

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Desenvolvimento de um procedimento
micro-QuEchERS para determinação de
pesticidas em vinhos**

Fernando Jorge Geraldês Dagli

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues Batista

Dissertação de Mestrado

2018

Fernando Jorge Geraldês Dagli

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO MICRO-QuEchERS PARA
DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM VINHOS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Química, Doutorado, do Instituto de
Química da Universidade Federal
de Uberlândia, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Química

Uberlândia, 09 de Março de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- D126d
2018
- Dagli, Fernando Jorge Geraldês, 1978-
Desenvolvimento de um procedimento micro-QuEchERS para
determinação de pesticidas em vinhos / Fernando Jorge Geraldês Dagli. -
2018.
60 f. : il.
- Orientador: Alex Domingues Batista.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1129>
Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. 2. Uva - Teses. 3. Pesticidas - Teses. 4.
Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses. I. Batista, Alex
Domingues. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

CDU: 64



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado Acadêmico, NÚMERO 282/PPQUI.

DATA: 09/03/2018

DISCENTE: Fernando Jorge Geraldês Dagli
11612QMI016

MATRÍCULA:

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de um procedimento micro-QuEchERS para determinação de pesticidas em vinhos.

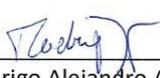
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

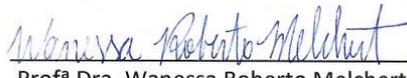
LINHA DE PESQUISA: Espectroanalítica Aplicada

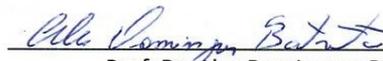
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de procedimento QuEchERS combinado a micro-extração em gota única para determinação de pesticidas em amostras de interesse comercial

Às nove horas do dia nove de março do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, Universidade Federal de Uberlândia, Profª Dra. Wanessa Roberto Melchert, Universidade de São Paulo e Prof. Dr. Alex Domingues Batista, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 45 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz


Profª Dra. Wanessa Roberto Melchert


Prof. Dr. Alex Domingues Batista

AGRADECIMENTOS

Sou muito grato aos meus pais por me apoiarem nas minhas decisões e me darem, no passado, o suporte necessário para que eu chegasse até aqui. A todas as pessoas que contribuíram com meu aprendizado acadêmico, seja na sala de aula ou na operação dos equipamentos que eu desconhecia, minha sincera gratidão.

RESUMO

O grande consumo de vinhos ao redor do mundo associado ao fato das uvas serem produzidas com a aplicação de pesticidas traz um alerta aos seus consumidores. Durante o processo de produção essas substâncias tóxicas podem permanecer presentes no produto final, tornando importante sua análise residual afim de garantir o respeito as legislações vigentes acerca do assunto. Muitas técnicas têm sido empregadas em tais determinações, desde a preparação da amostra, separação dos analitos, até suas detecções. O método QuEChERS sugere diversas vantagens na preparação de amostras, no entanto, são empregadas grandes quantidades de solventes durante sua aplicação. A miniaturização do método mostrou ser possível a obtenção de resultados satisfatórios na determinação dos pesticidas: imidaclopride, carbofurano e tebuconazol em vinhos branco e rosé, utilizando quantidades de solventes e sais 20 vezes menor que o método original, indo de encontro às propostas da química verde. A separação desses analitos foi conseguida através da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de espectrometria no ultravioleta com arranjos de diodo (HPLC-DAD). Utilizando esse sistema, após a otimização do método de preparação da amostra, foram conseguidas recuperações acima de 80% para os 3 pesticidas e, dentro dos valores de limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecido nas legislações vigentes, a técnica se mostrou capaz de obter resultados que garantem seu respeito.

Palavras chave: HPLC-DAD, química verde, preparo de amostra, imidaclopride, carbofurano, tebuconazol

ABSTRACT

The great consumption of wine around the world, associated with the fact that the grapes are produced using pesticides, brings an alert to the consumers, since these toxic substances remain present in the final product, making their residual analysis important in order to ensure compliance with current legislation on the subject. Many techniques have been employed in such determinations, from the preparation of the sample, separation of the analytes, to their detection. The QuEChERS method suggests several advantages in the preparation of samples. However, large quantities of solvents are employed during its application. The miniaturization of the method showed that it is possible to obtain satisfactory results in the determination of the imidacloprid, carbofuran and tebuconazole pesticides in white and rosé wines, using amounts of solvents and salts 20 times smaller than the original method, coinciding with the green chemistry proposals. The separation of these analytes was achieved by the use of high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet spectrometry detector with diode array (HPLC-DAD). Using this system, after optimization of the sample preparation method, recoveries above 80% were achieved for the three pesticides and, within the values of maximum residue limits (MRLs) established in the current legislation, the technique proved capable of obtaining results that guarantee their respect.

Key words: HPLC-DAD, green chemistry, sample preparation, imidacloprid, carbofuran, tebuconazole

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da flavona.....	14
Figura 2. Fórmula estrutural do imidaclopride	24
Figura 3. Fórmula estrutural do carbofurano	25
Figura 4. Fórmula estrutural do tebuconazol.....	27
Figura 5. Etapas do método QuEChERS	32
Figura 6. Cromatograma do vinho branco dopado e do padrão analítico a 10 mg/L	39
Figura 7. Cromatograma comparativo dos métodos QuEChERS e micro QuEChERS para Imidaclopride, Carbofurano e Tebuconazol a 10 mg L ⁻¹	41
Figura 8. Comparação do método QuEChERS original e miniaturizado	41
Figura 9. Estudo da composição da mistura de sais	43
Figura 10. Estudo da proporção dos sais utilizados na separação de fases	45
Figura 11. Avaliação dos métodos de extração comparados ao padrão	46
Figura 12. Curvas analíticas para imidaclopride, carbofurano e tebuconazol .	48
Figura 13. Padrões analíticos com adição de Fe ³⁺ (0,25 µmol, 0,5 µmol e 1,0 µmol)	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de pesticidas e seus organismos alvo	19
Tabela 2. Classes de pesticidas e suas doses letais	20
Tabela 3. Limites máximos de resíduo para uva permitidos na Europa e nos Estados Unidos	23
Tabela 4. Propriedades físico-químicas do imidaclopride	24
Tabela 5. Características físico-químicas do carbofurano.....	26
Tabela 6. Propriedades físico-químicas do tebuconazol	27
Tabela 7. Quantidades de amostra, acetonitrila e sais utilizados na preparação da amostra pelos métodos QuEChERS original e miniaturizado	40
Tabela 8. Composição dos sais no processo de separação de fases.....	42
Tabela 9. Proporção dos sais utilizados no processo de separação de fases .	44
Tabela 10. Comparação do método QuEChERS original e miniaturizado	46
Tabela 11. Figuras de mérito calculadas para Imidaclopride, Carbofurano e Tebuconazol.....	49
Tabela 12. Resultado obtidos das análises de vinho branco dopado a 1000 µg L ⁻¹ , 500 µg L ⁻¹ e 100 µg L ⁻¹	50
Tabela 13. Resultados obtidos das análises de vinho rosé dopado a 1000 µg L ⁻¹ , 500 µg L ⁻¹ e 100 µg L ⁻¹	51
Tabela 14. Resultados obtidos das análises de vinho tinto dopado a 1000 µg L ⁻¹ , 500 µg L ⁻¹ e 100 µg L ⁻¹	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

CV: Coeficiente de variação

DAD: Detecção por arranjo de diodos

DL₅₀: Dose Letal

dp: desvio padrão

EC: Comissão Europeia

EPA: Agência de Proteção Ambiental norte americana

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FL: Faixa linear

GC: Cromatografia gasosa

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

LD: Limite de detecção

LMR: Limite máximo de resíduo

LQ: Limite de quantificação

MS: Espectrometria de massas

OMS: Organização Mundial da Saúde

PSA: Amina primária-secundária

QuEChERS: Quick, Effetive, Cheap, Easy, Rugged and Safe

r²: Coeficiente de correlação

SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SDME: Microextração em gota única

UV: Detecção no ultravioleta

Sumário

1. Introdução	10
1.1. O vinho	10
1.2. Composição química dos vinhos	11
1.3. Produção de vinhos no Brasil	16
1.4. Revolução verde	16
1.5. Pesticidas	17
1.5.1. Histórico	17
1.5.2. Classificação dos Pesticidas	19
1.5.3. Pesticidas de estudo	22
1.5.3.1. Imidaclopride	23
1.5.3.2. Carbofurano	25
1.5.3.3. Tebuconazol	26
1.6. Determinação de pesticidas	28
1.6.1 Preparação da amostra	29
2. Objetivos	33
3. Parte experimental	34
3.1. Equipamentos	34
3.1.1. Condições cromatográficas	35
3.2. Reagentes e soluções	35
3.3. Preparação da amostra	36
3.3.1. Dopagem dos vinhos	36
3.3.2. Extração dos analitos	36
4. Resultados e discussões	38
4.1. Otimização das condições cromatográficas	38
4.2. Otimização do método QuEChERS (preparação da amostra)	39
4.2.1. Estudos preliminares de miniaturização	40
4.2.2. Influência do tipo de sais	42
4.2.3. Proporção dos sais	44
4.2.4. Miniaturização do método QuEChERS	45
4.3. Características analíticas	47
4.4. Análise de vinhos	49
4.4.1. Análise de vinhos dopados	50
4.4.2. Análise de amostras reais de vinhos	55
5. Conclusão	56
6. Referências bibliográficas	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Vinho

Não é dos tempos modernos que as uvas são fermentadas para produzir uma bebida de tamanha apreciação. Provavelmente de forma acidental, as uvas guardadas acabavam por fermentar levando a formação do vinho. Vestígios encontrados em jarras na região das montanhas Zagros no oeste do Irã sugerem sua presença e datam de 5400 a 5000 a.C. Uma combinação de análise química e pesquisa arqueológica fazem dessa descoberta a prova mais consistente da sua origem. Do Oriente Médio a cultura da produção e consumo do vinho se expandiu para outras partes do mundo. Os gregos foram responsáveis pela introdução da bebida no sul da Itália enquanto os romanos levaram esse conhecimento durante seu Império para França, Alemanha e Hungria. Aos poucos, esse conhecimento se desenvolveu e o homem pôde controlar de forma mais adequada as condições para aperfeiçoar as técnicas de cultivo da videira (viticultura), assim como da produção do vinho (vinicultura). (PHILLIPS, 2003)

No Brasil, de acordo com o decreto nº 8.198, de 20 de Fevereiro de 2014, define-se como vinho, a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

O vinho pode ser classificado de acordo com seu teor alcoólico e de açúcares em: (i) vinho de mesa o qual apresenta teor alcoólico entre 8,6 e 14% (v/v) podendo conter dióxido de carbono com pressão de até 1 atm a 20°C; (ii) vinho leve: sua graduação alcoólica é menor do que do vinho de mesa, podendo variar entre 7,0 e 8,5%, originada exclusivamente da fermentação dos açúcares presentes naturalmente nas uvas; (iii) vinho fino: comumente considerado um

vinho de mesa, porém, produzido exclusivamente a partir de uvas da espécie *vitis vinifera* e de tecnologias específicas (ALMEIDA, 2017).

Quanto a coloração, os vinhos são classificados em: tinto, branco e rosé. A diferença da cor se deve aos diferentes processos de produção. Os pigmentos do vinho são oriundos essencialmente da casca das uvas, as quais participam de todo o processo fermentativo do vinho tinto. Eles estão ausentes na produção do vinho branco (que também pode ser produzido a partir de uvas brancas) e, normalmente, permanecem em um curto período nessa etapa de produção, para se obter o vinho rosé. Produzidos em menor escala, os vinhos compostos, vinhos fortificados, vinhos licorosos, dentre outros, são exemplos de outras classes (ALMEIDA, 2017).

1.2 Composição química dos vinhos

Os vinhos apresentam composição química complexa devido à presença de grande variedade de componentes. Sua composição está estritamente relacionada com as variedades das uvas empregadas no seu preparo, além das condições de cultivo (inclusive climáticas), grau de maturação, dentre outros. No processo de produção de vinho, diversos fatores podem também influenciar na composição química final do produto, sendo o processo fermentativo e suas condições um dos principais motivos.

O vinho é produzido basicamente pela fermentação anaeróbica dos açúcares presentes na uva, dos quais se destacam a glicose e a frutose. Estes dois carboidratos simples formam-se na hidrólise da sacarose e o primeiro também pela hidrólise do amido.

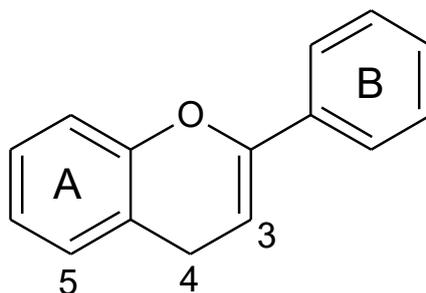
Os principais produtos da fermentação alcoólica são o etanol e o gás carbônico. O segundo pode permanecer solubilizado no vinho em pequenas concentrações no final do processo. Como a fermentação alcoólica ocorre através de uma sequência de muitas reações (mais de 30), cada uma catalisada por uma enzima específica, alguns produtos secundários são formados em baixas concentrações. Alguns destes são a glicerina (ou glicerol), os ácidos succínico, acético, láctico, e pirúvico, o acetaldeído, polialcoóis e um grande número de outras substâncias presentes em concentrações muito baixas. Quando, dentro de uma faixa de pH favorável (4-5), além da presença de aminoácidos e vitaminas essenciais para o desenvolvimento das bactérias lácticas, a fermentação alcoólica pode ser sucedida da fermentação malolática do ácido málico. Nesse caso, forma-se ácido láctico, pequenas quantidades de ácido acético e de outras substâncias. (ALPUIM, 1997). Os principais componentes dos vinhos são:

- Etanol: Depois da água, o etanol é o constituinte majoritário do vinho. Sua concentração pode variar de 8,5 a 14% no vinho de mesa.
- Açúcares: Açúcares residuais da fermentação da uva (glicose e frutose) permanecem no vinho assim como as pentoses das quais se destacam a arabinose, a ramnose e a xilose.
- Polióis: Derivados das hexoses e pentoses, encontra-se alguns polióis nos vinhos. A partir das primeiras, formam-se o sorbitol e o manitol. Das segundas, originam-se o arabinol, xilitol e adositol.
- Ácidos: O pH do vinho pode variar entre 2,8 e 3,8. Alguns processos físico-químicos são dependentes das condições de pH. A precipitação de compostos

ou complexos de ferro (III) e cobre (II), por exemplo, ocorrem numa faixa de pH entre 3,0 e 3,5. A fermentação malolática, embora ocorra em maior ou menor grau, é otimizada em pH alto.

- Compostos fenólicos e polifenóis: São os responsáveis pela coloração do vinho. As transições eletrônicas que ocorrem nos orbitais moleculares π (de ligações duplas) ou em orbitais atômicos que possuem pares de elétrons não ligantes, resultam na cor que pode ser observada no vinho. Os compostos fenólicos podem ser divididos em quatro principais grupos: antocianinas, flavonas, ácidos fenólicos e taninos.

Antocianinas são glucosídeos das antocianidinas que, por sua vez, são flavonóides (grupo mais diversificado e extenso dos compostos fenólicos). A denominação flavonóide deriva das flavonas, por serem essas as mais comuns no meio natural. Antocianidinas e flavonas absorvem luz na região do visível (são cromogênicos). Além disso, são do tipo doador-aceptor complexo, ou seja, apresentam grupos doadores de elétrons nos anéis A e B que interagem com o heteroátomo do anel central (oxigênio) que é um aceptor eletrônico, ou com substituintes dos anéis, geralmente nas posições 3 e 5, eventualmente presentes (Figura 1). Como resultado dessas interações tem-se um aumento do comprimento de onda máximo de absorção. Assim, compostos que não apresentariam cor, passam a ser coloridos enquanto que os que já a apresentavam (como muitas antocianidinas e flavonas), tendem a mudar de cor na direção do vermelho.

Figura 1. Estrutura molecular da flavona

Como as substâncias responsáveis pela cor estão na casca das uvas, torna-se compreensível o fato de vinhos brancos poderem ser obtidos a partir de uvas tintas sabendo-se que, no seu processo de produção, essas películas são descartadas. Já o contrário não seria possível.

O pH tem influência significativa na coloração dos vinhos, dado que o aumento da concentração hidrogeniônica leva a formação de cátions por protonação, tornando as antocianidinas vermelhas (em pH 7 têm a coloração púrpura). Já em meio alcalino, as mesmas tornam-se azuis devido a desprotonação com conseqüente formação do ânion. Isso explica o fato de servirem como indicadores ácido-base. O fato do pH do vinho estar na faixa entre 2,8 e 3,8 explica a coloração vermelha dos vinhos tintos. Contudo, nos vinhos brancos, devido a diferença no processo de produção, a baixa concentração de compostos fenólicos faz com que não influenciem na sua coloração. Complexos do cátion ferro com ácidos orgânicos ou certos compostos fenólicos são amarelos estão presentes nos vinhos brancos. Isso pode explicar, em partes, a coloração apresentada por estes.

As flavonas são compostos flavonoides e se apresentam como pigmentos amarelos em flores e frutos. Na forma de monoglicosídeos dos flavonóis: campferol, quercetina e miricetina, estão presentes nos bagos da uva tinta.

Ácidos fenólicos também são encontrados em uvas e no vinho. Sendo sete ácidos fenólicos além de três ácidos cinâmicos altamente hidroxilados e metoxilados os compostos mais presentes. Suas concentrações variam entre 0,1 e 30 mg/L.

Os taninos são espécies resultantes da polimerização de compostos fenólicos elementares. Se deve basicamente a esses compostos, o sabor adstringente notado nos vinhos.

- Compostos nitrogenados: Além dos compostos do cátion amônio, um grande número de compostos orgânicos nitrogenados, podem ser encontrados nos vinhos. Dentre eles destacam-se os aminoácidos, peptídeos e proteínas; aminas (primárias, secundárias e terciárias); hexosaminas, que são derivados aminados das hexoses; nucleosídeos e nucleotídeos.

- Outros compostos: Além de todas as classes de compostos já citados, pode-se encontrar nos vinhos alguns polissacarídeos como pectinas e protopectinas, que são originárias das paredes celulares da uva. Responsáveis pelos aromas do vinho, compostos como o geraniol, limoneno, nerol, linalol, farnesol, beta-citronelol, alfa-terpineol, etc. estão comumente presentes. Alguns cátions metálicos são encontrados nos vinhos como o K^+ (0,5 a 2,0 g/L); Ca^{2+} e Mg^{2+} (50 a 150 mg/L); Li^+ , Fe^{3+} e Cu^{2+} (>1,0 mg/L); Na^+ (~10 mg/L) dentre outros em menores concentrações.

1.3 Produção de vinhos no Brasil

Entre 2014 e 2016 a área média com cultivo de videiras no Brasil foi cerca de 78 mil hectares. O estado do Rio Grande do Sul detém a maior parte da área cultivada (cerca de 50 mil hectares) o que levou a produção média nesse período, de mais de 700 mil toneladas de uvas, que quando processadas produziram mais de 444 milhões de litros, entre vinhos, sucos e derivados (cerca de 90% da produção nacional). Os vinhos representaram 195 milhões de litros. Isso porque as condições climáticas em 2016 provocaram redução de mais de 52% na produção no estado quando comparada aos anos anteriores (MELLO, 2017).

Além do Rio Grande do Sul, outras regiões do território nacional têm sua representatividade na produção de vinhos. Entre eles se destacam os estados de Santa Catarina e Paraná; no Vale do São Francisco: Pernambuco e a Bahia; na região sudeste: São Paulo e Minas Gerais.

1.4 Revolução verde

No final da Segunda Guerra mundial, grandes empresários internacionais encontraram espaço para o uso da tecnologia para a produção de alimentos. Tal processo recebeu o nome de “Revolução Verde” e seu foco era ampliar os lucros com a produção de produtos da base da alimentação humana, como o trigo, o milho e o arroz. O desenvolvimento de máquinas, tecnologia biológica e agroquímicos (agrotóxicos e fertilizantes) foi fundamental para que essa transformação ocorresse (ANDRADES, 2007).

A substituição da biodiversidade local pela monocultura nos latifúndios provocou, com a devastação da fauna e da flora, a criação de um ambiente ecologicamente desequilibrado com lavouras propícias ao ataque de pragas. Nesse contexto, abre-se o espaço para a implementação do uso de pesticidas, onde há grande interesse econômico por parte de poderosas indústrias químicas que os produzem. O mesmo aconteceu com uso de fertilizantes quando o solo, agora empobrecido, necessita da adição de nutrientes para os cultivos (PINGALI, 2012).

1.5 Pesticidas

Considera-se pesticida, uma substância capaz de eliminar ou controlar um organismo indesejável. Sua ação se baseia na interferência no metabolismo vital dos organismos alvo (BAIRD; CANN, 2011). Quando destinados ao uso agrícola, comumente são denominados agrotóxicos. No Brasil, ao longo das diversas mudanças legais que ocorreram, outras denominações surgiram como agroquímicos ou fitossanitários. Além de serem amplamente utilizados nas lavouras de diversas espécies vegetais, alguns também são destinados ao uso doméstico, industrial, urbano, dentre outros.

1.5.1 Histórico

A queima de enxofre por fumigação na Grécia (cerca de 1000 anos a.C.) é o registro mais antigo do uso de pesticidas. Tal prática perdurou até pelo menos o século XIX. Outros compostos inorgânicos como o fluoreto de sódio e ácido

bórico foram usados domesticamente no controle de formigas e baratas. Compostos de arsênio têm ação inseticidas e foram empregados do período Romano até a década de 50. Fungicidas à base de mercúrio já provocaram envenenamentos em massa (BAIRD; CANN, 2011).

Metais e semimetais tóxicos como o mercúrio e o arsênio não são biodegradáveis e permanecem nos meios naturais e até na cadeia alimentar por período indefinido. Em meados da década de 40, iniciou-se o desenvolvimento de pesticidas orgânicos que passaram a ser utilizados no lugar das substâncias inorgânicas e organometálicas. Geralmente é necessária a utilização de menores quantidades de um pesticida orgânico no controle de pragas, quando comparados aos pesticidas inorgânicos. Inicialmente, os pesticidas orgânicos foram considerados biodegradáveis. Mais tarde essa afirmação foi contestada e, em muitos casos, tida como não verdadeira (BAIRD; CANN, 2011).

Grande parte destes pesticidas são compostos organoclorados dos quais muitos são persistentes, ou seja, apresentam estabilidade frente a degradação e decomposição (WEBER et al., 2010). Possuem baixa solubilidade em água (com a exceção dos oxigenados e/ou nitrogenados), alta solubilidade em ambientes lipofílicos (como o tecido adiposo da matéria viva) e alta toxicidade para insetos. Porém sua persistência ambiental associada ao seu caráter lipofílico que favorecem sua bioacumulação gerou a necessidade de substituição. Nesse momento, surgem os pesticidas organofosforados e carbamatos. Estes apresentam maior suscetibilidade à degradação quando comparados aos organoclorados e, dessa forma, contribuem menos para a bioacumulação nos tecidos vivos. Entretanto, muitos deles apresentam maior toxicidade aguda para humanos e outros mamíferos (BAIRD; CANN, 2011).

Posteriormente, muitas outras classes de pesticidas surgiram, dos quais grande parte se destinou ao uso agrícola.

1.5.2 Classificação dos pesticidas

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com o organismo alvo, toxicidade, grupo químico, dentre outras.

De acordo com o organismo que se deseja eliminar ou controlar, os pesticidas recebem uma denominação específica como pode se observar na Tabela 1.

Tabela 1. Tipos de pesticidas e seus organismos alvo

Tipo de pesticida	Organismo alvo
Inseticida	Insetos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Acaricida	Ácaros
Larvicida	Larvas de insetos
Bactericida	Bactérias
Nematicida	Nematóides
Raticida	Roedores
Algicida	Algas
Avicida	Aves
Moluscicida	Caracóis, lesmas
Nematicida	Nematóides
Cupicida	Cupins
Piscicida	Peixes

Fonte: Baird, C., Química Ambiental, 2011

De acordo com o grupo químico a qual pertencem ou são derivados, os pesticidas recebem uma classificação específica. Os mais clássicos são os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e atrazinas. Com o avanço da tecnologia agroquímica, muitos outros pesticidas foram desenvolvidos. Atualmente, o número de pesticidas disponíveis no mercado é enorme, enquadrando-se nos mais diversos grupos químicos.

A classificação toxicológica de um pesticida é baseada na dose letal da substância (DL_{50}), que pode ser entendida como a massa necessária para provocar a morte da metade da população do organismo em estudo (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011). As quatro classes estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2. Classes de pesticidas e suas doses letais

Classe	Classificação	DL_{50} (mg de pesticida/kg de organismo)
I	Extremamente tóxico	<50
II	Altamente tóxico	50-500
III	Medianamente tóxico	500-5000
IV	Pouco tóxico	>5000

Fonte: Baird, C., Química Ambiental, 2011.

No Brasil, um grande número de casos de intoxicação por contaminação com pesticidas (e até óbito em alguns casos) é registrado anualmente. Nos anos de 2011 e 2012, tem-se registro no SINITOX, de 5075 e 4656 casos,

respectivamente, de intoxicação por pesticidas de uso agrícola no território nacional. A tentativa de suicídio representa mais de 40% dos motivos de intoxicação. Isso porque esses venenos são facilmente adquiridos no comércio, principalmente na zona rural. As intoxicações ocupacionais representam cerca de um quarto desse número e os acidentes individuais, coletivos e ambientais aproximadamente outro quarto do todo. Nesses dois anos foram registrados 19 casos de intoxicação por alimentos contaminados (SINITOX, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declara que para cada caso de intoxicação por pesticidas notificado, há cerca de 50 casos não são notificados.

Como pode ser observado na Tabela 2, a classificação toxicológica é baseada na DL_{50} , na qual são administradas, relativamente, grandes quantidades da substância tóxica. A esse tipo de intoxicação, em que rapidamente se pode perceber os sintomas, dá-se o nome de intoxicação aguda. Já no caso em que o indivíduo tem contato contínuo e prolongado com o composto tóxico (a exemplo do consumo de alimentos contaminados com agrotóxicos) considera-se “intoxicação crônica” (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011).

É muito importante ressaltar que os registros de intoxicação relatados referem-se aos casos de intoxicação aguda, uma vez que foi possível notar os sintomas para tal conclusão. Identificar os casos de intoxicação crônica é uma tarefa mais árdua, pois os sintomas, quando surgem, podem demorar meses, anos ou até décadas para se manifestar (HUMAN RIGHTS COUNCIL, 2017). Outra questão é a associação de diversos pesticidas diferentes em um determinado período. Tais associações podem resultar em diferentes

mecanismos toxicológicos em um determinado organismo por um efeito denominado sinergismo.

1.5.3 Pesticidas de estudo

Foram selecionados para esse trabalho de pesquisa, três pesticidas: carbofurano, imidaclopride e tebuconazol. Os dois últimos estão relacionados na lista de agrotóxicos registrados para o cultivo da uva no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO, 2014) .

O uso do carbofurano não é permitido na Europa tampouco nos Estados Unidos, no entanto, estudos recentes apontam a presença de resíduos desse pesticida em vinhos brasileiros, chilenos, argentinos e portugueses em concentrações que atingem $26,3 \mu\text{g L}^{-1}$ (DOS ANJOS; DE ANDRADE, 2015).

Não existem legislações específicas para tolerâncias residuais em vinhos (somente para uvas) para nenhum dos pesticidas desse trabalho. Desde a uva que será processada até se obter o vinho, a concentração de um pesticida pode variar de acordo com a etapa do processo. Um estudo que investigou, dentre outros pesticidas, o imidaclopride, mostrou que a variação de sua concentração é muito pequena durante todo o processo. No entanto, para outros analitos, essa variação pode ser significativa (PAZZIROTA et al., 2013).

Na Tabela 3 são apresentados valores dos limites máximos de resíduo (LMR) tolerados para uva na Europa e nos Estados Unidos, e que servem como referência para a elaboração das regulamentações nacionais.

Tabela 3. Limites máximos de resíduo para uva permitidos na Europa e nos Estados Unidos.

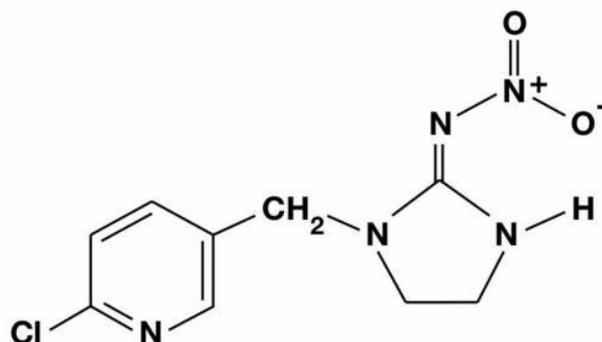
	LMR (mg kg ⁻¹)	
	Europa ^(a)	Estados Unidos ^(b)
Imidaclopride	1,0	1,0
Carbofurano	0,002	0,4*
Tebuconazol	1,0	5,0

Fonte: (a) Comissão Europeia (EC); (b) Agência de Proteção Ambiental norte-americana (EPA); *Legislação expirada em 2009.

1.5.3.1 Imidaclopride

O imidaclopride pertence a maior classe de novos inseticidas sintéticos, denominada neonicotinóides. É utilizado mundialmente no controle de insetos em diversos cultivos do agronegócio e de pulgas em animais domésticos. Embora apresente baixa toxicidade, um estudo realizado por Ramazan Bal e colaboradores aponta diminuição da fertilidade de ratos machos quando submetidos a exposição crônica (longa exposição a substâncias tóxicas em concentrações reduzidas), mesmo em concentrações inferiores a 1,0 mg/kg de massa corporal (BAL et al., 2012). Introduzido inicialmente nos Estados Unidos em 1991, o primeiro inseticida derivado da nicotina, foi licenciado na Europa 3 anos depois.

A fórmula estrutural do imidaclopride está representada na Figura 2 e suas propriedades físico-químicas na Tabela 4.

Figura2. Fórmula estrutural do Imidaclopride

Fonte: Próprio autor

Tabela 4. Propriedades físico-químicas do imidaclopride

Nome	1[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]- <i>N</i> -nitro-2-imidazolidinimine
Fórmula molecular	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Massa molar (g mol ⁻¹)	255,7
Ponto de fusão (°C)	144
Densidade (g mL ⁻¹)	1,54
Solubilidade em água a 20°C (mg L ⁻¹)	610
Coefficiente de partição octanol/água (logP)	0,57

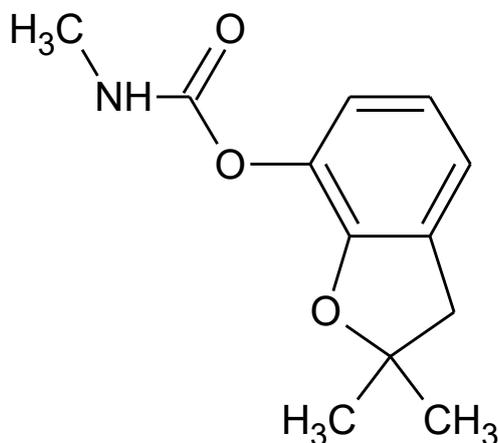
Fonte: Pesticide Properties DataBase

1.5.3.2 Carbofurano

Pesticida do grupo N-metil carbamato amplamente utilizado como inseticida, nematicida e acaricida sistêmico e de contato. Apresenta um amplo espectro de atividade contra diversas pragas da atividade agrícola. Por apresentar alta toxicidade para mamíferos ($DL_{50} = 8-11$ mg/kg em ratos), e muitas outras espécies animais, requer grande cuidado para se evitar a contaminação ambiental afim de se preservar a saúde humana e da biota (OTIENO et al., 2010). O carbofurano apresenta toxicidade elevada mesmo em baixos níveis de exposição, podendo apresentar efeitos agudos, subagudos e crônicos em organismos não alvos (GUPTA, 1994).

A Figura 3 representa a fórmula estrutural do carbofurano e suas propriedades físico-químicas estão representadas na Tabela 5.

Figura 3. Fórmula estrutural do Carbofurano



Fonte: Próprio autor

Tabela 5. Características físico-químicas do carbofurano

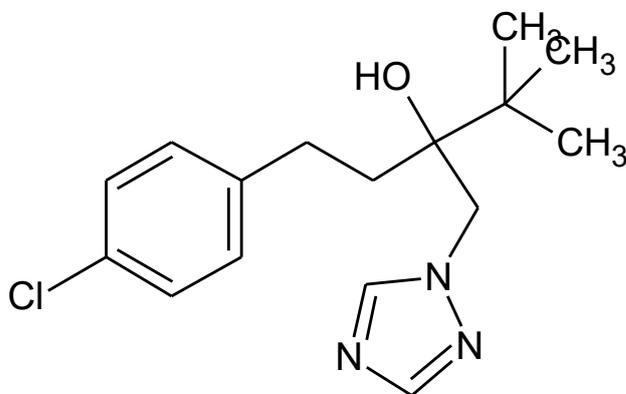
Nome	2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ylmethylcarbamate
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
Massa molar (g mol ⁻¹)	221,3
Ponto de fusão (°C)	153
Densidade (g mL ⁻¹)	1,26
Solubilidade em água a 20°C (mg L ⁻¹)	322
Coefficiente de partição octanol/água (logP)	1,8

Fonte: Pesticide Properties DataBase

1.5.3.3 Tebuconazol

Fungicida sistêmico que apresenta um amplo espectro de ação. Pertencente ao grupo químico dos triazóis, o tebuconazol é mundialmente utilizado no controle de fungos patógenos de frutas, castanhas, cereais e verduras. Seus resíduos podem persistir nos frutos e outras partes vegetativas das plantas, tornando seu controle uma ação importante afim de garantir a preservação da saúde humana (YOU et al., 2016).

A fórmula estrutural do tebuconazol está representada na Figura 4. Na Tabela 6 estão representadas suas propriedades físico-químicas.

Figura 4. Fórmula estrutural do Tebuconazol

Fonte: Próprio autor

Tabela 6. Propriedades físico-químicas do tebuconazol

Nome	(RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol
Fórmula molecular	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O
Massa molar (g mol ⁻¹)	307,8
Ponto de fusão (°C)	105
Densidade (g mL ⁻¹)	1,25
Solubilidade em água a 20°C (mg L ⁻¹)	36
Coeficiente de partição octanol/água (logP)	3,7

Fonte: Pesticide Properties DataBase

A toxicidade apresentada por esses compostos torna importante a análise de vinhos para verificar se, uma vez presentes nos mesmos, suas quantidades estão abaixo dos limites de resíduos regulamentados.

1.6 Determinação de pesticidas em vinho

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para a determinação residual de pesticidas em alimentos. Devido à complexidade das amostras de vinhos, os procedimentos propostos para determinação de pesticidas, usualmente empregam técnicas analíticas de separações. As técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas para esse fim. Particularmente, para a análise de vinhos e sucos de uva, segundo um trabalho de revisão de autoria de Baohui Jin e colaboradores (JIN et al., 2012), verificou-se que a maioria dos artigos publicados relacionados ao tema, reporta o uso de cromatografia gasosa (GC) para essas determinações. Contudo, uma parcela significativa dos artigos adota a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a separação dos analitos com diferentes tipos de detecção, embora o sistema de detecção acoplado mais amplamente utilizado seja a espectrometria de massas (MS).

Um estudo recente efetuou uma simples preparação da amostra de vinhos através de centrifugação, diluição do sobrenadante numa mistura de acetonitrila/água (1:9) seguida de filtração. Cromatografia líquida foi aplicada para a separação dos 3 analitos, cuja fase móvel por gradiente foi composta por ácido fórmico (1%) e acetonitrila. A simplicidade do método de preparação se deve à técnica de detecção empregada (espectrometria de reflectância) utilizando biosensores significativamente seletivos (KOUKOUVINOS et al., 2017)

A detecção por captura eletrônica foi reportada em um trabalho realizado por Wei-Jun Kong e colaboradores em que foram determinados resíduos de 27 pesticidas em vinhos. O método QuEChERS foi utilizado na preparação das amostras e a cromatografia gasosa (GC) empregada na separação dos analitos (KONG et al., 2016).

1.6.1. Preparação da amostra

A complexidade das amostras de vinhos e os baixos níveis de concentração os quais os pesticidas estão presentes neste tipo de amostra, tornam necessário o emprego de etapas de preparo de amostra para remoção de potenciais interferentes e/ou pré-concentração dos analitos. Diversas técnicas têm sido empregadas para este fim, como: (i) extração líquido-líquido (CABRAS et al., 2001) em que foram empregados 10 mL de hexano para a extração de pesticidas em 10 g de amostras de vinho; (ii) extração em fase sólida (TOPUZ; ÖZHAN; ALPERTUNGA, 2005) onde os analitos foram adsorbidos em um material sólido previamente tratado com 20 mL de metanol e eluídos com 3 mL de diclorometano; (iii) microextração em fase sólida (RAVELO-PÉREZ et al., 2008) onde uma fibra contendo o material adsorvente foi adicionado diretamente na amostra e a eluição dos pesticidas realizada com a utilização de 1 mL de metanol; (iv) extração em barra sortiva (MAGGI et al., 2008), (v) dispersão de matriz em fase sólida (ALBERO; SÁNCHEZ-BRUNETE; TADEO, 2003), trabalho em que foram empregados de 2 a 10 mL de acetato de etila para a eluição dos analitos, de acordo com o nível de fortificação adotado; (vi) microextração em gota única (MARTENDAL; BUDZIAK; CARASEK, 2007) onde, apesar da

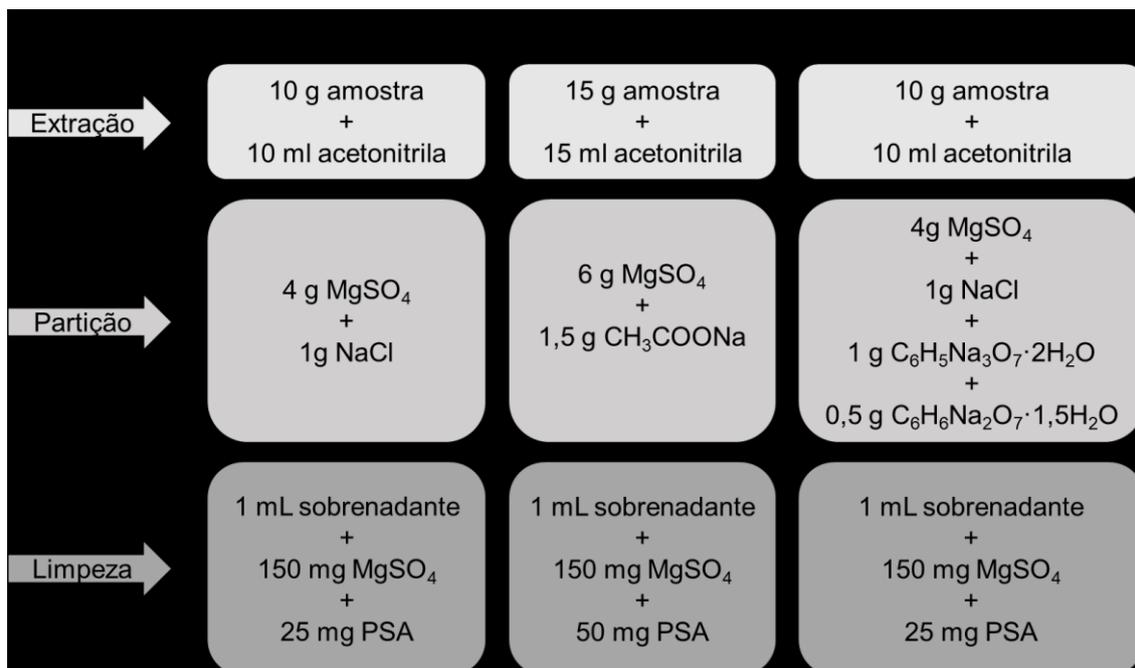
utilização de ínfimas quantidades de solvente no processo de extração (2 μL) as seringas utilizadas foram, após cada análise, lavadas 20 vezes com acetona e 10 vezes com 1-octanol. Apesar destas técnicas apresentarem alta eficiência na etapa de limpeza da amostra e pré-concentração, o seu desempenho na análise de multiresíduos de pesticidas, em alguns casos, não é satisfatório devido a diversidade das características físico-químicas dos analitos. Além disso, em muitos casos é empregada uma grande quantidade de solventes em todo o processo de extração.

Uma técnica que mostra eficiente no que se diz respeito a economia de reagentes é a microextração em gota única (SDME). Em um artigo publicado, o autor utiliza uma seringa de injeção cromatográfica em que uma micro gota com volume de 1 μL de tolueno foi exposta no interior da amostra de vinho. Após 30 minutos de agitação magnética, a gota contendo os analitos extraídos foi recolhida para o interior da seringa foi imediatamente injetada no sistema de cromatografia gasosa (DOS ANJOS; DE ANDRADE, 2015).

Uma técnica que foi recentemente utilizada se baseia na adição de dicloroetano (solvente extrator) para a extração de pesticidas organofosforados e atrazinas em vinhos. Através da agitação por vortex por 30 segundos, seguida de banho de ultrassom por 10 minutos. O método é conhecido como microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vortex e tem como vantagens a pré concentração dos analitos além da utilização de pequenas quantidades de solvente para a extração (250 μL no caso desse estudo) (CINELLI et al., 2014).

Outra técnica bastante recente e que foi aplicada à determinação de inseticidas em amostras de vinho é a microextração líquido líquido dispersiva assistida por evaporação. Em um artigo publicado em 2017, Irina Timofeeva e colaboradores adicionaram 400 μL de uma mistura (1:1) de diclorometano (alta densidade e volatilidade) e hexanol (baixa densidade) a 10 mL de amostra de vinho branco num frasco cônico que, após agitação permanece no fundo do frasco. Após a adição de glicose e aquecimento ocorreu a transferência dos analitos para a parte superior enquanto o diclorometano evapora e os analitos presentes no octanol, menos denso e menos volátil. Essa fase sobrenadante foi então analisada através de um sistema HPLC-MS. Assim, são utilizados pequenos volumes de solvente (TIMOFEEVA et al., 2017).

Afim de se contornar as limitações dos métodos multiresíduos existentes, foi proposto um novo procedimento para a extração dos pesticidas em amostras de alimentos da agricultura, conhecido como QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) (ANASTASSIADES et al., 2003). O método surge com a proposta de ser, supostamente, muito vantajoso por sua rapidez, facilidade, economia, eficiência, robustez e segurança, características que lhe conferem o nome. A praticidade, o desnecessário uso de instrumentações específicas, seu excelente desempenho e compatibilidade com a maioria das técnicas de separação popularizaram o método QuEChERS. Ele é baseado em três etapas: (i) extração com acetonitrila; (ii) partição promovida pela adição de sais e (iii) extração em fase sólida. Na Figura 5 estão apresentadas as principais etapas do método QuEChERS original e duas variantes. Contudo, o método original sugere o emprego de uma quantidade relativamente grande de solvente (10 mL de acetonitrila).

Figura 5. Etapas do método QuEChERS

A utilização do método QuEChERS na determinação de 17 pesticidas em vinho tinto foi reportada em um estudo (WANG; TELEPCHAK, 2013) seguindo o método tradicional em que foram empregados 10 mL de acetonitrila para a extração dos analitos e a adição de sais para a separação de fases (partição). Nesse trabalho foi feita a limpeza da amostra utilizando diferentes quantidades de PSA (extração em fase sólida dispersiva). A medida em que se aumentou a quantidade de PSA, as amostras tornaram-se mais claras, uma vez em que pigmentos, açúcares e ácidos orgânicos são removidos, otimizando a determinação dos pesticidas estudados.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um procedimento de preparo de amostra baseado na metodologia QuEChERS para determinação residual de 3 pesticidas em vinhos, que são conhecidamente empregados no cultivo da videira, por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrofotometria no ultravioleta. Dessa forma, poder assegurar que os limites máximos de resíduo (LMR) regulamentados sejam respeitados.

Objetivos específicos incluem a miniaturização do procedimento QuEChERS pela avaliação do uso de diminutas quantidades de solvente e sais a fim de se obter resultados compatíveis com o método original, seguindo assim, as tendências da química verde no sentido de minimizar a geração de resíduos. A aplicação do procedimento otimizado à análises de vinhos tintos, rosé e branco constitui o objetivo final deste trabalho.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos

Foram utilizados dois instrumentos analíticos: Um cromatógrafo líquido de alta eficiência modular Shimadzu LC-10AVP equipado com bomba LC-10ADvp, válvula selenoide FCV-10ALvp, degaseificador DGU-2A, forno CTO-10Avp, detector de ultravioleta SPD-10Avp e interface SCL-10Avp. O segundo equipamento é um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-6AD equipado com detector de ultravioleta com arranjo de diodos SPD-M20A.

Na otimização do método foi utilizado o sistema de injeção manual primeiramente descrito. Para estimativa das características analíticas e análises das amostras foi empregado um sistema automatizado devido ao grande número de amostras a serem analisadas e pela maior sensibilidade que apresenta, devido a sua tecnologia mais recente.

Em conjunto com ambos os sistemas se fez o uso de uma coluna de separação de fase reversa da Phenomenex, Gemini 5u C18 CLC-ODS de 150 x 4,6mm d.i. As injeções manuais foram realizadas com o auxílio de uma seringa de injeção para cromatografia.

As pesagens dos sais e padrões analíticos foram realizadas utilizando uma balança analítica (Shimadzu, AUY220). Para centrifugação utilizou-se uma mini centrífuga Interprise Modelo C1008-P.

3.1.1 Condições cromatográficas

Na separação dos analitos foi utilizada fase móvel por gradiente composta por acetonitrila e água cuja composição (ACN/água) variou, nos primeiros 10 minutos da corrida, da proporção em volume de 20:80 até 80:20. Dos 10 aos 15 minutos a composição retornou a proporção inicial (20:80) e assim permaneceu até o final da corrida, totalizando 20 minutos. A temperatura do forno foi fixada em 35°C. Durante a etapa de otimização do método o detector foi fixado no comprimento de onda de 220nm. Na etapa final do trabalho (análise de vinhos) utilizando o cromatógrafo automatizado com detecção UV-DAD, foi selecionado o comprimento de onda de absorção máxima para cada analito: 296 nm para o imidaclopride e 221 nm tanto para o carbofurano como o tebuconazol.

3.2 Reagentes e soluções

A água deionizada ($R \geq 18M\Omega\text{cm}$) utilizada na preparação de todas as soluções foi obtida de um sistema de purificação Q (Milipore – DirectQ, Belford, MA, USA). Acetonitrila com grau de pureza HPLC ($\geq 99,9\%$), foi adquirida da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Sulfato de magnésio, cloreto de sódio e acetato de sódio, todos de pureza analítica (PA) foram obtidos da Synth (Diadema, Brasil). Os padrões analíticos dos pesticidas foram obtidos da Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemanha).

3.3 Preparação da amostra

3.3.1 Dopagem dos vinhos

As amostras de vinho foram dopadas com soluções de acetonitrila/água na proporção 1:1 (proporção média da composição da fase móvel por gradiente durante a corrida) contendo os padrões analíticos dos três pesticidas. Diferentes concentrações foram obtidas especificamente para cada etapa do presente trabalho.

3.3.2 Extração dos analitos

A extração dos pesticidas foi realizada utilizando o método QuEChERS miniaturizado, na qual uma alíquota de 0,5 mL da amostra foi transferida para um frasco eppendorf com capacidade para 2,0 mL, seguido da adição de 0,5 mL de acetonitrila. A mistura foi agitada manualmente por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 150 mg de acetato de sódio anidro e 50 mg de cloreto de sódio. Novamente foi realizada agitação manual por 1 min. As amostras foram, então, centrifugadas por 5 min conseguindo-se, assim, a formação de um sistema bifásico (aquoso e orgânico). Cerca de 100 µL da fase orgânica foram extraídos manualmente com o auxílio de uma seringa de injeção para cromatografia e imediatamente injetada no sistema de cromatografia para análise. Quando utilizado o sistema HPLC-DAD, removeu-se cuidadosamente (também através da seringa) praticamente todo o volume da fase orgânica

transferindo-o para um frasco de vidro tipo vial com capacidade para 2,0 mL, para amostragem automatizada.

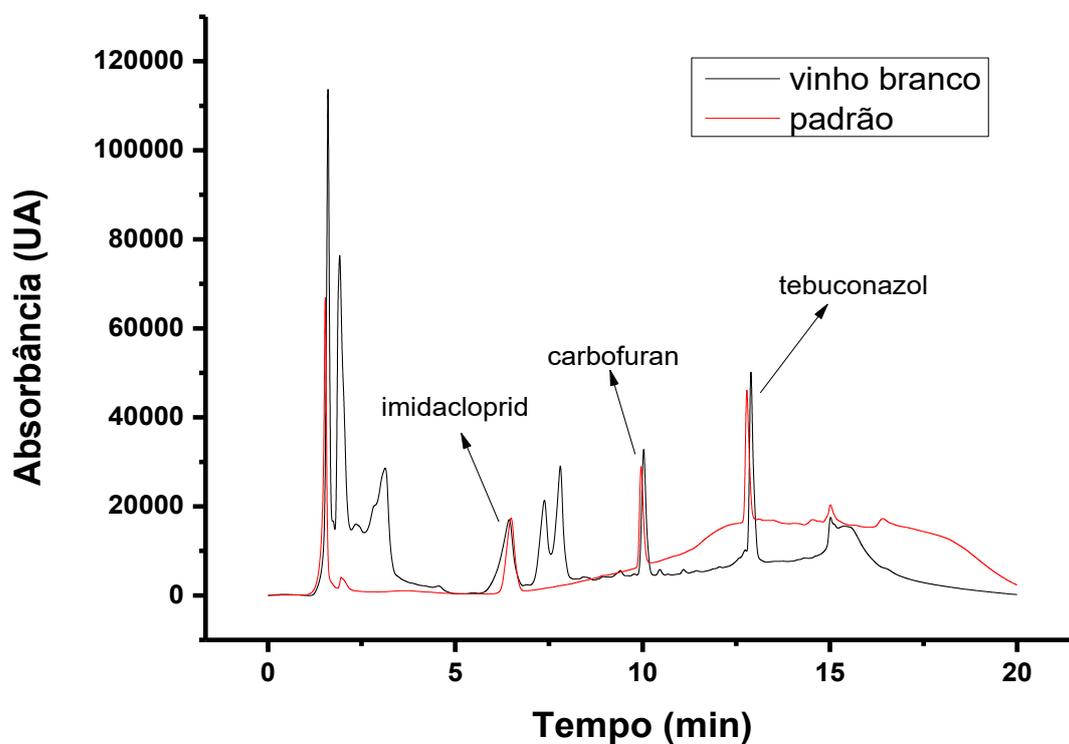
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização das condições cromatográficas (HPLC-UV)

Na tentativa de separação dos analitos adotando-se eluição isocrática, muitos interferentes das amostras de vinho se sobrepueram aos picos dos analitos investigados, especialmente ao imidaclopride, cujo tempo de retenção foi o menor (molécula mais polar). Isso se deve à presença de compostos polares presentes no vinho que foram extraídos juntamente com os pesticidas durante a preparação da amostra. Para solucionar esse problema foi adotada a eluição por gradiente. Uma vez que no início da corrida a concentração de água foi muito elevada (80%), a maior parte desses compostos polares da amostra foram removidos da coluna nos primeiros 3 minutos de corrida (tempo morto). Nessas condições, o primeiro analito (imidaclopride) foi eluído aos 6,5 minutos, possibilitando assim, sua detecção sem interferências que a comprometessem. Os tempos de retenção do carbofurano e do tebuconazol foram, respectivamente, 10,0 min e 12,8 min. Assim, logo no primeiro ensaio obteve-se um gradiente que possibilitou a separação dos pesticidas dos interferentes da matriz. As condições cromatográficas estão descritas detalhadamente no item 3.1.1.

Os cromatogramas da amostra de vinho branco dopado a 10 mg L^{-1} e do padrão analítico na mesma concentração estão representados na Figura 6.

Figura 6. Cromatograma do vinho branco dopado e do padrão analítico a 10 mg/L



4.2 Otimização do método QuEChERS (preparação da amostra)

Alguns parâmetros do procedimento de preparação da amostra pelo método QuEChERS foram otimizados através de análises realizadas fazendo-se uso do sistema de HPLC-UV. Em todos os ensaios realizados, foram preparadas amostras de vinho branco dopadas com Imidaclopride, Carbofurano e Tebuconazol com concentração final de 10 mg L⁻¹ para cada analito. A preparação das amostras foi realizada em triplicata.

4.2.1 Estudos preliminares de miniaturização

Tendo como objetivo minimizar a quantidade de solventes e sais utilizados na preparação da amostra, o método original foi miniaturizado reduzindo-se as quantidades dos reagentes em 20 vezes. As massas de sais utilizadas foram reduzidas proporcionalmente à redução dos volumes de amostra e acetonitrila. Tais quantidades estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7. Quantidades de amostra, acetonitrila e sais utilizados na preparação da amostra pelos métodos QuEChERS original e miniaturizado.

	Amostra (mL)	ACN (mL)	MgSO₄ (g)	NaCl (g)
QuEChERS original	10	10	4	1
QuEChERS miniaturizado	0,5	0,5	0,2	0,05

Excepcionalmente para este ensaio preliminar, a preparação das amostras, assim como as análises foram realizadas em procedimento único. Os resultados comparativos entre o método QuEChERS original e miniaturizado podem ser observados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7. Cromatograma comparativo dos métodos QuEChERS e micro QuEChERS para Imidaclopride, Carbofurano e Tebuconazol a 10 mg L^{-1}

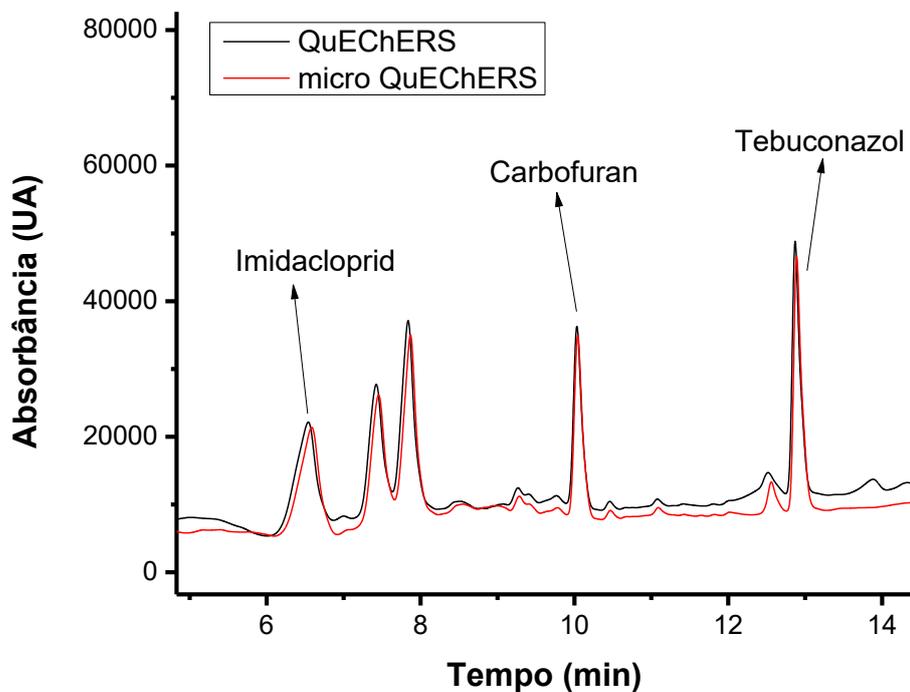
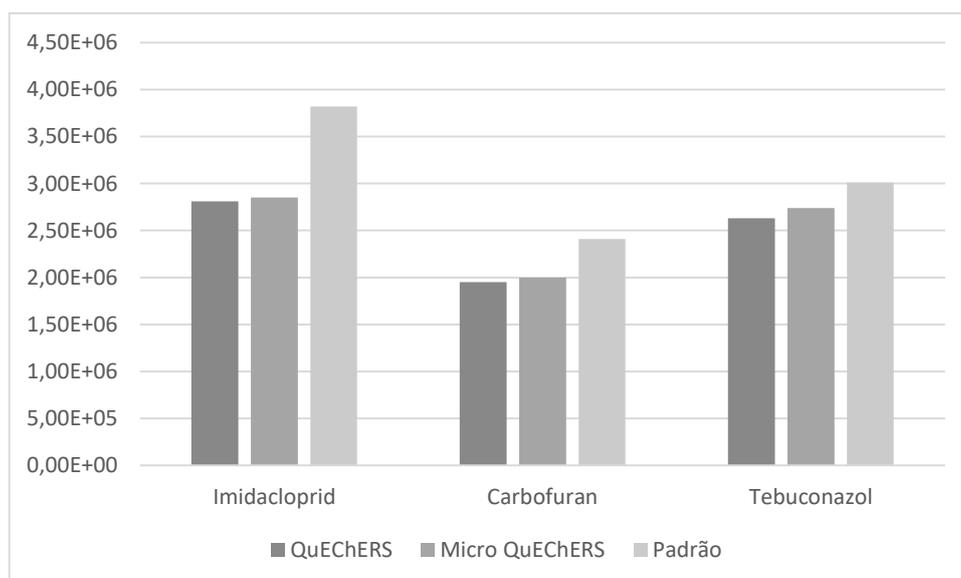


Figura 8. Comparação do método QuEChERS original e miniaturizado.



A partir da comparação das áreas dos picos calculadas, pode-se concluir que a variação observada não compromete as análises realizadas pelo método QuEChERS miniaturizado quando comparado ao método original. Contudo, o ensaio foi realizado posteriormente em triplicata (com os subsequentes parâmetros otimizados) e os resultados podem ser observados no item 4.2.4.

4.2.2 Influência do tipo de sais

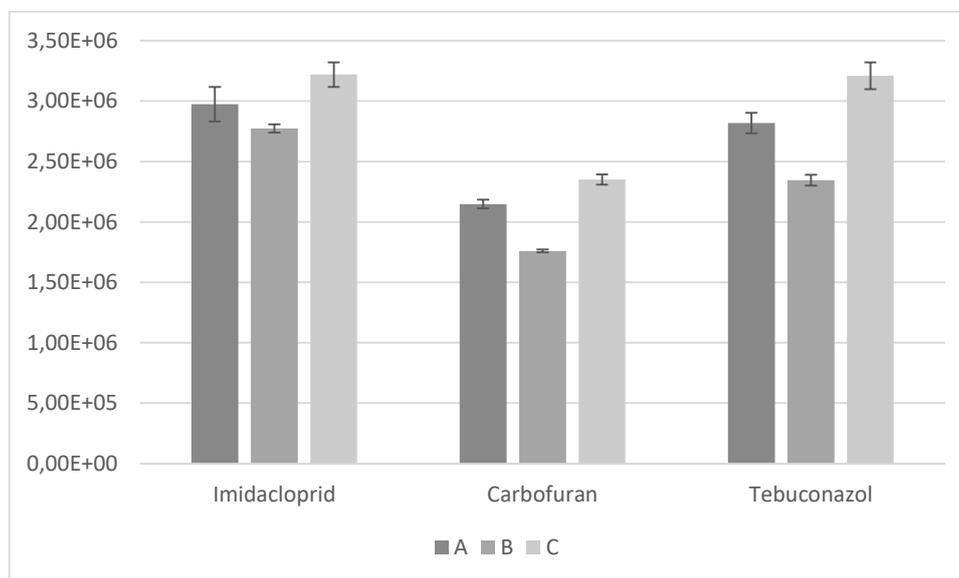
A adição de sais a mistura de amostra e acetonitrila tem a função de mudar as propriedades físico-químicas do sistema a fim de se obter duas fases e diminuir a solubilidade dos analitos na fase aquosa (amostra). Com o intuito de se obter a melhor combinação de sais para a separação das fases (*salting out*), três diferentes composições foram estudadas. Para tal comparação, estudou-se o comportamento de três misturas, cada uma composta por dois dos seguintes sais: MgSO_4 , NaCl e CH_3COONa . A Tabela 8 relaciona as combinações utilizadas assim como suas massas.

Tabela 8. Composição dos sais no processo de separação de fases.

Experimento	Na_2SO_4 (mg)	NaCl (mg)	CH_3COONa (mg)
A	200	50	-
B	200	-	50
C	-	100	100

Os resultados obtidos pelas análises cromatográficas estão representados na Figura 9.

Figura 9. Estudo da composição da mistura de sais



Das três diferentes composições de misturas binárias de sais, a mistura composta por NaCl e CH₃COONa se mostrou mais eficaz na extração dos três analitos.

Na composição de melhor desempenho (mistura C), os sais se solubilizaram por completo na fase aquosa. Já nas combinações A e B, uma parcela significativa da mistura de sais permaneceu na forma cristalizada. As evidências apontam para o sulfato de sódio como sendo o sal que não dissolveu-se por completo, afinal, este não estava presente na combinação C, totalmente solubilizada. Isso se deve a menor solubilidade do sulfato de sódio (139 g L⁻¹) frente ao acetato (465 g L⁻¹) e cloreto de sódio (359 g L⁻¹). Melhor desempenho de limpeza da amostra e extração dos analitos foi observado nas composições contendo NaCl, pois este contribui na redução da extração de interferentes

polares da matriz, além de diminuir a solubilidade dos analitos na fração aquosa (Correia-Sá, et. al, 2012).

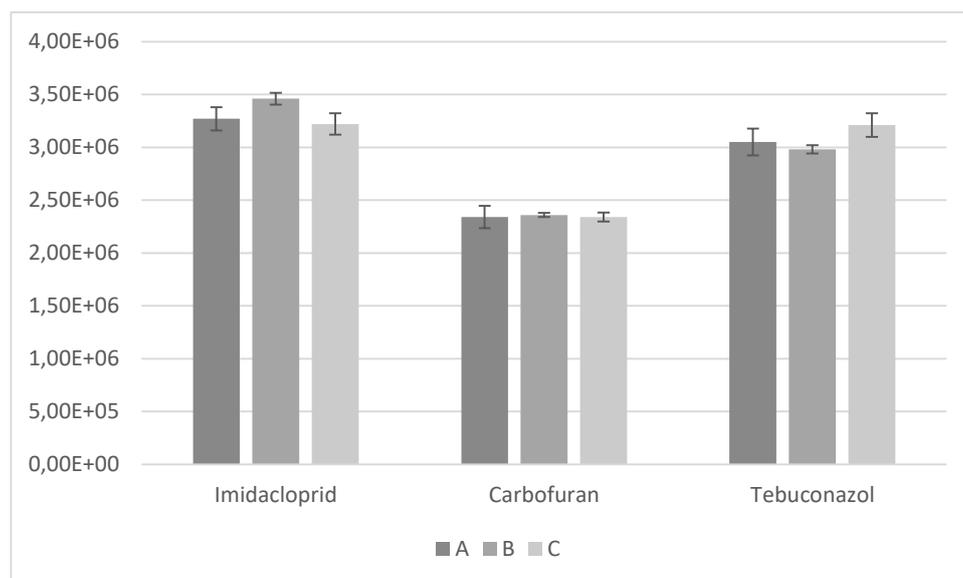
4.2.3 Proporção dos sais

Verificou-se também a influência de diferentes proporções dos sais utilizados para a separação de fases na preparação da amostra. Na Tabela 9 estão relacionadas as quantidades e proporções dos sais da combinação que apresentou os melhores resultados no estudo do item 4.2.2.

Tabela 9. Proporção dos sais utilizados no processo de separação de fases

Experimento	NaCl (mg)	CH₃COONa (mg)	Proporção
A	150	50	3:1
B	50	150	1:3
C	100	100	1:1

Os resultados das análises estão representados na Figura 10.

Figura 10. Estudo da proporção dos sais utilizados na separação de fases

Quando os dois sais anteriormente selecionados (NaCl/CH₃COONa) foram utilizados na proporção de 1:3, a extração dos pesticidas foi maior exceto para o tebuconazol, para o qual a proporção C se mostrou mais eficiente.

4.2.4 Miniaturização do método QuEChERS

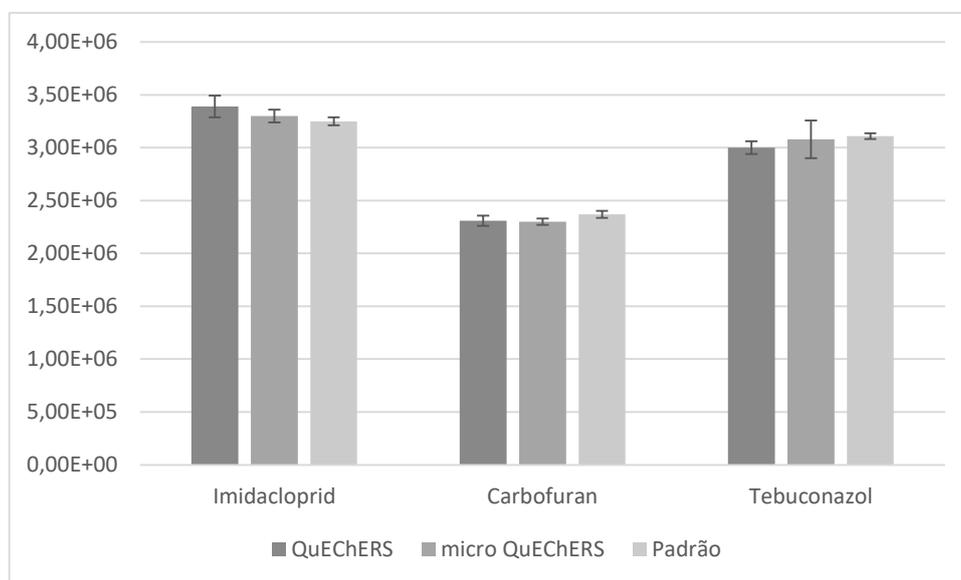
A miniaturização do método de preparação da amostra de vinhos, agora sendo conhecidas as melhores composição e proporção dos sais, foi realizada novamente, dessa vez em triplicata. As quantidades de amostra dopada, acetonitrila e sais estão representadas na Tabela 10.

Tabela 10. Comparação do método QuEChERS original* e miniaturizado

	Amostra (mL)	ACN (mL)	NaCl (g)	CH₃COONa (g)
QuEChERS original*	10	10	3	1
QuEChERS miniaturizado	0,5	0,5	0,15	0,05

*Escolha e proporção de sais otimizadas

Pode-se observar os resultados obtidos comparados ao padrão analítico na Figura 11.

Figura 11. Avaliação dos métodos de extração comparados ao padrão

A miniaturização do método QuEChERS se mostrou efetiva, não apresentando resultados significativamente diferentes comparada ao método original. O procedimento miniaturizado consome 20 vezes menos sais,

acetonitrila e amostra, além de não empregar a fase de extração em fase sólida dispersiva com PSA, o que resulta em um procedimento mais barato, rápido e ambientalmente amigável, seguindo as proposições da química verde principalmente na prevenção, minimizando a produção de resíduo.

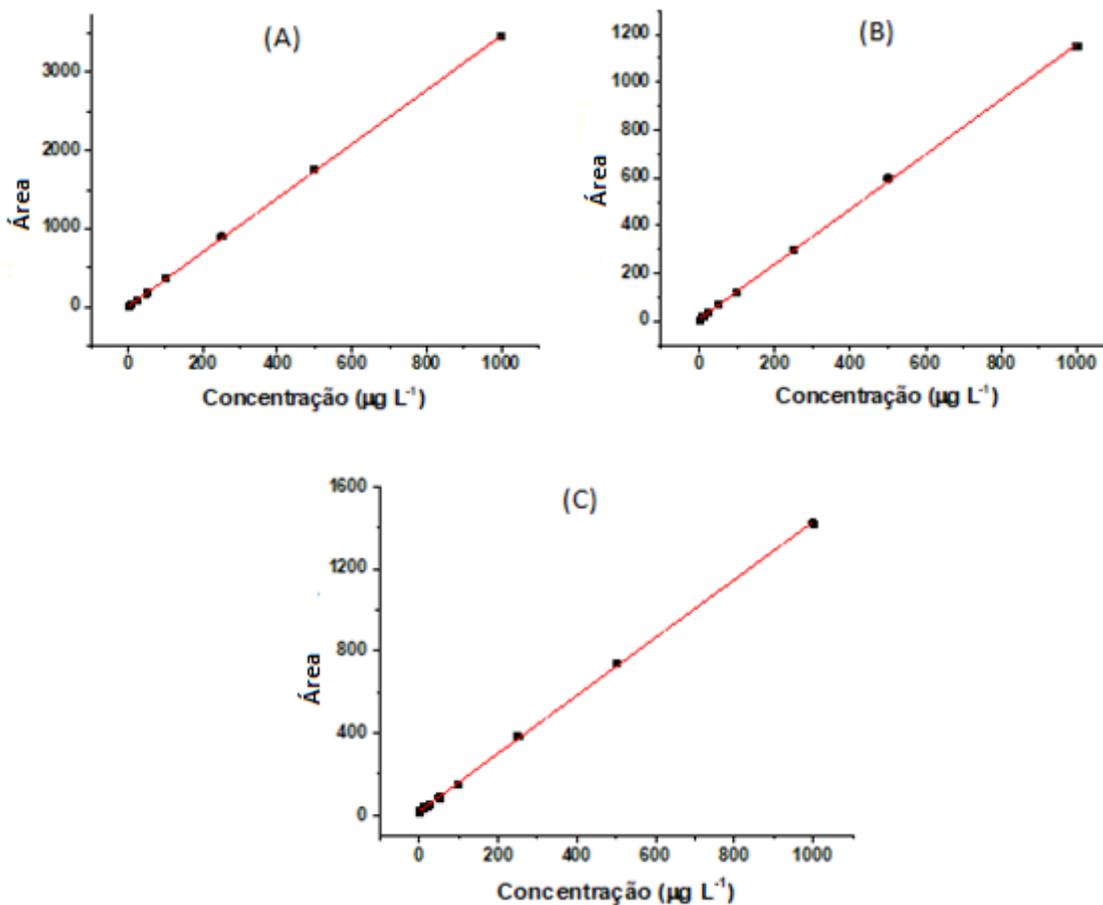
Como citado no item 1.6.1, em diversos outros artigos é reportada a utilização de diferentes técnicas de extração em que foram utilizados volumes de solventes muito maiores.

4.3 Características analíticas (HPLC-DAD)

Para a construção das curvas analíticas foram preparadas 9 soluções contendo os 3 pesticidas estudados nesse trabalho. A faixa de concentrações analisada (em $\mu\text{g L}^{-1}$) foi de 1 a 1000. O solvente utilizado é uma mistura de acetonitrila e água deionizada na proporção em volume de 1:1 (composição média da fase móvel por gradiente durante os 20 minutos de corrida).

Na Figura 12 são apresentadas as curvas analíticas obtidas para imidaclopride, carbofurano e tebuconazol.

Figura 12. Curvas analíticas para imidaclopride (A), carbofurano (B) e tebuconazol (C)



Baseados nas curvas analíticas da Fig. 11 foram calculados os parâmetros para a apresentação das figuras de mérito na Tabela 11. O cálculo do limite de detecção (LD) foi realizado adotando-se a expressão matemática representada pela Equação 1.

$$LD = \frac{3 \times dp}{b}$$

Equação 1. Cálculo do limite de detecção

Onde: dp = desvio padrão do branco (linha base); b = coeficiente angular

O limite de quantificação (LQ) foi calculado multiplicando-se o limite de detecção por 3.

Tabela 11. Figuras de mérito calculadas para Imidaclopride, Carbofurano e Tebuconazol a partir das curvas analíticas da Figura 11.

Analito	FL ($\mu\text{g L}^{-1}$)	n	r^2	a	b	CV(%)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)
Imidaclopride	1 -1000	8	0,9998	2,1331	3468,458	1,47	0,097	0,29
Carbofurano	1 -1000	8	0,9996	8,2784	1150,502	2,47	0,17	0,51
Tebuconazol	1 -1000	8	0,9996	18,9908	1411,247	2,26	0,14	0,42

Onde: FL = faixa linear; n = número de pontos na curva; r^2 = coeficiente de correlação; a = coeficiente linear; b = coeficiente angular; CV = coeficiente de variação; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação

4.4 Análise de vinhos

Seis vinhos, sendo 3 tintos, 2 brancos e 1 rosé foram adquiridos em um mercado local. Efetuou-se prova de branco em todas as amostras. Um vinho de cada tipo (totalizando 3 vinhos) foi dopado em 3 diferentes concentrações.

Com todos os parâmetros de preparação das amostras otimizados, assim como as condições cromatográficas, os vinhos foram analisados utilizando-se do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência automatizado com detecção ultravioleta por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

Dessa forma, foram obtidos 6 resultados para cada vinho analisado, para os quais se determinou a média aritmética e o desvio padrão.

4.4.1 Análise de vinhos dopados

Três vinhos (um branco, um tinto e um rosé) foram selecionados e dopados com os padrões analíticos dos 3 pesticidas em três concentrações diferentes: 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 12, 13 e 14.

Tabela 12. Resultado obtidos das análises de vinho branco dopado a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Vinho branco			
	Dopado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
imidaclopride	1000	1168 \pm 45	117
	500	440 \pm 16	88
	100	88 \pm 3	88
carbofurano	1000	740 \pm 23	74
	500	304 \pm 6	61
	100	52 \pm 4	52
tebuconazol	1000	1054 \pm 27	105
	500	434 \pm 48	87
	100	39 \pm 5	39

No vinho branco dopado, o pesticida imidaclopride apresentou ótimas recuperações mesmo em baixas concentrações. A recuperação do carbofurano

foi mediana variando entre 74% à 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 52% à 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Percebe-se grande variação das recuperações do tebuconazol em função das concentrações em que se encontra na amostra de vinho branco dopada. Nas três concentrações em que a dopagem foi feita, em ordem decrescente, obteve-se as seguintes recuperações: 105%, 87% e 39%, sendo a última, portanto, a menos satisfatória.

Tabela 13. Resultados obtidos das análises de vinho rosé dopado a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Vinho rosé			
	Dopado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
imidaclopride	1000	1059 \pm 56	106
	500	524 \pm 10	105
	100	88 \pm 5	88
carbofurano	1000	916 \pm 46	92
	500	409 \pm 11	82
	100	66 \pm 6	66
tebuconazol	1000	1081 \pm 49	108
	500	500 \pm 38	100
	100	< LD	—

Quando a matriz foi o vinho rosé, foram obtidos os melhores resultados de recuperação dos analitos. Com a exceção da concentração mais baixa (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em que o tebuconazol não foi detectado e o carbofurano recuperado em 66%, as recuperações nas demais concentrações foram superiores a 80%. Os destaques positivos nas concentrações de 1000 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram o

imidaclopride e o tebuconazol, os quais foram recuperados totalmente, dentro dos desvios calculados. As recuperações menos satisfatórias ocorreram com essa matriz dopada a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, na qual o tebuconazol não foi detectado e o carbofurano, recuperado em 66%. Todavia, ainda que baixa a concentração, o pesticida imidaclopride apresentou recuperação de 88%.

Tabela 14. Resultados obtidos das análises de vinho tinto dopado a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

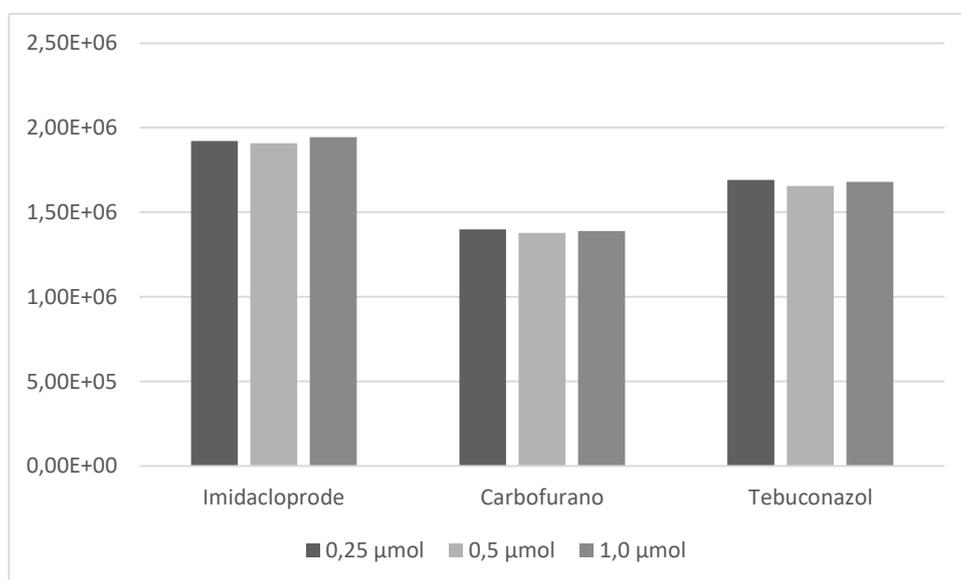
Vinho tinto			
	Dopado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
imidaclopride	1000	487 ± 8	49
	500	168 ± 3	34
	100	< LOD	—
carbofurano	1000	< LOD	—
	500	< LOD	—
	100	< LOD	—
tebuconazol	1000	958 ± 23	96
	500	449 ± 43	90
	100	33 ± 3	33

O vinho tinto se mostrou a matriz mais problemática quanto a recuperação dos analitos. Exceto pelo tebuconazol, que apresentou recuperações maiores que 90%, tanto na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ quanto na de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, as recuperações do imidaclopride foram muito baixas mesmo em concentrações relativamente mais elevadas e o carbofurano não pôde ser detectado em quaisquer das três diferentes concentrações de dopagem analisadas. Neste

último caso notou-se a presença de um interferente da matriz que foi eluído em um tempo de retenção muito próximo ao do carbofurano (em torno de 9,3 min).

Cátions ferro oriundos das uvas estão presentes no vinho em concentrações que podem ultrapassar 1,0 mg/L. Estes íons poderiam, supostamente, complexar com as moléculas dos analitos (principalmente com o imidaclopride e o carbofurano, cujas recuperações foram as mais problemáticas) provocando uma diminuição do sinal de absorção dos mesmos devido a alteração de suas propriedades. Essa hipótese foi verificada adicionando-se 3 diferentes concentrações de cloreto férrico hexaidratado às soluções dos padrões analíticos dos três pesticidas em estudo. Os resultados estão representados na Tabela 13.

Figura 13. Padrões analíticos com adição de Fe^{3+} (0,25 μmol , 0,5 μmol e 1,0 μmol).



Os resultados mostram que a adição de Fe^{3+} às soluções contendo os padrões analíticos dos pesticidas não provocou alteração significativa na

detecção de quaisquer analitos nas três diferentes adições realizadas. Isso descarta a hipótese de tais íons estarem complexando com os pesticidas.

Como citado no item 1.2, na produção do vinho tinto, as películas das uvas participam de toda a etapa de fermentação, aumentando a variedade de espécies químicas presentes (principalmente compostos fenólicos e polifenóis) assim como suas concentrações, em comparação com os demais tipos de vinho. A capacidade de interação dessas espécies pode ter contribuído com os insatisfatórios resultados de recuperação, por terem, supostamente, se ligado aos analitos alterando suas propriedades físico-químicas. Ao analisar as estruturas químicas do imidaclopride e do carbofuran, é possível notar a presença de um maior número de grupos que apresentam pares de elétrons não ligantes quando comparadas ao tebuconazol. Essa característica favorece a interação destes pesticidas com esses compostos.

Se essa hipótese for verdadeira, esse problema pode ser supostamente contornado efetuando-se a limpeza da amostra por extração em fase sólida, que utiliza o PSA como adsorvente, removendo os compostos responsáveis por essa interação. Na tentativa de se desenvolver um método de baixo custo, essa etapa não foi realizada.

Um estudo (JIANG et al., 2009) verificou a eficiência do método QuEChERS na determinação multiresidual de pesticidas em vinhos em que o tebuconazol estava presente. Suas recuperações variaram de 83% a 94% (dopagem contendo $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente). Contudo, além da limpeza da amostra utilizando-se PSA, foram utilizados 5 mL de acetonitrila

para a extração dos analitos. Ressaltando ainda que o sistema de detecção adotado foi a espectrometria de massas (MS), muito mais sensível.

Segundo as recomendações da Comissão Europeia para métodos analíticos para determinação de pesticidas em alimentos, recuperações entre 60 e 120% são aceitáveis para amostras de alimentos de origem animal ou vegetal, como é o caso dos vinhos (C.E., 2007). Além disso, no menor nível de concentração avaliado é aceitável desvios padrões de até 30% entre amostras dopadas. Considerando estes parâmetros, o procedimento desenvolvido é aplicável à determinação dos pesticidas em estudo em amostras de vinho branco e rosé. Nestas matrizes, a maioria dos valores de recuperação satisfazem as recomendações da Comissão Europeia. As recuperações para as amostras de vinho tinto ficaram abaixo dos recomendados devido a maior complexidade deste tipo de matriz.

4.4.2 Análise de amostras reais de vinhos

Todos os seis vinhos adquiridos foram analisados adotando-se rigorosamente o mesmo procedimento utilizado na análise dos vinhos dopados.

Dentro das limitações de sensibilidade do equipamento utilizado, não foi possível detectar a presença de nenhum dos três pesticidas investigados nas amostras de quaisquer um dos 6 vinhos analisados.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que é possível obter uma eficaz extração de pesticidas em amostras de vinho pelo método QuEChERS miniaturizado, mesmo reduzindo em 20 vezes as quantidades de solventes e sais utilizados no processo quando comparadas ao método original. Dessa forma, além de se conseguir grande economia de reagentes, minimiza-se o descarte dos mesmos ampliando as suas vantagens, também para o ponto de vista ambiental.

O procedimento desenvolvido apresentou recuperações satisfatórias para os vinhos branco e rosé (acima de 80% para os 3 pesticidas), enquanto para o vinho tinto não se atingiu valores aceitáveis de recuperação. Apesar deste inconveniente, as vantagens do procedimento proposto superam esta desvantagem, sendo a estratégia uma alternativa ambientalmente amigável na análise de vinhos branco e rosé, uma vez que emprega quantidades muito inferiores de solventes e amostra, além de evitar a etapa de extração em fase sólida dispersiva.

As limitações do sistema de detecção espectrofotométrica utilizado, pode ser superada com a implementação de um sistema mais sensível, a exemplo da espectrometria de massas. Todavia, os resultados obtidos nesse trabalho são de grande serventia para se assegurar o respeito as regulamentações acerca dos limites máximos de resíduo (LMR) para o imidaclopride e o tebuconazol, orientados pelos órgãos europeus e norte-americanos e que são utilizados no Brasil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Nota técnica: Reavaliação toxicológica do ingrediente ativo carbofurano.

ALBERO, B.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J. L. Determination of Organophosphorus Pesticides in Fruit Juices by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 6915–6921, 1 nov. 2003.
<https://doi.org/10.1021/jf030414m>

ALMEIDA, C. **Guia completo sobre os principais tipos e classificações de vinhos**.

ALPUIM, J. P. Aprendendo a Química do Vinho. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 65, p. 13–27, 1997.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANDRADES, T. O. DE. Revolução verde e apropriação capitalista. **CES Revista**, v. 21, p. 43–56, 2007.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: bookman, 2011.

BAL, R. et al. Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 5, p. 434–444, 1 maio 2012.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2012.663311>

CABRAS, P. et al. Fenhexamid residues in grapes and wine. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 7, p. 625–629, 2001.
<https://doi.org/10.1080/02652030120571>

CINELLI, G. et al. Ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector for simultaneous and rapid determination of organophosphorus pesticides and triazines in wine. **Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 782–790, 2014.
<https://doi.org/10.1080/02652030120571>

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2011.

DOS ANJOS, J. P.; DE ANDRADE, J. B. Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and ros?? wine by SDME/GC-MS. **Microchemical Journal**, v. 120, p. 69–76, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.01.009>

GUPTA, R. C. Carbofuran toxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, n. 4, p. 383–418, dez. 1994.
<https://doi.org/10.1080/15287399409531931>

HUMAN RIGHTS COUNCIL, U. N. **Report of the Special Rapporteur on the right to food**. Ge. **Anais...**2017

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. Agrotóxicos registrados para a cultura da videira. 2014.

JIANG, Y. et al. Multiresidue method for the determination of 77 pesticides in wine using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 26, n. 6, p. 859–866, 2009.
<https://doi.org/10.1080/02652030902822794>

JIN, B. et al. Multi-residue detection of pesticides in juice and fruit wine: A review of extraction and detection methods. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 399–409, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.003>

KONG, W.-J. et al. Trace analysis of multi-class pesticide residues in Chinese medicinal health wines using gas chromatography with electron capture detection. **Scientific Reports**, v. 6, p. 21558, 17 fev. 2016.
<https://doi.org/10.1038/srep21558>

KOUKOUVINOS, G. et al. Fast simultaneous detection of three pesticides by a White Light Reflectance Spectroscopy sensing platform. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 238, p. 1214–1223, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.035>

MAGGI, L. et al. Comparison of stir bar sorptive extraction and solid-phase microextraction to determine halophenols and haloanisoles by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 753–759, 15 maio 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.12.013>

MARTENDAL, E.; BUDZIAK, D.; CARASEK, E. Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole from wine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, n. 2, p. 131–136, 4 maio 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.079>

MELLO, L. Panorama da produção de uvas e vinhos no Brasil. **Campo & Negócios, Uberlândia**, v. 12, n. 142, p. 54-56, 2017.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2014. Disponível em:

<http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao_consumidor/legislacao/leg_produtos_humano/IN-16-2010-MAPA.pdf>

OTIENO, P. O. et al. Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidence for Furadan exposure in vultures (*Gyps africanus*) in Kenya. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 5, p. 536–544, 2010.

<https://doi.org/10.1007/s00128-010-9956-5>

PAZZIROTA, T. et al. Processing factor for a selected group of pesticides in a wine-making process: distribution of pesticides during grape processing. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 30, n. 10, p. 1752–1760, 2013.

<https://doi.org/10.1080/19440049.2013.815806>

PHILLIPS, R. **Uma breve história do vinho**. 1. ed. Rio de Janeiro: Record, 2003.

PINGALI, P. L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12302–12308, 31 jul. 2012.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>

RAVELO-PÉREZ, L. M. et al. Solid-phase microextraction and sample stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 764–770, 1 dez. 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.020>

TIMOFEEVA, I. et al. An evaporation-assisted dispersive liquid–liquid microextraction technique as a simple tool for high performance liquid chromatography tandem–mass spectrometry determination of insecticides in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1512, n. Supplement C, p. 107–114, 2017.

TOPUZ, S.; ÖZHAN, G.; ALPERTUNGA, B. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. **Food Control**, v. 16, n. 1, p. 87–92, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.11.012>

WANG, X.; TELEPCHAK, M. J. Determination of Pesticides in Red Wine by QuEChERS Extraction, Rapid Mini-Cartridge Cleanup and LC-MS-MS Detection. **LC-GC Europe**, v. 26, n. 2, p. 66–76, fev. 2013.

WEBER, J. et al. Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 15, p. 2966–2984, 1 jul. 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.077>

YOU, X. et al. Residue analysis and risk assessment of tebuconazole in jujube (*Ziziphus jujuba Mill*). **Biomedical Chromatography**, 2016.