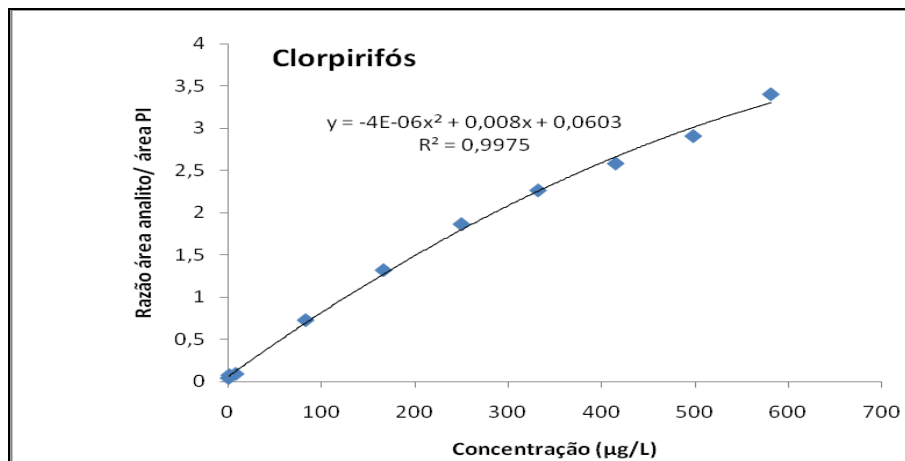


**Figura 17** - Gráficos de resíduos para o ajuste polinomial (a) e resíduos para o ajuste linear (b) para o clorotalonil.

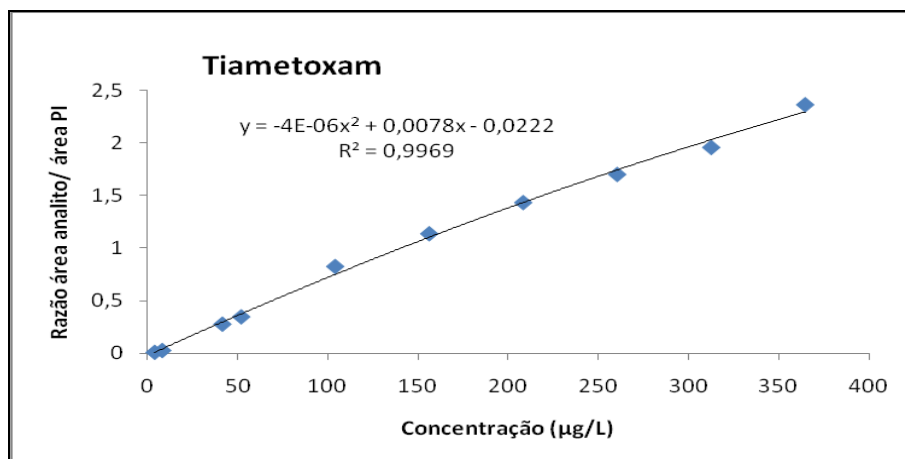
Para a faixa estudada o melhor ajuste foi o polinomial conforme mostrado nas figuras 18 a 29 uma vez que o valor para os resíduos foi menor e estes apresentaram uma distribuição adequada enquanto para o ajuste linear os resíduos mostraram que os dados na faixa de concentração estudada não são adequados.



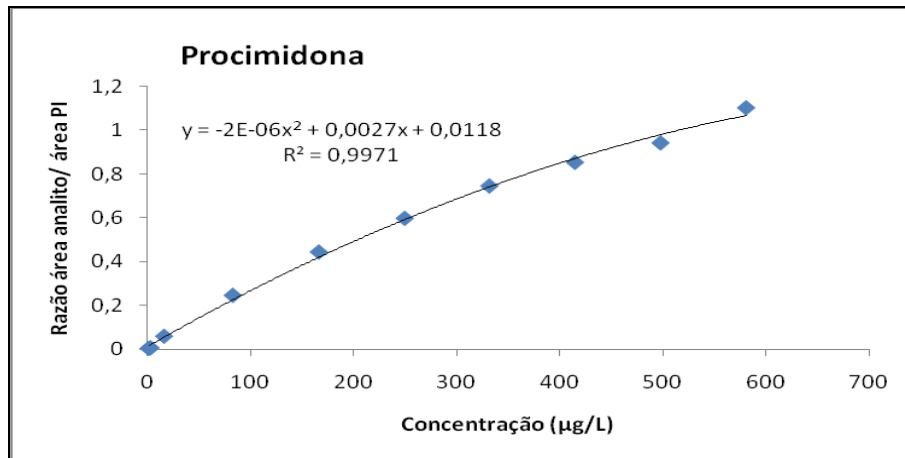
**Figura 18.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do clorotalonil em acetonitrila.



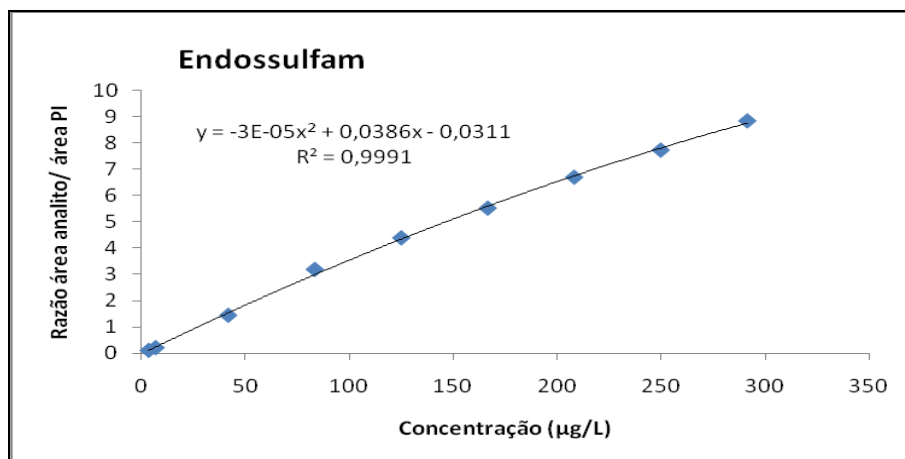
**Figura 19.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do clorpirifós em acetonitrila.



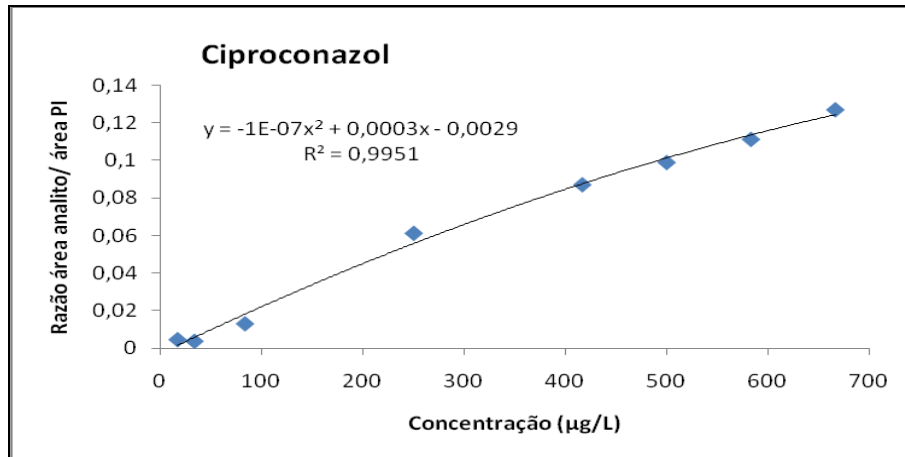
**Figura 20.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do tiametoxam em acetonitrila.



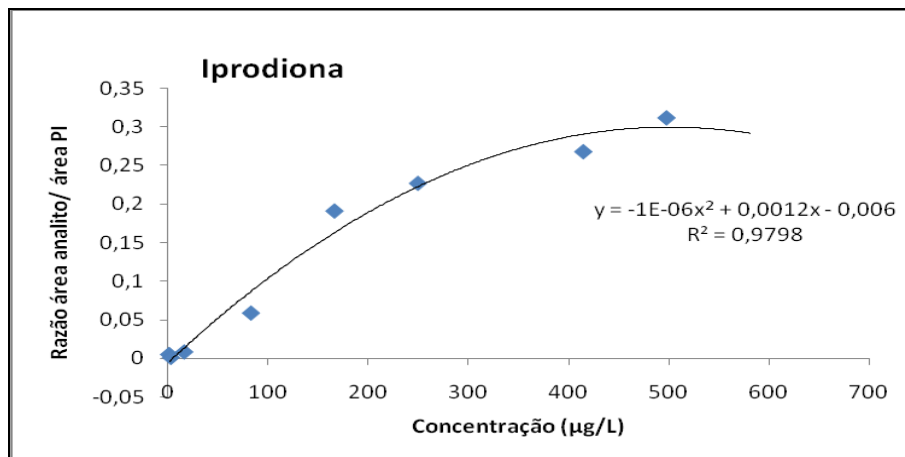
**Figura 21.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da procimidona em acetonitrila.



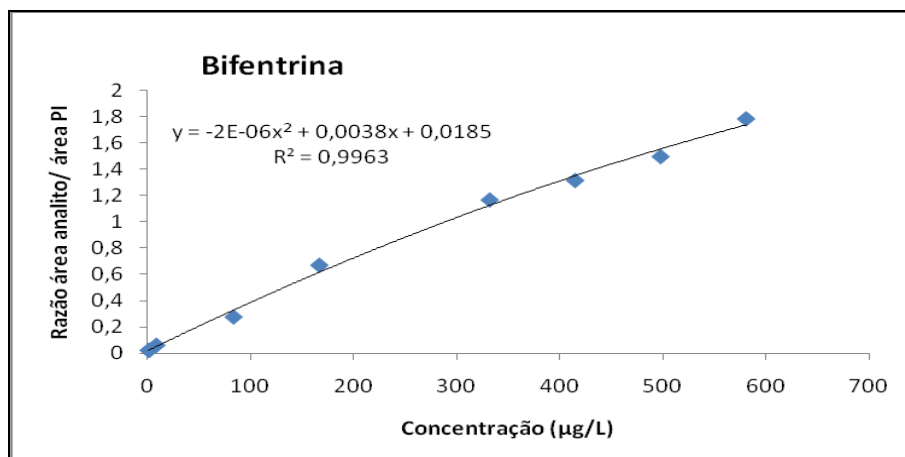
**Figura 22.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do endossulfam em acetonitrila .



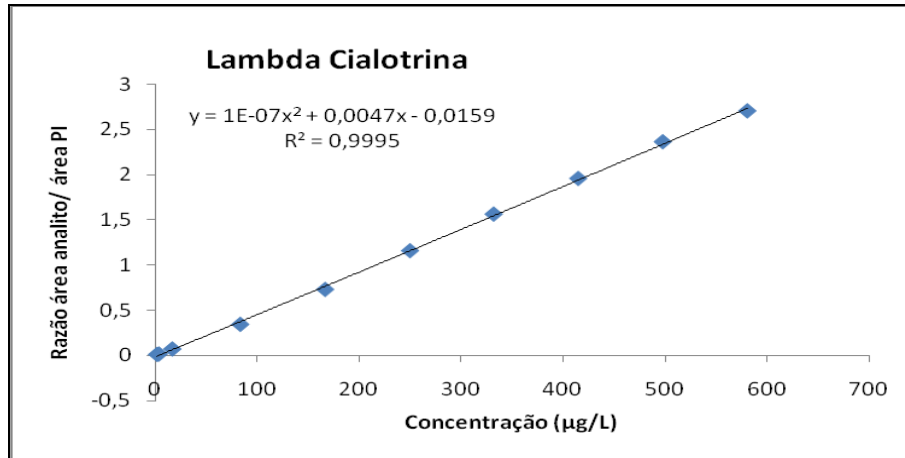
**Figura 23.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica do ciproconazol em acetoneitrila.



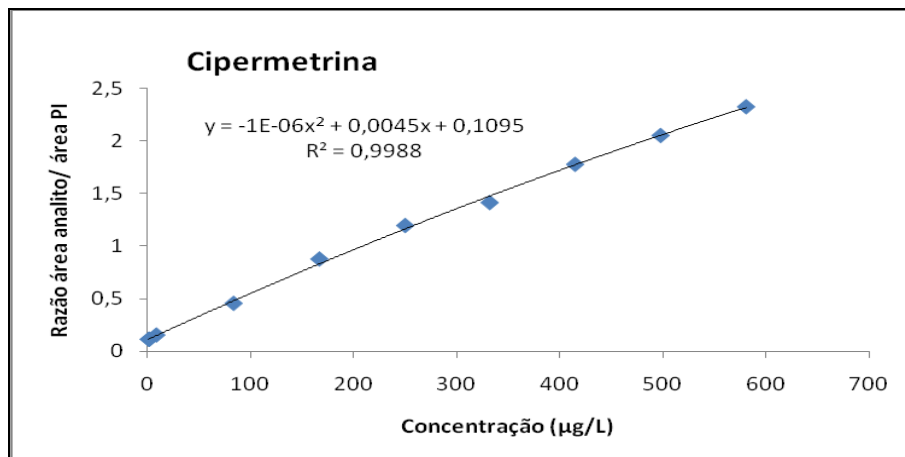
**Figura 24.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da iprodiona em acetoneitrila.



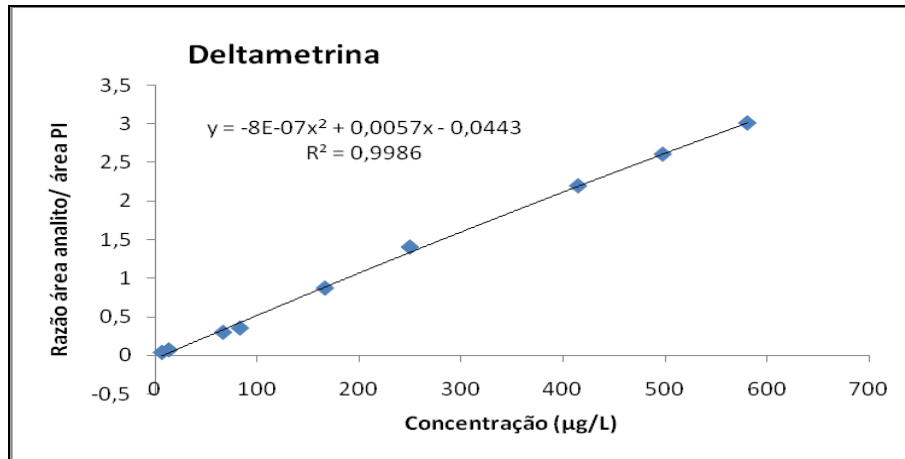
**Figura 25.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da bifentrina em acetonitrila.



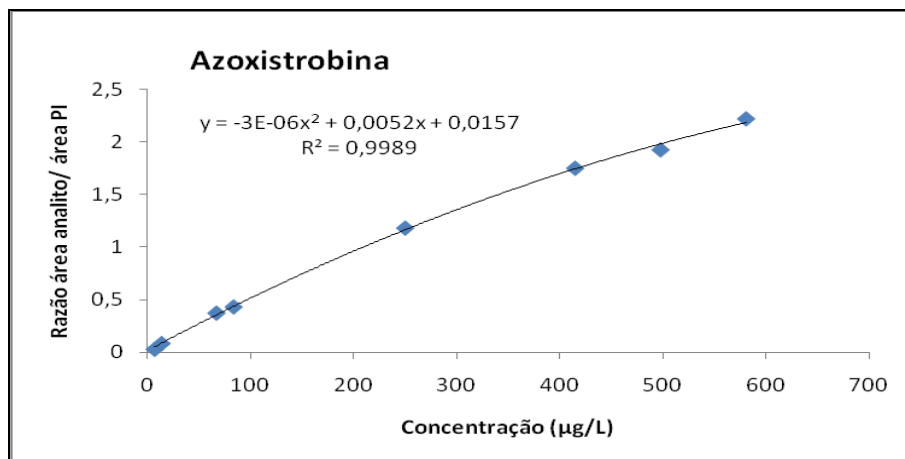
**Figura 26.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da lambda-cialotrina em acetonitrila.



**Figura 27.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da cipermetrina em acetonitrila.



**Figura 28.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da deltametrina em acetoneitrila.



**Figura 29.** Ajuste da regressão polinomial da curva analítica da azoxistrobina em acetoneitrila.

#### 5.4.4. Limite de detecção e limite de quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, a análise de resíduos, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectada pelo método (INMETRO, 2007).

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção. Analistas, quando desenvolvem métodos novos ou modificados para análise de traços, freqüentemente definem Limites de

Detecção (LD) em termos do desvio-padrão de medidas do branco. O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos.

O sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. A determinação da razão sinal/ruído é realizada por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. A razão sinal/ruído com valor 3 é geralmente considerada (BRITO, 2003).

Limite de quantificação (LQ) é a quantidade mínima do analito que pode ser determinado com precisão e exatidão, sob as condições do método analítico otimizado (ANVISA, 2003).

Assim, fica estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada ou quantificada. A relação sinal/ruído 3:1 e 10:1 são as proporções aceitas como estimativas do limite de detecção e do limite de quantificação, respectivamente (RIBANI *et al.*, 2004).

Assim, o LD e do método proposto foram determinados considerando o valor igual a três vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido para amostras de uva isentas de agrotóxicos e analisadas por CG-DCE, e o LQ do método foi obtido considerando dez vezes o sinal da linha de base (ruído) também para amostras de uva isentas de contaminação.

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação para o método de ESL-PBT em uva são mostrados pela tabela 11.

**Tabela 11.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método de ESL-PBT para os agrotóxicos estudados em amostra de uva

Agrotóxico	LD (mg kg <sup>-1</sup> )	LQ (mg kg <sup>-1</sup> )	LMR(mg kg <sup>-1</sup> )
Clorotalonil	0,0006	0,0020	5,0000
Clorpirifós	0,0007	0,0023	Não autorizado
Tiametoxam	0,0033	0,0110	0,0200
Procimidona	0,0015	0,0049	5,0000
Endossulfam	0,0024	0,0080	Não autorizado
Ciproconazol	0,0150	0,0495	0,1000
Iprodiona	0,0025	0,0081	1,0000
Bifentrina	0,0010	0,0034	0,1000
Lambda-cialotrina	0,0011	0,0036	0,1000
Cipermetrina	0,0005	0,0017	Não autorizado
Deltametrina	0,0033	0,0110	Não autorizado
Azoxistrobina	0,0044	0,0146	0,5000

Verificou-se que os valores dos limites de detecção obtidos para os compostos utilizando CG-DCE estão entre 0,0005 e 0,0150 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto os limites de quantificação estão entre 0,0017 e 0,0495 mg kg<sup>-1</sup>.

Levando-se em consideração os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela legislação, pode-se observar que os valores de LQ obtidos estão abaixo do permitido para cada agrotóxico no tipo de alimento avaliado.

Vários trabalhos são encontrados na literatura sobre injeção dos extratos das amostras em cromatógrafo a gás, sem divisão de fluxo, também denominado de modo “splitless” (SHULING *et al.*, 2007). Este tipo de procedimento permite que menores valores de LD e LQ sejam determinados, pois ocorre a introdução de maior quantidade de amostra na coluna cromatográfica. No entanto, para amostras complexas, como a uva, onde a presença de co-extrativos é grande, este procedimento não é conveniente uma vez que pode danificar o aparelho que está sendo utilizado.

#### 5.4.5. Exatidão

A exatidão, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, constitui a chave para o propósito da validação (BRITO, 2003).

A exatidão é considerada dentro de limites, a um dado nível de confiança. Ou seja, aparece associada a valores de precisão (RIBANI *et al.*, 2004). O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e com as características da pesquisa. A ANVISA recomenda ensaios em triplicata para três níveis de concentração.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, comparação de métodos, adição padrão e ensaios de recuperação (RIBANI *et al.*, 2004).

Sendo que este último foi utilizado para avaliar a exatidão do método ESL-PBT neste trabalho.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo, ou seja, é definida como a proporção da quantidade de analito, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004).

Nos ensaios de recuperação os agrotóxicos foram adicionados em amostras de uvas em concentrações iguais a uma, duas e dez vezes o limite de quantificação do método. Desta forma, os ensaios foram realizados conforme o método otimizado (item 1.3.), sendo que as concentrações foram variáveis para cada agrotóxico nas amostras de uva.

A exatidão foi avaliada realizando-se ensaios de recuperação em que a porcentagem de extração foi calculada adicionando os agrotóxicos em concentrações próximas a 1, 2 e 10 vezes o valor de LQ.

Na Tabela 12 estão os resultados obtidos para extração dos agrotóxicos em uva, bem como os coeficientes de variação (CV) referentes às porcentagens de recuperação de cada um, sendo que os ensaios foram realizados em triplicata.

**Tabela 12.** Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de uva fortificada com os agrotóxicos em três níveis de concentrações diferentes

Agrotóxico	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	CV (%)
Clorotalonil	0,0020	82,0	9,4
	0,0039	84,2	2,6
	0,0197	86,4	6,1
Clorpirifós	0,0023	92,2	3,2
	0,0047	103,1	12,3
	0,0235	95,5	11,0
Tiametoxam	0,0110	124,8	4,5
	0,0221	123,3	3,5
	0,1104	117,3	10,1
Procimidona	0,0049	82,1	3,1
	0,0098	76,9	3,1
	0,0489	88,0	3,4
Endossulfam	0,0080	112,8	14,1
	0,0160	97,0	11,5
	0,0799	106,2	4,7
Ciproconazol	0,0495	78,5	4,0
	0,0990	79,9	2,0
	0,4950	71,0	7,9
Iprodiona	0,0081	70,5	6,1
	0,0163	72,0	0,3
	0,0814	74,1	7,5
Bifentrina	0,0034	103,5	10,7
	0,0068	89,5	12,8
	0,0342	106,5	8,1
Lambda-Cialotrina	0,0036	109,3	4,4
	0,0072	111,7	1,8
	0,0362	110,2	4,2
Cipermetrina	0,0017	96,8	3,1
	0,0034	96,5	11,3
	0,0169	96,0	12,5
Deltametrina	0,0110	104,7	12,1
	0,0220	117,2	6,3
	0,1100	108,8	9,2
	0,0146	161,4	6,3

Azoxistrobina	0,0291	160,8	1,9
	0,1457	144,9	4,8

Os resultados obtidos para a extração dos agrotóxicos em polpa de uva são estatisticamente iguais entre si, ao nível de 95 % de probabilidade, pelo teste Tukey, mostrando exatidão do método, exceto para a procimidona que os resultados das porcentagens de recuperação mostraram diferentes entre si para os três níveis de concentração estudados. Além disso, os coeficientes de variação apresentaram-se menores do que 15 %.

#### 5.4.6. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003).

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2007). É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e precisão intermediária.

##### 5.4.6.1. Repetitividade

A repetitividade é um dos parâmetros empregados para se avaliar a precisão, e definido como o grau de concordância entre os resultados, sob as mesmas condições de medição (INMETRO, 2007).

A repetitividade do método ESL-PBT dos doze agrotóxicos estudados em amostras de uva foi estudada pelo cálculo da estimativa do coeficiente de variação de sete repetições da metodologia otimizada (item 1.3.), ou seja, pelo preparo, injeção e análise no mesmo dia de sete extratos de amostras de uva fortificadas pelos princípios agrotóxicos, em concentrações iguais a dez vezes o limite de quantificação de cada agrotóxico.

Os resultados dos coeficientes de variação obtidos para as amostras variaram entre 4,1 % e 30,1 %, como mostrado na Tabela 13.

**Tabela 13.** Razão de área dos analitos/ PI e coeficientes de variação (CV) obtidos para análise dos sete extratos obtidos de amostras de uva fortificadas com os agrotóxicos.

Agrotóxico	área analito/área PI	Coeficiente de variação (%)
Clorotalonil	0,1852	6,1
Clorpirifós	0,0909	19,5
Tiametoxam	0,2795	7,3
Procimidona	0,0588	5,7
Endossulfam	4,8351	6,9
Ciproconazol	0,0132	14,8
Iprodiona	0,0083	18,8
Bifentrina	0,0607	30,2
Lambda-cialotrina	0,0685	4,2
Cipermetrina	0,1513	15,1
Deltametrina	0,2945	6,6
Azoxistrobina	0,3741	5,8

Esses resultados indicam boa repetitividade, já que para amostras complexas são aceitáveis coeficientes de variação de até 20 % (RIBANI *et al.*, 2004), exceto para a bifentrina que apresentou um coeficiente de variação igual a 30,2 devido a um possível erro experimental.

#### 5.4.6.2. Precisão intermediária

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuada na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Usualmente, é expressa como o desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas (BRITO, 2003).

A precisão intermediária é o outro parâmetro utilizado para se determinar a precisão de um método e se refere à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo a(s) condição(ões) a variar, tais como: diferentes analistas, equipamentos ou tempos (INMETRO, 2007).

A precisão intermediária do método foi verificada pelas porcentagens de recuperação dos analitos e respectivos coeficientes de variação, obtidos pelo

preparo, injeção e análise dos extratos de amostras de uva fortificadas pelos agrotóxicos, e submetidas à técnica de extração otimizada (item 1.3.), em concentrações iguais a dez vezes o limite de quantificação de cada um, em três dias diferentes (1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia) e em sete repetições. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 14

**Tabela 14.** Porcentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) obtidos pela análise de extratos obtidos de amostra de uva fortificada com os agrotóxicos, em três dias diferentes

Agrotóxico	Recuperação	Recuperação	Recuperação	Média	CV (%)
	1 <sup>o</sup> dia	3 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia		
Clorotalonil	76,32	78,94	70,11	75,12	6,04
Clorpirifós	119,25	120,49	113,57	117,77	3,13
Tiametoxam	134,57	136,93	131,95	131,15	6,14
Procimidona	88,77	105,23	93,70	95,90	8,81
Endossulfam	112,53	102,55	104,29	113,12	8,08
Ciproconazol	87,86	97,33	83,61	89,60	7,84
Iprodiona	83,27	87,52	79,79	83,53	4,63
Bifentrina	99,32	106,51	103,61	103,15	3,50
Lambda-cialotrina	122,73	129,53	128,80	117,02	13,80
Cipermetrina	88,04	74,39	74,70	79,04	9,86
Deltametrina	125,97	122,03	124,74	117,58	9,61
Azoxistrobina	128,24	134,64	136,65	139,84	10,66

Conforme mostrado na tabela 14 para maioria dos compostos não apresentou diferença significativa nas porcentagens de extração variando-se os dias de análise ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste Tukey.

### **5.5. Influência dos componentes da uva na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa**

A exatidão na quantificação de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais é de suma importância, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias para contornar o problema de alta recuperação de certos compostos. Este problema pode estar associado à presença nos extratos, que

são analisados por cromatografia em fase gasosa, de co-extrativos da matriz (MENKISSOGLU-SPIROUDI & FOTOPOULOU, 2004).

O efeito de matriz é mais pronunciado em análises de amostras complexas, como frutas. Os problemas gerados pelos componentes endógenos da matriz nas respostas do detector não dependem apenas das características dos compostos, mas também das próprias condições cromatográficas, particularmente no injetor, na coluna cromatográfica e no detector do CG (PINHO *et al.*, 2009).

A porcentagem de extração dos analitos pode ser determinada com maior exatidão, fazendo-se uma correção nos resultados obtidos após análise cromatográfica. Este procedimento significa desconsiderar o aumento da resposta devido ao efeito de matriz. Para isso, duas curvas analíticas dos padrões de analitos são preparadas, sendo uma em solvente puro e a outra no extrato da matriz, em determinada faixa de concentração.

#### **5.5.1. Adição de Padrão**

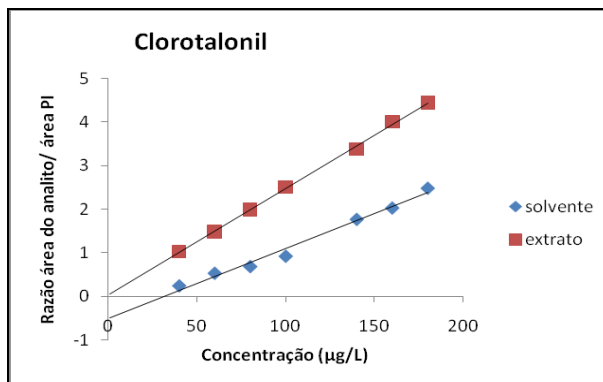
Um método bem comum e simples usado em laboratórios oficiais e em trabalhos científicos que monitoram resíduos de agrotóxicos é a utilização de curva analítica proveniente de soluções-padrão preparadas em extratos da matriz, para quantificação dos compostos de interesse.

Nesta técnica, as soluções-padrão são preparadas em extratos da matriz, livres de agrotóxicos (branco) e analisadas por cromatografia gasosa. Com isso, os próprios componentes da matriz ocupam os sítios ativos do injetor durante análise do padrão, assim como acontece na análise dos extratos (PINHO *et al.*, 2009).

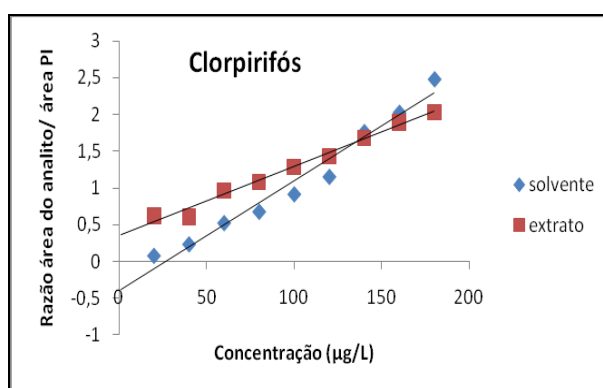
Para a análise dos compostos em uva o efeito de matriz foi avaliado de acordo com o procedimento descrito no item 1.1.7. Foi avaliada fazendo-se a comparação de curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de agrotóxicos preparadas em solvente puro (acetonitrila) e em extratos da matriz livres de agrotóxicos.

Nas figuras 30-41 é apresentada as curvas para o princípios ativos estudados.

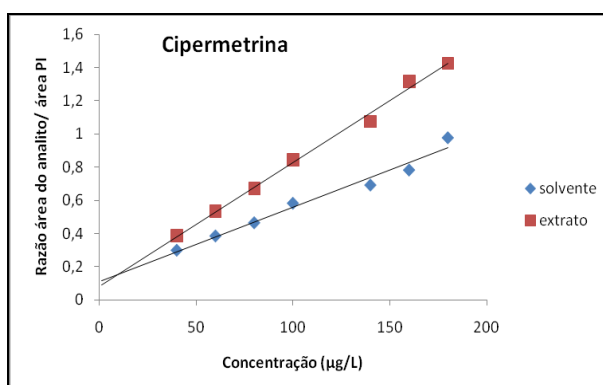
Para a faixa de concentração de 0 a 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  pode-se fazer um ajuste linear uma vez que nesta faixa de concentração tal ajuste torna-se adequado, enquanto em faixas maiores o ajuste de regressão polinomial é mais indicado.



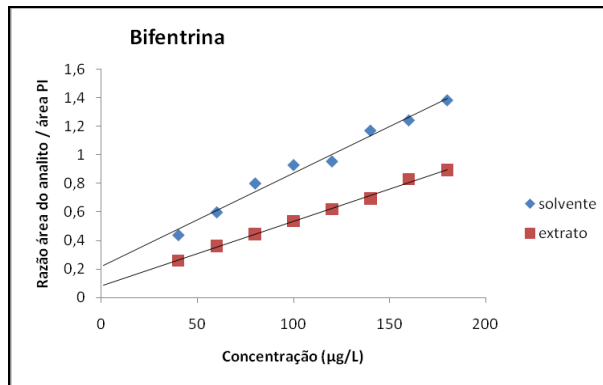
**Figura 30.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de clorotalonil preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



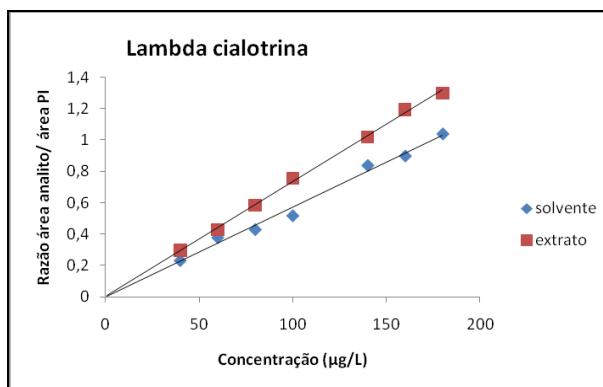
**Figura 31.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de clorpirifós preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



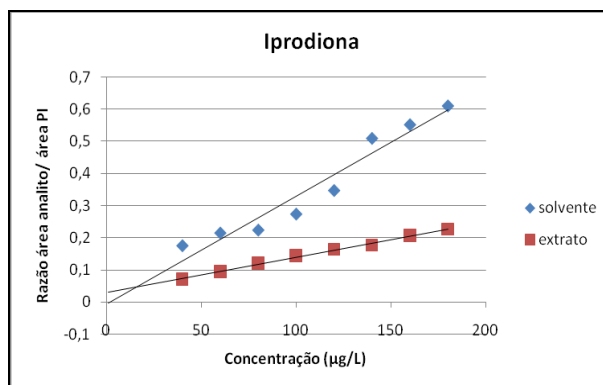
**Figura 32.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de cipermetrina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



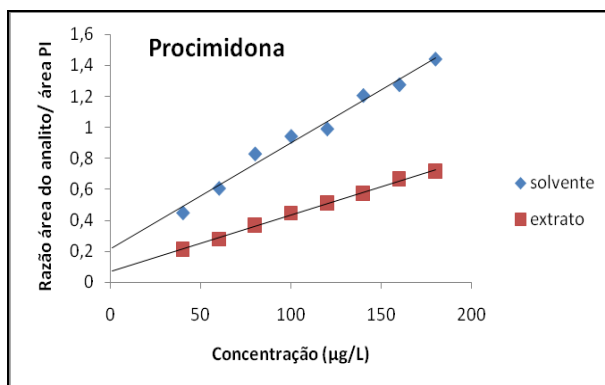
**Figura 33.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de bifentrina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



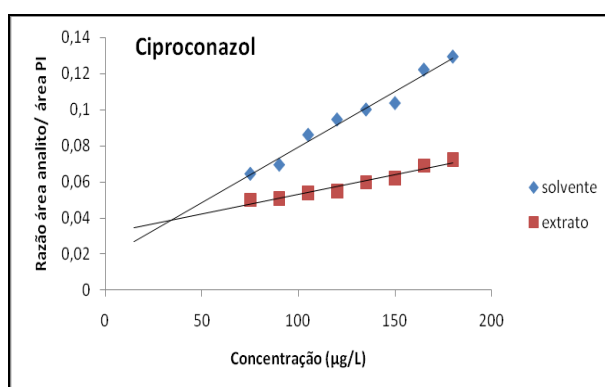
**Figura 34.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de lambda-cialotrina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



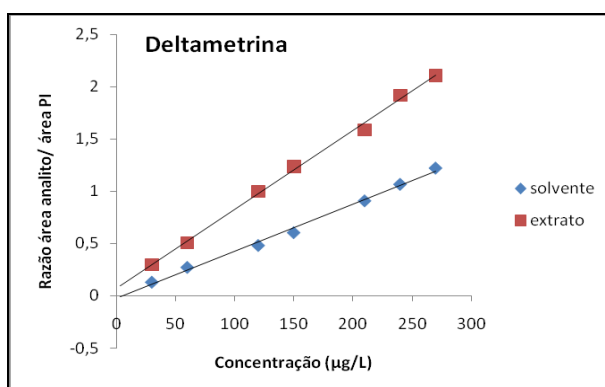
**Figura 35.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de iprodiona preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



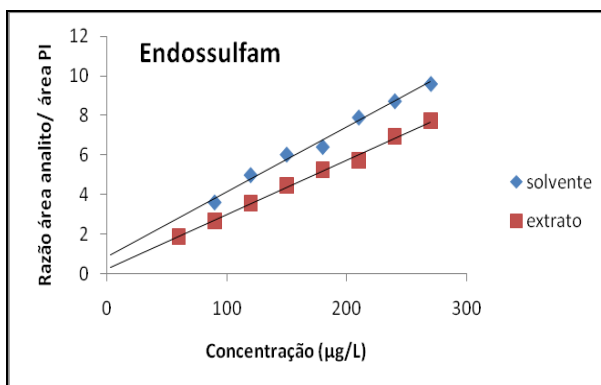
**Figura 36.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de procimidona preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



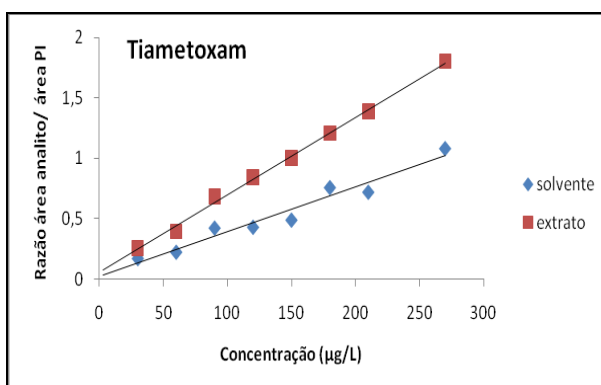
**Figura 37.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de ciproconazol preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



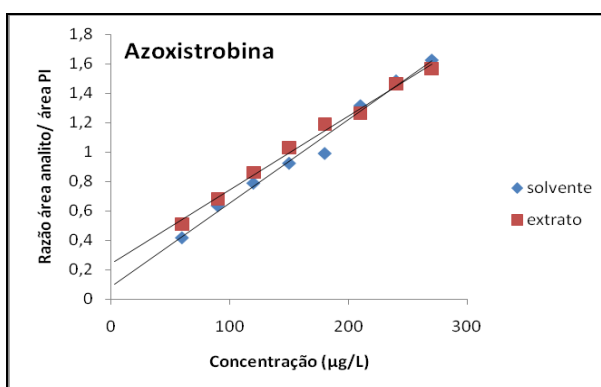
**Figura 38.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de deltametrina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



**Figura 39.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de endossulfam preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



**Figura 40.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de tiametoxam preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.



**Figura 41.** Curvas analíticas construídas a partir da análise de soluções-padrão de azoxistrobina preparadas em acetonitrila e em extrato da matriz obtido pela ESL-PBT de amostras de uva.

Para cada agrotóxico são apresentados os resultados, apontando diferenças entre os coeficientes angulares e lineares das equações de reta das duas curvas analíticas conforme mostrado pela figuras 30-41.

Pela comparação das curvas analíticas, observamos que para todos os agrotóxicos, exceto para a azoxistrobina que na faixa de concentração estudada apresentou pequena diferença entre as curvas, ocorre uma diferença significativa dos coeficientes angulares e lineares das equações de reta comprovando que para estes compostos, a presença dos componentes da matriz interfere, significativamente, em suas análises cromatográficas.

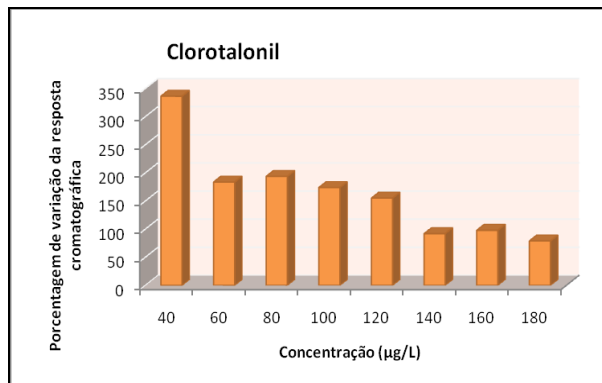
Para os compostos bifentrina, procimidona, iprodiona, cipermetrina e endossulfam são observadas uma redução na resposta cromatográfica quando se compara a injeção da curva analítica obtida em extrato da matriz com a curva obtida em solventes puros. Para os demais ocorre um aumento na resposta cromatográfica quando se realiza a mesma comparação.

Sánchez-Brunete *et al.* (2005) observaram que compostos menos polares, com maiores massa molar e ponto de ebulição, como os piretróides, tiveram suas respostas cromatográficas aumentadas, quando extratos dos brancos das matrizes foram fortificados, com padrões desses compostos, e analisados.

Exceto para alguns compostos como a cipermetrina, lambda-cialotrina, ciproconazol e tiametoxam o efeito de matriz é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta. Nessa situação, quando injetada a solução-padrão dos agrotóxicos preparados em solvente puro, em baixa concentração, uma quantidade expressiva do analito é retida na interface do insertor. Conseqüentemente, pequena quantidade de analito é detectada. Quando se analisam os extratos, apenas uma quantidade insignificante do analito é adsorvida, porque a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta e os interferentes são preferencialmente adsorvidos. Este fato faz com que o efeito de matriz seja maior para os extratos em que o analito está em menores concentrações. Esses resultados podem ser vistos nas figuras 44– 55 onde foi determinada a porcentagem de aumento da resposta cromatográfica dos agrotóxicos em diferentes concentrações, segundo a fórmula:  $\% = [(A_{\text{matriz}} - A_{\text{solvente}})/A_{\text{solvente}}] \times 100$ , onde:  $A_{\text{matriz}}$  = média das razões das áreas do pico correspondente ao agrotóxico sobre as áreas do pico correspondente ao padrão interno ( $\text{área}_{\text{agrotóxico}}/\text{área}_{\text{PI}}$ ), em solução-padrão preparada em extrato da matriz;

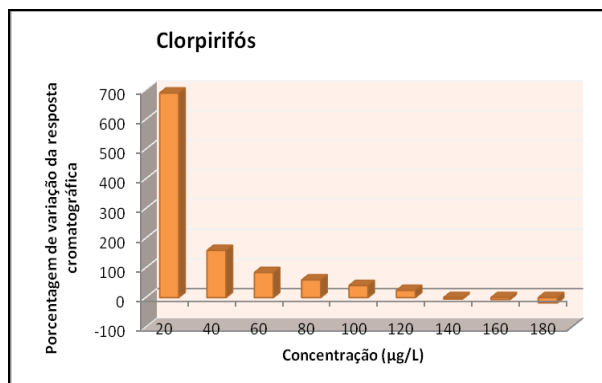
$A_{\text{solvente}}$  = média das razões das áreas do pico correspondente ao agrotóxico sobre as áreas do pico correspondente ao padrão interno ( $\text{área}_{\text{agrotóxico}}/\text{área}_{\text{PI}}$ ), em solução-padrão preparada em solvente puro.

Para o clorotalonil observa-se um maior efeito de matriz quando a concentração do analito é baixa, esse vai diminuindo a medida que se aumenta a concentração, sendo portanto, o efeito de matriz para esse analito inversamente proporcional a concentração do mesmo.



**Figura 42.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do clorotalonil quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

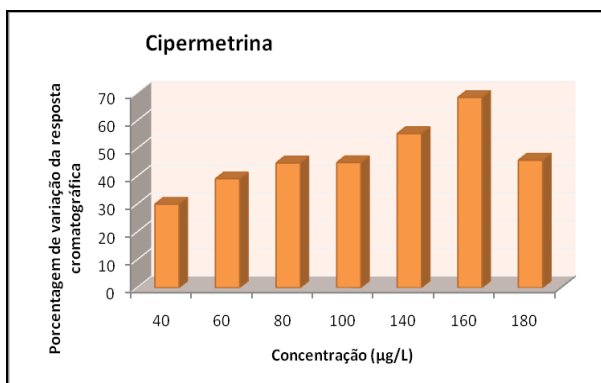
A figura 43 mostra que para o clorpirifós o comportamento se assemelha ao do clorotalonil, sendo que a queda é mais acentuada chegando em um ponto em que o efeito de matriz deixa de ser positivo passando a negativo a medida em que ocorre aumento da concentração.



**Figura 43.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do clorpirifós quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

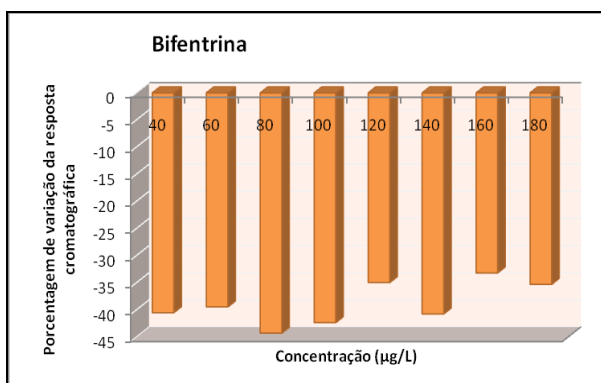
De acordo com a figura 44 o comportamento do efeito de matriz para a cipermetrina é o oposto do clorotalonil, a medida em que se aumenta a

concentração do analito, aumenta-se o efeito de matriz para concentrações até 160  $\mu\text{g/L}$ . Na concentração de 180  $\mu\text{g/L}$  ocorre uma redução do mesmo.



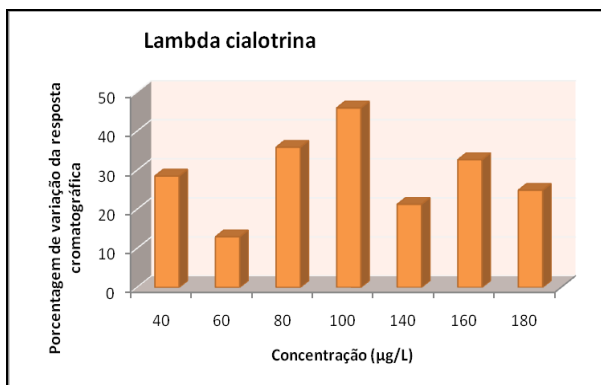
**Figura 44.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da cipermetrina quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

A bifentrina apresenta um efeito de matriz negativo, porém praticamente constante para todas as concentrações estudadas conforme mostra a figura 45.



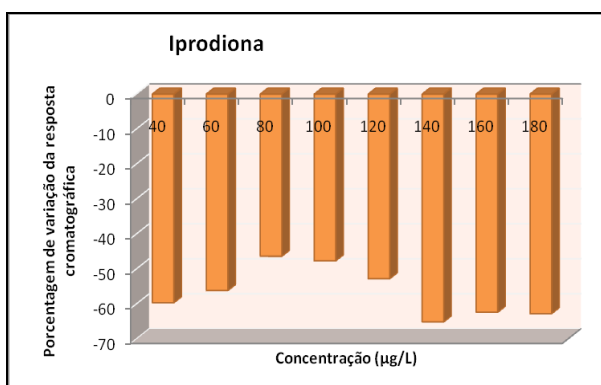
**Figura 45.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da bifentrina quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

O composto lambda-cialotrina não apresenta nenhuma tendência em relação as concentrações avaliadas como mostrado pela figura 46.



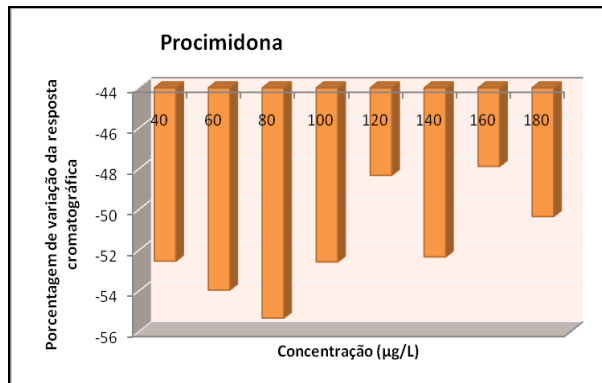
**Figura 46.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da lambda-cialotrina quando preparado orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT em extratos de uva em relação à preparada em solvente puro.

O comportamento da iprodiona é semelhante ao da bifentrina, ou seja, efeito de matriz negativo e praticamente constante nas concentrações avaliadas, isso é claramente mostrado pela figura 47.



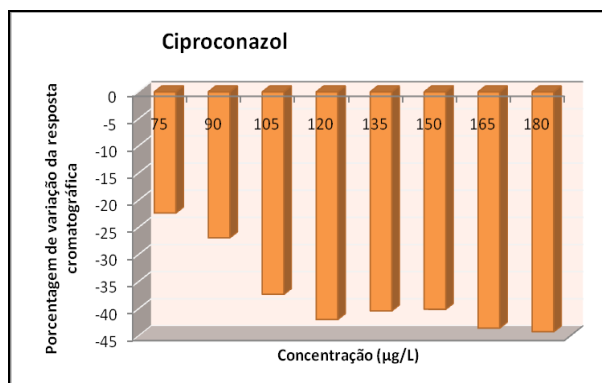
**Figura 47.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da iprodiona quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

O princípio ativo procimidona também não apresenta um comportamento com tendência definida para o efeito de matriz na faixa de concentração avaliada como mostrado pela figura 48.



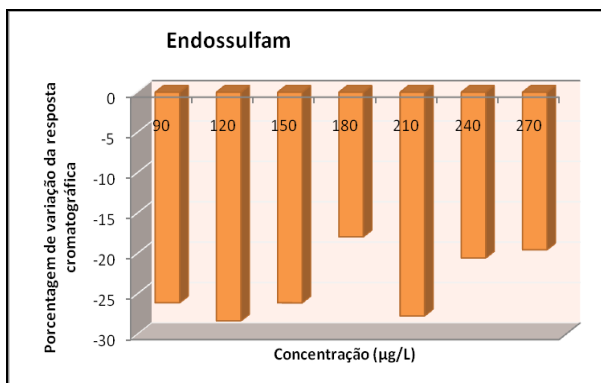
**Figura 48.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da procimidona quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

O ciproconazol apresenta um crescimento em módulo do efeito de matriz quando se aumenta a concentração e apresenta um efeito negativo, ou seja os componentes da uva reduzem a resposta cromatográfica para o princípio ativo.



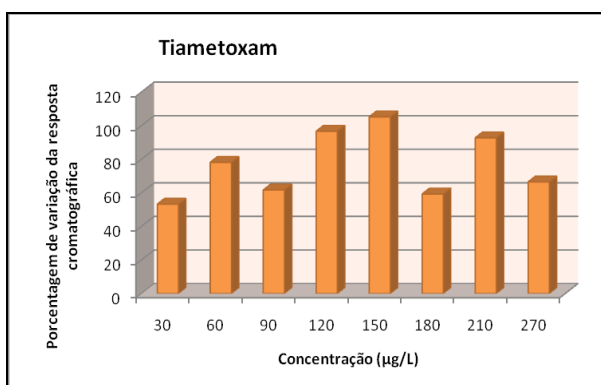
**Figura 49.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do ciproconazol quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

O composto endossulfam além de apresentar um efeito de matriz negativo, uma vez que sua resposta cromatografica diminui devido a existencia de componentes naturais da uva, a figura 50 não mostra nenhuma tendência de comportamento do mesmo, sendo que ora ele aumenta ora ele diminui sem ter concordância alguma com o aumento ou redução da concentração.



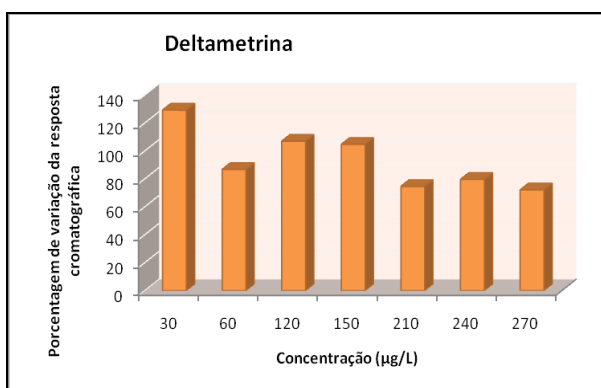
**Figura 50.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do endossulfam quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

A figura 51 mostra que para o tiametoxam o efeito de matriz é menor para a concentração de 30 µg/L e maior para a concentração de 150 µg/L.



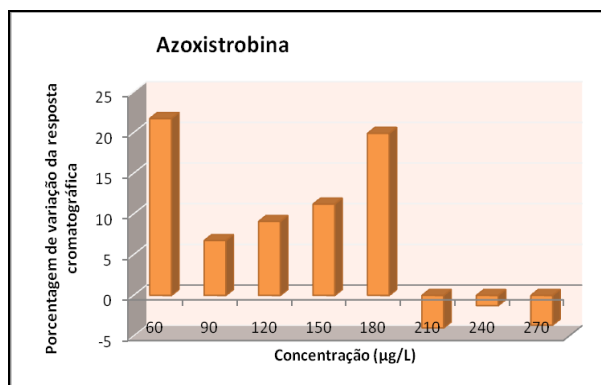
**Figura 51.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica do tiametoxam quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

Para a deltametrina a menor concentração apresenta maior efeito de matriz e para as demais concentrações avaliadas o efeito de matriz permanece quase que constante conforme mostra a figura 52.



**Figura 52.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da deltametrina quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

A azoxistrobina, como mostra a figura 53 apresenta um comportamento para o efeito de matriz semelhante ao do clorpirifós, no sentido em que à medida que se aumenta a concentração tal efeito passa de positivo para negativo.



**Figura 53.** Porcentagem de variação da resposta cromatográfica da azoxistrobina quando preparado em extratos orgânicos obtidos pelo método ESL-PBT de uva em relação à preparada em solvente puro.

Dessa forma, conclui-se que, para todos agrotóxicos, os componentes da matriz contribuem para introduzir alterações sejam elas positivas ou negativas nas respostas cromatográficas.

## 5.6 Aplicação da técnica ESL-PBT otimizada em amostras de uva e suco

## de uva industrializados

A técnica ESL-PBT otimizada e validada foi aplicada em onze amostras de uva de cinco espécies diferentes (Itália, rubi, rosada, Brasil e bentaka) adquiridas em quatro mercados distintos da cidade de Viçosa, Minas Gerais garantindo assim procedência distinta ao se tratar de uvas da mesma variedade.

Os resultados para as amostras de uva que apresentaram possíveis contaminações, assim como os coeficientes de variação para os ensaios que foram realizados em triplicata são mostrados pela tabela 15.

**Tabela 15-** Amostras de uva contaminadas pelos agrotóxicos estudados.

Analito	Concentração em mg kg <sup>-1</sup>					
	Supermercado A			Supermercado B		
	Rubi	Itália	Rosada	Rubi	Itália	Rosada
Clorpirifós	-	-	0,083 (4,65 %)	-	-	-
Cipermetrina	-	-	-	-	-	0,176 (9,20%)

Como mostra a tabela 15 foi encontrada uma possível contaminação por clorpirifós em uma amostra de uva rosada no supermercado A e contaminação por cipermetrina em uma amostra de uva rosada.

Mas é válido ressaltar que essas amostras, se comprovada a contaminação, estão irregulares uma vez que nenhum dos dois compostos no Brasil são autorizados, pela ANVISA, para a cultura da uva.

Para os demais compostos estudados não foi observada nenhuma contaminação, assim como as amostras avaliadas para os supermercados C e D também nenhuma contaminação foi encontrada.

No que se diz respeito às amostras de suco de uva industrializados os resultados são mostrados na tabela 16.

**Tabela 16-** Amostras de suco de uva industrializado contaminadas

Princípio Ativo	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )								
	Suco A	Suco B	Suco C	Suco D	Suco E	Suco F	Suco G	Suco H	Suco I
Clorpirifós	40,9	-	39,3	40,5	44,8	-	-	41,9	68,3

Em seis das nove amostras analisadas verificou-se a possibilidade de contaminação por clorpirifós, sendo que este princípio ativo não é autorizado para aplicação em culturas da videira.

Os demais compostos avaliados não foram encontrados pelo menos em limites superiores ao limite de quantificação do método.

## 6-CONCLUSÕES

A metodologia ESL-PBT para extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de uva e análise por CG-DCE resultou em um método simples, eficaz e de baixo custo. As porcentagens de recuperação ficaram entre 70 e 120%, exceto para azoxistrobina e tiametoxam. A grande vantagem desta técnica é o baixo consumo de solventes para a extração dos agrotóxicos e a não necessidade de clean up, uma vez que nos tempos de retenção dos compostos avaliados não se observou interferentes. A modificação da polaridade da fase extratora, constituída de acetonitrila, pela adição de pequena quantidade de acetato de etila favoreceu a extração dos agrotóxicos. Como forma de homegeinização a mesa agitadora por 20 minutos a 200 opm apresentou melhores resultados. Não houve necessidade de ajustar o pH das amostras, o aumento da força iônica assim como o tempo de congelamento não provocaram mudanças significativas nas porcentagens de extração dos agrotóxicos.

Na validação o método se mostrou seletivo, exato e preciso para os doze princípios ativos onde obteve-se limites de detecção na faixa de 0,0006 a 0,0150 mg kg<sup>-1</sup> e quantificação na faixa de 0,0020 a 0,0495 mg kg<sup>-1</sup> sendo esses abaixo dos limites máximos permitidos pela legislação vigente para todos os agrotóxicos estudados, possibilitando que o método seja utilizado na avaliação da contaminação de uvas.

Os componentes da matriz influenciam na quantificação dos agrotóxicos em análises por cromatografia gasosa, sendo que para cada composto um comportamento distinto foi observado.

A metodologia ESL-PBT otimizada e validada foi aplicada em amostras de uva e suco de uva industrializado, sendo encontrado resíduo dos agrotóxicos clorpirifós e cipermetrina em duas das onze amostras avaliadas e resíduos de clorpirifós em seis das nove amostras de suco avaliadas. Essas possíveis contaminações deverão ser confirmadas por análise em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M.; MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, n. 1-2, p. 163-184, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, DF, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Controlando Agrotóxicos nos Alimentos: o trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR E ITEP/PE**. Relatório de atividades 2001-2004, Brasília, 2005.

ARCHANGELO, E. R. **Sorção, Desorção e Potencial de Lixiviação de Atrazine e Dimethenamid em Solos Brasileiros**. 2003. 63f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

BARBOSA, L. C. A. **Os Pesticidas, o Homem e o Meio Ambiente**. Viçosa: Ed. UFV, 215 p. 2004.

BEDOR, C. N. G. **Estudo do Potencial Carcinogênico dos Agrotóxicos Empregados na Fruticultura e sua Implicação para a Vigilância da Saúde**. 2008. 110f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, PE, 2008.

BRASIL. Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989. Estabelece as Diretrizes e Bases da Educação Nacional, **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 1989.

BRITO N.M., Amarante Júnior OP, Polese L, Ribeiro ML. **Validação de Métodos Analíticos: estratégia e discussão**. *Pesticidas* 2003; 13(dez/jan):129-46.

CABRAL, M. F. *et al.*. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida Ametryn utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, São Paulo, SP, v. 28, n. 2, p. 41-47, 2003.

CAI, Z.; WANG, D.; MA, W.T. Gas chromatography/ion trap mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters by an isotope dilution technique. **Analytica Chimica Acta**, 503, p.263-270, 2004.

CARVALHO, S. P. L. de. **Toxicidade de Inseticidas Neonicotinóides sobre o Psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera :Psyllidae e o Parasitóide *Tamarixia Radiata* (Waterson) (Hymenoptera :Eulophidae)**. Piracicaba, 2008.

CAVALIERE, M. J.; CALORE, E. E.; PEREZ, N. M.; PUGA, F. R.. Miotoxicidade por Organofosforados. **Revista Saúde Pública**, 30 (3): 267-72, 1996 267

COSTA, E. H. **Análise Multirresíduo de Agrotóxicos em Abacaxi por Cromatografia Gasosa**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em agroquímica)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

DARDENGO, R. P. **Análise Multiressíduo de Inseticidas em Batata (*Solanum tuberosum* L)**. 2007. 117f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

DELGADO, M.J. S.; BARROSO, S.R.; FERNANDEZ-TOSTADO, G.T.; POLO-DÍEZ, L.M. Stability studies of carbamate pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography A**, 9 2 1, p.287-296, 2001.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Mudas e sementes**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira/agrotoxicos.htm> >. Acesso em: 03 dez. 2010.

FERREIRA, R. C. F. **Biologia, Exigências Térmicas e Tabela de Vida de Fertilidade do Ácaro-Branco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) (Acari: Tarsonemidae) em Videira (*Vitis vinifera* L.) cv. Itália.** 2005. 42 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

FLORES, A. V.; QUEIROZ, M. E. L. R de NEVES, A .A. ; GOULART, S. M. **Extração e Análise de Organoclorados em Sedimentos do Ribeirão São Bartolomeu, Viçosa-MG.** Revista Analytica • Outubro/Novembro 2004 • Nº13, 2004.

FRINHANI, E. M. D. **Separação de Misturas II- Métodos Cromatográficos.** 2005. 18f. Universidade do Contestado. Concordia. Santa Catarina , 2005.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. P. R.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D. **Manual de Entomologia Agrícola.** 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1998. 649p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R .P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola.** Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GALLI, A. *et al.*. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GOBO, A. B. *et al.*. Development and validation of methodology for the determination of residues of organophosphorus pesticides in tomatoes. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 945-950, 2004.

GOTO, T.; ITO, Y.; YAMADA, S.; MATSUMOTO, H.; OKA, H.; NAGAE, H. The high throughput analysis of N-methyl carbamate pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry using a short column. **Analytica Chimica Acta**, 555, p.225- 232, 2006.

GORENSTEIN, O. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças frescas comercializadas na CEAGESP: análise de resultados de 2003. **Informações Econômicas**, **34 (10)**: 34-42, 2003.

GOULART, S. M. **Extração de Deltametrina e Cipermetrina de Leite e Análise por Cromatografia Gasosa**. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2003.

Haji, F. N. P.; MOREIRA, A. N.; FERREIRA, R. C. F.; ALENCAR, J. A. de; BARBOSA, F. R. **Monitoramento e Determinação do Nível de Ação do Ácaro-Branco na Cultura da Uva**. Petrolina, EMBRAPA-CPATSA, 2001a. 7p. (EMBRAPA- CPATSA, Circular Técnica, 68).

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. 2007.

IMOTO, M. N. **Validação de Método Multirresíduo para Pesticidas Organohalogenados em Maçã por Cromatografia Gasosa com Captura de Elétrons (Cg/Ecd) e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG/MS)**. 2004. 114f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F.; **Solvent Microextraction into a Single Drop**. *Anal. Chem.* 1996, **68**, 2236.

JEONG, M. L.; CHESNEY, D. J. Determination of N-methylcarbamate pesticide from spiked matrices using supercritical fluid extraction. **Analytica Chimica Acta**, **389**, p.53-57, 1999.

KAIPPER, B. I. A.; MADUREIRA, L. A. S.; CORSEUIL, H. X. Use of activated charcoal in a solid-phase extraction technique for analysis of pesticide residues in tomatoes. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 514-518, 2001.

KLAASSEN, C. D. **Toxicology-the Basic Science of Poisons (Casartt & Doull's)**. 5 ed., International Edition: New York, 1989.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: ed. Rima, 2004. 96 p.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R.; *J. AOAC Int.* 2005, 88, 615.

LARA, W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 15, n. 2, p. 161-166, 1992.

LIMA, F. J. C. *et al.*. Inseticida organofosforado metamidafós: aspectos toxicológicos e analíticos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, PR, v. 11, p. 17-34, 2001.

MACEDO, J.A.B. **Introdução a Química Ambiental**. Química & Meio Ambiente & Sociedade, 1ª Edição, p. 191-259, 2002.

MAJORES, R. E. **Salting-out Liquid-Liquid Extraction (SALLE)**. Disponível em:  
<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=613590>. Acesso em 15 de janeiro de 2010.

MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; FOTOPOULOU, A. Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 84, n. 1-3, p. 15-27, 2004.

MORAES, A. R. A. *et al.*. **Efeito da aplicação de thiamethoxam para o controle do tripses na redução da severidade da verrugose do amendoim**. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 164-170, 2006.

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, MG, v. 3, n. 10, p. 26-40, 2003.

NAVARRO, M. *et al.*. Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 968, n. 1-2, p. 201-209, 2004.

N. Draper, H. Smith, **Applied Regression Analysis**. New York: Wiley. 1998.

OLIVEIRA, José Eudes de Moraes; MOREIRA, Andréa Nunes Moreira. **Manejo Integrado de Pragas da Videira**, 2010.

PASCHOAL, J. A. R. *et al.*. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, SP, v.31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction Theory and Practice**, Willey-VCH, Cambridge, 247 p. 1997.

PINHO, G. P. **Extração de Pesticidas em Amostras de Tomate pelas Técnicas: extração sólido líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão de matriz em fase sólida (DMFS) para análise por cromatografia gasosa**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009

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

RICHARDSON, M.; *Water Sci. Technol.* **1998**, 37, 19.

RHODEN, K. K. **Desenvolvimento e Validação de Método Multiresíduo Empregando CG-ECD e CG-MS para Investigação de Pesticidas em Morango, Maçã e Uva.** 2005. 132f Dissertação de Mestrado.Universidade Federal de Santa Maria.Santa Maria. 2005.

RODRIGUES, A. A. Z. **Otimização e Validação da Técnica de Extração Líquido – Líquido com Partição Induzida por Sal para Análise de Agrotóxicos em Amostras de Água por Cromatografia Gasosa e Aplicações.** (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Viçosa, 2010.

SARTORI, J. E. **1978-S251a Avaliação da Sensibilidade in Vitro de Isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a Fungicidas.** – Botucatu : [s.n.],2007.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C. *et al.*. Determination of pesticides residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect. **Analytical Sciences**, v. 21, p. 1291-1296, 2005.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, SP, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SHULING, S.; XIAODONG, M.; CHONGJIU, L. Multi-residue determination method of pesticides in leek by gel permeation chromatography and solid phase extraction followed by gas chromatography with mass spectrometric detector. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 448-453, 2007.

SILVA, E. P. **Validação de Método de Extração e Análise Multirresíduo de Agrotóxicos em Carne Bovina por Cromatografia Gasosa.** 2008. 102f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

SILVA, D. M. L. *et al.*. Organochlorine pesticides in Piracicaba river basin (São Paulo/Brazil): a survey of sediment, bivalve and fish. **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 31, n. 2, p. 214-219, 2008.

SODERLUND, D. M. *et al.*. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications

for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3-59, 2002.

SOLOMON, K.R.; BAKER, D.B.; RICHARDS, R.P.; DIXON, K.R.; KLAINE, S.J.; LAPOINT, T.W.; KENDALL, R.J.; WEISSKOPF, C P.; GIDDINGS, J.M.; GEISY, J.P.; HALL Jr., L.W.; WILLIAMS, W.M. Ecological risk assessment of atrazine in North American Surface waters - Annual Review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 15, p. 31-76, 1996.

STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, RJ, v. 10, p. 91-100, 2005.

SUCEN – **Superintendencia de Controle de Epidemias**. Disponível em < [www.sucen.sp.gov.br/down/segtrb/sequi5.pdf](http://www.sucen.sp.gov.br/down/segtrb/sequi5.pdf) >. Acesso em: 10 set. 2010.

SUN, L.; LEE, H. K. Stability studies of propoxur herbicide in environmental water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1014, p.153-163, 2003.

VALENTINE, W. M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 20, n. 2, p. 375-382, 1990.

VIEIRA, H. P. **Otimização e Validação da Extração Simultânea de Piretróides em Água e Solo e Análise por Cromatografia Gasosa**. 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

WESSELING, C.; CORRIOLS, M.; BRAVO, V. Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2, p. 697-705, 2005.

ZUCCHI, R. A. SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de Identificação de Pragas Agrícolas**. Piracicaba: FEALQ, 1993. 139p.