

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”- Unesp

Instituto de Química

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento e Aplicação de Métodos para
Análise de Resíduos dos Fungicidas
Fluquinconazol, Pirimetanil e Procloraz e dos
Acaricidas Clofentezina e Cihexatina em Frutas**

Sandro Navickiene

Araraquara-SP
2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Desenvolvimento e Aplicação de Métodos para Análise de Resíduos dos
Fungicidas Pirimetanil, Procloraz e Fluquinconazol e dos Acaricidas
Clofentezina e Cihexatina em Frutas**

Tese apresentada ao Instituto de
Química de Araraquara como
requisito para obtenção do título de
Doutor, no Programa de Pós-
Graduação em Química, na Área de
Concentração: Química Orgânica

Sandro Navickiene

Orientadora: Profa Dra Maria Lúcia Ribeiro

**Araraquara-SP
2003**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP – Araraquara

Prof. Dr. Gilberto Casadei de Baptista
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ – Piracicaba

Profa. Dra. Rosalinda Carmela Montone
Instituto Oceanográfico – USP – São Paulo

Profa. Dra. Ângela Regina Araújo
Instituto de Química – UNESP – Araraquara

Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
Instituto de Química – UNESP - Araraquara

1. Dados Pessoais

Nome: Sandro Navickiene
Data de Nascimento: 19/07/1969
Nacionalidade: Brasileira
Naturalidade: São Paulo-SP
Filiação: Jorge Navickiene Filho
 Helena Navickiene
Documento de Identidade: 20471451-5
Cadastro de Pessoa Física: 151099388/65
Estado Civil: Casado
Profissão: Químico
Endereço residencial: Av. Dr. Rocha Lima, nº 1096, Jardim Adalgisa
 14806-146. Araraquara-SP
Telefone residencial: (16) 33247833
Endereço profissional: Rua Prof. Francisco Degni, s/nº - Araraquara-SP
Telefone profissional: (16) 2016664
e-mail: sandnavi@posgrad.iq.unesp.br

2. Formação Profissional

2.1- Graduação

Curso: Bacharel em Química
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista
 “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp
Período: 1992-1996

2.2- Pós-Graduação

2.2.1- Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista
 “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp
Modalidade: Análise de Resíduos de Pesticidas
Projeto: “Análise de resíduos dos fungicidas tiabendazol e imazalil
 em citros e de carbendazim em uva”
Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro
Período: 1997-1999 (Data da Defesa: 26/02/1999)

2.2.2- Doutorado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica

Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho” – Unesp

Modalidade: Análise de Resíduos de Pesticidas

Projeto: “Desenvolvimento e aplicação de métodos para análise de resíduos dos fungicidas pirimetanil, procloraz e fluquinconazol e dos acaricidas clofentezina e cihexatina em frutas”.

(Processo FAPESP n°98/15891-6)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro

Período: 1999-2003 (Data da Defesa: 10/04/2003)

3. Área de Atuação

3.1- Desenvolvimento de métodos para análise de traços por técnicas cromatográficas
(CLAE e CG)

4. Idiomas

Compreende: Inglês (Bem), Italiano (Bem), Espanhol (Razoavelmente), Francês (Razoavelmente)

Fala: Inglês (Razoavelmente), Italiano (Bem), Espanhol (Razoavelmente), Francês (Pouco)

Lê: Inglês (Bem), Italiano (Bem), Espanhol (Bem), Francês (Bem)

Escreve: Inglês (Bem), Italiano (Bem), Espanhol (Razoavelmente), Francês (Pouco)

5. Participação em Congressos e Reuniões Científicas

5.1-Participação no Workshop “*Controle de resíduos de pesticidas em alimentos - modelo europeu*”, realizado na cidade de Araraquara, de 04 a 06 de outubro de 1999.

5.2-Participação no “*1º Seminário nacional sobre monitoramento de resíduos de agrotóxicos*”, realizado na cidade de Ilhéus, BA, de 28 a 30 de julho de 1999.

5.3-Participação no Workshop “*Biodegradação*”, realizado no auditório do CATI, em Campinas, no período de 14 a 16 de outubro de 1996.

5.4-Participação no Seminário “*Chembrasil 2005-Desafios e tendências da indústria química brasileira na década de 1996-2005*”, realizado em São Paulo, no período de 07 a 09 de maio de 1996.

5.5-Participação na XXIII Semana da Química “Prof. Dr. Massao Ionashiro”, realizado no período de 18 a 22 de outubro de 1993.

5.6-Participação da IV Jornada Científica do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, realizada de 18 a 20 de maio de 1992.

6. Participação e Apresentação de Trabalhos Científicos em Congressos

6.1-“*Análise de resíduos de benomil em shiitake (Lentinula edodes) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica (CLAE-UV)*”, durante o **I Simpósio Internacional sobre Cogumelos em Alimentação, Saúde, Tecnologia e Meio Ambiente no Brasil**, realizado em Brasília, DF, de 05 a 08 de dezembro de 2002.

6.2-“*Método simplificado para análise de resíduos de carbofuran, 3-hidroxicarbofuran e metomil em água de coco empregando extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV/Vis*”, durante o **XIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, no Campus de Presidente Prudente de 22 a 27 de setembro de 2002.

6.3-“*Simplified procedure for determination of fluquinconazole, clofentezine and pyrimethanil in fruit by HPLC-UV detection*”, durante o **4th European Pesticide Residues Workshop**, realizado na cidade de Roma, Itália, de 28 a 31 de maio de 2002.

6.4-“*Método simplificado para análise de resíduos de fungicida prochloraz em frutas por CG-DCE e CLAE-UV*”, durante a **25^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, realizada na cidade de Poços de Caldas, MG, de 20 a 23 de maio de 2002.

6.5-“*Procedimento simplificado de extração par análise de resíduos de tiabendazol e imzalil em limão por CG-DTE*”, no **XIII Encontro Regional de Química da Sociedade Brasileira de Química**, durante a XXXI Semana da Química “Difusão do Conhecimento”, realizada no Instituto de Química da Unesp, na cidade de Araraquara, SP, de 21 a 26 de outubro de 2001.

6.6-“*Método rápido para análise de resíduos de pesticidas em água de coco empregando EFS/CLAE*”, durante a **24^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, realizada na cidade de Poços de Caldas, MG, de 28 a 31 de maio de 2001.

- 6.7-“*Metodologia para análise de resíduos de pyrimethanil e pirimiphos-metil em laranja*”, durante a **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, realizada na cidade de Poços de Caldas, MG, de 23 a 26 de maio de 2000.
- 6.8-“*Procedimento analítico simplificado para análise de resíduos de pyrimethanil em frutas*”, durante o **VIII Congresso Latinoamericano de Cromatografia Y Técnicas Afines**, realizado na cidade de Buenos Aires, Argentina, de 12 a 14 de abril de 2000 e no XXI Encontro Nacional de Analistas de resíduos de Pesticidas, realizado no Instituto Adolfo Lutz, de 22 a 23 de novembro de 2000.
- 6.9-“*Determination of herbicide residues in soil by small scale extraction*”, durante o **9th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography**, realizado na cidade do Porto, Portugal, de 10 a 13 de outubro de 1999.
- 6.10-“*Determinação de carbendazim por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*”, durante a **21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, realizada na cidade de Poços de Caldas, MG, de 23 a 26 de maio de 1998.
- 6.11-“*Gas chromatographic determination of fenpropathrin residues in fruits*”, durante o **International Conference on Pesticide Use in Developing Countries Impact on Health and Environmental**, realizado em San Jose, Costa Rica, 1998.
- 6.12-“*Gas chromatographic determination of thiabendazol and imazalil in oranges*”, durante o **7º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Afins-COLACRO VII**, realizado em Águas de São Pedro, SP, 1998.
- 6.13-“*Estudo para o estabelecimento de um procedimento on-line para determinação de deltametrina*”, durante o **XI Encontro Regional de Química da SBQ**, realizado no Instituto de Química da Unesp, Araraquara, SP, 1995.

7. Publicações

- 7.1-“*LC-UV procedure for the determination of fluquinconazole, clofentezine and pyrimethanil residues in fruits*”, Navickiene, S., and Ribeiro, M.L. **Journal of AOAC International**. (submetido)
- 7.2-“*Evaluation of insecticide contamination in coconut water from coconut palms submitted to Marshal 200SC treatment*”, Ogawa, S., Navickiene, S., Brito, N.M., Abakerli, R.B., Ferreira, J.M.S., Silva, M.R.S., and Ribeiro, M.L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. (submetido)
- 7.3-“*A simple and rapid extraction for gas chromatographic determination of thiabendazole and imazalil residues in lemons*”, Navickiene and Ribeiro, M.L., **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol. 13 (5), 592-596, 2002.

- 7.4-“*Determination of pesticide residues in coconut water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*”, Brito, N.M., Navickiene, S., Polese, L., Jardim, E.F.G., Abakerli, R.B., and Ribeiro, M.L., **Journal of Chromatography A**, 957/2, 201-209, 2002.
- 7.5-“*Determination of herbicide residues in soil by small scale extraction*”, Polese, L., Jardim, E.F.G., Dores, E.F.G., Navickiene, S. and Ribeiro, M.L., **Eclética Química**, col. 27, 247-256, jan/dez de 2002.
- 7.6-“*A simplified method for the gas chromatographic determination of pyrimethanil residues in foods*”, Navickiene, S., and Ribeiro, M.L., **Journal of Separation Science**, 24, 470-472, 2001.
- 7.7-“*Método par determinação de heptacloro, aldrin, dieldrin e endrin em própolis*”, Polese, L., Jardim, E.F.G., Navickiene, S. e Ribeiro, M.L., **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, vol. 11, 35-44, jan/dez 2001.
- 7.8-“*Procedimento simplificado de extração para análise de resíduos de carbendazim em uva por cromatografia à liquido de alta eficiência*”, **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, vol. 10, 23-30, jan/dez 2000.
- 7.9-“*Rapid method for the determination of thiabendazole and imazalil residues in orange by capillary column gas chromatography*”, **Journal High Resolution Chromatography**, vol. 22, nº5, 303-304, 1999.
- 7.10-“*Determination of buprofezin, pyridaben, tebufenpyrad residues by gas chromatography-mass selective detection in clementine citrus*”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 46, nº10, 4255-4259, 1998.
- 7.11-“*Simplified method for determination of fenprothrin residues in fruits*”, **Chromatographia**, vol. 48, nº 894, 1998.
- 7.12-“*Gas-chromatographic determination of deltamethrin in crops*”, **Fresenius's Journal Analytical Chemistry**, 360, 252-255, 1998.

7.13-“*Metodologia rápida e eficiente para a análise de pesticidas organoclorados em fubã*”, **Química Nova**, vol. 19, nº6, 620-622, 1996.

8. Cooperação em Projetos com outras Instituições

8.1-**Determinação de resíduos do fungicida benomil em matriz de cogumelo da variedade Skiitake**, em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Antônio Graciolli do Departamento de Biologia e Zootecnia da Unesp de Ilha Solteira.

8.2-**Determinação de resíduos de pesticidas de diferentes classes químicas em matriz de água de coco**, em colaboração com a Dr^a Rosângela B. Abakerli da EMBRAPA-Meio Ambiente (Jaguariúna-SP) e a Dr^a Joana M. S. Ferreira da EMBRAPA-Tabuleiros Costeiros (Aracaju-SE).

9. Estágios

9.1-Estágio supervisionado pela Química Responsável Marilena Draetta no **Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas ANALITO S.A.**, localizado na cidade de Araraquara, no período de janeiro a fevereiro de 2000.

9.2-Estágio realizado sob orientação do Professor Paolo Cabras, junto ao **Dipartimento di Tossicologia da Università di Cagliari**, Itália, inserido no Projeto ALFA de Cooperação Científica e Tecnológica entre União Européia e América Latina, no período de 10 de janeiro a 10 de fevereiro de 1998.

10. Atividades Acadêmicas

10.1-Elaboração do curso **Análise de Resíduos de Pesticidas**, ministrado no **1º Curso de Especialização de Inverno**, realizado no Instituto de Química da Unesp, entre os dias 15 e 18 de julho de 2002, com duração de 16 horas.

10.2-Palestra intitulada **Análise de Resíduos de Pesticidas em Plantas**, ministrada aos alunos da disciplina de Biologia de Insetos, do Curso de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, em 12 de maio de 1998.

11. Cursos

11.1-Advances in GC/MS/MS-Ion Trap

Instituição: Instituto de Química-UNESP

Profissionais responsáveis: Dr. Terry Sheehan (Varian Inc.-USA) e Valmir David (Varian Ind. & Com. Ltda.)

Período: 13 a 17 de julho de 2000. Duração: 8 horas.

Local: Instituto de Química da UNESP de Araraquara

11.2-Segurança e Higiene Ocupacional em Laboratórios Químicos

Evento: Curso de Extensão Universitária

Profissional responsável: Profa. Dra. Mary Rosa R. M. S. Silva

Período: 12 de setembro a 28 de novembro de 1994. Duração: 40 horas.

Local: Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP

12. Atividades Extracurriculares

12.1-Membro da Química Júnior Projetos & Consultoria, empresa júnior dos alunos do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, atuando como Diretor de Projetos, no período de 30 de março de 1995 a 03 de agosto de 1995

12.2-Membro da Química Júnior Projetos & Consultoria, empresa júnior dos alunos do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, atuando como Gerente de Projetos, no período de 25 de novembro de 1994 a 30 de março de 1995

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Química Orgânica que engendrou um Analista de Resíduos de Pesticidas

Aos Professores e Funcionários do departamento de Química Orgânica e do Instituto de Química que com diligência e competência sempre buscaram nos auxiliar em nossas dúvidas prementes

À incansável Luciana Polese e à bem-humorada Elaine Galatti Jardim que nestes anos aprendi a admirar pela seriedade, competência, objetividade e ética no desenvolvimento de um trabalho científico

Ao exímio pescador Nivaldo Boralle que nos propiciou mesas repletas de saborosos peixes adquiridos com maestria nas inumeráveis e infindáveis pescarias nos rios, atoleiros e mercearias da região

Ao amigo Alex Jeller e colegas do Departamento de Química Orgânica pelo convívio salutar

À FAPESP pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

Dedico esta Tese de Doutorado

**A meus pais, Jorge e Helena,
Como uma homenagem de gratidão e amor filial e
Ao meu irmão Sérgio,
Do qual tenho muito orgulho e afeto**

**A minha amada esposa Hosana,
Cuja beleza e graça rivalizam com sua determinação e coragem
Tenho por ti um verdadeiro e ardente Amor
Adoro-te**

À Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro, cujo rigor inicial de uma profissional exigente, séria e competente, preocupada em ensinar valores éticos e seus alunos, foi sendo dissipado nos anos de convivência, os quais puderam revelar que se trata de uma pessoa como poucas, de muita energia e perseverança, que está sempre pronta a ouvir e a ajudar. Mais do que uma orientadora, que me possibilitou um sólido aprendizado, considero-a uma grande amiga.

ÍNDICE

	RESUMO	1
	ABSTRACT	3
1-	INTRODUÇÃO	5
1.1-	Frutas: benefícios e produção	5
1.2-	Pragas em frutas	6
1.3-	Controle químico das pragas que infestam frutas	8
1.3.1-	Pesticidas estudados	8
1.3.2-	Resíduos de pesticidas	10
1.4-	Métodos analíticos para determinação de resíduos de pesticidas	10
1.5-	Legislação	11
2-	OBJETIVOS	15
3-	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4-	EXPERIMENTAL	26
4.1-	Desenvolvimento do trabalho	26
4.2-	Preparação das soluções padrões dos fungicidas e acaricidas	27
4.3-	Linearidade dos detectores	27
4.4-	Análise do branco dos métodos analíticos	33
4.5-	Aquisição e preparação das amostras de frutas	33
4.6-	Análise das amostras testemunhas de frutas	34
4.7-	Análise das diferentes partes das frutas	34
4.8-	Procedimento de fortificação da amostras de frutas	35

4.9-	Métodos analíticos para pesticidas estudados em frutas	35
4.9.1-	Análise por cromatografia a gás do fungicida pirimetanil em matrizes de laranja (polpa), morango, maçã e uva	35
4.9.2-	Análise por cromatografia a gás do fungicida procloraz em matrizes de laranja e uva	35
4.9.3-	Análise por cromatografia a gás do acaricida cihexatina em matrizes de uva, laranja e morango	36
4.9.4-	Análise simultânea por cromatografia líquida dos fungicidas fluquinconazol, e pirimetanil e do acaricida clofentezina em casca e polpa das matrizes de manga, maçã e mamão (papaia)	37
5-	Aplicação das metodologias para análise de resíduos de fungicidas e acaricidas em amostras de frutas comercializadas nas cidades de Araraquara, São Carlos, Ribeirão Preto e Jaboticabal	42
5.1-	Tratamento pós-colheita de amostras de frutas realizado com produtos comerciais sob condições de laboratório	42
6-	Análise cromatográfica	44
6.1-	Análise qualitativa	44
6.2-	Análise quantitativa	44
6.3-	Procedimento estatístico	45
7-	Condições operacionais dos cromatógrafos para análise dos resíduos dos fungicidas e acaricidas em matrizes de frutas	46
7.1-	Especificações dos equipamentos, padrões dos pesticidas, solventes, reagentes, vidraria e gases para as análises cromatográficas e a limpeza de vidraria	48
7.1.1-	Equipamentos	48
7.1.2-	Padrões dos pesticidas, solventes, reagentes, vidraria e gases	48
7.1.3-	Limpeza dos materiais	49

8-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
8.1-	Estudo de recuperação	51
8.2-	Repetibilidade e reprodutibilidade das soluções de padrões dos pesticidas	52
8.3-	Limites de detecção e quantificação das soluções de padrões dos pesticidas	53
8.4-	Método para análise de resíduos de pirimetanil em frutas	55
8.5-	Método para análise de resíduos de procloraz em frutas	61
8.6-	Método para análise de resíduos de cihexatina em frutas	69
8.7-	Método para análise de resíduos de fluquinconazol em frutas	73
8.8-	Método para análise de resíduos de clofentezina em frutas	77
8.9-	Método para análise simultânea de resíduos de pirimetanil, fluquinconazol e clofentezina em frutas por cromatografia líquida	81
8.10-	Tratamento pós-colheita de amostras de frutas realizado com produtos comerciais sob condições de laboratório	83
8.11-	Aplicação dos métodos para análise de resíduos dos pesticidas estudados em frutas amostradas nas cidades de Araraquara, São Carlos, Ribeiro Preto e Jaboticabal	85
9-	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
10-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

TABELAS

Tabela 1-	Limites máximos de resíduos estabelecidos pelas legislações nacional e internacional para os pesticidas estudados para matrizes de frutas	13
Tabela 2-	Procedimentos de extração e de purificação e a técnica de análise por cromatografia líquida	23
Tabela 3-	Condições operacionais para análise dos pesticidas estudados por cromatografia líquida	24
Tabela 4-	Condições operacionais para análise dos pesticidas estudados por cromatografia líquida	25
Tabela 5-	Linearidade dos detectores do cromatógrafo a gás e cromatógrafo líquido	28
Tabela 6-	Condições operacionais de análise individual de pirimetanil e fluquinconazol por cromatografia a gás	46
Tabela 7-	Condições operacionais de análise individual de procloraz e cihexatina por cromatografia a gás	47
Tabela 8-	Condições operacionais de análise simultânea de clofentezina, fluquinconazol e pirimetanil por cromatografia líquida	47
Tabela 9-	Propriedades físico-químicas dos pesticidas estudados	50
Tabela 10-	Repetibilidade e reprodutibilidade das soluções de padrão dos pesticidas analisados	53
Tabela 11-	Limites de detecção e de quantificação dos métodos para análise de resíduos de fungicidas e acaricidas nas frutas estudadas	55
Tabela 12-	Recuperação de pirimetanil de amostras de frutas fortificadas em diferentes níveis de fortificação (n=5* e 8 ^a repetições)	59
Tabela 13-	Recuperações de procloraz de amostras de laranja (polpa) e de uva fortificadas (n=8 repetições)	64
Tabela 14-	Recuperação de cihexatina de amostras de uva fortificadas (n=4 repetições)	70

Tabela 15-	Recuperação de fluquinconazol de amostras de maçã fortificadas (n=5 repetições)	76
Tabela 16-	Recuperação de clofentezina de amostras de frutas fortificadas (n=4 repetições)	79
Tabela 17-	Recuperação de resíduos de fluquinconazol, clofentezina e pirimetanil de amostras fortificadas de frutas por CLAE-UV (n=8 repetições)	82
Tabela 18-	Tratamento de frutas com formulações comerciais dos pesticidas estudados	84

FIGURAS

Figura 1-	Gráfico da participação das culturas no valor bruto da produção de frutas em 2001	6
Figura 2-	(1) Manga infectada com a doença antracnose causada pelo fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; (2) maçã infectada por sarna causada pelo fungo <i>Venturia inaequalis</i>	7
Figura 3-	Folhas de mamoeiro com sintomas de ataque do ácaro-rajado <i>Tetranychus urticae</i>	7
Figura 4-	Curvas analíticas dos pesticidas estudados – cromatografia líquida com detector espectrofotométrico	29
Figura 5-	Curva analítica do fungicida pirimetanil – cromatografia a gás com detector termiônico	30
Figura 6-	Curva analítica do fungicida procloraz – cromatografia a gás com detector por captura de elétrons	31
Figura 7-	Curva analítica do acaricida cihexatina – cromatografia a gás com detector por captura de elétrons	32
Figura 8-	Cromatograma (CG-DT): 1- amostra testemunha de polpa de laranja; 2- amostra de laranja fortificada com solução padrão de pirimetanil (0,2 mg/Kg); 3- solução padrão de pirimetanil (0,2 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna DB-5: 100°C (1min) direto até 200°C, taxa de 10°C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume de injeção, 1 µL, modo splitless	60
Figura 9-	Cromatograma (CG-DCE): 1- amostra testemunha de laranja; 2- solução padrão de procloraz (0,1 mg/Kg); 3- amostra de laranja fortificada com solução padrão de procloraz (0,1 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna megabore DB-608: 140°C (1min) direto até 200°C, taxa de 10°C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume de injeção, 1 µL, modo splitless	65

Figura 10-	Cromatograma (CG-DCE): Análise de solução padrão de procloraz (0,5 mg/Kg) submetida a diferentes temperaturas iniciais na rampa de temperatura em coluna megabore DB-608: 1- 100°C; 2- 110°C; 3- 120°C; 4- 140°C. Volume injetado 1 µL, modo splitless	66
Figura 11-	Cromatograma (CG-DCE): 1- solução padrão de procloraz na forma de 2,4,6-triclorofenol (0,5 mg/Kg); 2- solução padrão certificado de 2,4,6-triclorofenol (0,5 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna megabore DB-608: 140°C (1min) direto até 200°C, taxa de 10°C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume de injeção, 1 µL, modo splitless	67
Figura 12-	Cromatograma (CLAE-UV): 1- solução padrão de procloraz sem reação de hidrólise (0,1 mg/kg); 2- solução padrão de procloraz na forma de 2,4,6-triclorofenol (0,1 mg/Kg). Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 8:2, v/v. Fluxo: 0,8 mL/min, modo isocrático. Volume injetado 20 µL. Detecção 220nm	68
Figura 13-	Proposta de reação para obtenção do derivado de cihexatina	71
Figura 14-	Cromatograma (CG-DCE): 1- amostra testemunha de uva; 2- solução padrão de cihexatina (0,1 mg/Kg); 3- amostra de uva fortificada com solução padrão de cihexatina (0,1 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna megabore DB-608: 140°C (1min) direto até 200°C, taxa de 10°C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume de injeção, 1 µL, modo splitless	72
Figura 15-	Cromatograma (CG-DT): 1- solução padrão de fluquinconazol (0,5 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna DB-5: 100°C (1min) direto até 200°C, taxa de 10°C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume de injeção, 1 µL, modo splitless	76
Figura 16-	Cromatograma (CLAE-UV): 1- solução padrão de fluquinconazol (0,1 mg/kg); 2- amostra de maçã fortificada com fluquinconazol (0,1 mg/Kg). Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 7:3, v/v. Fluxo: 0,8 mL/min, modo isocrático. Volume injetado 20 µL. Detecção 254 nm	77

Figura 17-	Cromatograma (CLAE-UV): 1- solução padrão de clofentezina (0,5 mg/kg); 2- amostra de manga fortificada com clofentezina (0,5 mg/Kg). Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 7:3, v/v. Fluxo: 0,8 mL/min, modo isocrático. Volume injetado 20 µL. Detecção 220 nm; 3- análise simultânea da solução padrão de clofentezina (1), fluquinconazol (2) e pirimetanil (3) (0,1 mg/Kg). Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 7:3, v/v. Fluxo: 0,8 mL/min, modo isocrático. Volume injetado 20 µL. Detecção 254 nm	80
Figura 18-	Cromatogramas: 1- análise do branco do método para cihexatina; 2- análise do branco do método para procloraz; 3- análise do branco do método para pirimetanil	86
Figura 19-	Cromatogramas das amostras testemunhas das frutas (CLAE-UV): 1- manga; 2- mamão; 3- maçã; 4- laranja. Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 8:2, v/v. Fluxo: 0,8 mL/min, modo isocrático. Volume injetado 20 µL. Detecção 254 nm	87

ESQUEMAS

Esquema 1-	Procedimento experimental para análise de resíduos de pirimetanil em frutas por cromatografia a gás	38
Esquema 2-	Procedimento experimental para análise de resíduos de procloraz em frutas por cromatografia a gás	39
Esquema 3-	Procedimento experimental para análise de resíduos de cihexatina em frutas por cromatografia a gás	40
Esquema 4-	Procedimento experimental para análise simultânea de resíduos de fluquinconazol, pirimetanil e clofentezina em frutas por cromatografia líquida	41

ABREVIATURAS

LMR	Limite máximo de resíduos
CG	Cromatografia a gás
CLAE	Cromatografia líquida
DNF	Detector nitrogênio-fósforo
DCE	Detector de captura de elétrons
DT	Detector termiônico
EM	Espectrometria de massas
UV	Ultravioleta
RP	Reverse phase

RESUMO

Fungicidas, como pirimetanil, fluquinconazol e procloraz, e acaricidas, como clofentezina e cihexatina, são aplicados tanto no período de pré-colheita, como para preservar a qualidade e as características de cor e sabor das frutas durante a armazenagem, o transporte e a comercialização (procloraz). Contudo, devido à persistência dos seus resíduos nas frutas, monitoramentos devem ser realizados, empregando-se técnicas analíticas sensíveis, para avaliar se os resíduos de tais pesticidas atendem aos limites estabelecidos pelas legislações dos países exportadores e importadores. Um número reduzido de métodos para análise de resíduos dos fungicidas pirimetanil, procloraz e fluquinconazol e dos acaricidas cihexatina e clofentezina, usados no controle de doenças e pragas em culturas de frutas, estão descritos na literatura. Aliando este dado à importância econômica da produção de frutas em nosso país, foram desenvolvidos e/ou adaptados métodos eficientes, rápidos e simples para a determinação destes fungicidas e acaricidas na casca e na polpa de mamão (papaia), manga e laranja e no fruto inteiro de morango e uva. As metodologias são baseadas em extração líquido-líquido e análise individual por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons para procloraz e cihexatina e detecção termiônica para pirimetanil; e, por cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica para análise simultânea de pirimetanil, fluquinconazol e clofentezina, e individual de procloraz. Recuperações médias para todos os pesticidas compreenderam o intervalo de 73% a 101% com coeficiente de variação entre 1,2% e 12,7%. Os limites de detecção foram de 0,02 a 0,1mg/Kg, e os de quantificação de 0,05 a 0,2 mg/Kg. Os níveis de fortificação estudados para os pesticidas nestas matrizes de 0,05 a 2,0 mg/Kg

estão compreendidos nos valores de limites máximos de resíduos estabelecidos pelas legislações internacional e nacional. Em comparação à literatura, os métodos apresentam vantagens, como: simplicidade, consumo reduzido de solventes e reduzido tempo de análise, permitindo que sejam empregados em análises de rotina e em programas de monitoramento. Os tratamentos das frutas por imersão com formulações comerciais de fluquinconazol, pirimetanil e procloraz, realizados sob condições de laboratório, demonstraram que os resíduos não excederam os níveis estabelecidos pela legislação. As metodologias foram aplicadas em amostras de frutas comercializadas nas cidades de Araraquara, Ribeirão Preto, Jaboticabal e São Carlos, contudo, não foram detectados resíduos dos pesticidas estudados, segundo as condições de análise descritas neste trabalho.

ABSTRACT

Fungicides, as pyrimethanil, prochloraz and fluquinconazole, besides acaricides, as clofentezine and cyhexatin, have been used to preserve the quality of perishable fruits during their production, storage and commercialization. Also, these fungicides and acaricides are employed in the pre-harvest period. However, the presence of pesticide residues in fruits represents a serious problem, once the pesticides could become a risk to human consumption. So, the development of analytical methods looking for a rapid screening can ensure that the pesticide concentrations are below of the maximum residue limits allowed by the regulatory agencies. In the literature, some methods for the determination of pyrimethanil, prochloraz, clofentezine and cyhexatin in fruit matrices have been described. Respecting fluquinconazole, there is only a German review. Considering the subjects mentioned and that Brazil plays an important role in the worldwide production of fresh fruit, the purpose of this work was to develop simple and efficient methods for the determination of these fungicides and acaricides in peel and pulp of papaya, mango and orange, besides in grape and strawberry (entire fruit). The methodologies are based on liquid-liquid extraction. The analyses were performed by means of gas chromatography with thermionic specific detection for pyrimethanil and electron-capture detection for prochloraz and cyhexatin. In addition, pyrimethanil, prochloraz, fluquinconazole and clofentezine were analyzed employing a liquid chromatography with ultraviolet detection. Average recoveries to all the pesticides ranged from 73% to 101% with relative standard deviations between 1.2% and 12.7%. Detection limits ranged from 0.02 to 0.1 mg/Kg and quantification limits ranged from 0.05 to 0.2 mg/Kg. The fortification levels (0.05-2.0 mg/Kg) were selected according to

the Brazilian and international legislation. According to the literature, the methods described here show advantages, as simplicity, reduced solvent consumption and shorter time, which allow their use for routine analysis. The data reported gave similar results to the reference methods related in the literature, at the same level of concentration. The treatments of the fruits by dipping, using commercial formulations of fluquinconazole, pyrimethanil and prochloraz, demonstrated that the residues found were not higher than that established limits by legislation. In addition, the methodologies were applied in fruit samples commercialized in the Araraquara, São Carlos, Jaboticabal and Ribeirão Preto counties. The data obtained have showed that the samples analyzed presented good quality for the consumption, once no pesticide residues were detected in the fruits.

1-INTRODUÇÃO

1.1-Frutas: benefícios e produção

As frutas proporcionam importantes benefícios à saúde, como fonte, por exemplo, de açúcares, vitaminas (C e A) e sais minerais (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ etc) que apresentam implicações diretas na qualidade de vida (AWAD, 1994), além de metabólitos secundários. Frequentemente as frutas são indicadas como excelentes aliados da medicina preventiva e mesmo curativa, haja vista as propriedades anti-reumáticas e diuréticas apresentadas pelas uvas e morangos. Nesse sentido, a mídia se encarrega de estimular o consumo de frutas, sobretudo na forma in natura.

O Brasil apresenta uma das maiores produções de frutas do mundo (3º lugar), com 34,5 milhões de toneladas, segundo dados de 2002. Nesse ano, as exportações brasileiras de frutas aumentaram 14,4%. Foram embarcadas 599,3 mil toneladas de frutas, movimentando US\$ 218 milhões de dólares. Dentre as frutas brasileiras mais exportadas em 2001 estão a manga, a uva, o mamão (papaia) e a maçã. A Figura 1 apresenta o gráfico da participação das culturas no valor bruto da produção de frutas no Brasil. Em torno de 70% das frutas exportadas são consumidas por países europeus: Holanda, Inglaterra, Espanha, França e Alemanha, sendo que a Holanda compra 39% destas frutas e as redistribui aos outros países da Europa (BLECHER, 2002).

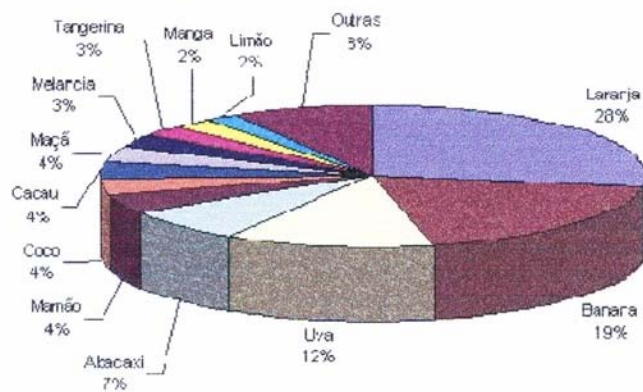


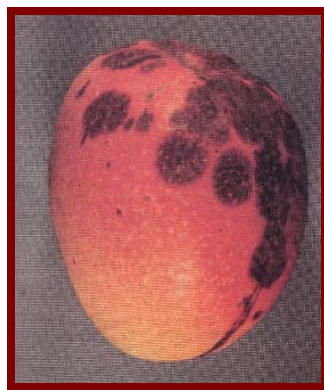
FIGURA 1- Gráfico da participação das culturas no valor bruto da produção de frutas de 2001.

1.2-Pragas e doenças em frutas

As frutas estão sujeitas à ação prejudicial de um grande número de pragas e de doenças nos períodos de produção e comercialização. Uma definição bastante ampla de pragas informa que são organismos, tais como insetos, fungos patogênicos, animais e plantas invasoras, capazes de reduzir a quantidade ou a qualidade de alimentos, rações, forragens, fibras, flores, madeiras durante a produção e a colheita, processamento, armazenagem, transporte ou uso; que podem transmitir doenças ao homem e aos animais domésticos e às plantas cultivadas; que injuriam ou perturbam o homem ou seus animais; que estragam plantas ornamentais; ou que danificam propriedades ou objetos de uso pessoal (ALVES FILHO, 2002).

Estima-se que de 30 a 40% das perdas na produção de frutas são causadas por pragas, tais como os ácaros fitófagos (ácaro-branco, ácaro-vermelho e ácaro-rajado) e as doenças causadas por fungos como: oídio (*Uncinula necator*, *Oidium mangiferae*),

pinta-preta (*Asperisporium caricae*), mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) que podem comprometer a produção de mamão, morango, uva, laranja, maçã e da manga, frutas selecionadas para este trabalho. A Figura 2 mostra uma manga infectada com a doença antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e uma maçã infectada por sarna causada pelo fungo *Venturia inaequalis*, e a Figura 3 apresenta folhas de mamoeiro com sintomas de ataque do ácaro-rajado *Tetranychus urticae*



(1)



(2)

Figura 2- (1) Manga infectada com a doença antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (MANGA Coleção FRUPEX); (2) Maçã infectada por sarna causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (MAÇÃ Coleção Plantar).



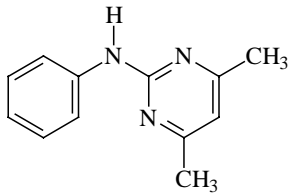
Figura 3- Folhas de mamoeiro com sintomas de ataque do ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (MAMÃO Coleção Plantar).

1.3-Controle químico das pragas que infestam frutas

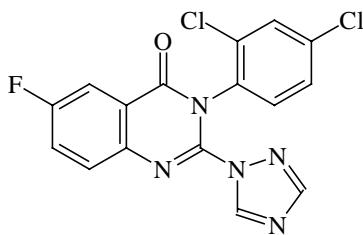
A indústria de frutas frescas busca evitar as deteriorações causadas por diferentes espécies de fungos patogênicos e ácaros, entre outras pragas, a fim de prover os consumidores com alimentos de qualidade. O conceito de deterioração geralmente significa “mudança indesejável” nos produtos agrícolas. Os patógenos causadores da deterioração de hortifrutícolas, além de causadores de doenças e intoxicações, são os que devem ser eliminados para poder conservar os produtos e gerar alimentos saudáveis e de maior vida útil. Desta maneira, uma das formas ainda bastante utilizadas é o uso de diferentes classes de pesticidas, como fungicidas e acaricidas que são aplicados para preservar a qualidade e as características de cor e sabor das frutas durante a armazenagem, o transporte e a comercialização. Contudo, esta prática pode levar à ingestão de resíduos de pesticidas, uma vez que por falta de informação ou pressão da demanda, os produtores podem antecipar a colheita de frutas, desobedecendo ao período de carência do(s) princípio(s) ativo(s) aplicado(s).

1.3.1- Pesticidas estudados

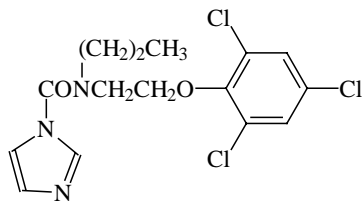
As classes dos fungicidas e acaricidas são bastante amplas, apresentando uma grande diversidade de grupos químicos e modos de ação, como pode ser verificado pelos pesticidas selecionados para este trabalho, os quais estão apresentados na seqüência e as propriedades físico-químicas na Tabela 9, p. 50. A literatura registra um número reduzido de métodos analíticos para a determinação de resíduos destes fungicidas e acaricidas em matrizes de frutas.



Pirimetanil, N-(4,6-dimetilpirimidina-2-il) anilina, é um fungicida de ação preventiva e curativa que pertence ao grupo químico anilinoimidazólico. É utilizado no controle de diversas doenças, como a sarna (*Venturia inaequalis*) que ataca macieiras e o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) que causa prejuízos em videiras.

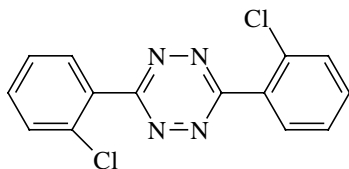


Fluquinconazol, 3-(2,4-diclorofenil)-6-flúor-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)quinazolin-4 (3H)ona, é um fungicida sistêmico que pertence ao grupo químico triazol. É usado no controle de sarna (*Venturia inaequalis*) em macieiras.

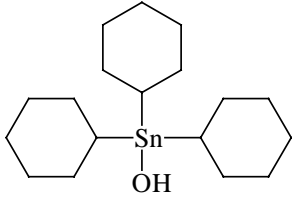


Procloraz, 1-[(N-propil-N-2-(2,4,6 triclorofenoxi)

etil]carbamoil imidazol, é um fungicida de ação por contato que pertence ao grupo químico imidazol. Apresenta metabólitos de interesse toxicológico, como 2,4,6-triclorofenol. É indicado para o controle de doenças como a verrugose (*Elsinoe australis*) que ataca plantações de citros e a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), em plantações de manga e citros.



Clofentezina, 3,6-bis-(2-clorofenil)-1,2,4,5-tetrazina, é um acaricida-ovicida do grupo químico orto-halo fenil tetrazinas substituídas. É indicado para o controle de pragas como o ácaro-vermelho-europeu (*Panonychus ulmi*) em macieiras.



Cihexatina, hidróxido de triciclo-hexil-estanho, é um acaricida do grupo químico dos organoestânicos. É usado no controle de pragas como o ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*), ácaro da leprose (*Brevipalpus phoenicis*) em citros, ácaro vermelho-europeu (*Panonychus ulmi*) em maçã, e ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) em culturas de pêsego e de morango.

1.3.2-Resíduos de pesticidas

A aplicação indiscriminada e a falta de critérios definidos na seleção de agrotóxicos para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas que afetam as culturas, podem levar a contaminação de alimentos, solos e cursos de água, acarretando sérios problemas como a presença de resíduos tóxicos nos alimentos e no meio ambiente, podendo afetar direta e indiretamente a saúde humana. Contudo, os níveis de resíduos de agrotóxicos em quantidades superiores aos permitidos pela legislação vigente podem ser evitados, observando-se o número correto de aplicações, as dosagens recomendadas e o intervalo de tempo adequado entre a última aplicação do pesticida e a colheita.

1.4-Métodos analíticos para determinação de resíduos de pesticidas

O estudo e a análise de resíduos de pesticidas em frutas são importantes, pois permitem estabelecer curvas de degradação de princípios ativos em estudos de campo supervisionados, a fim de gerar dados para estabelecer critérios como períodos de

carência de princípios ativos, nº de aplicações para as diferentes culturas, consumo diário aceitável etc, para registro de novos princípios ativos; e, na execução de programas de monitoramento, checar os níveis de resíduos presentes em produtos agrícolas comercializados, para verificar se estão de acordo com os limites máximos estabelecidos nas legislações interna e externa, a fim de disponibilizar à população produtos de melhor qualidade para serem consumidos.

Por outro lado, a realização de pesquisas que permitam a avaliação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é necessária para que os dados gerados norteiem a ação governamental a fim de coibir os possíveis problemas de saúde que poderiam advir pela ingestão desses resíduos. Além disso, o estudo de resíduos de pesticidas é de máxima relevância, pois possibilita o desenvolvimento e/ou aprimoramento de procedimentos analíticos e das técnicas de análise dos resíduos dessas substâncias nos alimentos, pois a seleção de um método analítico está baseada em critérios como confiabilidade, aplicabilidade e praticidade. No entanto, o Brasil conta com um número bastante reduzido de laboratórios que atuam nesta área. A escassez de programas de monitoramento não permite a sistematização de dados sobre pesticidas que oferecem riscos de contaminação e, portanto, sobre qualidade dos produtos agrícolas distribuídos interna e externamente.

1.5- Legislação

O tratamento das culturas agrícolas com pesticidas é uma das técnicas comumente utilizadas para o controle das pragas. Porém, o uso de pesticidas comporta riscos para o homem e para o ambiente devido à sua toxicidade. Assim, para resguardar a saúde do homem, há legislações que fixam para cada uma das culturas

agrícolas um limite máximo de resíduos (LMRs) de pesticidas nas diferentes culturas agrícolas. A Tabela 1 apresenta os LMRs estabelecidos pelas legislações nacional e internacional para os pesticidas estudados em matrizes de frutas. Por resíduos de pesticidas entendem-se não somente o princípio ativo ainda presente numa matriz, mas também os seus metabólitos e/ou produtos de degradação e as impurezas da formulação de interesse toxicológico. Os dados toxicológicos constituem a base para a determinação dos LMRs. Fatores como depósito inicial e velocidade de degradação dos resíduos são importantes para se conhecer a quantidade de resíduos numa cultura.

Tabela 1- Limites Máximos de Resíduos estabelecidos pelas Legislações Nacional e Internacional para os Pesticidas Estudados para Matrizes de Frutas.

Pesticida	Matriz	Limite Máximo de Resíduos (mg/Kg)	
		<i>Nacional #</i>	<i>Internacional</i>
pirimetanil (fungicida)	Uva	5,0	3,0 ^a
	Morango	1,0	5,0 ^a
	Maçã	1,0	1,0 ^a
fluquinconazol (fungicida)	Maçã	0,5	0,1 ^a
procloraz (fungicida)	Uva		0,2 ^b
	Laranja	0,5	5,0 ^a
	Manga	0,2*	2,0 ^a
	Morango		2,0 ^b
	Maçã	0,5	
	Mamão	1,0*	
cixexatina (acaricida)	Laranja	0,5	0,5 ^a
	Morango	2,0	1,0 ^a
	Maçã	0,5	
clofentezina (acaricida)	Manga		2,0 ^b
	Laranja	0,2 (casca)	5,0 ^b
	Mamão		1,0 ^b
	Maçã	0,1	

* tratamento pós-colheita.

BRASIL, 2003; a: CODEX, 1998; b: LASSERRE, 1999

A preocupação mundial com as conseqüências do uso indiscriminado de pesticidas é demonstrada por meio de regulamentações mais exigentes quanto aos níveis de resíduos nos produtos agrícolas e a intensificação da fiscalização pelos países importadores, visando assegurar a preservação do meio ambiente e a melhoria da qualidade de vida (AHMED, 2001; BOLOGNESI, 2000; MOTARJEMI, 2001; GLADE, 1998).

2-OBJETIVOS

- Desenvolver e/ou adaptar métodos analíticos para a determinação de resíduos dos pesticidas pirimetanil, procloraz, cihexatina, fluquinconazol e clofentezina, empregando as técnicas de cromatografia a gás e cromatografia líquida.
- Avaliar a eficiência dos métodos pelos parâmetros de exatidão e precisão, bem como pela determinação dos limites de detecção e de quantificação.
- Realizar ensaios de tratamento pós-colheita com formulações comerciais dos fungicidas fluquinconazol, pirimetanil e procloraz em algumas das matrizes de frutas estudadas.
- Aplicar as metodologias em amostras de frutas comercializadas nas cidades de Araraquara, Ribeirão Preto, Jaboticabal e São Carlos.

3-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Metodologias para análise de resíduos dos fungicidas pirimetanil, procloraz e fluquinconazol e dos acaricidas clofentezina e cihexatina em matrizes de frutas

Procedimentos analíticos têm sido desenvolvidos e descritos na literatura para a determinação dos resíduos destes fungicidas e acaricidas em culturas de frutas.

As técnicas de cromatografia a gás (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) constituem atualmente a base da grande maioria dos métodos analíticos para análise dos resíduos destes pesticidas, sendo que os detectores mais utilizados compreendem o de captura de elétrons e o de nitrogênio-fósforo para CG e o de UV com arranjo de diodos e o de massas para CLAE.

Estão sumarizadas abaixo informações relevantes com respeito à análise dos resíduos dos fungicidas e acaricidas estudados em matrizes de frutas descritas na literatura.

CABRAS *et al.*, 1997, aplicaram um método para a análise de resíduos de pirimetanil em amostras de uva, mosto e vinho. Os níveis de fortificação variaram de 0,05 a 3,0 mg/Kg, com recuperações médias de 101% para a uva. O sistema de solventes empregado na extração foi acetona:éter etílico (1:1, v/v). As análises dos resíduos foram efetuadas por cromatografia a gás de alta resolução com detector de nitrogênio-fósforo.

NAVARRO *et al.*, 2000, aplicaram um método para análise de resíduos de pirimetanil entre outros pesticidas, em amostras de uva, mosto e vinho. Os níveis de

fortificação variaram de 0,01 a 0,1 mg/Kg, com recuperações médias que variaram entre 89% e 103%, com coeficientes de variação entre 1,0% e 14,3% para estas matrizes. O sistema de solvente empregado num procedimento de simples extração foi acetona:diclorometano (1:1, v/v). As análises dos resíduos foram efetuadas por cromatografia a gás de alta resolução com detector de nitrogênio-fósforo.

GELSOMINO *et al.*, 1997, desenvolveram um método para analisar resíduos de clofentezina e de procloraz, entre outros pesticidas, em amostras de cenoura, melão e tomate. Os níveis estudados foram 0,06 e 0,08 mg/Kg, com recuperações médias (3 repetições) de 88,3% e de 86,3%, respectivamente para amostras de melão. O solvente utilizado para a extração foi acetona, seguido de partição com diclorometano. A purificação foi realizada por cromatografia de permeação em gel. As análises dos resíduos foram realizadas por cromatografia a gás com detector por captura de elétrons. O método foi aplicado em análises de rotina das matrizes citadas por um período de 9 meses.

STAN, 2000, apresenta os resultados dos trabalhos desenvolvidos em seu laboratório no desenvolvimento de métodos para análise de resíduos de pesticidas. Uma metodologia multirresíduo de pesticidas de diferentes classes químicas é apresentada, sem especificar as matrizes estudadas. Contudo, exemplifica o desempenho de seu método com matriz de morango. Um número superior a 300 princípios ativos é analisado por cromatografia a gás com diferentes detectores e colunas cromatográficas: captura de elétrons (DCE) com uma coluna capilar SE-54 (50 m x 0,32 mm, 0,17 μ m), nitrogênio-fósforo (DNF) com uma coluna capilar OV-17 (25 m

x 0,32 mm, 0,25 μm) e detector de massas (DM) com uma coluna capilar SE-54 (25 m x 0,2 mm, 0,33 μm). O procedimento de extração é uma versão simplificada do método de Luke (LUKE, 1975) e a purificação é realizada por cromatografia de permeação em gel. Da significativa relação de pesticidas, estão relacionados pirimetanil, procloraz e cihexatina. Considerando, contudo, a detecção destes pesticidas neste trabalho, empregando os detectores por captura de elétrons e por nitrogênio-fósforo, o autor apresenta que o acaricida cihexatina responde bem com DCE e DNF; pirimetanil, com DNF e procloraz, com DNF.

SCIBALDI *et al.*, 1997, testaram a resposta individual de soluções padrões de 150 pesticidas, dentre os quais procloraz, utilizando colunas cromatográficas de diferentes fases estacionárias (DB-5 e DB-1701) e detectores (captura de elétrons e termiônico) por cromatografia a gás de alta resolução. Segundo os resultados obtidos, clofentezina e procloraz foram apenas detectados pelo captura de elétrons em ambas as colunas (DB-5 e DB-1701).

DE PAOLI *et al.*, 1997, determinaram procloraz em diferentes matrizes, como maçã, tomate e trigo por cromatografia a gás com detector por captura de elétrons. O método é eficiente com recuperações de 82%, para o nível de 0,05 mg/Kg para matriz de maçã.

BARNES *et al.*, 1995, extraíram clofentezina de amostras de ameixa e morango. As amostras foram homogeneizadas em acetona e extraídas com uma mistura de diclorometano e ciclohexano. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (ionização química). A coluna

empregada foi de C₁₈, com metanol:água como fase móvel. As recuperações médias de clofentezina foram da ordem de 70% para as duas matrizes.

YAMAMOTO *et al.*, 1996, descreveram um método para a determinação de cihexatina e óxido de fenbutatina em sucos de frutas (maçã) e vegetais (cenoura) e outras matrizes. A extração foi realizada empregando uma mistura de ácido acético:éter etílico (1;99, v/v). Em seguida foram etilados com reagente de Grignard e estes foram extraídos com hexano. A fase hexânica foi concentrada e purificada com cartuchos Sep-pak de florisil. Cada um dos derivados foi analisado por cromatografia a gás de alta resolução empregando o detector FPD (Sn) e uma coluna DB-1. As recuperações variaram de 80 a 105% para o nível de 1,0 mg/Kg para cihexatina.

BALINOVA, 1998, aplicou um método para análise de resíduos de clofentezina em amostras de maçã e tomate. Os níveis de fortificação variaram de 0,2 a 1,0 mg/Kg, com recuperações médias de 89%, para amostras de maçã, no nível de concentração mais baixo. O solvente empregado para a extração foi o acetato de etila e a purificação foi realizada por cromatografia de permeação em gel. As análises dos resíduos foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A fase móvel utilizada foi metanol:água (8:2), com um de fluxo de 1 ml/min. O comprimento de onda do detector UV-Vis foi 254nm.

WONG *et al.*, 1999, aplicaram um método de extração em fase sólida (C₁₈) para analisar pirimetanil em amostras de vinho (tinto e branco). O solvente de eluição foi acetato de etila. Os níveis estudados variaram de 0,01 a 1,0 mg/Kg. As análises dos resíduos foram realizadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas

FUSE *et al.*, 2000, desenvolveram um método para a análise de resíduos de procloraz em amostras de frutas e vegetais. O solvente empregado para extração foi acetona, seguida de uma reextração com acetato de etila. Em seguida, o extrato foi submetido à derivação com cloreto de piridina, a 200 °C por 3 h, para conversão de procloraz em 2,4,6-triclorofenol. As análises dos resíduos foram efetuadas por cromatografia a gás de alta resolução com detector de captura de elétrons. As recuperações médias variaram entre 67% e 85%. O limite de determinação foi de 0,02 mg/Kg.

BLASCO *et al.*, 2002a, desenvolveram um método multirresíduo para analisar resíduos de fungicidas (dicloran, flutriafol, o-fenilfenol, procloraz e tolclofos-metil) em amostras de frutas e vegetais. Os resíduos foram extraídos por dispersão em fase sólida com C₈. As recuperações médias variaram entre 52% e 91%, com coeficientes de variação entre 6,1% e 11,9%. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas. O limite de quantificação foi de 0,01 mg/Kg.

KAIHARA *et al.*, 2000, desenvolveram um método multirresíduo para analisar resíduos de 27 pesticidas, dentre os quais clofentezina, em matrizes de frutas e vegetais. Os resíduos foram submetidos à extração por fluido supercrítico. O extrato é purificado com cartuchos Sep-Pak de florisil e Bond Elut de PSA (fase trocadora de ânions). Os resíduos foram eluídos com diferentes sistemas de solvente: 15% éter-etílico/n-hexano, e 15% e 50% de acetona/n-hexano. As três frações foram analisadas em separado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo

de diodos. Os limites de detecção variaram entre 0,005 e 0,01 mg/Kg para os 27 pesticidas estudados.

BLASCO, 2002b, desenvolveram um método para a análise de resíduos de cinco fungicidas, dentre eles procloraz, em amostras de frutas e vegetais. A extração foi realizada pela técnica de dispersão em fase sólida (C_{18} como adsorvente). O solvente empregado para eluição foi acetato de etila. As análises dos resíduos foram efetuadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas. As recuperações médias variaram entre 67% e 85%. O limite de determinação foi de 0,02 mg/Kg. O método desenvolvido foi aplicado a 200 amostras das matrizes estudadas (laranja, limão, banana, e três vegetais) coletadas nos mercados locais. Em 35% foram detectados resíduos do fungicida procloraz, nas concentrações de 0,06 a 1,95 mg/kg.

NAVARRO *et al.*, 2002, desenvolveram um método multirresíduo para analisar resíduos de oito fungicidas, dentre eles pirimetanil, em amostras de frutas (maçã e laranja) e vegetais. Os autores compararam o desempenho do método proposto, cujo procedimento envolve a técnica de dispersão em fase sólida [0,5 g de C_{18} (adsorvente) para 0,5 g de amostra e eluição com acetato de etila], com a extração realizada com acetato de etila e sulfato de sódio (50 g de amostra para 250 ml de solvente). As análises foram realizadas por cromatografia a gás de alta resolução com dois detectores: o de captura de elétrons (quintozene, captan e folpet) e o de nitrogênio-fósforo (pirimetanil, fludioxonil, flutolonil, carboxin e tebuconazol) acoplado a espectrometria de massas para confirmação. Para o método proposto, as recuperações (níveis de fortificação: 0,01, 0,1 e 1,0 mg/Kg) para o fungicida pirimetanil de amostras de maçã variaram entre 93% e 99%, com coeficientes de variação entre 8% e 10%.

enquanto que para amostras de laranja foram de 91% a 93%, com coeficientes de variação entre 6% e 7%. Para o método de extração com acetato de etila e sulfato de sódio para amostras de laranja, as recuperações foram de 95% a 108% (n = 5 análises) e coeficiente de variação de 7%. As análises foram realizadas por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas, compreendendo o intervalo de 0,002 a 5,0 mg/Kg. O limite de quantificação foi de 0,002 mg/Kg. Os métodos foram aplicados a amostras coletadas em mercados locais. Nestas análises, o fungicida pirimetanil foi detectado em amostras de tomate: o método proposto detectou 0,52 mg/Kg, enquanto que o método com extração com acetato de etila e sulfato de sódio, 0,43 mg/Kg.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 que se seguem estão sumarizadas outras informações relevantes com respeito à análise dos resíduos dos fungicidas e acaricidas selecionados descritas na literatura.

Tabela 2- Procedimentos de extração e de purificação e a técnica de análise dos pesticidas estudados

Pesticida	Matriz	Extração	Purificação	Análise	Referência
	Uva	Acetona: Diclorometano (1:1, v/v)	-	CG-DNF	NAVARRO et al., 2000
	Maçã Laranja	Acetato de etila	-	CG-DNF	NAVARRO et al., 2002
pirimetanil	Uva	Acetona:éter de petróleo (1:1, v/v)	-	CG-DNF	CABRAS et al, 1997
	Pêra Morango	Acetato de etila	-	CLAE-DM	TAYLOR et al., 2002
procloraz	Laranja	Acetato de etila	-	CLAE-UV	LAFUENTE et al., 1984
	Maçã	Diclorometano	Partição ácido/base	CG-DCE	DE PAOLI et al., 1997
clofentezina	Maçã	Acetato de etila	Cromatografia de permeação em gel	CLAE-UV	BALINOVA, 1998
	Solução de padrão	-	-	CG-DCE	SICBALDI et al., 1997
		Método de Luke	Cromatografia de permeação em gel	CG-DCE	GELSOMINO et al.,1997
fluquinconazol	Maçã Uva	Acetona	-	CG-DCE	SIEBERS et al., 1998
cihexatina	Citros	Reação de complexação		CLAE-DM	ANASTASSIADES et al., 2000

Tabela 3 - Condições operacionais para análise dos pesticidas estudados por cromatografia líquida

Pesticida	Coluna Cromatográfica (λ , nm)	Dimensões	Fluxo (ml/min)	Fase móvel	Referência
pirimetanil	Hypersil C ₁₈ BDS	100x4,6 mm 3 μ m	0,5	solução de acetato de amônio [pH=7,1, 25°C]:metanol (30:70, v/v) modo isocrático	TAYLOR et al., 2002
	LiChrospher 100-RP ₁₈ (204)	10 μ m	1,3	metanol:solução de amônia 0,25% (80:20, v/v)	LAFUENTE et al., 1984
clofentezina	LiChrospher 100-RP ₁₈ (254)	250x4,6mm 5 μ m	1,0	metanol:água	BALINOVA, 1998
cihexatina	RP ₁₈			solução de ácido acético a 3%	ANASTASSIADES et al., 2000

Tabela 4- Condições operacionais para análise dos pesticidas estudados por cromatografia a gás

Pesticida	Coluna Dimensões (t_R , min)	Temperatura (°C)			Gases (ml/min)	Referência
		detector	injetor	coluna		
pirimetanil	HP-5 30mx0,32mm 0,25 μ m (16)	300	250	90(1min)10°C/min- 180(1min)-1°C/min- 205-30°C/min-250	N ₂ =1* H ₂ =3 Ar=60	NAVARRO et al., 2000
	DB-5ms 30mx0,25mm 0,25 μ m (17)	300	280	50(1min)-30°C/min- 180(2min)-2°C/min- 280(1min)	He=1* H ₂ =4 Ar=60	NAVARRO et al., 2002
	DB-17 30mx0,25mm 0,25 μ m (10,5)	280	250	110(1min)20°C/min -280(10min)	He=120 Kpa*	CABRAS et al., 1997
clofentezina	DB-5/DB-17 30mx0,25mm 0,25 μ m	300	250	DCE: 120(2min)- 3°C/min-190- 2°C/min-220- 5°C/min- 280(30min)	He=1,5* Ar=190 H ₂ =2,4	SCIBALDI et al., 1997
				DTE: 120(2min)- 5°C/min-190(2min)- 3°C/min-220(5min)- 5°C/min- 260(30min)		
	SPB-608 30mx0,25mm 0,25 μ m (9,4)	300	275	50(1min)-20°C/min- 150(5min)-4°C/min- 280(20min)	He=1*	GELSOMINO et al., 1997
procloraz	SE-54 20mx0,32mm 0,25 μ m	320		100(7min)-1°C/min- 103°C-240(5min)	He*	DE PAOLI et al., 1997
fluquinconazol	PTE-5					SIEBERS et al., 1998

*gás de arraste

4-PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Desenvolvimento do trabalho

Após a realização de uma revisão bibliográfica dos métodos descritos na literatura para análise de resíduos dos fungicidas e acaricidas selecionados em matrizes de frutas, foi desenvolvido o trabalho experimental constituído das seguintes etapas:

- preparação das soluções padrões dos fungicidas e acaricidas;
- otimização das condições operacionais dos equipamentos;
 - aquisição e armazenamento de amostras de frutas;
- preparação das amostras de frutas;
- extração dos fungicidas e acaricidas das amostras de frutas;
- análise cromatográfica:
 - avaliação da eficiência do método, considerando os parâmetros:
 - valores percentuais de recuperação (exatidão)
 - coeficientes de variação (precisão)
 - limites de detecção e de quantificação.

4.2-Preparação das soluções padrões dos fungicidas e acaricidas

Os padrões certificados dos pesticidas pirimetanil, procloraz, cihexatina, fluquinconazol, clofentezina e do metabólito 2,4,6-triclorofenol foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha). As soluções estoque destes pesticidas foram preparadas na concentração de 1000 µg/mL em metanol. Por diluições sucessivas destas soluções com auxílio de uma pipeta volumétrica, foram obtidas as soluções de trabalho utilizadas para a determinação da linearidade dos detectores, para a fortificação das amostras de frutas e para a obtenção dos gráficos analíticos. As soluções foram mantidas em *freezer*. As soluções dos pesticidas e do metabólito foram preparadas a cada três meses para não comprometer os resultados dos trabalhos analíticos.

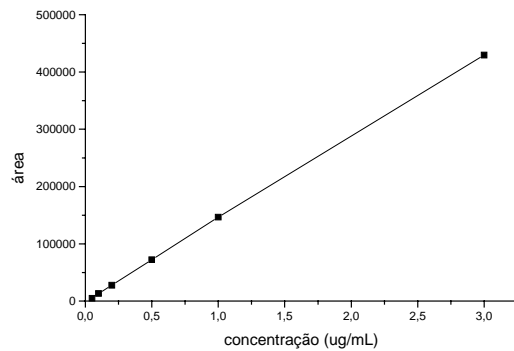
4.3- Linearidade dos detectores

Durante a parte experimental deste trabalho foram determinadas as faixas de linearidade dos detectores de captura de elétrons (DCE) e termiônico (DT) do cromatógrafo a gás (CG) e do detector ultravioleta (UV/Vis) do cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Para os pesticidas estudados foram obtidos os intervalos apresentados na Tabela 5, p. 28.

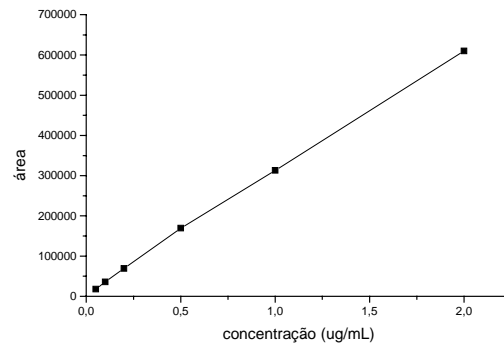
Tabela 5- Linearidade dos Detectores dos Cromatógrafos a Gás e Líquido

Pesticida	Técnica analítica	Linearidade ($\mu\text{g/mL}$)
Pirimetanil	CG-DT	0,05-2,0
	CLAE-UV/Vis	0,05-1,0
Procloraz	CG-DCE	0,05-1,0
	CLAE-UV/Vis	0,1-3,0
Fluquinconazol	CLAE-UV/Vis	0,03-2,0
Clofentezina	CLAE-UV/Vis	0,05-3,0
Cihexatina	CG-DCE	0,1-1,0

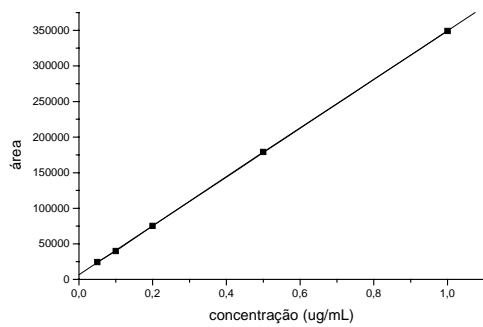
Assim, nas análises e no estudo de recuperação, foram utilizadas soluções padrões cujas concentrações estavam compreendidas na faixa linear específica de cada um dos princípios ativos estudados, como exemplificado pelas curvas analíticas obtidas por cromatografia líquida, Figura 4, p. 29, e cromatografia a gás, Figuras 5 a 7, p. 30 a 32.



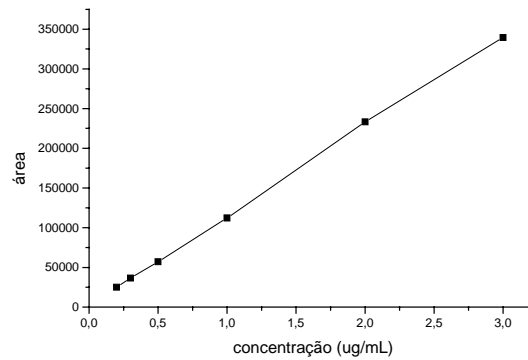
Clofentezina
 $y=143742,3x-528,4$
 $r=0,9999$



Fluquinconazol
 $y=8849+302205,88x$
 $r=0,9997$



Pirimetanil
 $y=6680,7+342749,5x$
 $r=0,9999$



Procloraz
 $y=1723,68+113351,12x$
 $r=0,9997$

Figura 4- Curvas analíticas dos pesticidas estudados – CLAE-UV/Vis.

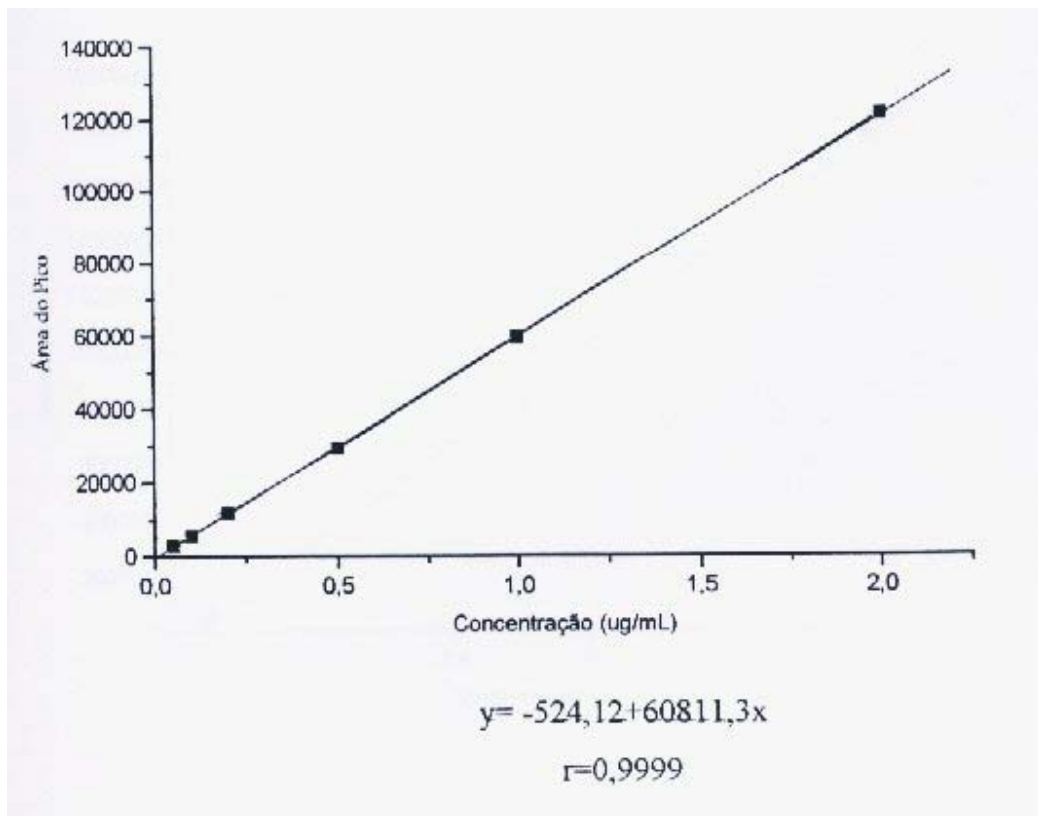


FIGURA 5- Curva analítica do fungicida pirimetanil – cromatografia a gás com detector termiônico específico.

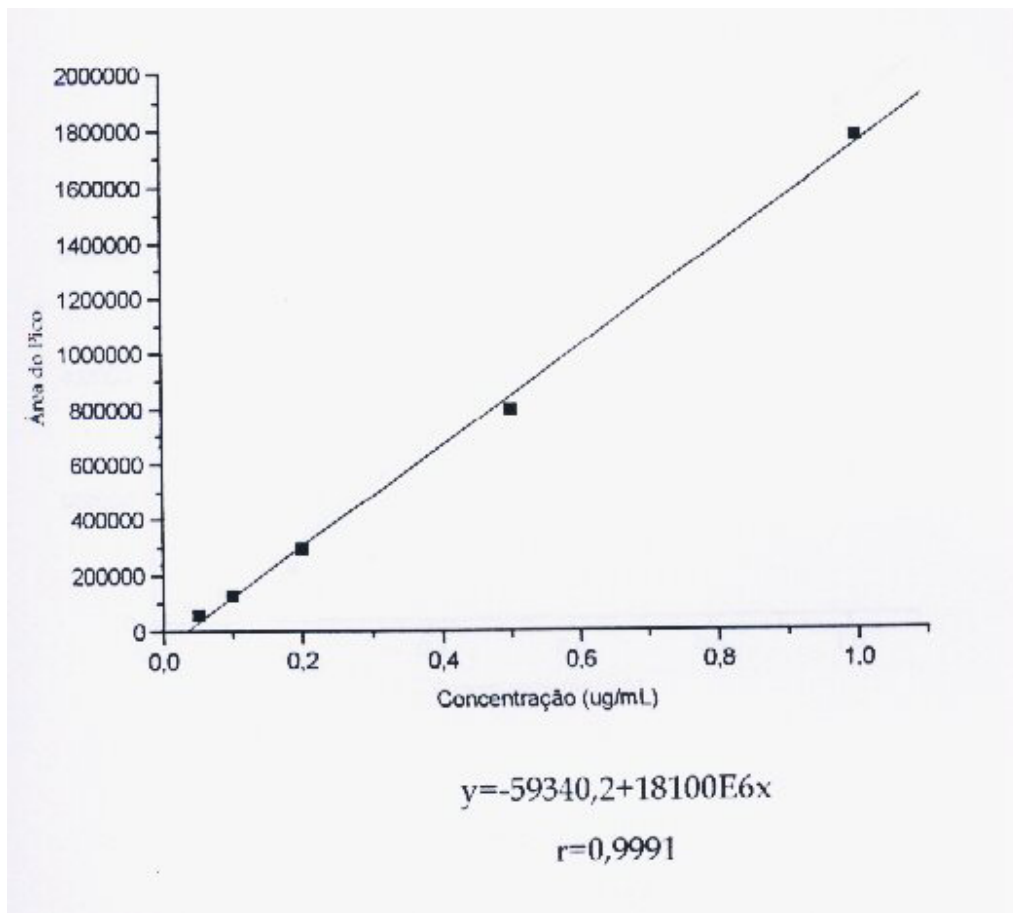


FIGURA 6- Curva analítica do fungicida procloraz – cromatografia a gás com detector por captura de elétrons.

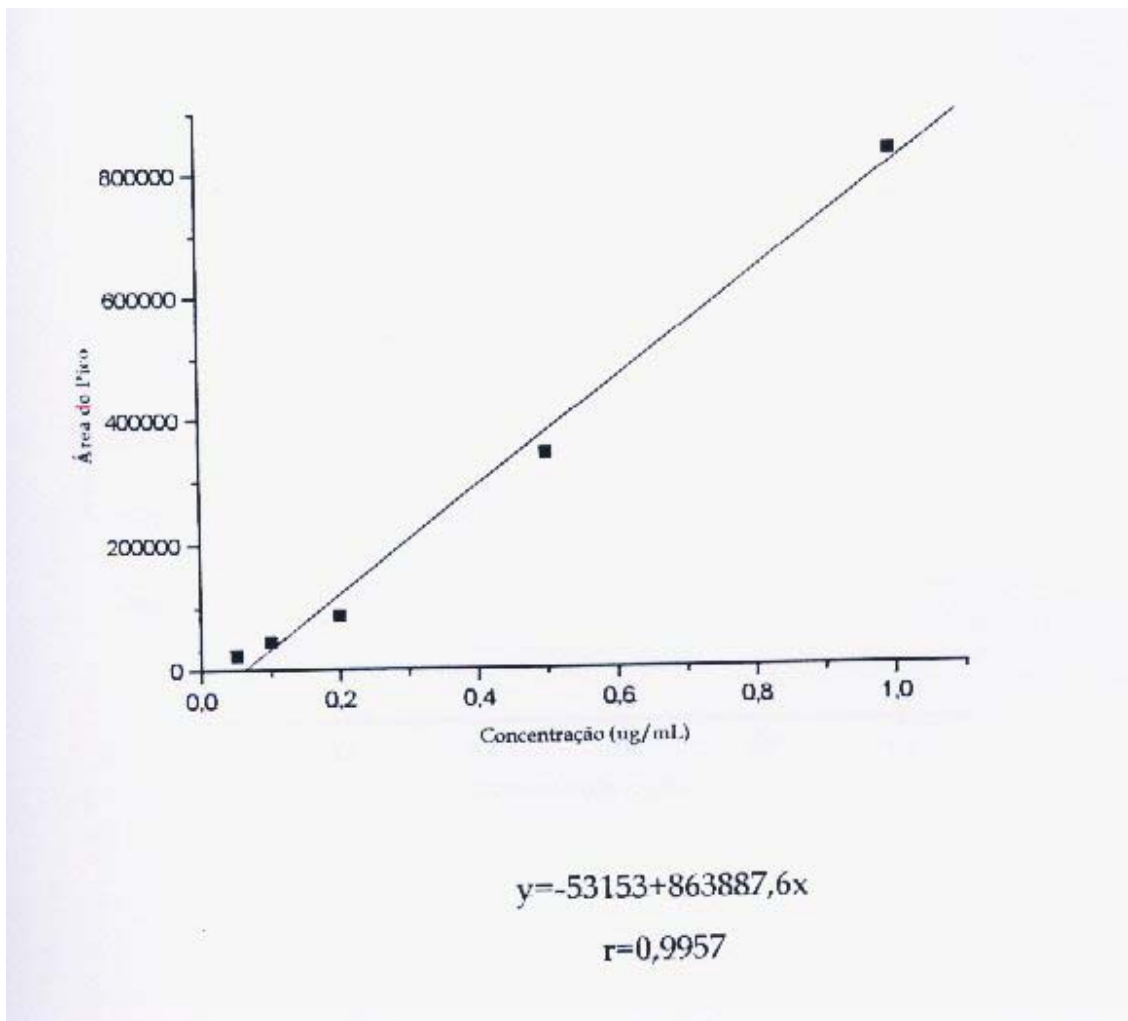


FIGURA 7- Curva analítica do acaricida cihexatina – cromatografia a gás com detector por captura de elétrons.

4.4-Análise do branco dos métodos analíticos

As análises do branco consistem na aplicação do procedimento experimental sem a inclusão da amostra estudada, para verificar a presença de compostos interferentes em solventes e reagentes que foram empregados nas metodologias propostas, Figura 18, p. 86.

4.5-Aquisição e preparação das amostras de frutas

Amostras de frutas *in natura* foram adquiridas no comércio varejista (supermercados, quitandas, feiras livres e vendedores ambulantes) das cidades de Araraquara, São Carlos, Ribeirão Preto e Jaboticabal, localizadas no Estado de São Paulo. As amostras foram etiquetadas e acondicionadas em caixas de isopor para o transporte.

No laboratório, foi realizada uma amostragem por quarteamento de cada uma das amostras de frutas. Em seguida, uma amostra analítica de 1 Kg de manga, mamão (papaia), e maçã foi descascada com faca. As cascas e as polpas, em separado, foram trituradas em liquidificador, homogeneizadas e armazenadas sob atmosfera de nitrogênio, em recipientes selados e devidamente etiquetados, em *freezer*. Os frutos inteiros de uva e morango também foram submetidos a este processo de preparação e armazenamento. As amostras de frutas não foram lavadas com água durante seu processamento.

4.6-Análise das amostras testemunhas de frutas

As amostras de frutas foram adquiridas no comércio varejista da cidade de Araraquara. A análise das amostras testemunhas de cada uma das matrizes de frutas consistiu na aplicação das metodologias analíticas, sem a inclusão da(s) solução(ões) de padrão(ões) do(s) pesticida(s). Os cromatogramas obtidos nestas análises estão apresentados na Figura 19, p. 87.

4.7-Análise das diferentes partes das frutas

Os pesticidas fluquinconazol, pirimetanil e procloraz são sistêmicos, isto é, após a aplicação, parte do produto incorpora-se às frutas devido à sua habilidade de penetrar no tecido hospedeiro, capacitando-o, portanto, a erradicar infecções latentes que podem ter ocorrido antes da colheita. Desta forma, além da casca, torna-se imprescindível o estudo da polpa das frutas, visto que se trata da parte comestível.

4.8-Procedimento de Fortificação das amostras de frutas

O procedimento de fortificação consistiu em adicionar de forma homogênea 1,0 mL \pm 0,1 mL de solução padrão de cada um dos pesticidas, com pipeta volumétrica, em uma amostra analítica de 20,0 g do homogeneizado de cada uma das variedades de frutas estudadas, o qual foi colocado em um erlenmeyer com uma espátula de aço

inoxidável, isto é, casca e polpa de laranja, manga, mamão (papaia) e maçã e fruto inteiro de morango e uva e proceder à análise.

4.9. Métodos Analíticos para os Pesticidas Estudados em Frutas

4.9.1-Análise por cromatografia a gás do fungicida pirimetanil em matrizes de laranja (polpa), morango, maçã e uva.

Uma alíquota de 5 g de amostra foi transferida para um frasco com tampa juntamente com 2 g de NaCl (SHERMA, 1992) e 10,0 mL do sistema de solventes hexano:acetato de etila (1:1, v/v). A mistura foi homogeneizada empregando-se um agitador de garras durante 20 min. O sobrenadante foi transferido para um outro frasco, seco com 2 g Na₂SO₄ anidro. A alíquota de 1 µL foi analisada por cromatografia a gás de alta resolução com detector termiônico. Esquema 1, p. 38.

4.9.2-Análise por cromatografia a gás do fungicida procloraz em matrizes de laranja e uva.

Uma alíquota de 5 g da amostra foi transferida para um frasco, juntamente com 2 g de NaCl e 10,0 mL de diclorometano. A mistura foi homogeneizada utilizando-se um agitador de garras durante 20 min. O volume de 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo e levado a secura sob suave corrente de nitrogênio e submetido à reação de hidrólise com 1 g de cloreto de piridina, sob aquecimento, em banho de glicerina a 200 °C, por 90 min. Em seguida, ao resíduo sólido, foi adicionado 5,0 mL (2x) de água.

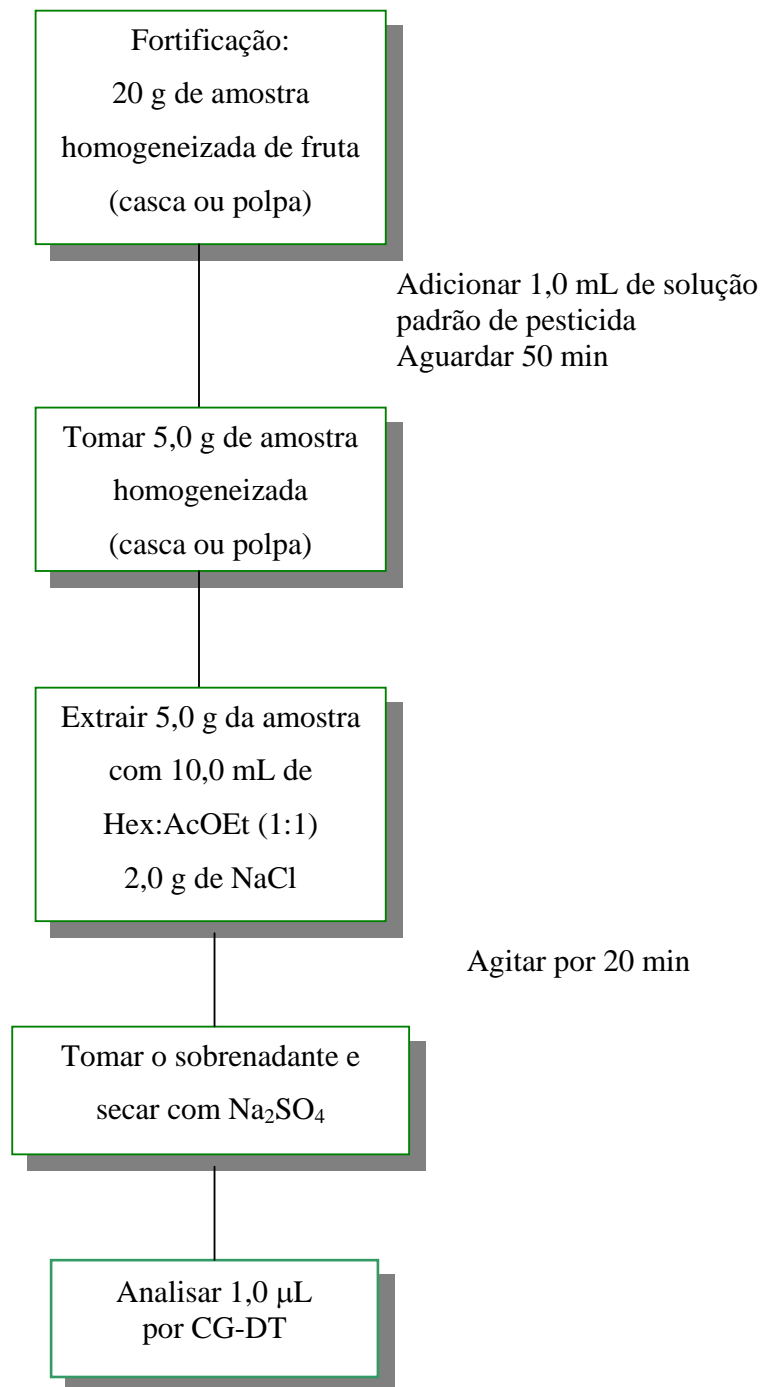
A solução resultante foi particionada com 5,0 mL (2x) de hexano:éter etílico (4:1, v/v); a fase orgânica foi alcalinizada, então, com 5 mL de KOH (1M) e neutralizada com 5 mL de HCl (0,1 M). Em seguida, foi extraída com 5 mL (2x) de tolueno. Um volume de 1 μ L do extrato em tolueno foi analisado por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons. Esquema 2, p. 39.

4.9.3- Análise por cromatografia a gás do acaricida cihexatina em matrizes de uva, laranja e morango

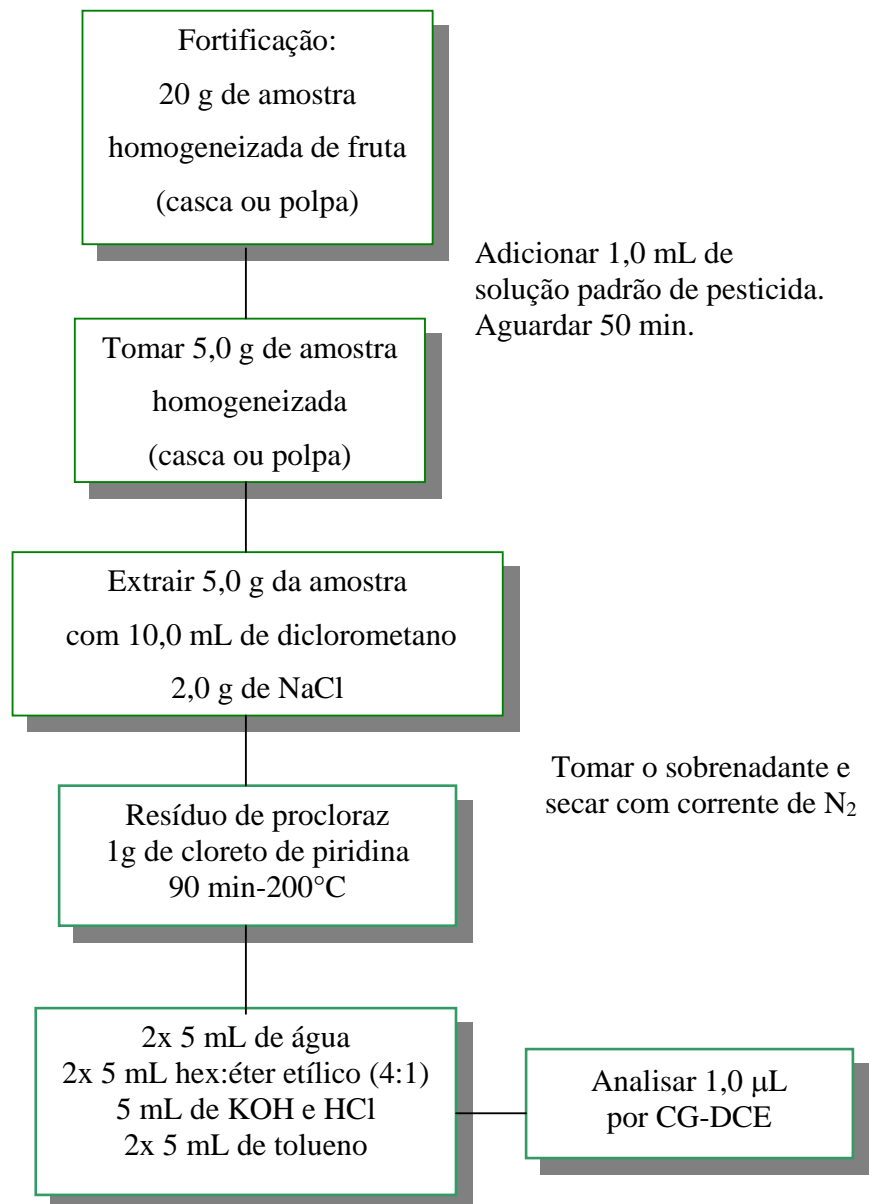
Uma alíquota de 5 g de amostra foi transferida para um frasco juntamente com 2 g de NaCl e 10,0 mL de diclorometano. A mistura foi homogeneizada empregando-se um agitador de garras durante 20 min. Um volume de 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo e levado à secura com suave corrente de nitrogênio e submetido à reação de derivação com 5,0 mL de HCl concentrado e submetido à agitação em ultra-som, durante 30 min. Em seguida, o derivado foi extraído com 2x de 5,0 mL de hexano e 1 μ L foi analisado por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons. Esquema 3, p. 40.

4.9.4-Análise simultânea por cromatografia líquida dos fungicidas fluquinconazol e pirimetanil e do acaricida clofentezina em casca e polpa das matrizes de manga, maçã e mamão (papaia).

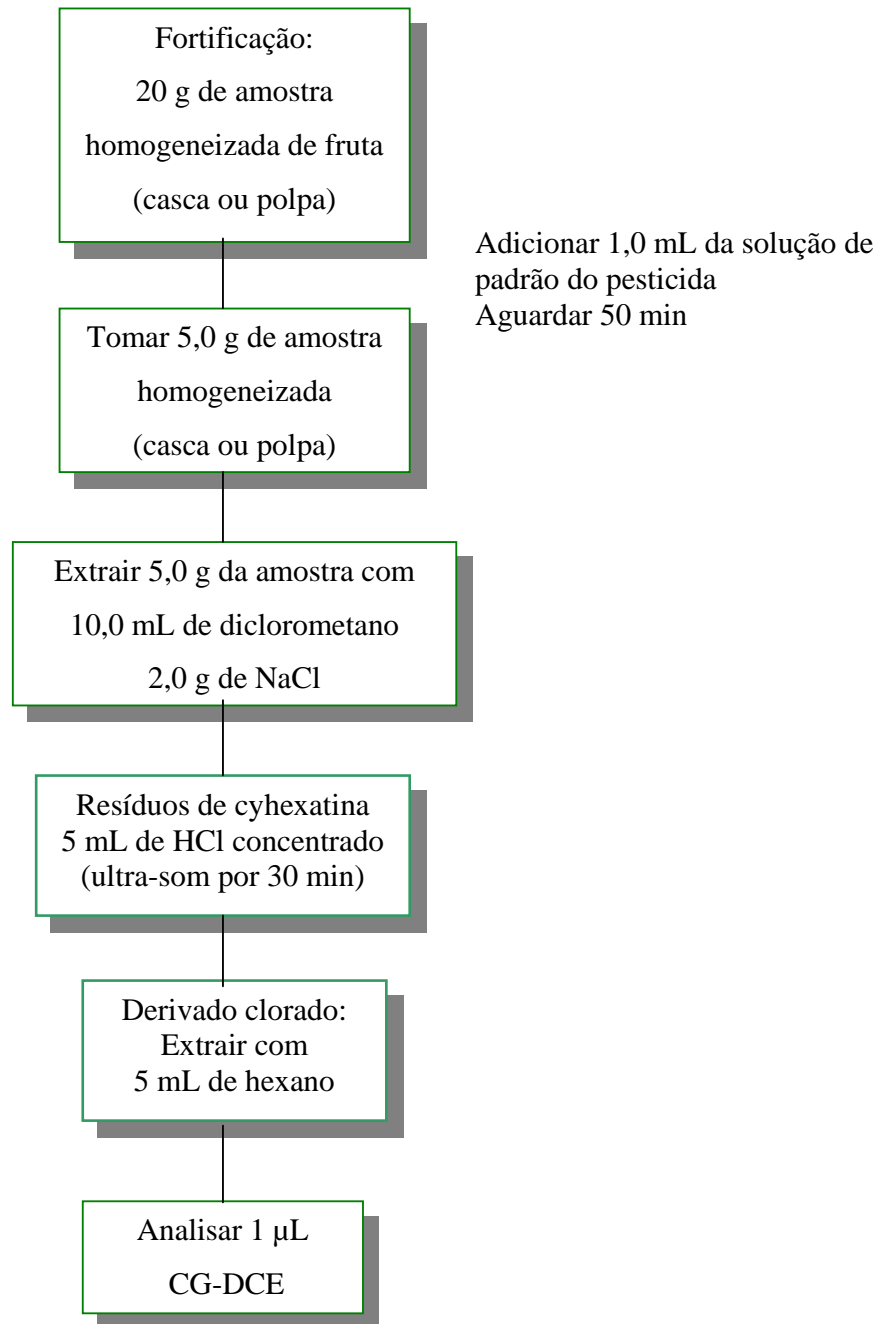
Uma alíquota de 5 g de amostra foi transferida para um frasco juntamente com 2 g de NaCl e 10,0 mL do sistema de solventes hexano:acetato de etila (1:1, v/v). A mistura foi homogeneizada empregando-se um agitador de garras durante 20 min. O sobrenadante foi transferido para um outro frasco, seco com 2 g Na₂SO₄ anidro. Uma alíquota de 2,0 mL foi levada à secura em suave corrente de N₂. O resíduo foi retomado em 2,0 mL da fase móvel (metanol:água). Uma alíquota de 20 µL foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV/Vis. Esquema 4, p. 41.



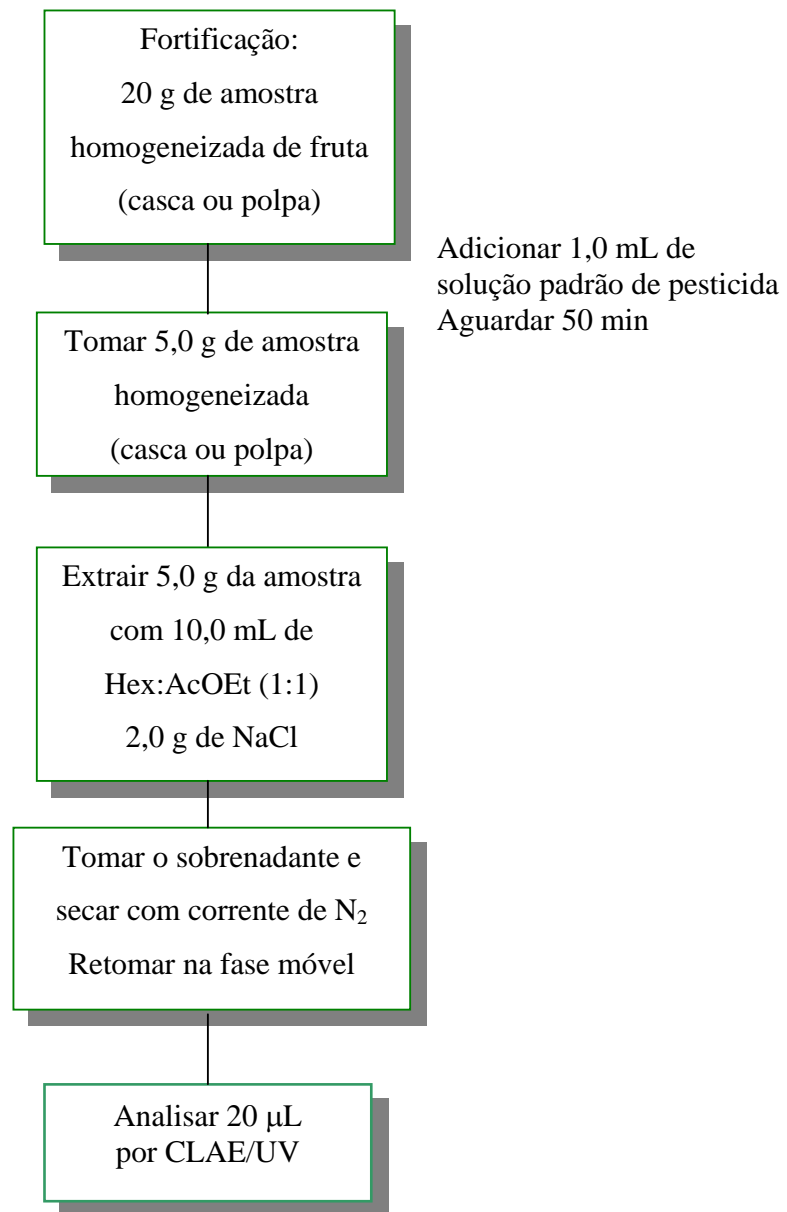
Esquema 1- Procedimento experimental para análise de resíduos de pirimetanil em frutas por cromatografia a gás. Condições de análise, ver Tabela 6, p.46.



Esquema 2- Procedimento experimental para análise de resíduos de procloraz em frutas por cromatografia a gás. Condições de análise, ver Tabela 7, p.47.



Esquema 3- Procedimento experimental para análise de resíduos de cihexatina em frutas por cromatografia a gás. Condições de análise, ver Tabela 7 p.47.



Esquema 4- Procedimento experimental para análise simultânea de resíduos de fluquinconazol, pirimetanil e clofentezina em frutas por cromatografia líquida. Condições de análise, ver Tabela 8, p. 47.

5-Aplicação das metodologias para análise de resíduos de fungicidas e acaricidas em amostras de frutas comercializadas nas cidades de Araraquara, São Carlos, Ribeirão Preto e Jaboticabal.

Os métodos desenvolvidos neste trabalho foram aplicados em amostras de frutas [mamão (papaia), manga, morango, maçã, laranja e uva] coletadas durante o 1º e o 2º semestre de 2001 e de 2002, nas cidades de Araraquara, São Carlos, Ribeirão Preto e Jaboticabal. Foram efetuadas 42 amostragens de frutas, perfazendo 252 amostras de frutas.

5.1-Tratamento pós-colheita de amostras de frutas realizado com produtos comerciais sob condições de laboratório

Os tratamentos de frutas com formulações comerciais foram realizados no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Unesp de Araraquara. Amostras de maçã, manga, laranja e uva foram selecionadas de tal forma a obter frutas uniformes e sem defeitos para os tratamentos, os quais foram realizados em recipientes plásticos sob condições de laboratório, isto é, sem a interferência de elementos climáticos (vento, radiação solar, chuva etc). Em seguida, foram tomados em torno de 20 unidades de maçã Royal Gala, manga Haden e laranja Pêra e 20 cachos de uva da variedade Itália, os quais foram imersas em suspensões aquosas das formulações comerciais durante o período de 3 minutos com agitação manual periódica. Os tratamentos foram realizados à temperatura ambiente (27-28°C). As amostras de frutas foram então retiradas dos recipientes e deixadas secar sobre folhas de papel alumínio à temperatura ambiente

durante o período de 4 horas. Em seguida, as frutas tratadas foram encaminhadas a câmara fria (9-10°C, 85-90% de umidade) do Instituto de Química da Unesp, onde permaneceram estocadas pelo tempo máximo de 29 dias. Amostras de frutas foram periodicamente submetidas aos métodos analíticos estudados neste trabalho, para verificar a presença de resíduos destes fungicidas, Tabela 18, p. 84. Foram realizados tratamentos com os produtos comerciais SPORTAK 450 CE[®] (princípio ativo: procloraz) em amostras de manga (dose: 49 g/100 L de água; intervalo de segurança: 14 dias, em tratamento pós-colheita) e laranja (dose: 45g/100 L de água; intervalo de segurança: 7 dias), MYTHOS 300SC[®] (princípio ativo: pirimetanil) em amostras de maçã (dose: 30 g/100 L de água; intervalo de segurança: 14 dias) e uva (dose: 60 g/100 L de água; intervalo de segurança: 21 dias) e PALISADE 250PM[®] (princípio ativo: fluquinconazol) em amostras de maçã (dose: 20 g/100 L de água; intervalo de segurança: 14 dias). (ANDREI, 1999).

6-Análise cromatográfica

6.1-Análise qualitativa

Os pesticidas pirimetanil, procloraz, fluquinconazol, clofentezina e cihexatina foram identificados nas amostras de frutas fortificadas, comparando-se os tempos de retenção dos picos nos cromatogramas com os apresentados nos cromatogramas das soluções padrões destes pesticidas, uma vez que as análises das amostras testemunha destas frutas não revelaram co-eluídos que pudessem interferir ou suscitar dúvidas quanto à identificação destes pesticidas.

6.2-Análise quantitativa

A quantificação dos pesticidas foi efetuada pelo método do padrão externo, interpolando-se os valores das áreas dos picos cromatográficos das amostras de frutas fortificadas nos gráficos analíticos, mostrados nas Figuras 4 a 7, p. 29 a 32. Duas injeções no mínimo foram efetuadas para cada uma das soluções padrões dos fungicidas e acaricidas, dos extratos, das amostras testemunhas e fortificadas de cada matriz estudada: laranja, maçã, morango e uva. Nos casos em que os valores para as duplicatas diferiam em mais de 10%, as análises foram repetidas.

6.3-Procedimento estatístico

Foi executada a análise estatística dos dados obtidos no estudo de recuperação dos resíduos dos pesticidas estudados em frutas, aplicando-se o procedimento de THIER e ZEUMER, 1987. A estimativa do desvio padrão (σ) e do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (σ_{rel}) foram calculados com as seguintes equações:

$$\sigma = \left[\sum_{i=1}^N (x_i - x_m)^2 / (N - 1) \right]^{1/2}$$
$$\sigma_{rel} = \sigma \cdot 100 / x_m$$

onde:

x_i = valor da recuperação
 x_m = média aritmética dos valores das recuperações
N = número de experimentos.

7-Condições operacionais dos cromatógrafos para análise dos resíduos dos fungicidas e acaricidas em matrizes de frutas.

As condições ótimas de operação dos cromatógrafos para a análise dos resíduos de pirimetanil, fluquinconazol, procloraz, clofentezina e cihexatina por cromatografia a gás e cromatografia líquida estão especificadas nas Tabelas 6 a 8:

Tabela 6- Condições Operacionais de Análise Individual de Pirimetanil e Fluquinconazol por Cromatografia a Gás

Condições Operacionais	
coluna capilar (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m)	DB-5 (5% fenil 95% metilpolisiloxano)
volume injetado (μ L)	1
modo de injeção	modo splitless (40s)
detector	termiônico (DT)
corrente da pérola do detector (A)	3,1
temp. injetor ($^{\circ}$ C)	240
temp. coluna (programação)	100 $^{\circ}$ C(1min)-200 $^{\circ}$ C a 10 $^{\circ}$ C/min- 260 $^{\circ}$ C (5min) a 10 $^{\circ}$ C/min e resfriar
temp. detector ($^{\circ}$ C)	300
fluxo dos gases (mL/min): gases	hidrogênio: 4 nitrogênio: 30 ar sintético: 175
tempos de retenção (min): pirimetanil	9,5
fluquinconazol	26,0

Tabela 7- Condições Operacionais de Análise Individual de Procloraz e Cihexatina por Cromatografia a Gás.

Condições Operacionais	
coluna <i>megabore</i> (15 m x 0,53 mm d.i., 0,83 μ m)	DB-608 (similar a DB-5)
volume injetado (μ L)	1
modo de injeção	modo splitless (40s)
detector	captura de elétrons (DCE)
temp. injetor ($^{\circ}$ C)	240
temp. coluna (programação)	140 $^{\circ}$ C(1min)-200 $^{\circ}$ C a 10 $^{\circ}$ C/min- 260 $^{\circ}$ C (5min) a 10 $^{\circ}$ C/min e resfriar
temp. detector ($^{\circ}$ C)	300
fluxo de gás de arraste (mL/min):	nitrogênio: 3
tempos de retenção (min):	
procloraz	3,58
cihexatina	2,85

Tabela 8- Condições Operacionais de Análise Simultânea de Clofentezina, Fluquinconazol e Pirimetanil por Cromatografia Líquida

Condições Operacionais	
coluna de aço inoxidável (125 x 4 mm d.i., 5 μ m)	Lichrospher 100 RP-18
pré-coluna de aço inoxidável (5 μ m)	Lichrospher 100 RP-18
volume injetado (μ L)	20
modo de detecção	UV-Vis
comp. de onda (nm)	254
fluxo (mL/min)	0,8
fase móvel: (modo gradiente)	metanol:água-[40:60(0 min) 70:30 (9 min) 40:60 (13 min)]
tempos de retenção (min):	
clofentezina	5.70
fluquinconazol	7.80
pirimetanil	8.90

7.1-Especificações dos equipamentos, padrões dos pesticidas, solventes, reagentes, vidraria e gases para as análises cromatográficas e a limpeza da vidraria.

7.1.1- Equipamentos:

-Cromatógrafo a gás Varian, modelo 3300, equipado com os detectores de captura de elétrons (DCE) e termiônico específico (DT), injetor split/splitless, modelo 1078, acoplado a integrador Varian, modelo 4290.

-Cromatógrafo líquido Waters modelo 501, acoplado a integrador Waters modelo 746, com detector UV/Vis variável, modelo 486.

-Agitador Mecânico de 4 garras Thermolyne, modelo Maxi-Mix III - Type 65800.

7.1.2- Padrões dos pesticidas, solventes, reagentes, vidraria e gases:

-Padrões certificados dos pesticidas pirimetanil (98,5% de pureza), procloraz (98,4% de pureza), cihexatina (99,5% de pureza), fluquinconazol (98,2% de pureza), clofentezina (99,4% de pureza) e do metabólito 2,4,6-triclorofenol (99,5% de pureza), foram adquiridos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemanha);

-Solventes: acetato de etila (grau pesticida) Carlo Erba; hexano, metanol, tolueno, isooctano e diclorometano (nanograde) Mallinckrodt.

-Reagentes Químicos: sulfato de sódio (p.a.), cloreto de sódio (p.a.) e cloreto de piridina (p.a) Sigma;

-Vidraria comum de laboratório: béquer, erlenmeyer, balão volumétrico, espátula e pipetas volumétricas de 100, 200, 500 e 1000 μL ;

-Gases utilizados: Nitrogênio N-50UP (White Martins), Hidrogênio 4.5 FID (White Martins) e Ar Sintético N-50 (White Martins).

7.1.3- Limpeza dos materiais:

O procedimento adotado para a limpeza da vidraria (béquer, erlenmeyer, espátula, balão volumétrico etc) compreendeu as seguintes etapas:

- enxaguar o material utilizado com água;
- enxaguar com uma solução 20% do detergente Extran alcalino;
- enxaguar o material com água destilada;
- secar o material em estufa a 120° C, e os materiais volumétricos ao ar livre;
- proteger as extremidades dos materiais com papel alumínio e manter em armários fechados.

Tabela 9- Propriedades Físico-Químicas dos Pesticidas Estudados (ROBERTS et al., 1999; TOMLIN, 1995)

Pesticida	Solubilidade (g/L)												
	água	acetona	xileno	etanol	clorofórmio	éter dietílico	tolueno	dimetil sulfóxido	hexano	benzeno	metanol	tetracloroeto de carbono	diclorometano
Pirimetanil	1,2.10 ⁻¹												
Procloraz	3,4.10 ⁻²	3,5.10 ³	2,5.10 ³	2,5.10 ³	2,5.10 ³	2,5.10 ³	2,5.10 ³	7,5					
Fluquinconazol	1	50	10	3			200						
Clofentezina	2,5.10 ⁻⁶	9,3		0,5	50			1	2,5				37
Cihexatina	1,0.10 ⁻³	1,3 ^a	3,6 ^a		216 ^a		1,0.10 ^a		16 ^a	37 ^a		28 ^a	
Fórmula molecular	Peso molecular	DT ₅₀ # (dias)	K _{oc} ^c	Pressão de Vapor (Pa)	Log K _{ow} [*]	pKa							
Pirimetanil	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	199,3	23 a 111	2,2.10 ⁻³	2,8	3,52	75-500						
Procloraz	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	376,7	5 a 37	1,5.10 ⁻⁴	4,2	3,80	500						
Fluquinconazol	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	376,2	50 a 300	6,4.10 ⁻⁹	3,2 (pH=5,6)		>740						
Clofentezina	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄	303,1	28 a 56	1,3.10 ⁻⁷	3,1	2,18							
Cihexatina	C ₁₈ H ₃₄ OSn	358,2		3,0.10 ⁻⁷		5,39							

a= g/kg; *Log K_{ow}= coeficiente de partição octanol:água; #DT₅₀= tempo de ½ vida em condições de campo; c= coeficiente de adsorção.

8-RESULTADOS e DISCUSSÕES

8.1- Estudo de recuperação

Os trabalhos experimentais preliminares consistiram em selecionar as amostras testemunhas das matrizes de frutas: laranja, maçã, mamão (papaia), morango, e uva. Os cromatogramas obtidos das análises cromatográficas das amostras testemunhas evidenciaram a ausência de picos interferentes num largo intervalo de tempo, que inclui os tempos de retenção dos pesticidas em estudo. Os níveis de fortificação foram selecionados de acordo com os valores de limites máximos de resíduos (LMR) compilados nas legislações brasileira ou internacional, Tabela 1, p. 13, para as matrizes de frutas de interesse.

As condições cromatográficas de análise inicialmente avaliadas foram obtidas de trabalhos previamente realizados por nosso grupo (CABRAS et al., 1997; NAVICKIENE et al, 1999). O estudo de recuperação em diferentes níveis de fortificação foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência dos métodos de análise em estudo: valores percentuais de recuperação para avaliar a exatidão e coeficientes de variação para avaliar a precisão.

Os valores de recuperação percentual e de coeficientes de variação (C.V.) para os pesticidas estudados, apresentados nas Tabelas de 12 a 17, respectivamente, estão compreendidos dentro dos intervalos descritos na literatura para resíduos de pesticidas, isto é, entre 70 e 120%, para os valores de recuperação, e menor do que 20%, para os valores de coeficientes de variação (BRITO et al., 2002).

8.2- Repetibilidade e reprodutibilidade das soluções de padrões dos pesticidas estudados

Durante os trabalhos experimentais, com auxílio de soluções de padrão de 1,0 ng/ μ L de cada um dos princípios ativos estudados, foi verificada a variação do valor das áreas dos padrões de pesticidas durante as análises realizadas nos períodos de um, cinco e trinta dias, utilizando as técnicas de cromatografia a gás e de cromatografia líquida de alta eficiência, bem como a variação do tempo de retenção dos pesticidas nestes mesmos intervalos de tempo. Os resultados obtidos demonstram que a precisão da resposta dos equipamentos de cromatografia a gás e líquida foi adequada, visto que os valores dos coeficientes de variação foram inferiores a 6%, valor aceitável para a precisão de análises realizadas por cromatografia líquida (BIDLINGMEYER, 1992), Tabela 10.

Tabela 10- Repetibilidade e reprodutibilidade das soluções de padrão dos pesticidas analisados por cromatografia a gás (CG/DCE e CG/DT) e cromatografia líquida (CLAE/UV)

Pesticida	Técnica cromatográfica	Período de tempo (dias)	Coeficiente de variação (C.V., %)*	
			Área do pico cromatográfico	Tempo de retenção
pirimetanil	CG/DT	1	1,0	1,5
		5	2,1	0,9
		30	2,4	2,3
	CLAE/UV	1	1,1	2,5
		5	3,4	3,5
		30	4,3	3,6
procloraz	CG/DCE	1		
		5	2,5	1,2
		30	1,9	2,6
fluquinconazol	CLAE/UV	1	2,1	1,4
		5	1,3	3,2
		30	4,7	3,3
clofentezina	CLAE/UV	1	3,6	1,2
		5	4,5	3,1
		30	5,6	2,9
cihexatina	CG/DCE	1	3,7	2,5
		5	4,8	3,1
		30	6,2	3,2

*n= 2-3 replicatas

8.3-Limites de detecção e quantificação dos métodos estudados

Os limites de detecção e de quantificação obtidos neste trabalho estão apresentados na Tabela 11, p. 55. É importante ressaltar que os valores de limites de quantificação estão abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela

legislação nacional e internacional para os fungicidas e acaricidas estudados, com exceção do acaricida cihexatina, cujo valor corresponde ao valor do LMR estabelecido para a matriz de maçã, 0,1 mg/Kg, Tabela 1, p. 13. Isto evidencia que apesar de serem métodos simples e rápidos, demonstram-se adequados para realizar as análises de resíduos dos fungicidas e acaricidas selecionados nos níveis exigidos pela legislação com eficiência e sensibilidade requeridas.

O limite de detecção é caracterizado pelo menor valor de concentração do analito na amostra para o qual um determinado método analítico produz um sinal, cujo valor difere com 95% de probabilidade daquele da amostra testemunha.

O limite de quantificação é definido em análise de resíduos de pesticidas como o menor valor de concentração do analito na amostra estudada que pode ser quantificado; deve satisfazer a 3 condições, segundo THIER e ZEUMER, 1987:

- 1) o limite de quantificação deve ser maior ou igual ao limite de detecção;
- 2) a recuperação para o limite de quantificação deve ser igual ou maior do que 0,7 (equivalente a 70%);
- 3) e o coeficiente de variação para o limite de quantificação deve ser igual ou menor do que 0,2 (equivalente a 20%).

Tabela 11- Limites de detecção e de quantificação dos métodos para a análise dos resíduos de fungicidas e acaricidas nas frutas estudadas

<i>Pesticida</i>	<i>Matriz</i>	<i>Limite de Detecção (mg/Kg)</i>	<i>Limite de Quantificação (mg/Kg)</i>
pirimetanil	maçã morango laranja uva manga	0,1	0,2
procloraz	laranja uva manga	0,05	0,1
fluquinconazol	maçã	0,02	0,05
cihexatina	uva laranja morango	0,05	0,1
clofentezina	laranja mamão manga	0,05	0,1

8.4- Método para análise de resíduos de pirimetanil em frutas

Para a análise do fungicida sistêmico pirimetanil, foram testadas inicialmente as condições cromatográficas que permitiram a análise simultânea dos fungicidas tiabendazol e imazalil (NAVICKIENE et al., 1999) em matrizes de citros. Como os resultados experimentais foram bastante satisfatórios, estas condições cromatográficas foram utilizadas para realizar as análises de frutas por meio de cromatografia a gás com detecção termiônica, usando uma coluna capilar DB-5. A rampa de temperatura

descrita na Tabela 6, p. 46, proporcionou uma melhor separação do fungicida dos componentes da amostra, quando comparado com a análise isotérmica. O tempo de retenção foi de 10,50 min, Figura 8, p. 60. A faixa linear de resposta do detector para o fungicida compreendeu o intervalo entre 0,05 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$, como descrito na Tabela 5, p. 28.

Na otimização do procedimento analítico para a extração do fungicida pirimetanil das matrizes de frutas, foi avaliado o método descrito em NAVICKIENE et al., 1999 e apresentado no item 4.9.1, p. 35. Os resultados obtidos no estudo de recuperação evidenciam que este método é adequado para a análise de resíduos de pirimetanil em amostras fortificadas de laranja (polpa), maçã, morango e uva. Os dados estão apresentados na Tabela 12, p. 59. A média de 5 análises variou de 83% a 101% com coeficientes de variação de 1,2% a 12,7%. Os limites de detecção e de quantificação do método foram de 0,1 mg/Kg e 0,2 mg/Kg, respectivamente, Tabela 11, p. 55.

Numa segunda etapa, foram otimizadas as condições cromatográficas para viabilizar a análise de pirimetanil por cromatografia líquida de alta eficiência. Preliminarmente uma coluna de aço inoxidável de fase C_{18} (LiChrospher 100 RP-18) e fase móvel constituída pelo sistema de solventes metanol:água (70:30, v/v-modo isocrático) foram avaliados. Como os resultados experimentais com as soluções padrões foram bastante satisfatórios, análises das amostras de frutas fortificadas (laranja e manga) foram realizadas com esta técnica. O solvente acetonitrila também pode ser utilizado nas análises nesta mesma proporção com água, que apresentará um desempenho bastante similar ao metanol. O comprimento de onda de 254 nm

proporcionou uma boa resposta para o fungicida, comparativamente a outros comprimentos testados: 208 e 220 nm. Um fluxo de 0,8 ml/min permitiu obter um pico mais estreito, simétrico e melhor resolvido com relação aos interferentes das matrizes. O tempo de retenção foi de 11,3 min. A faixa linear do detector UV/Vis para as soluções padrões do fungicida compreendeu o intervalo entre 0,05 e 1,0 µg/mL. A Tabela 12, p. 59, apresenta também as recuperações do fungicida analisado individualmente em amostras fortificadas de laranja (polpa) e manga. A média de 8 análises variou de 73% a 93%, com coeficientes de variação de 1,6% a 12,2%. Os limites de detecção e de quantificação do método foram 0,1 e 0,2 mg/Kg, respectivamente. As condições cromatográficas de análise por CLAE-UV foram posteriormente otimizadas com um gradiente do sistema de solventes para possibilitar a análise conjunta com fluquinconazol e clofentezina. A Tabela 17, p. 82, apresenta os valores de recuperação na análise simultânea com, Figura 17-3, p. 80.

Estes dados confirmam a eficiência do método proposto para todas as matrizes estudadas (manga, maçã, uva, laranja e morango), nos níveis de fortificação selecionados e demonstram a viabilidade da aplicação de ambas as técnicas cromatográficas (CG-DTE e CLAE-UV) para a análise de resíduos do fungicida pirimetanil nas frutas estudadas.

Com relação aos trabalhos descritos na literatura, Tabelas 2 a 4, p. 23 a 25, a simplicidade do método estudado é ressaltada, tanto com respeito ao procedimento de extração, o qual é constituído por uma simples extração com solvente, quanto à técnica analítica, cromatografia a gás com detector termiônico, visto que os procedimentos

relatados utilizam técnicas mais elaboradas para a extração, tais como: microextração em fase sólida, dispersão em fase sólida e headspace. Os valores de recuperação para as matrizes de frutas foram equivalentes para o mesmo nível de fortificação. Por exemplo, para 1,0 mg/Kg, NAVARRO et al., 2002, obtiveram $99 \pm 8\%$ (n=5) para a matriz de maçã, utilizando 15 g de amostra e 250 mL de acetato de etila, enquanto o procedimento estudado propiciou uma recuperação de $95 \pm 2,6\%$ (n=5), com 5 g de amostra e 10 mL do sistema de solvente acetato de etila:hexano (1:1, v/v). Além disso, a literatura não registra dados de recuperação deste fungicida para as matrizes de manga e mamão.

Tabela 12- Recuperação de primetamil de amostras de frutas fortificadas em diferentes níveis de fortificação (n=5* e 8ª repetições).

<i>Fungicida</i>	<i>Técnica Analítica</i>	<i>Amostra</i>	<i>Nível de Fortificação (mg/Kg)</i>	<i>Recuperação*</i>		
				<i>Intervalo</i>	<i>Média</i>	<i>C.V. (%)</i>
pirimetamil	<i>CG/DTE</i>	<i>Laranja</i> (polpa)	0.2	81-101	95	8.7
			2.0	83-103	93	8.1
		<i>Uva</i>	0.2	90-104	96	5.7
			0.5	81-92	86	5.6
			1.0	99-104	101	2.3
	<i>CLAE/UV^a</i>	<i>Maçã</i>	0.2	90-100	96	4.2
			0.5	78-108	92	12.7
			1.0	93-99	95	2.4
		<i>Morango</i>	0.5	99-102	100	1.2
			1.0	72-93	83	11.8
		<i>Laranja</i> (polpa)	0,2	85-101	93	12,2
			0,5	76-79	78	1,60
<i>Manga</i>		0,2	90-96	93	3,45	
		0,5	72-75	73	1,70	

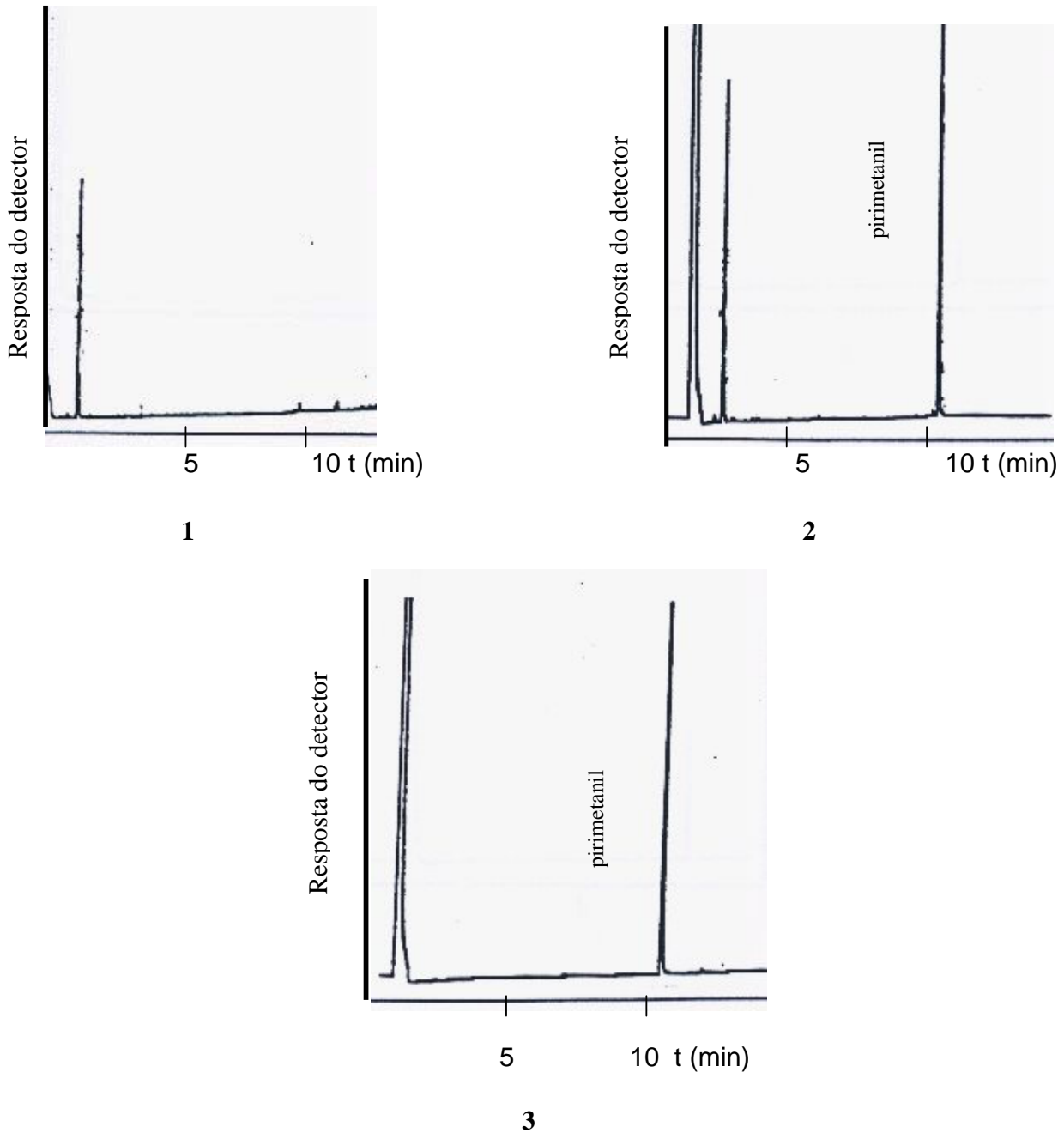


Figura 8-Cromatogramas CG-DT: 1- amostra testemunha de polpa de laranja; 2 amostra de laranja fortificada com solução padrão de pirimetaniil (0,2 mg/Kg); 3- solução padrão de pirimetaniil (0,2 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna DB-5: 100 °C (1min) direto até 200 °C, taxa de 10°C/min até 260°C (min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume injetado, 1µL, modo splitless.

8.5– Método para análise de resíduos de procloraz em frutas

As análises preliminares com solução padrão de procloraz por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons evidenciaram que a molécula de procloraz se degrada na coluna cromatográfica, inviabilizando sua análise direta por esta técnica analítica. Desta forma, para possibilitar a análise de resíduos de procloraz em frutas, empregando cromatografia a gás e detecção por captura de elétrons, foi necessário converter este fungicida num derivado estável a esta técnica. Assim, baseando-se num método reportado por DE PAOLI *et al.*, 1997, foi possível, por meio de uma reação com cloreto de piridina, analisar procloraz, na forma do derivado 2,4,6-triclorofenol, com o detector por captura de elétrons. O padrão certificado de 2,4,6-triclorofenol foi também adquirido a fim de comprovar, por meio da comparação dos tempos de retenção sob as mesmas condições de análise, que a reação foi efetiva, como mostrado na Figura 11, p. 67.

As condições cromatográficas de análise por cromatografia a gás foram otimizadas para possibilitar a separação dos componentes das amostras de frutas do fungicida procloraz. Neste procedimento foram utilizadas uma coluna *megabore* DB-608 e uma rampa de temperatura descrita na Tabela 8, p.48. O tempo de retenção do fungicida foi 3,58 min.

Isto posto, foram avaliados diferentes tempos de reação (30, 60 e 90 min) com cloreto de piridina, a qual foi realizada em banho de glicerina a 200 °C. Também várias temperaturas iniciais para a programação de temperatura utilizada nas análises foram experimentadas: 100 °C, 110 °C, 120 °C e 140 °C. Os resultados experimentais

demonstraram que: o tempo de reação de 90 min e a temperatura inicial de 140 °C foram os mais adequados para obtenção do pico cromatográfico do derivado 2,4,6-triclorofenol, como mostrado na Figura 10, p. 66.

O intervalo de resposta linear do detector termiônico para o fungicida procloraz foi 0,5 a 2,0 µg/mL. O método do padrão externo foi utilizado na quantificação do fungicida procloraz em amostras fortificadas de frutas.

As médias de recuperação de 8 análises para o nível de 0,1 mg/Kg variaram de 83% a 94%, com coeficientes de variação da ordem de 11%, item 4.9.2, p. 35.

Numa segunda etapa, foi verificada a resposta do fungicida procloraz em análises por cromatografia líquida de alta eficiência, tanto na forma do derivado 2,4,6-triclorofenol, como procloraz, isto é, sem a reação de derivação. Foram testadas inicialmente soluções padrões de procloraz sem sofrer a reação para obtenção do derivado com cloreto de piridina, utilizando-se uma coluna de aço inoxidável de fase C₁₈ (LiChrospher 100 RP-18) e metanol:água (80:20, v/v) como fase móvel, fluxo de 0,8 ml/min e comprimento de onda de 220 nm. Os resultados obtidos demonstraram um pico cromatográfico de base larga e de resposta irregular. Contudo, a análise do procloraz, como 2,4,6-triclorofenol, apresentou um pico cromatográfico mais estreito e reprodutível, Figura 12-1,2, p. 68. O intervalo linear do detector UV/Vis para o fungicida foi de 0,2 a 3,0 µg/mL, como pode ser observado na Figura 4, p. 29, que mostra a curva analítica, juntamente com a equação e coeficiente de correlação. O método do padrão externo foi utilizado na quantificação do fungicida procloraz em amostras fortificadas de manga e laranja. As médias de recuperação de 8 análises para os níveis de 0,1 e 0,2

mg/kg variaram de 82% a 89%, com coeficientes de variação entre 5,6 e 12,6%, como mostrado na Tabela 13, p. 64.

Estes resultados demonstram a viabilidade do procedimento aplicado para a determinação de resíduos de procloraz em matriz de laranja e uva por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons, como também a viabilidade de aplicar a técnica de cromatografia líquida na análise de resíduos em matrizes de manga e laranja.

Em comparação a DE PAOLI et al., 1997, que obtiveram para a matriz de maçã recuperações médias (n=3) na ordem de $93 \pm 4,8\%$, para o nível de 0,1 mg/Kg, a aplicação do método em matrizes de laranja, manga e uva resultou em valores médios de recuperação (n=8), para o mesmo nível de fortificação, de 82% a 94% com coeficientes de variação entre 5,6% e 11,4%, corroborando a eficiência do procedimento de derivação com cloreto de piridina da molécula de procloraz em 2,4,6-triclorofenol.

Tabela 13- Recuperação de procloraz de amostras de laranja (polpa) e uva fortificadas (* n= 8 repetições).

<i>Fungicida</i>	<i>Amostra</i>	<i>Nível de Fortificação (mg/Kg)</i>	<i>Recuperação* (%)</i>		
			<i>Intervalo</i>	<i>Média</i>	<i>C.V. (%)</i>
procloraz	<i>laranja (polpa)</i>	0,1	70-104	83	11,0
		0,2	80-96	88	7,5
	<i>uva</i>	0,1	73-107	94	11,4
		0,2	79-95	81	9,4
	<i>manga^a</i>	0,1	85-101	82	9,0
		0,2	77-104	89	12,6
	<i>laranja^a</i>	0,1	85-92	82	5,60
		0,2	88-96	83	8,30

^a análises realizadas por CLAE-UV.

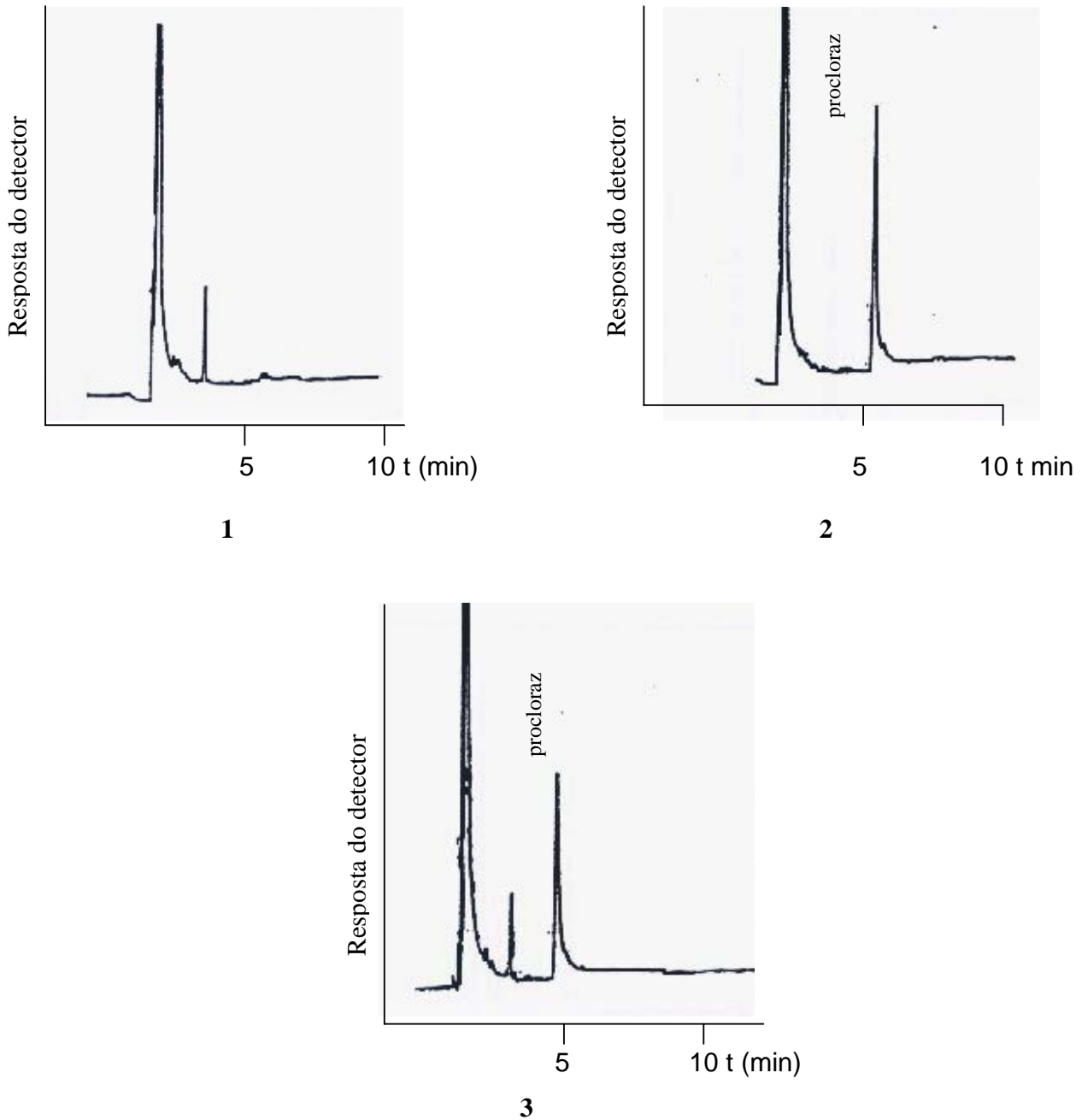


Figura 9- Cromatogramas CG-DCE: 1- amostra testemunha de laranja; 2- solução padrão de procloraz (0,1 mg/Kg); 3- amostra de laranja fortificada com solução padrão de procloraz (0,1 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna *megabore* DB-608: 140 °C (1min) direto até 200 °C, taxa de 10 °C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume injetado, 1µL, modo splitless.

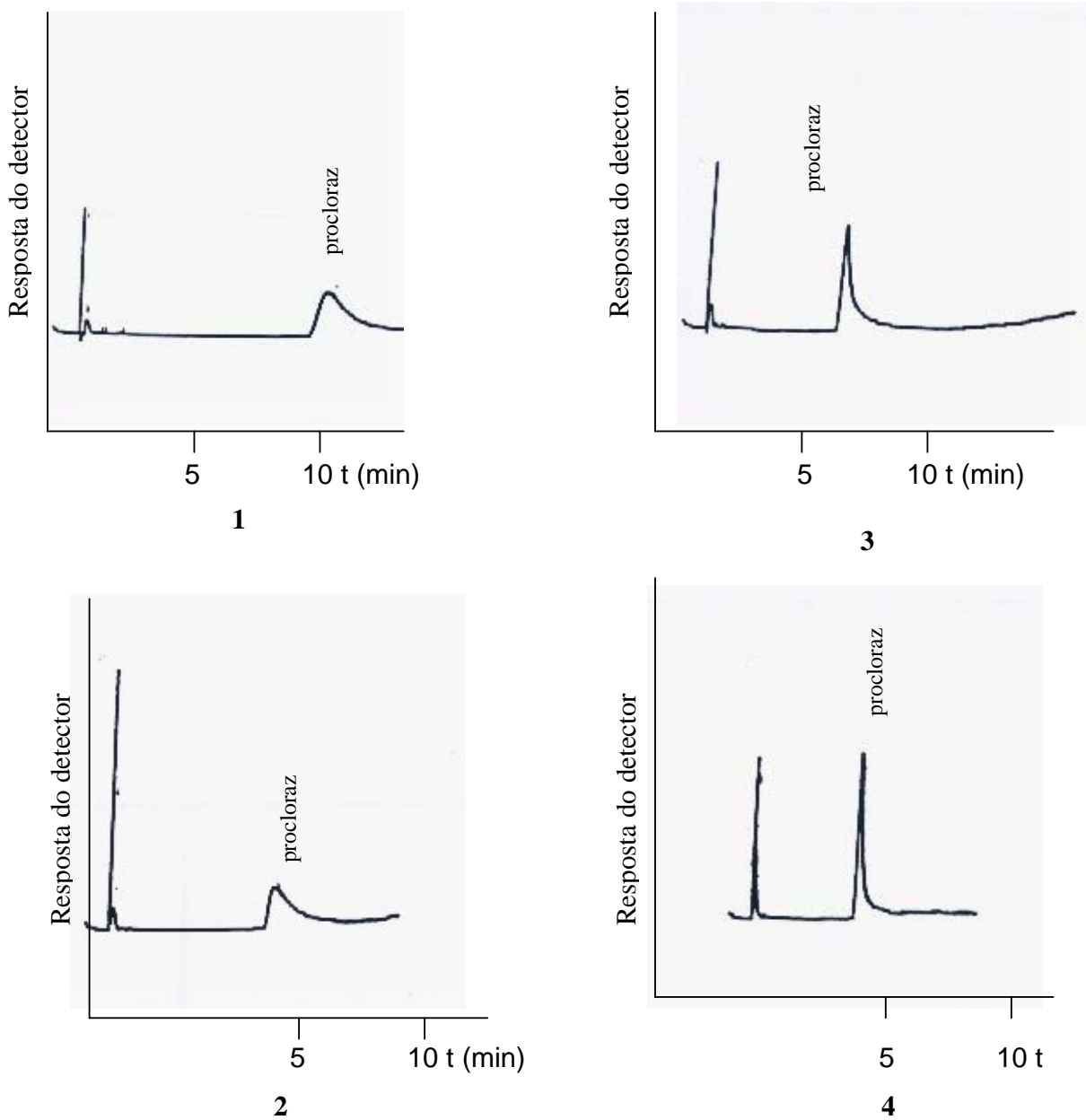


Figura 10- Cromatogramas CG-DCE: Análise de solução padrão de procloraz (0,5 mg/Kg) submetida a diferentes temperaturas iniciais na rampa de temperatura em coluna *megabore* DB-608: 1- 100°C; 2- 110°C; 3- 120 °C; 4- 140 °C. Condições: rampa de temperatura, ver Tabela 7, p. 46 . Volume injetado, 1 μ L, modo splitless.

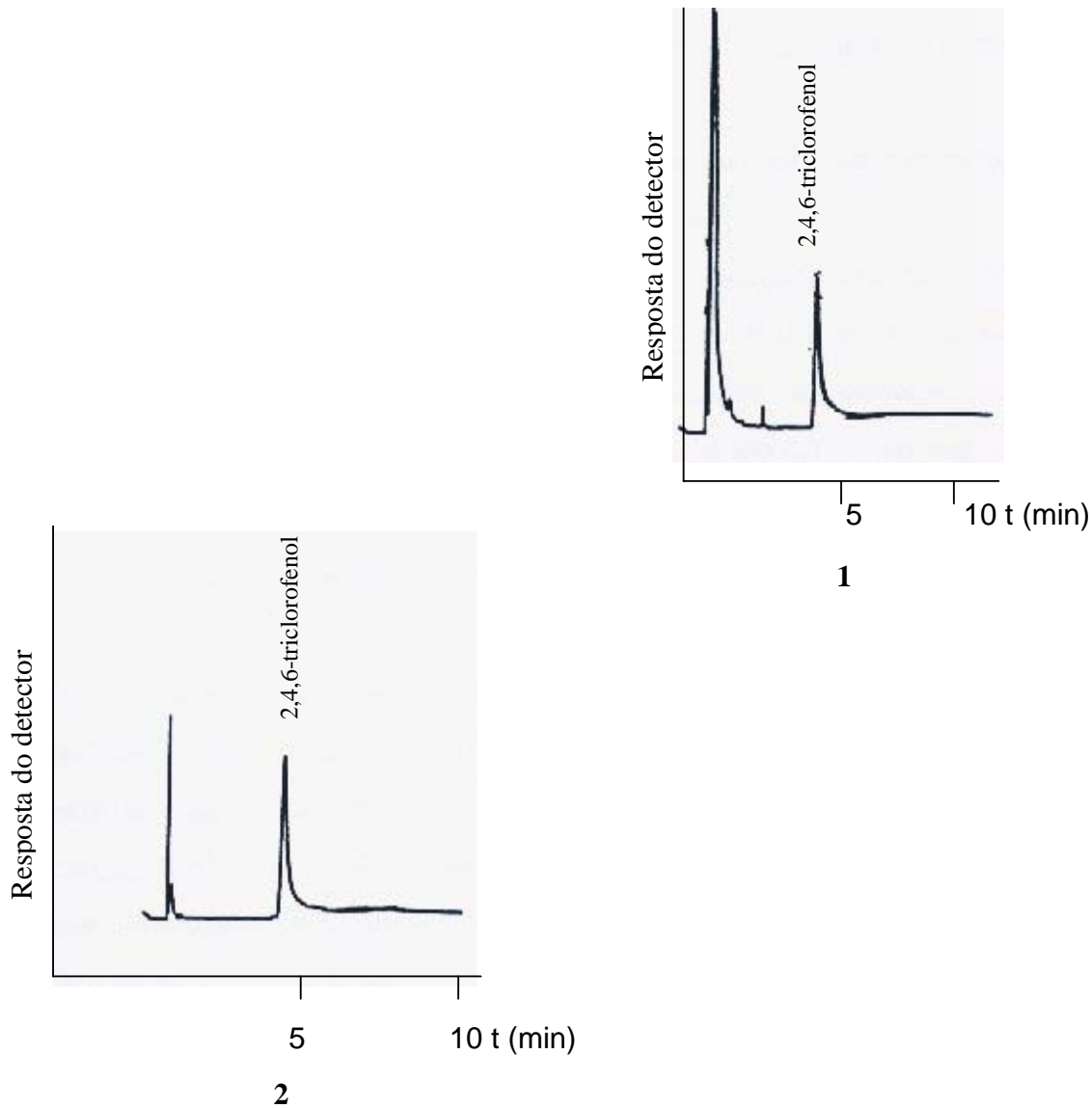


Figura 11- Cromatogramas CG-DCE: 1- solução padrão de procloraz na forma de 2,4,6-triclorofenol (0,5 mg/Kg); 2- solução padrão certificado de 2,4,6-triclorofenol (0,5 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna *megabore* DB-608: 140 °C (1min) direto até 200 °C, taxa de 10 °C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume injetado, 1µL, modo splitless.

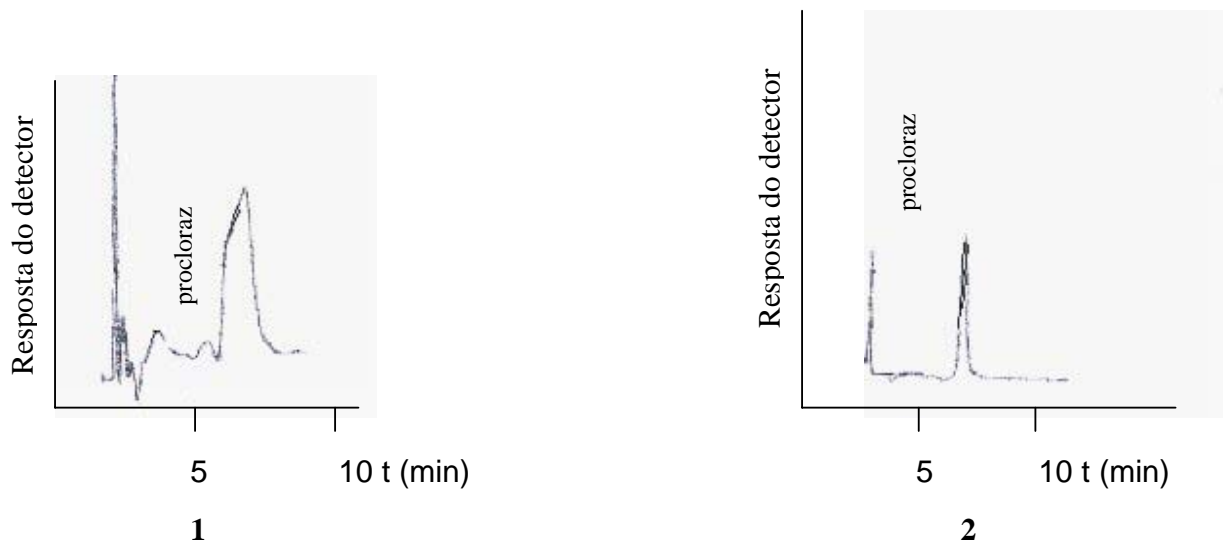


Figura 12- Cromatogramas CLAE-UV: 1- solução padrão de procloraz sem a reação de hidrólise (0,1 mg/Kg); 2- solução padrão de procloraz na forma de 2,4,6-triclorofenol (0,1 mg/Kg). Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 8:2, v/v. fluxo: 0,8 ml/min- modo isocrático. Volume injetado, 20 μ L. Detecção: 220 nm.

8.6-Método para análise de resíduos de cihexatina em frutas

O acaricida cihexatina não pôde ser diretamente analisado por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons. Baseando-se em procedimentos previamente estudados em nosso laboratório, foi realizada uma reação de substituição com ácido clorídrico concentrado, objetivando preparar um derivado clorado, a fim de tornar a molécula de cihexatina sensível ao detector por captura de elétrons.

Com o auxílio de soluções padrões do pesticida, alguns parâmetros da reação de derivação foram otimizados. Assim, diferentes tempos de agitação no ultra-som, com ou sem aquecimento, foram avaliados: 30, 50 e 60 min. Os dados obtidos demonstraram que o tempo de 30 min sem aquecimento apresentou resultados similares ao tempo de 60 min com aquecimento. A proposta para a reação ocorrida entre os resíduos de cihexatina com HCl para a obtenção do derivado está apresentada na Figura 13, p. 71.

Numa segunda etapa, foram avaliados diferentes solventes ou sistemas de solventes para a extração dos resíduos de cihexatina das matrizes de frutas (acetona, acetato de etila, diclorometano e hexano). Os resultados experimentais demonstraram que diclorometano foi o mais adequado para a extração de cihexatina de amostras de frutas, item 4.9.3, p. 36. Foram estudados três diferentes níveis de fortificação de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/Kg. Os valores de recuperação percentual de amostras fortificadas de uva, laranja e morango compreenderam o intervalo de 70 a 90%, com coeficiente de variação entre 5,7% e 10,3%, Tabela 14. Os cromatogramas estão apresentados na

Figura 14, p. 72. As condições cromatográficas de análise estão apresentadas na Tabela 7, p. 47.

A literatura registra métodos para determinação de resíduos de cihexatina e de outros organometálicos em matrizes biológicas e ambientais (sedimento, água etc) na forma de um derivado halogenado, quer seja com o cloro, quer seja com o bromo. A análise pode ser realizada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, no modo de ionização química (MIZUSHI et al., 1998) ou por captura de elétrons, sendo que a coluna cromatográfica foi dopada com uma solução metanólica de HBr (TSUDA et al., 1987). Com relação a frutas, um método determina cihexatina também na forma de um derivado obtido por complexação. A análise foi efetuada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (ANASTASSIADES et al., 2000). Desta maneira, os dados obtidos com este procedimento simplificado de derivação com HCl, apesar de preliminares, mostram-se bastante promissores e permitirão contribuir com a literatura com um método simples e rápido para determinar resíduos de cihexatina em matrizes de frutas

Tabela 14- Recuperação de cihexatina de amostras de uva fortificadas (* n= 4 repetições).

<i>Acaricida</i>	<i>Amostra</i>	<i>Nível de Fortificação</i> (mg/Kg)	<i>Recuperação*</i> (%)		
			<i>Intervalo</i>	<i>Média</i>	<i>C.V.(%)</i>
	uva	0,1	79-90	83	5,7
cihexatina	laranja (polpa)	0,5	70-78	73	7,7
	morango	1,0	70-82	77	10,3

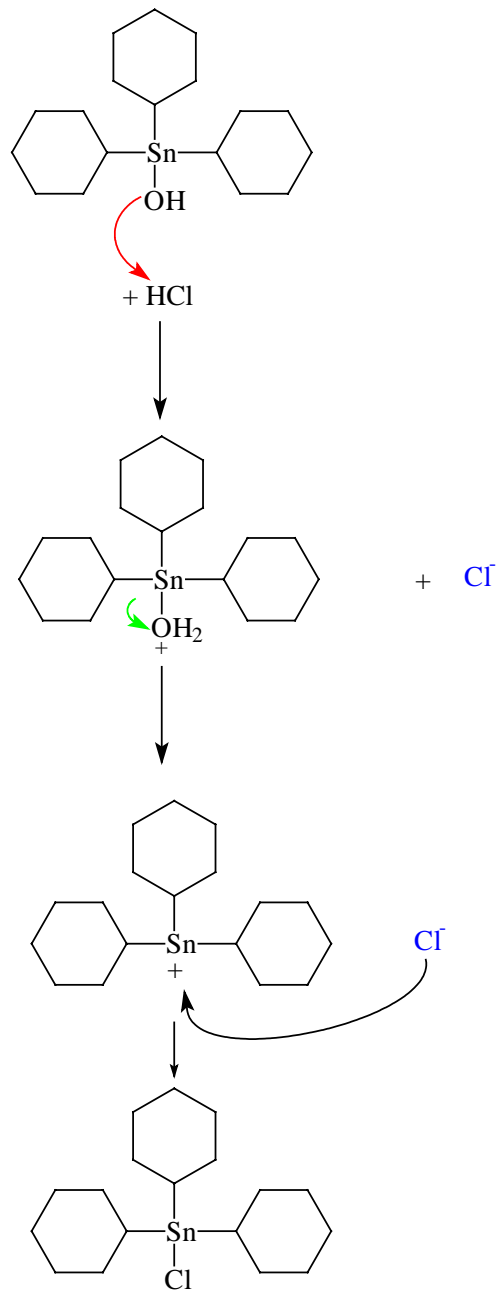


Figura 13- Proposta para a reação de obtenção do derivado do acaricida cihexatina.

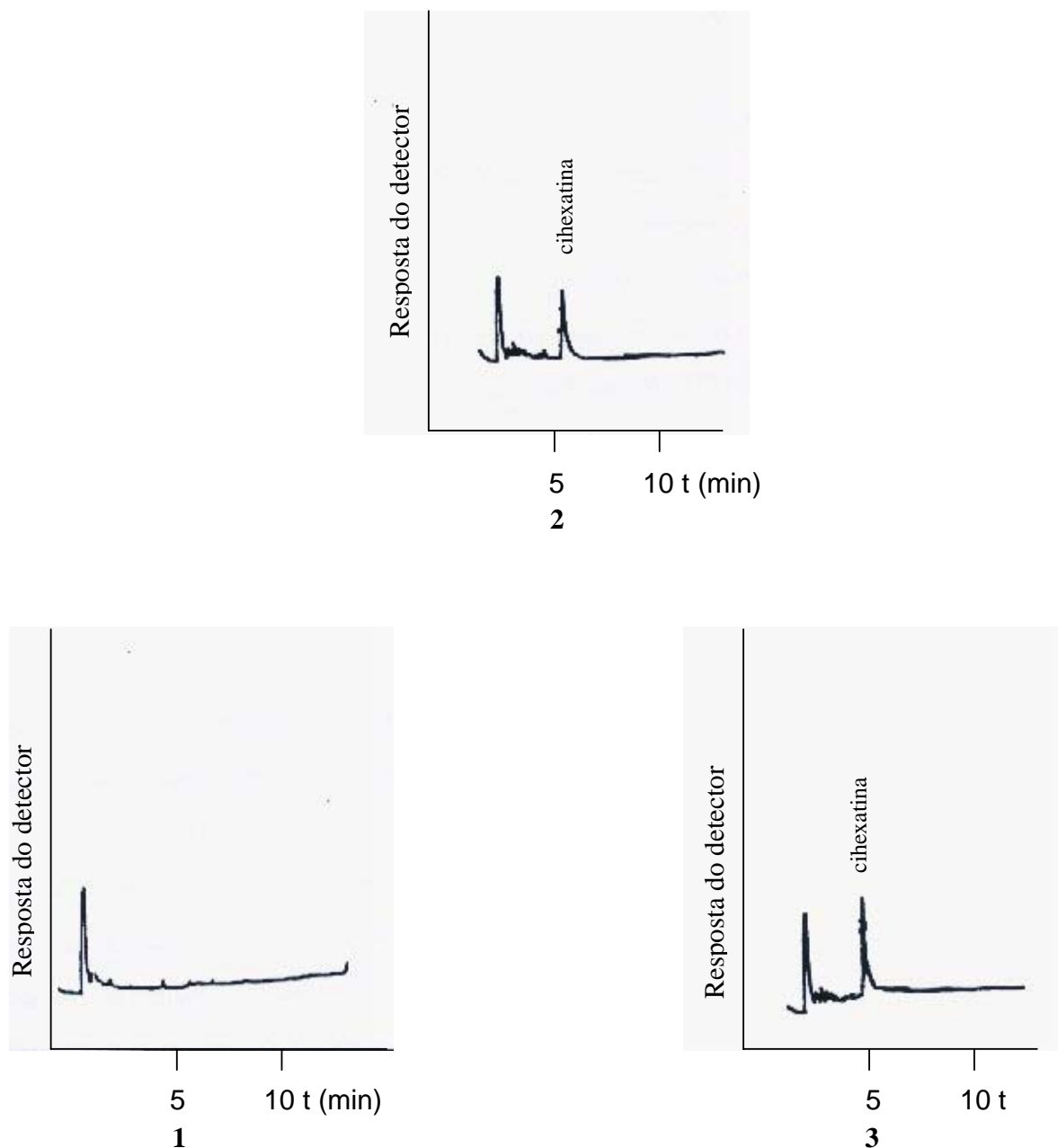


Figura 14- Cromatogramas CG-DCE: 1- amostra testemunha de uva; 2- solução padrão de cihexatina (0,1 mg/Kg); 3- amostra de uva fortificada com solução padrão de cihexatina (0,1 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna *megabore* DB-608: 140 °C (1min) direto até 200 °C, taxa de 10 °C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume injetado, 1µL, modo splitless.

8.7- Método para análise de resíduos de fluquinconazol em frutas

Experimentos preliminares com soluções padrões do fungicida fluquinconazol foram realizados com a técnica de cromatografia a gás com detecção termiônica, empregando-se a coluna capilar DB-1701, cuja fase estacionária é de maior polaridade do que a DB-5, a qual foi utilizada na análise dos princípios ativos já descritos. Na otimização das condições de análise, foram avaliadas diferentes proporções dos gases e de rampas de temperatura para a coluna cromatográfica. Contudo, os resultados não foram satisfatórios, pois o princípio ativo apresentou um longo tempo de análise e um baixo valor de área para o pico cromatográfico no nível de 0,5 mg/kg. Apesar do aparente êxito em se obter uma resposta para este fungicida, a concentração estava aquém da requerida pela legislação brasileira para a matriz de maçã, a qual estabelecia o nível de 0,05 mg/kg para este fungicida, Figura 15, p. 76.

Desta forma, foram otimizadas as condições de análise do fluquinconazol por cromatografia líquida de alta eficiência. A coluna empregada foi de aço inoxidável de fase C₁₈ (LiChrospher 100 RP-18). A fase móvel foi metanol:água (70:30, v/v-modo isocrático). O solvente acetonitrila pode também ser utilizado nas análises, nesta mesma proporção com água, que apresentará desempenho bastante similar ao metanol. O comprimento de onda de 254 nm proporcionou uma boa resposta para o fungicida, comparativamente a outros comprimentos de onda testados: 208 e 220 nm. O fluxo de 0,8 ml/min permitiu um pico cromatográfico estreito e simétrico. O tempo de retenção foi de 7,80 min. O procedimento de extração foi otimizado, avaliando-se solventes para a extração (acetona, acetato de etila e hexano), assim como o volume

(10, 15, 20 mL) e o tempo de extração (20, 30, 40 min) e a massa do homogeneizado de fruta (5, 10 ou 20 g). O volume de 10 mL do sistema de solventes acetato de etila:hexano (1:1, v/v) para 5 g de amostra de fruta proporcionou excelentes valores de recuperação do analito das amostras de frutas fortificadas, além de um extrato com menos componentes interferentes da amostra, comparativamente ao extrato obtido com acetona. O procedimento está apresentado no item 4.9.4, p. 37. Como os resultados experimentais foram bastante satisfatórios, as análises com amostras de maçã e de outras frutas foram realizadas por esta técnica. A linearidade do detector compreendeu o intervalo de 0,02 a 2,0 µg/mL. A Tabela 15, p. 76, apresenta as recuperações do fungicida analisado individualmente em amostras fortificadas de maçã. A média de 5 análises para a maçã variou de 84% a 85%, com coeficientes de variação de 8,90% a 12,0%. Posteriormente, foram otimizadas as condições para análise conjunta com pirimetanil e clofentezina. Foi estabelecido o gradiente do sistema de solventes metanol e água mais adequado para a resolução dos picos dos três pesticidas, Tabela 8, p. 47. A Tabela 17, p. 82, apresenta os valores de recuperação deste fungicida em análise simultânea com clofentezina e pirimetanil, Figura 17-3, p. 80. A Figura 16, p. 77, apresenta os cromatogramas da solução padrão de fluquinconazol e da amostra de maçã fortificada. Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,02 e 0,05 mg/Kg, respectivamente.

A literatura registra apenas uma revisão alemã dos métodos para análise de resíduos de fluquinconazol em diferentes matrizes: ambientais (solo e água), fluidos biológicos (sangue e urina) e alimentares (vegetais, frutas e grãos). Com relação a

frutas, são apresentados os valores de recuperação para as matrizes de uva e maçã: $89 \pm 11\%$ e $90 \pm 9\%$, respectivamente, para os níveis de 0,05 e 0,5 mg/Kg. A extração é realizada com acetona e o extrato é analisado por cromatografia a gás. Assim, o desenvolvimento deste método representa uma importante contribuição para a literatura, uma vez que disponibiliza uma metodologia rápida e eficiente utilizando a técnica de CLAE-UV para análise individual de resíduos de fluquinconazol ou simultânea com pirimetanil e clofentezina em matrizes de mamão, manga, maçã e laranja, em níveis abaixo dos LMRs estabelecidos pela legislação para este fungicida.

Tabela 15- Recuperação de fluquinconazol de amostras de maçã fortificadas (*n= 5 repetições).

Fungicida	Amostra	Nível de Fortificação (mg/Kg)	Recuperação*		
			Intervalo	Média (%)	C.V. (%)
fluquinconazol	maçã (polpa)	0,05	75-108	85	12,0
		0,1	75-91	84	8,90

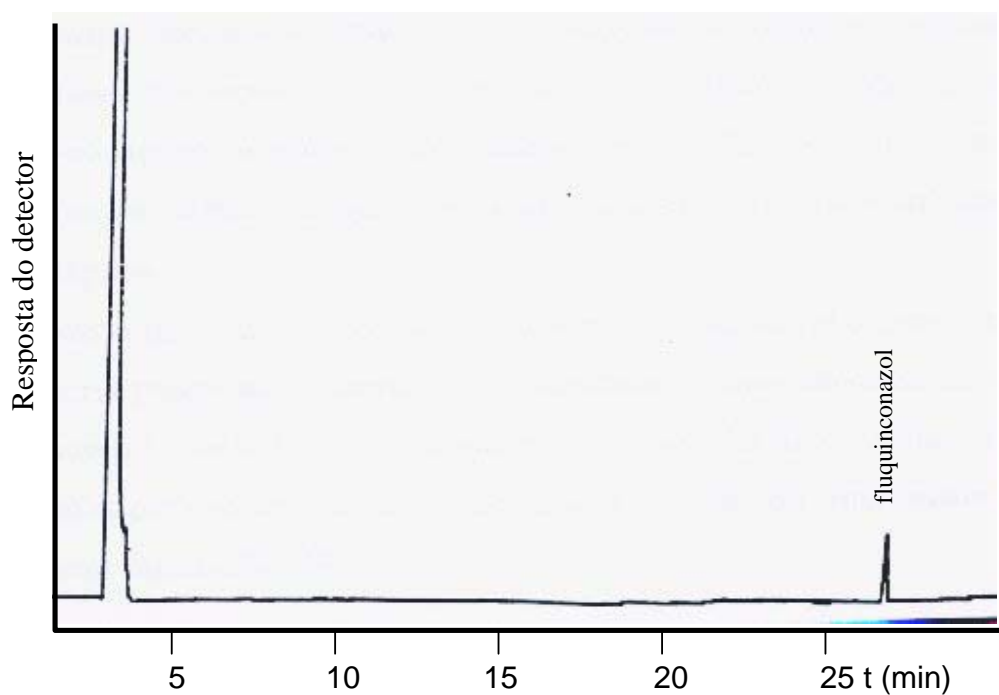


Figura 15- Cromatograma CG-DT: solução padrão de fluquinconazol (0,5 mg/Kg). Condições: rampa de temperatura em coluna DB-5: 100 °C (1min) direto até 200 °C, taxa de 10 °C/min até 260°C (5 min), taxa de 10°C/min e resfriar. Volume injetado, 1µL, modo splitless.

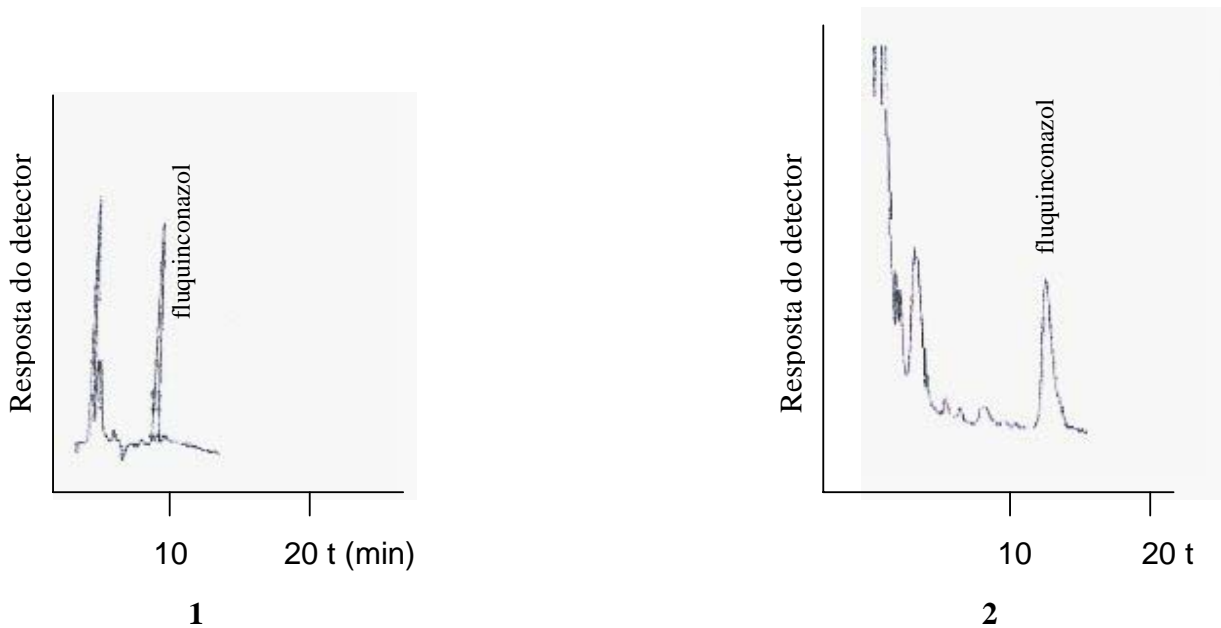


Figura 16- Cromatogramas CLAE-UV: 1- solução padrão de fluquinconazol (0,1 mg/Kg); 2- amostra de maçã fortificada com fluquinconazol (0,1 mg/Kg). Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 7:3, v/v. fluxo: 0,8 ml/min- modo isocrático. Volume injetado, 20 μ L. Detecção: 254 nm.

8.8- Método para análise de resíduos de clofentezina em frutas

Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório auxiliaram na seleção da coluna cromatográfica e da fase móvel (o solvente ou sistema de solventes) mais adequada. Assim, uma coluna de aço inoxidável LiChrospher 100 RP-18 e a fase móvel constituída por metanol:água (7:3, v/v) foram primeiramente testadas e mostraram-se bastante adequadas para a análise de soluções padrões de clofentezina, permitindo obter um pico cromatográfico bem resolvido e um tempo de retenção de 6,20 min, Figura 17, p. 80. O comprimento de onda de 254 nm foi utilizado para a otimização das condições cromatográficas de clofentezina, utilizando um detector óptico no UV-VIS. As

condições cromatográficas de análise estão sumarizadas na Tabela 9, p. 48. Uma série de injeções das soluções padrões de clofentezina foi realizada para ajustar os parâmetros de análise e estabelecer a faixa linear de resposta do detector, que compreendeu o intervalo entre 0,5 e 4,0 µg/mL. A Figura 4, p. 29, apresenta o gráfico analítico. Numa segunda etapa, o método apresentado no item 4.9.4, p. 37, foi usado para análise de clofentezina em amostras de frutas em diferentes níveis de fortificação de 0,1 mg/Kg a 2,0 mg/Kg. Os valores médios de recuperação percentual de amostras fortificadas de manga, laranja e mamão variaram entre 81% e 96% com coeficiente de variação entre 10,10% e 12,55%. Posteriormente a otimização da fase móvel no modo gradiente possibilitou a análise conjunta com fluquinconazol e pirimetanil. A Tabela 17, p. 82, apresenta os valores de recuperação de resíduos de clofentezina para diferentes matrizes frutas em análise simultânea com pirimetanil e fluquinconazol por CLAE-UV, Figura 17-3, p. 80.

O método proposto, que viabilizou a análise simultânea de clofentezina, pirimetanil e fluquinconazol por CLAE-UV, não está relatado na literatura. Este método permitiu obter valores de recuperação na ordem de $94 \pm 8,6\%$ (n=8) para a matriz de maçã, enquanto que BALINOVA, 1998, obteve para o mesmo nível de fortificação de 0,2 mg/Kg, 89%, utilizando 50 g de amostra e 100 mL de acetato de etila, além de uma etapa adicional de purificação por cromatografia de permeação em gel. GELSOMINO et al., 1997, obtiveram 88% (n=3) em amostra de melão, para o nível de 0,06 mg/Kg, com 100g de amostra, 200 mL de acetona e partição com outros 200 mL de diclorometano e

purificação por cromatografia de permeação em gel, sendo que a análise foi realizada por cromatografia a gás com detector por captura de elétrons.

Tabela 16- Recuperação de clofentezina de amostras de frutas fortificadas (*n= 4 repetições).

<i>Acaricida</i>	<i>Amostra</i>	<i>Nível de Fortificação (mg/Kg)</i>	<i>Recuperação* (%)</i>		
			<i>Intervalo</i>	<i>Média</i>	<i>C.V. (%)</i>
clofentezina	<i>laranja</i>	0,1	82-109	94	10,43
		0,3	70-98	81	11,85
		1,0	81-108	96	12,55
	<i>manga</i>	1,0	87-96	93	11,10
		2,0	72-94	81	11,23
	<i>mamão</i>	0,1	79-108	91	10,90
		1,0	75-92	85	10,53

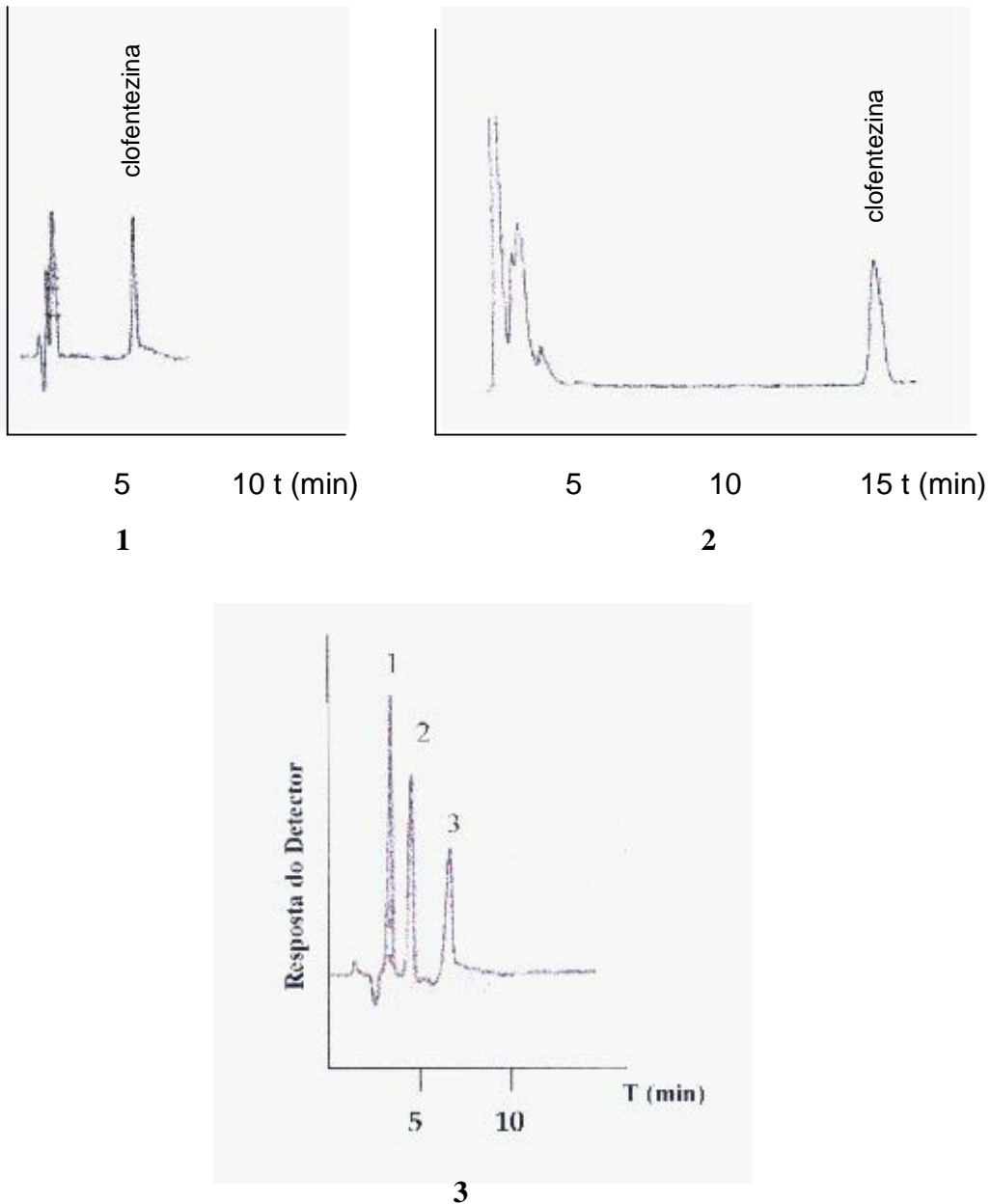


Figura 17- Cromatogramas CL-UV: 1- solução padrão de clofentezina (0,5 mg/Kg); 2- amostra de manga fortificada com clofentezina (0,5 mg/Kg). Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 7:3, v/v. fluxo: 0,8 ml/min- modo isocrático. Volume injetado, 20 μ L. Detecção: 220 nm.; 3- análise simultânea da solução padrão de clofentezina (1), fluquinconazol (2) e pirimetanil (3) (0,1 mg/Kg). Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água - modo gradiente. Fluxo: 0,8 ml/min. Volume injetado, 20 μ L. Detecção: 254 nm.

8.9. Método para análise simultânea de resíduos de pirimetanil, fluquinconazol e clofentezina em frutas por cromatografia líquida.

Considerando os dados experimentais obtidos nas análises individuais de pirimetanil, fluquinconazol e clofentezina em frutas por cromatografia líquida com detecção no UV-Vis, foi verificada a viabilidade de análise simultânea destes três pesticidas por esta técnica cromatográfica. A otimização das condições cromatográficas de análise, utilizando uma coluna analítica LiChrospher 100-RP18, demonstrou que o gradiente de eluição, constituído por metanol e água e apresentado na Tabela 8, p. 47, foi o que permitiu a melhor resolução entre os picos cromatográficos dos três pesticidas estudados, Figura 17-3, p. 80. A análise em modo isocrático de eluição com estes mesmos solventes resultou em sobreposição de picos, inviabilizando a análise. Is to posto, foi avaliado a resposta destes princípios ativos com relação a uma fase estacionária NH₂, de maior polaridade. O perfil cromatográfico dos pesticidas não apresentou alteração significativa, isto é, a ordem de eluição foi mantida e as áreas dos picos cromatográficos para uma solução de mesma concentração resultaram em valores pouco superiores na ordem de 5% para pirimetanil e clofentezina e de 12% para fluquinconazol, em comparação à fase C₁₈. No entanto, os resultados apresentados na Tabela 17, p. 82, evidenciam que ambas as fases, C₁₈ e NH₂, são adequadas para a realização de análises de resíduos de fluquinconazol, pirimetanil e clofentezina em casca e polpa de mamão (papaia), manga, maçã e polpa de laranja.

8.10-Tratamento pós-colheita de amostras de frutas realizado com produtos comerciais sob condições de laboratório

Considerando alguns trabalhos da literatura (OLIVEIRA, 2002; OLIVEIRA et al., 1997; SCHIRRA et al., 1998; JIMÉNEZ et al., 1994 e CLAVIJO et al., 1996) foi avaliado a persistência de fluquinconazol, pirimetanil e procloraz em matrizes de frutas submetidas a tratamentos por imersão em solução de formulações comerciais, para simular as condições de uma viagem marítima a União Européia: 12°C e 85-90% de umidade relativa, por um período de 29 dias. Os trabalhos experimentais demonstraram que foram detectados resíduos da ordem de 0,1 mg/Kg de fluquinconazol e de 1,9 mg/Kg de pirimetanil em amostras de maçãs da variedade Royal Gala. Estes valores estão acima aos estabelecidos pela legislação: 0,05mg/Kg (nacional) e 1,0 mg/Kg (internacional), respectivamente. Não foram detectados resíduos de pirimetanil em amostras de uvas da variedade Itália após o intervalo de segurança de 22 dias. Resíduos de procloraz de 2,0 mg/Kg foram encontrados em amostras de manga Haden, valor acima ao estipulado pela legislação brasileira (0,2 mg/Kg), porém está de acordo com o estabelecido pela legislação internacional (2,0 mg/kg). Com relação a amostras de laranja Pêra, não foram detectados resíduos de prochloraz nas amostras analisadas. A Tabela 18, p. 84, apresenta os dados obtidos com os tratamentos realizados em laboratório. É importante ressaltar que os dados obtidos com as matrizes de frutas tratadas com as formulações comerciais PALISADE 250PM[®] e MYTHOS 300SC[®] fornecem novas informações à literatura em relação aos fungicidas fluquinconazol e pirimetanil.

Por outro lado, estudos desta natureza são importantes, porque as barreiras comerciais estão cedendo lugar às barreiras fitossanitárias no mercado externo, com implicações diretas sobre as exportações brasileiras de frutas, e resíduos de pesticidas acima dos limites permitidos podem inviabilizar as exportações e acarretar perdas de divisas.

Tabela18- Tratamento por imersão de frutas com formulações comerciais dos pesticidas estudados

Matriz	Formulação comercial	Tempo decorrido da aplicação (dias)	Resíduo*(C.V.) (mg/Kg)
Maçã	Palisade 250PM (fluquinconazol)	0	3,5 (1,6)
		7	2,0 (2,2)
		14	0,1 (1,8)
Maçã	Mythos 300SC (pirimetanil)	0	6,0 (2,1)
		7	4,8 (1,1)
		14	0,9 (2,3)
Uva	Mythos 300SC (pirimetanil)	0	12,5 (3,2)
		5	9,0 (2,4)
		10	6,0 (2,3)
		20	2,0 (1,2)
		22	nd
Manga	Sportak 450CE (procloraz)	0	8,0 (2,3)
		7	5,0 (1,4)
		14	2,0 (2,5)
		29	0,8 (3,1)
Laranja	Sportak 450CE (procloraz)	0	14,0 (2,6)
		7	8,0 (2,7)
		14	nd

* n= 2 replicatas / nd= não detectado.

8.11- Aplicação dos Métodos para Análise de Resíduos dos Pesticidas Estudados em Frutas Amostradas nas Cidades de Araraquara, São Carlos, Jaboticabal e Ribeirão Preto

Os métodos estudados neste trabalho foram aplicados em frutas [mamão (papaya), manga, maçã, morango, uva e laranja] amostradas nas cidades de Araraquara, São Carlos, Jaboticabal e Ribeirão Preto durante 2001 e 2002. No total foram realizadas 42 amostragens.

Os trabalhos experimentais demonstraram que as amostras de frutas analisadas não apresentaram resíduos dos pesticidas estudados, conforme as condições experimentais de análise. Contudo, é importante ressaltar que os resultados obtidos neste levantamento preliminar da presença de resíduos de fungicidas (fluquinconazol, pirimetanil e procloraz) e acaricidas (clofentezina e cihexatina) em algumas variedades de frutas comercializadas irão nortear os próximos trabalhos do Grupo de Análise de Resíduos de Pesticidas do IQ-UNESP de Araraquara, para possibilitar uma avaliação mais abrangente, isto é, considerando outras matrizes de frutas e classes químicas de pesticidas. Além disso, estes dados preliminares podem contribuir com a literatura, visto que não há trabalhos descritos de análise de resíduos de pesticidas em matrizes de frutas nas cidades citadas.

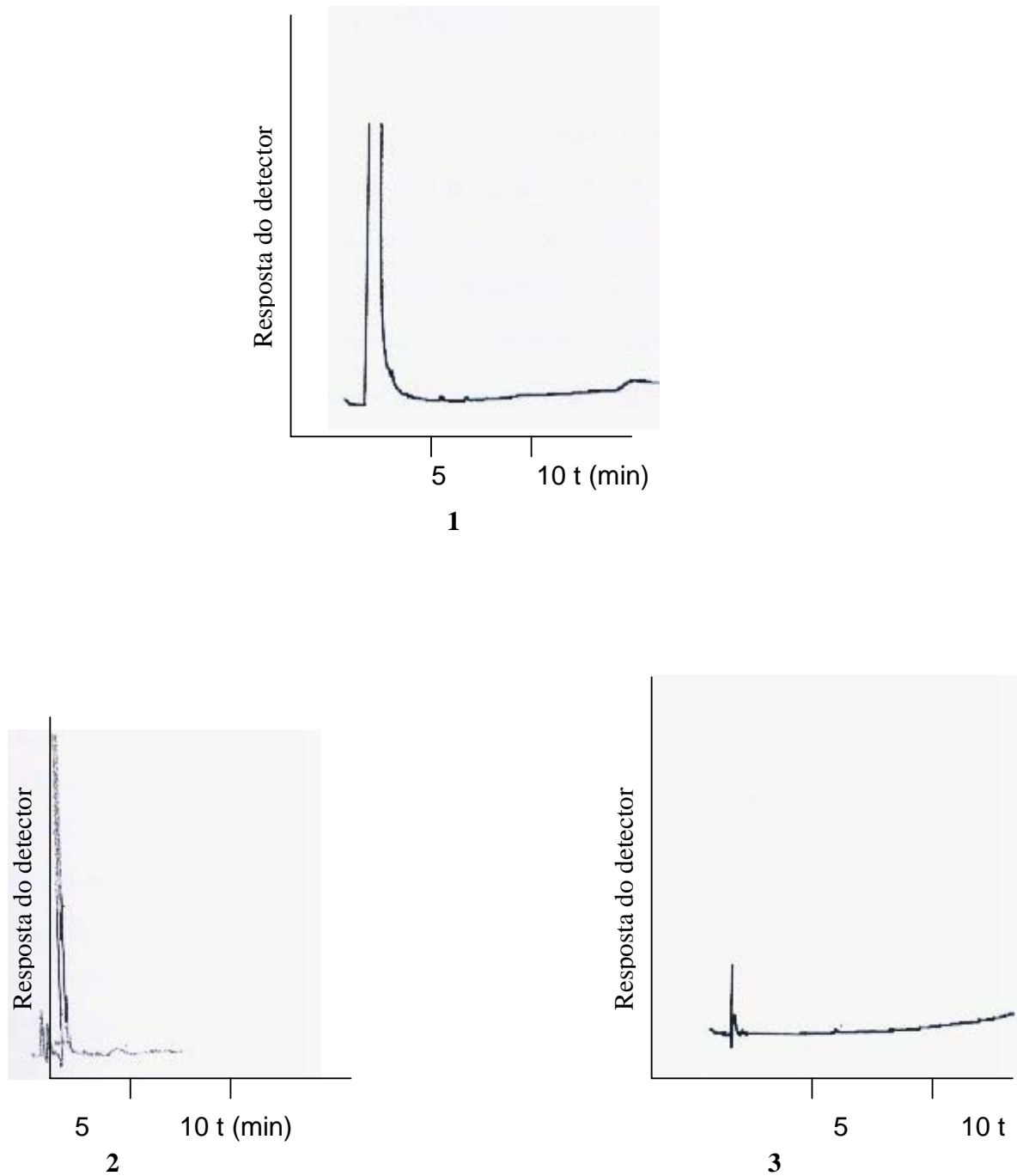


Figura 18- Cromatogramas: 1- análise do branco do método para cihexatina (CG-DCE); 2- análise do branco do método para procloraz (CG-DCE); 3- análise do branco do método para pirimetanil (CG-DT). Condições: ver Tabelas 6 a 8, p. 45 e 46.

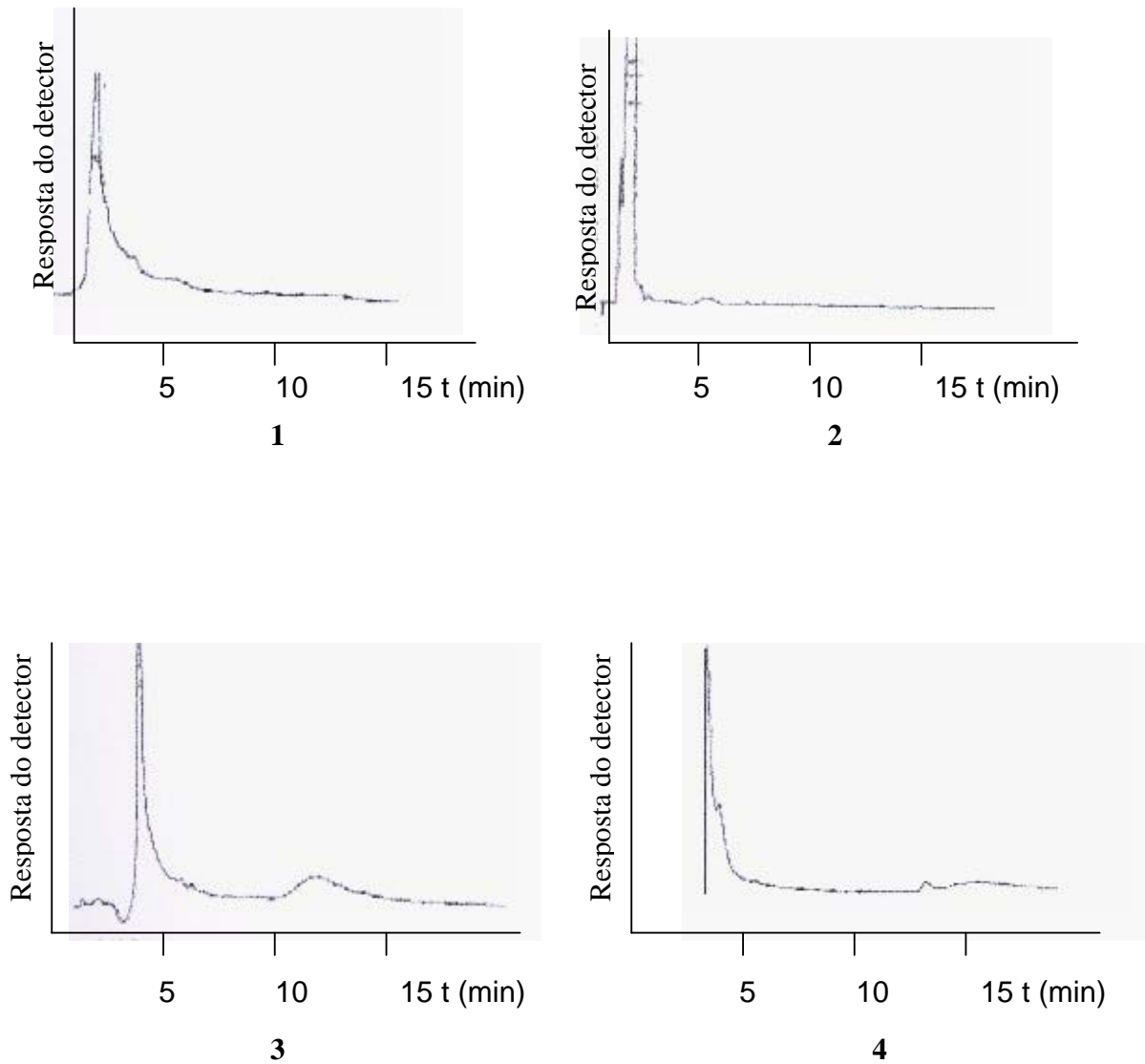


Figura 19- Cromatogramas (CLAE-UV) das amostras testemunhas das frutas: 1- manga; 2- mamão; 3- maçã; 4- laranja. Condições: coluna analítica LiChrospher 100 RP-18. Fase móvel: metanol:água, 8:2, v/v. Fluxo: 0,8 ml/min - modo isocrático. Volume injetado, 20 μ L. Detecção: 254 nm.

9-CONSIDERAÇÕES FINAIS

1-Com relação às metodologias analíticas para análise de resíduos de fungicidas e acaricidas selecionados em matrizes de frutas, as seguintes contribuições para a literatura na área de análise de resíduos de pesticidas podem ser ressaltadas, quais sejam:

- **fluquinconazol**: desenvolvimento de metodologia para análise dos resíduos em matrizes de frutas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV/Vis.
- **clofentezina**: metodologia analítica simplificada para análise dos resíduos em matrizes de frutas não descritas na literatura, além da possibilidade de inclusão deste princípio ativo em análise simultânea com fluquinconazol e pirimetanil por cromatografia líquida com detecção no UV/Vis.
- **pirimetanil**: metodologia analítica simplificada para análise dos resíduos por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons ou por cromatografia líquida com detecção no UV/Vis em matrizes de frutas não descritas na literatura.
- **procloraz**: metodologia analítica simplificada para análise dos resíduos por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons ou por cromatografia líquida com detecção no UV/Vis em matrizes de frutas não descritas na literatura.

- **cihexatina**: metodologia analítica simplificada (reação de derivação com ácido clorídrico) para análise dos resíduos por cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons em matrizes de frutas não descritas na literatura.

2-Com relação à aplicação das metodologias desenvolvidas para a análise de resíduos de fungicidas e acaricidas em amostras de frutas comercializadas nas cidades de Araraquara, São Carlos, Jaboticabal e Ribeirão Preto:

-os trabalhos experimentais demonstraram que os resíduos dos pesticidas estudados (procloraz, pirimetanil, cihexatina, clofentezina e fluquinconazol) não foram detectados nas frutas amostradas [mamão (papaia), manga, maçã, morango, uva e laranja], conforme as condições experimentais de análise.

3-Com relação à aplicação das metodologias desenvolvidas para a análise de resíduos de fungicidas e acaricidas em amostras de frutas tratadas com formulações comerciais realizadas sob condições de laboratório:

-os trabalhos experimentais demonstraram que os resíduos dos pesticidas fluquinconazol, pirimetanil e procloraz nas variedades de frutas avaliadas não excederam os limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação.

É importante ressaltar que a literatura registra métodos multirresíduos que viabilizam a análise simultânea de centenas de princípios ativos, dentre os quais

pirimetanil, procloraz e clofentezina em matrizes ambientais e/ou alimentares. Contudo, este fato não compromete a necessidade de se dispor de métodos individuais de análise de resíduos de pesticidas, que podem ser essenciais em pesquisas direcionadas a uma determinada classe química de pesticidas ou permitir trabalhos de grupos que não disponham de equipamentos acoplados a espectrômetro de massas ou de cromatógrafos com mais de um detector.

10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F. E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 649-660, 2001.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume; Fapesp, 2002. 188 p.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; SCHWACK, W. Multiresidue method for the determination of pre- and postharvest pesticides in citrus fruits-part 4: determination of organotin pesticides. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 96, n. 12, p. 466-477, 2000.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. São Paulo: Organização Andrei, 1999. 672 p.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: NOBEL, 1994. 114 p.

BALINOVA, A. Multiresidue determination of pesticides in plants by high performance liquid chromatography following gel permeation chromatographic clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 11-16, 1998.

BARNES, K. A.; FUSSELL, J.; STARTIN, J. R.; THORPE, S. A.; REYNOLDS, S. I. Determination of the pesticides diflubenzuron and clofentezine in plums, strawberries and blackcurrant-based fruit drinks by high performance liquid chromatography/atmospheric-pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Rapid Communication Mass Spectrum**, v. 9, n. 14, p. 1441-1445, 1995.

BIDLINGMEYER, B. A. **Practical HPLC methodology and applications**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1992. 452 p.

BLASCO, C.; PICÓ, Y.; MANES, J.; FONT, G. Determination of fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 947, n. 2, p. 227-235, 2002a.

BLASCO, C.; PICÓ, Y.; FONT, G. Monitoring of five postharvest fungicides in fruit and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Analytical Official American Chemistry International**, v. 85, n. 3, p. 704-711, 2002b.

BLECHER, B. Brasil exporta mais fruta e ganha menos. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 29 jan. 2002. Folha de São Paulo, Caderno Agrofolha, p. F1.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides potential risk for consumers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 182-187, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monografias de Produtos Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias>>. Acesso em: 18 fev. 2003.

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p.155-168, jan./dez. 2002.

CABRAS, P.; ANGIIONI, A.; GARAU, V. L. Gas chromatographic determination of cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil and tebuconazole in grapes, must and wine. **Journal of Analytical Official American Chemistry International**, v. 80, n. 4, p. 867-870, 1997.

CLAVIJO, M. P.; PLAZA, M. M.; SANZ, A.; BERNAL, J. G. Decay study of pesticide residues in apple samples. **Journal of Chromatography A**, v. 740, p. 146-150, 1996.

CODEX alimentarius-pesticide residues in food. Rome: Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 1998. v. 2.

CULTURA da maçã. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 107 p. (Coleção Plantar).

CULTURA do mamão. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. 92 p. (Coleção Plantar).

DE PAOLI, M.; BARBINA, M. T.; DAMIANO, V.; FABBRO, D.; BRUNO, R. Simplified determination of combined residues of prochloraz and its metabolites in vegetable, fruit and wheat samples by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 765, p. 127-131, 1997.

FUSE, J.; KANAMORI, H.; IDEYOSHI, N. Determination of prochloraz and its metabolites in fruits and vegetables by GC. **Journal of Hygienic Society of Japan**, v. 41, n. 1, p. 61-65, 2000.

GELSOMINO, A.; PETROVICOVA, B.; TIBURTINI, S.; MAGNANI, E.; FELICI, M. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 782, p. 105-122, 1997.

GLADE, M. J. The food quality protection act of 1996. **Nutrition**, v. 14, n. 01, p. 65-66, 1998.

JIMÉNEZ, J. J.; ATIENZA, J.; BERNAL, J. L. HPLC with fluorescence detection for the study of benomyl dissipation on treated lettuces. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 17, n. 18, p. 3999-4017, 1994.

KAIHARA, A.; YOSHII, K.; TSUMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; ISHIMITSU, S., TONOGAI, Y. Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and HPLC. **Journal of Health Science**, v. 46, n. 5, p. 336-342, 2000.

LAFUENTE, M.T.; TADEO, J. L. High performance liquid chromatography determination of prochloraz residues in citrus fruit. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 7, p. 268-270, 1984.

LASSERRE, Y. **Les résidus de pesticides dans les fruits et légumes et les pommes de terre dans les pays d'Europe occidentale (EU, Suisse, Norvège)**. France: Centre Français du Commerce Extérieur, 1997.

LUKE, M.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochloride, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal of Analytical Official American Chemistry International**, v. 58, n. 05, p. 1020-1026, 1975.

MANGA para exportação: aspectos fitossanitários. Brasília: Embrapa-SPI, 1993. 104 p. (Coleção Frupep).

MIZUSHI, K.; TAKEUCHI, M.; HOBBO, T. Trace analysis of tributyltin and triphenyltin compounds in sea water by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 267-273, 1998.

MOTARJEMI, Y.; VAN SCHOTHORST, M.; KAFERSTEIN, F. Future challenges in global harmonization of food safety legislation. **Food Control**, v. 12, p. 333-346, 2001.

NAVALÓN, A.; PRIETO, A.; ARAUJO, L.; VÍLCHEZ, J. L. Determination of pyrimethanil and kresoxim-methyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 355-360, 2002.

NAVARRO, M.; PICÓ, Y.; MARÍN, R.; MAÑES, J. 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, p. 201-209, 2002.

NAVARRO, S.; BARBA, A.; NAVARRO, G.; VELA, N.; OLIVA, J. Multiresidue method for the rapid determination - in grape, must and wine - of fungicides frequently used on vineyards. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 221-229, 2000.

NAVICKIENE, S.; RIBEIRO, M. L. Rapid method for the determination of thiabendazole and imazalil residues in orange by capillary Column gas chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 653, n. 22, p. 303-304, 1999.

OLIVEIRA, J. J. do V. Resíduos de benomil em mamão (*Carica papaya* L.) tratado em pós-colheita. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 101-104, jan/dez 2002.

OLIVEIRA, J. J. do V.; SIGRIST, J. M. M.; SPULVERATO, C. A.; POHLMANN, M. Degradação de benomil em mangas Palmer tratadas em pós-colheita. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 7, p. 25-32, jan./dez. 1997.

ROBERTS, T. R.; HUDSON, D. H. **Metabolic pathways of agrochemicals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999. v. 2.

SCHIRRA, M.; ANGIIONI, A.; RUGGIU, R.; MINELLI, E. V.; CABRAS, P. Thiabendazole uptake and persistence in lemons following post-harvest dips at 50°C. **Journal of Food Science**, v. 10, n. 2, p. 165-170, 1998.

SCIBALDI, E.; SARRA, A.; MUTTI, D.; BO, P. E. Use of gas-chromatography with electron-capture and thermionic-sensitive detection for the quantification and identification of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 765, p. 13-22, 1997.

SHERMA, J.; CAIRNS, T. **Emerging strategies for pesticide analysis**. Florida: CRC Press, 1992. 352 p.

SIEBERS, J.; HÄNEL, R. V.; FISCHER, R. Rückstandsanalytik neuer pflanzenschutzmittelwirkstoffe 3: mitteilung clomazone, cyprodinil, fluquinconazol, pymetrozin, quinoxifen. **Nachrichtenblatt Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, v. 50, n. 5, p. 118-126, 1998.

STAN, H. J. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection state-of-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 347-377, 2000.

TAYLOR, M. J.; HUNTER, K.; HUNTER, K. B.; LINDSAY, D.; LE BOUCHELLEC, S. Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electronspray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 982, p. 225-236, 2002.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. 433 p.

TOMLIN, C. **The pesticide manual**. Cambridge: BCPC, Crop Protection Publications, 1995. 1431 p.

TSUDA, T.; NAKANISHI, H.; AOKI, S.; TAKEBAYASHI, J. Determination of butyltin and phenyltin compounds in biological and sediment samples by electron-capture gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 387, p. 361-370, 1987.

YAMAMOTO, C.; NAKAMURA, M.; KIBUNE, N.; MACKAWA, Y. Determination of fenbutatin oxide and cyhexatin by GC. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 37, n. 5, p. 288-294, 1996.

WONG, J. W.; HALVERSON, C. A. Multiresidue analysis of pesticides in wines using C₁₈ solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 4, p. 435-442, 1999.