



Universidade de Aveiro
2009

Departamento de Química

**Inês Margarida Pereira
Rodrigues da Silva**

**Análise de pesticidas na polpa e casca de frutas
para sumo.**



Universidade de Aveiro
2009

Departamento de Química

**Inês Margarida Pereira
Rodrigues da Silva**

**Análise de pesticidas na polpa e casca de frutas
para sumo.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo de Qualidade, realizada sob a orientação científica do Doutor João Oliveira, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Doutor Valdemar Inocêncio Esteves

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira (Orientador)

Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva (Co-Orientador)

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Cármen Sofia Nunes Pinheiro

Responsável de Investigação na área de Projectos de Investigação – Sumol+Compal

Doutor Joaquim Carlos Gomes Esteves da Silva

Professor Associado do Departamento de Química/Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

agradecimentos

Aos meus orientadores pelo apoio incondicional e disponibilidade demonstrada durante o mestrado.

Sumol+Compal, pela oportunidade de realizar a parte experimental da dissertação do mestrado.

À Engenheira Elsa Carvalho pelo apoio e amizade prestada durante todo trabalho.

À Doutora Cármen Pinheiro pela excelente orientação do meu trabalho, os bons conselhos, dedicação, e sobretudo pela sincera amizade demonstrada.

À minha família, em especial, aos meus pais que estiveram sempre do meu lado durante esta fase.

Ao meu namorado pela paciência, ajuda e dedicação nesta fase muito importante para mim.

Às pessoas que conviveram comigo na Sumol+Compal, obrigada pelo apoio e amizade demonstrada.

Aos bons amigos que conheci durante o meu percurso académico.

palavras-chave

Amostragem, Efeito de matriz, Fruta, GC-MS, Pesticidas, QuEChERS, Validação.

Resumo

A aplicação de pesticidas na produção agrícola tem sido objecto de especial atenção. Na verdade existiu sempre a necessidade de determinar a contaminação dos alimentos por pesticidas, de modo a melhorar a qualidade dos produtos e reduzir a toxicidade e persistência dos seus resíduos nos alimentos e no meio ambiente. Neste trabalho, para a sua realização experimental foi necessário determinar o procedimento de amostragem adequado para os lotes de fruta analisados. O método “QuEChERS” foi usado como técnica de preparação e limpeza da amostra, para análise de pesticidas nas amostras de fruta. A validação do método de análise foi executado nas matrizes de pêra, maçã e morango. A determinação e quantificação dos pesticidas foi realizada por GC-MS. A validação do método nas matrizes de pêra e maçã mostrou-se satisfatória. Contudo, na matriz de morango não se obtiveram bons resultados de percentagens de recuperação de alguns pesticidas em análise. Verificou-se também que a matriz onde os pesticidas são analisados, é determinante para os resultados obtidos. Após a validação do método nas diferentes matrizes, estudou-se o efeito do descasque da fruta na redução dos resíduos de pesticidas. Observou-se, através do descasque da pêra, a redução de 83% do pesticida difenilamina e de 100% dos pesticidas folpeto e imazalil. Na maçã, o descasque reduziu 85% do pesticida difenilamina e 100% do pesticida clorpirifos e imazalil.

Em suma, o método de análise mostra-se válido para a quantificação de pesticidas na matriz de pêra e maçã. Na matriz de morango a percentagem de recuperação de alguns pesticidas é baixa, assim a quantificação destes é afectada. O descasque da fruta revela-se eficaz na redução de pesticidas.

Keywords

Sampling, Matrix Effect, Fruit, GC-MS, Pesticides, QuEChERS, Method Validation

Abstract

The application of pesticides in agricultural production has been a point of concern. Thus, there is a need to determine the contamination of food by pesticides in order to improve product quality and reduce the toxicity and persistence of its residues in food and environment. At this work, to perform experimental procedure was necessary to determine the appropriate sampling for the fruit examined. The method "QuEChERS" was used as a sample preparation and clean-up technique for the analysis of pesticides in fruit samples. The analysis method validation was implemented on matrices of pear, apple and strawberry. The determination and quantification of pesticides was performed by GC-MS. The method validation in matrices of pear and apple had shown to be satisfactory. However, at the strawberry matrix was not obtained good results in percentages of recovery of some pesticides. It was also noted that the matrix where pesticides are analyzed is critical to the results. After method validation in different matrices, the effect of peeling the fruit was studied in the reduction of pesticide residues. It was observed by peeling the pear, the reduction of 83% of the pesticide difenylamine and 100% of the pesticide folpet and imazalil. In apple, the peeling decreased 85% of the pesticide difenylamine and 100% of the pesticides chlorpyrifos and imazalil.

In brief, the analysis method is valid for the analysis of pesticides in the matrix of pear and apple. At the strawberry matrix, the percentages of recovery of some pesticides were low, so the quantification of them is affected. The peeling of fruit has proved to be effective in the reduction of pesticides.

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PESTICIDAS.....	1
1.1.1. <i>Insecticidas</i>	1
1.1.2. <i>Herbicidas</i>	2
1.1.3. <i>Fungicidas</i>	2
1.2. TRANSPORTE DOS PESTICIDAS	3
1.3. PESTICIDAS NA ALIMENTAÇÃO	4
1.4. REDUÇÃO DE PESTICIDAS NOS ALIMENTOS.....	4
1.5. AMOSTRAGEM.....	5
1.5.1. <i>Vantagens da amostragem</i>	5
1.5.2. <i>Erros da amostragem</i>	6
1.6. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA: “QUECHERS”	6
1.7. MÉTODOS ANALÍTICOS – GC-MS	7
1.7.1. <i>Injecção</i>	8
1.7.2. <i>Coluna</i>	8
1.7.3. <i>Detector</i>	8
1.7.4. <i>Espectrómetro de Massa</i>	9
1.7.5. <i>Analisadores – Espectrómetro de Massa Quadrupolar de Captura de Electrões</i>	9
1.8. EFEITO DA MATRIZ NA ANÁLISE DE PESTICIDAS	10
1.9. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	10
1.9.1. <i>Identidade/Selectividade</i>	11
1.9.2. <i>Limite Detecção</i>	11
1.9.3. <i>Limite de Quantificação</i>	11
1.9.4. <i>Gama de trabalho e Linearidade</i>	11
1.9.5. <i>Exactidão</i>	12
1.9.6. <i>Repetibilidade</i>	12
1.9.7. <i>Reprodutibilidade</i>	12
1.9.8. <i>Quantificação da incerteza</i>	12
1.9.9. <i>Sensibilidade</i>	12
1.9.10. <i>Robustez</i>	12
1.9.11. <i>Percentagens de Recuperação</i>	12
1.10. LEGISLAÇÃO.....	13
1.11. OBJECTIVOS DO TRABALHO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. REAGENTES E PADRÕES DE PESTICIDAS	14
2.2. EQUIPAMENTO GC-MS	14
2.3. AMOSTRAGEM.....	14

2.3.1. Amostragem no Pêssego.....	14
2.3.2. Amostragem na Pêra	15
2.3.3. Amostragem na Maçã.....	16
2.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	17
2.5. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES	17
2.5.1. Soluções de calibração de 0,4 e 4,0 ppm.....	17
2.5.2. Preparação de padrões de calibração	17
2.5.3. Preparação das amostras fortificadas de 20 e 200 ppb para ensaios de recuperação.....	18
2.7. QUANTIDADES DAS AMOSTRAS PARA A ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PESTICIDAS NO DESCASQUE DA FRUTA	19
2.8. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO NA MATRIZ PÊRA/MAÇÃ.....	20
3.1.1. Identidade/Selectividade do pesticida	20
3.1.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	20
3.1.3. Gama de trabalho e Linearidade.....	22
3.1.3.1. Verificação da Homocedasticidade das variâncias da recta de calibração.....	26
3.1.3.2. Verificação do ajuste da recta de calibração.....	27
3.1.4. Repetibilidade.....	29
3.1.5. Reprodutibilidade e Robustez.....	29
3.1.6. Sensibilidade.....	34
3.1.7. Percentagens de Recuperação.....	34
3.2. Validação do método na matriz Morango.....	39
3.2.1. Identidade/Selectividade dos pesticidas	39
3.2.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	40
3.2.3. Gama de trabalho e Linearidade.....	42
3.2.3.1. Verificação da Homocedasticidade das variâncias da recta de calibração.....	46
3.2.3.2. Verificação do ajuste da recta de calibração.....	47
3.2.4. Repetibilidade.....	49
3.2.5. Sensibilidade.....	49
3.2.6. Percentagens de Recuperação.....	49
3.3. ESTUDO DA EFICÁCIA DO DESCASQUE DA FRUTA NA REDUÇÃO DE PESTICIDAS	55
3.3.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PESTICIDAS NA POLPA E NA CASCA DA PÊRA.....	55
3.3.1.1. Quantificação da Incerteza associada à concentração determinada.....	55
3.3.1.2. Determinação da quantidade de pesticida numa peça de fruta.....	57
3.3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PESTICIDAS NA POLPA E CASCA DA MAÇÃ.....	60
3.3.2.1. Quantificação da Incerteza associada à concentração determinada.....	60
3.3.2.2. Determinação da quantidade de pesticida numa peça de fruta.....	61

3.4. <i>Efeito de Matriz</i>	64
4. CONCLUSÃO	66
5. BIBLIOGRAFIA	68
6. ANEXO 1 - PESTICIDAS E REAGENTES	73

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema básico de um cromatógrafo de gás.....	7
Figura 2. Esquema do espectrômetro de massa.....	9
Figura 3. Esquema do Ion Trap.....	10
Figura 4. Pêras de tamanho homogêneo.....	16
Figura 5. Pêras de tamanho heterogêneo.....	16
Figura 6. Maçãs de tamanho homogêneo.....	16
Figura 7. Maçãs de tamanho heterogêneo.....	16
Figura 8. Comparação dos declives na recta 1 e recta 2.....	25
Figura 9 Comparação dos declives na recta 1 e recta 2.....	25
Figura 10. Gráfico da comparação das médias das áreas dos pesticidas no padrão de 20ppb preparado por dois operadores.	30
Figura 11. Gráfico da comparação das médias das áreas dos pesticidas no padrão de 20ppb preparado por dois operadores.	30
Figura 12. Gráfico da comparação das médias das áreas dos pesticidas no padrão de 200ppb preparado por dois operadores.	31
Figura 13. Gráfico da comparação das médias das áreas dos pesticidas no padrão de 200ppb preparado por dois operadores.	31
Figura 14. Comparação das percentagens de recuperação a 20 e 200ppb.	38
Figura 15. Comparação das percentagens de recuperação de 20 e 200ppb.	38
Figura 16. Cromatogramas da análise dos pesticidas Tiabendazole(tr =16 minutos) e Cipermetrina (tr=28 minutos) em acetonitrilo acidificado e em matriz de morango.	39
Figura 17. Comparação dos declives nas rectas de calibração 1 e 2 na matriz de morang.....	45
Figura 18. Comparação dos declives nas rectas de calibração 1 e 2 na matriz de morango.....	45
Figura 19. Gráfico da comparação das percentagens de Recuperação a 20 e 200ppb.....	53
Figura 20. Gráfico da comparação das percentagens de Recuperação a 20 e 200ppb.....	53
Figura 21. Gráfico da comparação dos resíduos nos componentes de uma pêra.....	58
Figura 22. Gráfico de comparação dos resíduos presentes nos componentes de uma maçã.....	63
Figura 23. Comparação do efeito de matriz na análise dos pesticidas nas matrizes de morango e pêra/maçã.....	64
Figura.24. Comparação do efeito de matriz na análise dos pesticidas nas matrizes de morango e pêra/maçã.....	64

Índice de Tabelas

Tabela 1. Volumes necessários para a preparação dos padrões de calibração.....	18
Tabela 2. Volumes adicionados para preparação das fortificações 20 ppb.....	19
Tabela 3. Quantidades de cada amostra de pêra.....	19
Tabela 4. Quantidades de cada amostra de maçã.....	19
Tabela 5. Dados da Gama de trabalho da recta de calibração dos pesticidas em estudo.....	21
Tabela 6. Dados da Gama de trabalho dos primeiros 5 níveis da recta de calibração (LQ-120ppb).....	22
Tabela 7. Dados da Gama de trabalho dos últimos 5 níveis da recta de calibração (120-1200ppb).....	23
Tabela 8. Teste de Bartlett para verificação da Homocedasticidade das rectas de calibração.....	26
Tabela 9. Exemplo dos dados fornecidos pela ANOVA na recta 1 do pesticida diclorvos.....	28
Tabela 10. Avaliação da linearidade das rectas de calibração apresentadas nas tabelas 6 e 7.....	28
Tabela 11. Percentagem do Desvio padrão relativo das médias das áreas dos padrões de 20 ppb, preparado	32
Tabela 12. Percentagem do Desvio padrão relativo das médias das áreas dos padrões de 200 ppb, preparado	33
Tabela 13. Ensaio de recuperação do nível 20 ppb.....	34
Tabela 14. Ensaio Recuperação do nível 200 ppb.....	35
Tabela 15. Dados da recta de calibração para o morango.....	40
Tabela 16. Recta de calibração para os pesticidas estudados na matriz de morango para os primeiros 5 níveis (LQ-120ppb).....	42
Tabela 17. Recta de calibração para os pesticidas estudados na matriz de morango para os primeiros 5 níveis (120-1200ppb).....	43
Tabela 18. Teste de Bartlett para verificação da Homocedasticidade das rectas de calibração.....	46
Tabela 19. Avaliação da linearidade das rectas de calibração na matriz do morango apresentadas nas tabelas 16 e 17.....	48
Tabela 20. Percentagens de recuperação 20ppb.....	50
Tabela 21. Percentagens de recuperação 200ppb.....	51
Tabela 22. Tabela resumo dos resultados na pêra.....	55
Tabela 23. Determinação dos intervalos de confiança de cada concentração determinada na pêra.....	56
Tabela 24. Teste de significância dos resultados das concentrações.....	56
Tabela 25. Tabela das determinações das concentrações determinadas e respectivos intervalos de.....	57
Tabela 26. Valores de concentrações de pesticidas em mg/kg pêra.....	57
Tabela 27. Quantidade de pesticida nos componentes de uma pêra.....	57
Tabela 28. Percentagem de redução dos pesticidas do descasque.....	58
Tabela 29. Previsão do consumo do pesticida Difenilamina na pêra.....	58
Tabela 30. Tabela resumo dos resultados da maçã.....	60
Tabela 31. Determinação dos intervalos de confiança de cada concentração determinada na maçã.....	60
Tabela 32. Teste de significância dos resultados das concentrações.....	61

Tabela 33. Tabela das determinações das concentrações determinadas e respectivos limites de	61
Tabela 34. Valores de concentrações de pesticidas em mg/kg maçã.....	61
Tabela 35. Quantidade de pesticida nos componentes de uma maçã.....	62
Tabela 36. Percentagem de redução dos pesticidas do descasque.....	62
Tabela 37. Previsão do consumo do pesticida Difenilamina na maçã.....	63
Tabela 38. Tabela dos pesticidas usados no trabalho	73
Tabela 39. Reagentes usados no trabalho.....	74

1. Introdução

1.1. Pesticidas

Actualmente a contaminação alimentar tem-se mostrado uma área de interesse acrescido. A contaminação alimentar pode ser oriunda de várias vias como a acidental, a poluição, componentes de embalamento, metabolitos tóxicos dos microrganismos, resíduos de agricultura química usados para protecção da cultura (pesticidas) [1-3].

De modo a prevenir e controlar a contaminação alimentar são necessárias algumas medidas, tais como [2]:

- Controlo analítico intensivo dos alimentos;
- Determinação das fontes de contaminação;
- Legislação para estabelecer níveis seguros de presença de contaminantes.

O termo *pesticida* refere-se à substância ou mistura utilizada para prevenir, destruir ou controlar pragas, incluindo vectores de doença Humana ou animal, espécies de plantas ou animais indesejáveis passíveis de interferir com a produção, processamento, armazenamento ou venda de alimentos. O termo inclui substâncias reguladoras do crescimento da planta, desfolhantes, agentes controladores de tamanho de fruta ou agentes de prevenção da sua queda prematura, e substâncias aplicadas às plantações antes e após a colheita, de modo a prevenir deterioração durante o armazenamento e transporte [1,2,4].

Na segunda metade do século XX houve um incremento na utilização de pesticidas que permitiu satisfazer parte das exigências propostas pelos consumidores a nível alimentar [5,6]. Tais exigências basearam-se na necessidade do controlo de pragas, que diminuíssem a produção agrícola, bem como no aumento da qualidade dos alimentos que chegam aos consumidores [7].

Os grupos de pesticidas mais importantes são: os *insecticidas* para proteger as plantas dos danos causado pelos insectos, os *herbicidas* para eliminação de ervas e os *fungicidas* para inibir o crescimento de fungos [2, 8].

1.1.1. Insecticidas

Os insecticidas foram usados durante muitos anos para a protecção da planta e da saúde pública contra pragas. Contudo, actualmente têm causado problemas graves a nível ambiental, sendo considerados como poluentes prioritários de estudo, pois surgem com facilidade na cadeia alimentar e por conseguinte na dieta alimentar diária [9].

As classes mais importantes de insecticidas são os hidrocarbonetos clorados, os organofosfatos e os carbamatos. Os hidrocarbonetos clorados representam o grupo de insecticidas com grande impacto tanto no

meio ambiente como na saúde dos consumidores. As razões pelas quais este grupo remete para um maior alerta são o facto de serem muito estáveis, persistirem no meio ambiente e de se depositarem no tecido adiposo e na gordura do leite humano (liposolúveis), pelo que o seu *ADI (Dose Diária Aceitável)* no leite de amamentação é bastante baixo. No entanto, a contaminação através dos hidrocarbonetos clorados tem vindo a diminuir devido à sua substituição por insecticidas menos perigosos. Estes últimos insecticidas são degradados quase na sua totalidade durante o período de tempo estipulado, variável de pesticida para pesticida [2].

1.1.2. Herbicidas

A dependência da agricultura moderna pelo controlo de ervas indesejáveis implica o uso de herbicidas havendo a necessidade de controlar a quantidade aplicada [10].

Os herbicidas têm como objectivo o de proteger a planta das ervas indesejáveis, pois estas competem com a planta para os nutrientes, luz e humidade Estes podem ter uma actividade num espectro largo ou selectivo [10].

O grupo de herbicidas de espectro largo inclui os cloratos, sulfato de cobre, glifosato e derivados de ácidos gordos clorados. Os grupos de herbicidas de espectro selectivo incluem reguladores de crescimento, ácido carbâmico, derivados de ureia, triazinas e piridinas [2].

Os herbicidas são aplicados principalmente em culturas de milho e outros cereais e de beterraba. Embora a toxicidade dos seus resíduos seja praticamente nula em organismos de sangue quente, não se podem ignorar os efeitos causados em artrópodes e na microflora [2].

1.1.3. Fungicidas

Os fungicidas são usados para proteger as plantas contra os efeitos nefastos dos fungos em batatas, tomates, farinha e frutos. Os fungicidas mais importantes são: compostos inorgânicos, como o enxofre, bastante usados na agricultura devido ao seu baixo custo, com alta eficácia e pouco perigosos; ditiocarbamatos; compostos organometálicos, como hidróxido de fentina; compostos organofosforados, como os tiofosfatos; compostos halogenados, como o brometo de Metilo, tóxicos para os fungos mas também para os nemátodes e insectos, sendo usados como desinfectantes dos solos; compostos orgânicos azotados, como os carbamatos, com grande aplicabilidade em cereais, frutos e vegetais; e os compostos orgânicos azotado-sulfúricos, como o grupo de carboxamidas [2,10].

A principal característica do mecanismo de acção do fungicida é o reconhecimento deste pelas células dos fungos. Consoante o modo de acção no vegetal, os fungicidas dividem-se em quatro classes: cobertura, citotrópicos, translaminares, sistémicos [10].

Os fungicidas de cobertura permanecem na superfície do vegetal sem penetrarem nos seus tecidos e têm de ser aplicados antes do início do processo de infecção pois não são eficazes após este período. No caso dos citotrópicos, estes penetram na superfície do vegetal e propagam-se pelos tecidos através das membranas celulares. Os fungicidas translaminares têm a capacidade de atravessar a parte de uma folha para a oposta

sem se propagar pelas células. Os fungicidas sistêmicos, têm estruturas moleculares complexas que intervêm mesmo durante a fase de infecção [10].

A nível da função dos fungicidas estes podem ser caracterizados pelo seu cariz protector, terapêutico ou erradicante. O cariz protector do fungicida previne a infecção nos tecidos saudáveis da planta, sendo a sua eficácia dependente de factores abióticos. A acção terapêutica é indicada para combater a infecção durante o seu período de incubação. A acção de erradicação impede o desenvolvimento da infecção, de modo a prevenir a formação e propagação de novos fungos propagados [10].

Para além destes, existem os grupos dos *acaricidas*, *nematocidas*, *moluscidas*, *rodenticidas* e *reguladores de crescimento de plantas* [2,11].

1.2. Transporte dos pesticidas

Estima-se que o uso de pesticidas seja de 2,5 biliões de quilos por ano [3]. Contudo, para que estes demonstrem efeitos nocivos necessitam de permanecer activos durante algum tempo no meio ambiente. Assim, quanto mais tempo persistir no meio ambiente maior o potencial de transporte de uma fracção de pesticida do local de aplicação [12].

Os mecanismos de contaminação conhecidos são a aplicação agrícola, a erosão, a volatilização, o escoamento pelos rios e a infiltração pelas águas das chuvas [13].

Após aplicados, os pesticidas têm vários destinos no meio ambiente, tais como: degradação química, a transferência aérea, deposição nos solos, deposição nos géneros alimentícios (por exemplo: frutos), degradação abiótica, sedimentação, degradação biótica, deposição nos alimentos destinados à alimentação animal [13]. Contudo, a transformação dos pesticidas não está bem esclarecida, pois esta pode ocorrer no ar ou na superfície onde são sujeitos à volatilização ou à erosão pelo vento. Um exemplo importante de reacção de transformação do pesticida na atmosfera é a reacção com radicais OH. Porém, a dificuldade de estimar o tempo de vida do pesticida na atmosfera, reside no facto de se desconhecer a concentração de radicais OH disponíveis na atmosfera [14].

Estima-se que cerca de 50% de pesticida aplicado possa ser perdido na atmosfera. A atmosfera é considerada o maior receptor e transportador de resíduos de pesticidas. A emissão dos pesticidas para o meio ambiente inicia-se na aplicação, sendo a emissão dependente do tipo de aplicação, condições ambientais, à formulação do pesticida e do solo [12, 15].

Devido ao transporte atmosférico dos pesticidas, as áreas onde não são aplicados também podem conter níveis destes, pois estes são detectados na água, nas chuvas, nas áreas em volta dos terrenos de agricultura e em reservas naturais. Um dos casos que permitiu identificar este tipo de situações foi o aparecimento de animais residentes no Ártico com níveis de pesticidas organoclorados e de químicos industriais [5]. Deste modo, os pesticidas podem ser encontrados a uma longa distância geográfica em relação ao seu ponto de aplicação, incluindo os compostos de degradação rápida [6].

Após emissão dos pesticidas, as trocas realizadas pelas interfaces atmosfera/solo, atmosfera/água e atmosfera/vegetação dependem das concentrações dos pesticidas, propriedades da superfície que recebe o

pesticida, a divisão do pesticida entre as fases gasosa, aquosa e da partícula [14]. Contudo, os pesticidas usados actualmente são concebidos para terem uma persistência reduzida no meio ambiente, quando comparados com os pesticidas mais antigos [12].

Devido a estas interacções pesticida/meio-ambiente, os seres humanos e animais são os principais grupos de risco. As vias de exposição são a inalação, devido ao transporte aéreo dos pesticidas, a deposição nos alimentos para os animais e a alimentar, como o consumo de água potável contaminada [16, 13].

1.3. Pesticidas na alimentação

Actualmente, é cada vez mais divulgado o risco para a saúde pública representado pelos resíduos de pesticidas na dieta humana, denotando-se uma maior apreensão no uso destas substâncias e o desenvolvimento de novas estratégias de utilização destes na agricultura [17,18]. A capacidade dos pesticidas de originarem resíduos aquando aplicados nas plantações, depende de factores como o modo de tratamento, tipo de aplicação, verificação periódica, degradação, transferência para o meio ambiente envolvente, propriedades de cada pesticida e a temperatura ambiente [10].

A aplicação do pesticida pode ser feita através de várias metodologias como em pó, vaporização, irrigação ou fumigação [2]. Muitos dos pesticidas na agricultura e no caso da produção de fruta, são aplicados por vaporização (spray). Estima-se que somente uma pequena fracção de pesticida aplicado tenha o efeito desejado (<0,1%), sendo o restante perdido por evaporação, fotodegradação, etc. A absorção pelas folhas da planta é um passo importante para que estes ingredientes activos tenham o efeito desejado. A absorção foliar está dependente da superfície das folhas, propriedades físico-químicas, o tipo de pesticida, bem como a sua concentração e condições ambientais [19].

Existem duas vias de contaminação dos frutos e vegetais pelos pesticidas. A contaminação directa que pode ocorrer pelo tratamento anterior ao armazenamento e distribuição para posterior consumo, e a indirecta que pode ocorrer pela absorção de resíduos de pesticidas através do solo. A contaminação dos alimentos de origem animal é proveniente da ingestão de alimentos contaminados pelos animais [2].

O nível mínimo de pesticidas no produto final é garantido pelo cuidado da aplicação, ao seguir a dose recomendada e o número de aplicações, bem como respeitar o intervalo de segurança sugerido para a colheita após a aplicação [2].

1.4. Redução de Pesticidas nos alimentos

O processamento de alimentos como a lavagem, o descasque e, nalguns casos, o tratamento térmico, garante a redução da contaminação por pesticidas pela via alimentar [20]. A lavagem contribui para a redução de resíduos de superfície e a maior parte dos compostos polares, como por exemplo, o insecticida carbaril. A passagem por água quente aumenta a remoção de pesticidas e poderá hidrolisar fracções significativas de compostos de carácter não persistente. Os pesticidas não polares tendem a alojar-se nas camadas lipofílicas da pele de frutos e vegetais. [20].

Na indústria o processo de produção de sumos usa a fruta na sua totalidade, após a passagem pela fase de descaroçamento, no caso da fruta com caroço de dimensões justificáveis para este passo. Os sumos que contenham casca, retêm uma quantidade significativa de resíduos lipofílicos. No caso dos pesticidas de lipofilicidade moderada, estes são pouco transferidos para o sumo, sendo os seus resíduos reduzidos pelo processo de clarificação, como a centrifugação ou a filtração. Assim, os resíduos de pesticidas no sumo vão depender das propriedades de dispersão do pesticida entre a casca/polpa e o sumo [20].

No consumo directo de fruta, o descasque é um passo importante na redução de pesticidas. Os tipos de descasque como, o químico, mecânico, a calor e a frio são os mais convencionais. A maioria dos insecticidas e fungicidas aplicados directamente nas plantações mostram um movimento ou difusão limitada à cutícula, sendo assim passíveis de serem removidos através do descasque [20].

1.5. Amostragem

A amostragem é o processo que permite tirar conclusões de uma população através de um certo número de amostras desta. O objectivo da amostragem é permitir vários tipos de análise estatística de natureza quantitativa/qualitativa, de toda a população amostral com o mínimo de amostras necessárias [21].

Na área de pesquisa de resíduos de pesticidas nos alimentos a amostragem tem o objectivo de permitir uma amostra representativa de um lote para a determinação destes e para posterior comparação com limites máximos de resíduos (LMR) definidos na legislação [22].

Na amostragem várias questões são abordadas quando se pretende executá-la, tais como: qual a melhor forma de obter uma amostra representativa; qual a melhor via de obter uma estimativa fiável de toda a população; qual o tamanho da amostra; como seleccionar uma amostra; quais os métodos a usar; quais as medições a fazer [23].

A incerteza das estimativas obtidas pela amostragem é oriunda do facto de somente uma parte da população ser analisada, pelo que a estimativa depende da amostra seleccionada enquanto as características da população são fixas [23].

Existem duas origens da incerteza associada, a Estratégia da Amostragem, quando o valor estimado da amostra está próximo do valor esperado das características da população; e o Método, quando o valor estimado se desvia consideravelmente de uma possível amostra para outra [23].

1.5.1. Vantagens da amostragem

A amostragem permite uma maior economia, melhor qualidade de trabalho, melhor extensão de conhecimentos e maior confiabilidade [21].

Um número menor de observações permite obter resultados mais rapidamente do que na população inteira [21].

As amostras têm um espaço de análise melhor do que na análise da população, considerando a variedade de informação em causa, tem uma melhor flexibilidade, adaptabilidade e possibilidade de estudo das inter-relações de vários factores [23].

1.5.2. Erros da amostragem

A amostragem simples assume que cada variável de interesse é quantificada/caracterizada, em cada unidade de amostra, sem erros. Deste modo, os erros que ocorrem devido ao facto de somente uma parte da população estar a ser alvo de análise denominam-se como *erros de amostragem* [23].

1.6. Método de preparação da amostra: “QuEChERS”

A análise de resíduos de pesticidas tem vindo a ser praticada desde de há 40 anos. Contudo, os métodos mais antigos de extracção dos resíduos de pesticidas das amostras de alimentos e a sua preparação para análise mostram-se demorados no tempo, dispendiosos e com um procedimento laboratorial intenso. Por outro lado, a análise de múltiplos resíduos pode representar uma dificuldade devido à existência de várias classes de pesticidas na amostra. Deste modo, vários métodos de análise de múltiplos resíduos têm vindo a ser desenvolvidos para melhorar as condições de análise [25].

O método “QuEChERS” (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) caracteriza-se como um método de classes de preparação e limpeza da amostra (com elevada humidade) para a análise de múltiplos resíduos de pesticidas. Este método desenvolvido e publicado por *Anastassiades et al em 2003* [24] tem-se tornado mais divulgado visto que reúne vários passos de preparação da amostra, simplifica o método de extracção, melhora a recuperação de certos pesticidas na análise, como também revela uma boa exactidão (precisão e veracidade) [7, 26].

O método implementado como método da AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) [25] consiste numa micro extracção líquido-líquido, seguido da remoção da amostra de materiais indesejáveis da matriz, que possam interferir com a análise [24, 27]. Após agitar a amostra com acetonitrilo tamponizado com acetato de sódio, adiciona-se sulfato de magnésio à amostra para se iniciar a fase de extracção. O acetonitrilo revela-se o melhor solvente pois permite uma gama mais abrangente de extracção de compostos orgânicos sem a co-extracção de quantidades elevadas de materiais lipofílicos [24]. A limpeza da amostra é realizada através de sulfato de magnésio e PSA (Primary-Secondary Amine - adsorvente aminado). O PSA tem a característica de reter os ácidos gordos, entre outros ácidos orgânicos impedindo que estes interfiram na análise, enquanto o sulfato de magnésio diminui o conteúdo de água no extracto [28].

Como primeira abordagem foi usado somente para preparação de amostras de fruta e vegetais, contudo a gama de alimentos passíveis de serem preparados através deste tem sido alargada, como por exemplo mel, nozes, comida para animais, entre outros [24, 31]. Durante o passo de remoção, contaminantes como ácidos orgânicos, pigmentos de plantas entre outros são removidos, proporcionando melhores cromatogramas [25].

As vantagens deste método residem no facto de se obter percentagens superiores de recuperação dos analitos, resultados mais exactos, sensibilidade analítica e ser mais económico [25,27]. Por outro lado, há uma redução da exposição a solventes perigosos, do uso de material de vidro e da dificuldade da elaboração da técnica face aos métodos mais tradicionais [25].

1.7. Métodos Analíticos – GC-MS

Ao longo dos anos os efeitos adversos provocados por doses residuais de pesticidas na saúde humana e animal têm representado uma área de preocupação social. Deste modo, a regularidade de análises de controlo de resíduos nos alimentos passou a ser essencial.

A cromatografia é um método físico de separação. Actualmente, é possível separar misturas complexas contendo mais de 200 compostos muito semelhantes em amostras muito pequenas. Contudo, esta técnica apresenta algumas limitações, como o facto da amostra ter de ser analisada em fase gasosa, o que implica os analitos serem voláteis e termicamente estáveis. Estas limitações reduzem cerca de 20% dos compostos que podem ser analisados por esta técnica [29].

A cromatografia de gás consiste primeiramente na introdução da amostra numa corrente de gás puro e inerte, normalmente hidrogénio, hélio ou azoto, que actuarão como gás de arraste, cuja escolha depende do tipo de detector que é utilizado e dos componentes a detectar. O fluxo de gás passa pela coluna através da qual os componentes da amostra se deslocam a diferentes velocidades, influenciadas pelo grau de interacção de cada componente com a fase estacionária não volátil. As substâncias que têm a maior interacção com a fase estacionária são retidas por mais tempo e, portanto, são separadas das de menor interacção. À medida que as substâncias eluem da coluna, podem ser quantificadas por um detector e/ou retiradas para outra análise [30]. A Figura 1 representa um esquema de um cromatógrafo de gás.

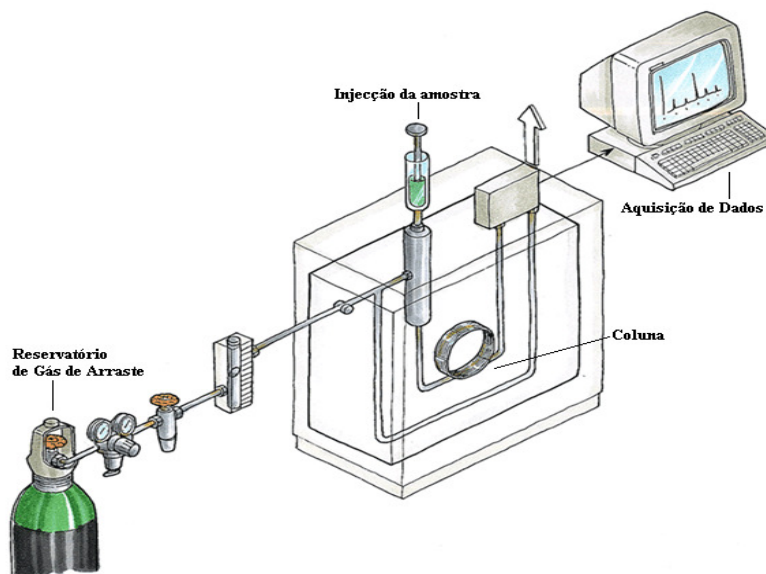


Figura 1. Esquema básico de um cromatógrafo de gás (Adaptado de: <http://hiq.aga.com.br>)

1.7.1. Injecção

Na injecção as amostras gasosas e líquidas podem ser introduzidas no injector com uma seringa ou fibra. O injector deve estar a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra, para que esta se volatilize completa e instantaneamente e seja introduzida na coluna. A temperatura não deve ser muito elevada pois pode ocorrer a degradação térmica da amostra, sendo normalmente usada uma temperatura entre os 150°C e os 250°C [30].

A injecção em sistemas capilares revela-se mais difícil de se obter condições óptimas de análise, por conseguinte desenvolveram-se várias técnicas de injecção como a injecção com divisão de fluxo, injecção sem divisão de fluxo e a injecção directa na coluna [29].

A injecção com divisão de fluxo está reconhecida como a mais usada e adequada à maioria das amostras, que consiste na injecção da amostra de 0,1 a 1,0 µL no injector aquecido, vaporizando e misturando-a com o gás de arraste. Passa para a coluna 1 a 10% da amostra, sendo o restante expelido para a atmosfera através de uma válvula [30].

A injecção sem divisão de fluxo, adequada para amostras com baixas concentrações de analito (análise vestigial), onde se injecta lentamente 0 até 5 µL da solução diluída num solvente volátil. A temperatura da coluna é mantida entre 20 e 25°C, inferior ao ponto de ebulição do solvente, este condensa-se nos primeiros milímetros da coluna e as moléculas da amostra concentram-se. Após 60 segundos da injecção, normalmente, abre-se a janela de divisão do fluxo e o excesso de solvente é expelido para evitar o alargamento dos picos. Após este processo a temperatura da coluna é aumentada, e o restante solvente e os analitos começam a ser eluídos pela coluna [30].

A injecção directa na coluna, é usada para amostras que se degradam acima dos seu ponto de ebulição e quando se pretende uma análise quantitativa. A solução da amostra é injectada directamente na coluna sem passar pelo injector. Neste ponto a temperatura da coluna está suficientemente baixa para condensar os solutos, quando se aquece a coluna, a separação dos analitos da amostra inicia-se [29].

1.7.2. Coluna

A separação dos analitos da amostra é feita na coluna capilar. A natureza do suporte sólido, o tipo e quantidade da fase líquida, o método de empacotamento, o tamanho da coluna e a temperatura desta são os vários factores que determinam a eficiência da separação analítica [29,30].

1.7.3. Detector

O detector, situado na saída da coluna, permite registar e medir as pequenas quantidades dos componentes da mistura separados na coluna e eluídos pelo fluxo de gás de arraste. O sinal de saída do detector alimenta um dispositivo que produz um gráfico denominado *cromatograma* . A escolha do detector depende de factores como o nível de concentração e a natureza dos componentes da mistura. Os detectores mais usados na cromatografia de gás são os de condutividade térmica, ionização de chama, captura de electrões e de massa [30].

1.7.4. Espectrómetro de Massa

A espectrometria de massa é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Para obter o espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies dessorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os iões obtidos são acelerados por um campo eléctrico e separados de acordo com a razão entre a sua massa e a sua carga eléctrica, m/z . O espectro de massa apresenta a resposta do detector contra m/z . Idealmente a área do pico é proporcional ao valor da abundância [30].

A Figura 2 representa um esquema de um espectrómetro de massa.

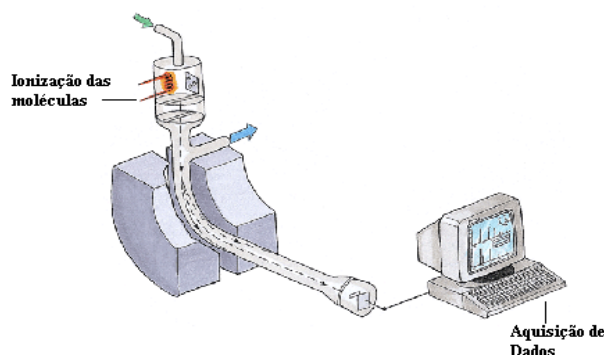


Figura 2. Esquema do espectrómetro de massa (*Adaptado de:* <http://hiq.aga.com.br>).

A espectrometria de massa é, actualmente, a melhor técnica de detecção para a cromatografia. As suas características principais são o facto do espectrómetro ser sensível a pequenas quantidades de analito, fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos que são eluídos a partir da coluna e poder distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção [30]. O espectrómetro pode ser altamente selectivo ao analito em interesse, facilitando as exigências na preparação da amostra ou na necessidade de separação cromatográfica completa dos constituintes presentes numa mistura [30].

1.7.5. Analisadores – Espectrómetro de Massa Quadrupolar de Captura de Electrões

Existem diferentes espectrómetros de massa como por exemplo: o espectrómetro de massa de Sector Magnético, de Dupla Focalização, Quadrupolo, Captura de Electrões e Tempo de Voo [31].

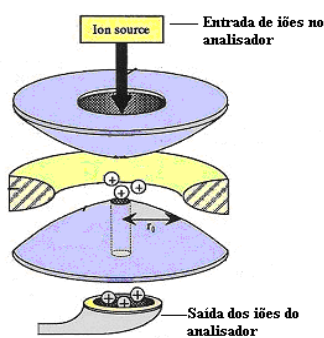


Figura 3. Esquema do Ion Trap (Adaptado de: www.rzuser.uni-heidelberg.de).

O espectrómetro de massa Quadropolar de Captura de Electrões, como esquematizado na Figura 3, é um quadropolo tridimensional que “captura” todos os iões que são introduzidos no seu interior (os iões retidos foram anteriormente criados por impacto electrónico ou por ionização química, a partir da amostra eluída). Assim, retém os iões até que se aplique uma determinada voltagem, tornando gradualmente os iões de razão m/z instáveis, possibilitando que sejam libertados do espectrómetro de massa. [32, 19]

A identificação dos compostos é feita por comparação com os compostos presentes na base de dados (biblioteca) e confirmada através da comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa com o dos compostos puros [30].

1.8. Efeito da Matriz na análise de pesticidas

O efeito de matriz define-se, na cromatografia gasosa, como a diferença de intensidades e formatos dos picos cromatográficos obtidos quando analisados na presença e ausência desta [34]. Este fenómeno existe devido ao bloqueio dos sítios activos do injector pela matriz, prevenindo a adsorção e degradação térmica dos analitos (pesticidas). Potencia-se ou diminui-se assim, a passagem dos analitos do injector para a coluna cromatográfica. Por exemplo, é frequente nos pesticidas organofosforados, a intensidade dos seus picos na matriz seja muito superior (aproximadamente 100%) em comparação quando analisado sem matriz [35].

O tipo de pesticida e a natureza do pesticida são alguns dos factores que determinam o efeito positivo ou negativo da análise dos analitos na matriz [31]. No entanto, o uso de analitos protectores permite a diminuição deste efeito nas análises em sistema cromatográfico gasoso, como por exemplo, o sorbitol [36].

1.9. Validação de Métodos

A validação de métodos é um aspecto importante nas análises químicas. Neste processo estabelece-se a adequação do método na análise através das características e limitações do método, como também as influências que podem modificar as características deste e a sua extensão. Em suma, o método de validação é

um procedimento de definição de pré-requisitos analíticos, confirmando-se se o método em uso tem aptidões para a aplicação estabelecida [37, 38].

Um método deverá ser validado em situações, como por exemplo, no desenvolvimento de um novo método para um dado problema; num método já implementado, mas no qual se pretende que este se integre em novas condições/objectivos; quando se verifica que o método sofre alterações ao longo do tempo através de análises de controlo de qualidade; quando um método já implementado é usado em diferentes laboratórios, com analistas diferentes ou em aparelhos diferentes; ou mesmo quando se pretende demonstrar a equivalência entre dois métodos [37, 38].

De um modo geral, as validações são realizadas entre laboratórios, através de estudos de colaboração. Contudo, a nível da indústria é pouco viável a realização de um estudo de validação inter-laboratorial. Assim, terá de se passar para uma validação individual, que reduz o conteúdo de informação que se consegue retirar de uma validação [37,38]

Os parâmetros para uma validação segundo o Eurachem Guide são os seguintes [8]:

1.9.1. Identidade/Selectividade

A confirmação da identidade do analito é essencial num processo de validação, pois pretende-se analisar rigorosamente na amostra os analitos sem a interferência de compostos semelhantes ao analito.

A selectividade, como especificidade, é definida como a capacidade de determinação exacta de um método, mais especificamente o/s analito/s de interesse na presença de outros componentes numa matriz, nas condições de teste.

1.9.2. Limite Detecção

Considera-se Limite de Detecção como o valor de concentração mais baixo que se consegue detectar com confiança. Este parâmetro é útil nas análises de resíduos, pois permite-nos conhecer qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método.

1.9.3. Limite de Quantificação

Define-se como a menor concentração à qual o analito pode ser determinado com um nível aceitável de repetibilidade e veracidade.

1.9.4. Gama de trabalho e Linearidade

A avaliação deste parâmetro é essencial em qualquer análise quantitativa, onde se determina a gama de concentrações que serão aplicadas ao método. O valor de menor concentração da gama de trabalho corresponde ao limite de detecção e/ou de limite de quantificação. O valor de concentração mais elevado depende do sistema utilizado.

A linearidade da gama de trabalho tem de ser testada. Quando esta existe, terá de existir uma relação linear entre a resposta, em forma de sinal, e a concentração do analito. Por outro lado, quando não se verifica a homogeneidade das variâncias dos resultados, não se verifica a homocedasticidade destes. Deste modo, os dados da gama de trabalho têm de ser analisados através de uma análise de regressão pesada.

1.9.5. Exactidão

A exactidão é avaliada através da veracidade e da precisão. A veracidade do método, corresponde à avaliação de quão o valor determinado está próximo do valor estabelecido como real ou esperado.

A precisão é usualmente determinada em circunstâncias que podem ser modificadas, sendo a quantificação feita através de repetibilidade e reprodutibilidade. O desvio padrão ou o desvio padrão relativo são as formas mais comuns de apresentar a precisão de um método.

1.9.6. Repetibilidade

A repetibilidade define-se como a menor precisão esperada, exprimindo a variabilidade esperada quando o método é aplicado por um analista, num equipamento durante um determinado espaço de tempo, isto é nas mesmas condições experimentais. No caso, de existir um estudo entre vários laboratórios, tem mais significado determinar a precisão através da reprodutibilidade.

1.9.7. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade caracteriza-se pela variabilidade esperada quando o método é aplicado, como por exemplo, por vários analistas, em vários equipamentos ou em dias diferentes.

Tanto, a repetibilidade como a reprodutibilidade dependem da concentração do analito. Então o procedimento mais correcto passa por determiná-las a diferentes concentrações.

1.9.8. Quantificação da incerteza

Este parâmetro abrange a gama de valores passíveis de ocorrerem num resultado de quantificação. Deste modo, tem de se ter em conta a precisão ao longo tempo de execução do método; o desvio e a sua incerteza, em relação ao método, à quantificação e ao material de referência; às incertezas na calibração e aos parâmetros que possam ter influência na determinação como a temperatura, pressão, etc.

1.9.9. Sensibilidade

A sensibilidade é representada pelo declive da curva de calibração, onde mudanças na resposta do instrumento correspondem a uma mudança da concentração do analito.

1.9.10. Robustez

Este factor caracteriza a robustez do método quando existem alterações neste, como a medição por dois analistas, dois equipamentos diferentes, etc. Permite assim, definir as variáveis que desempenham um efeito mais significativo no método, podendo controlá-las.

1.9.11. Percentagens de Recuperação

Normalmente, os métodos analíticos não quantificam exactamente o analito na amostra. Deste modo, é necessário conhecer a eficiência do método ao extrair o analito na sua matriz.

Durante a validação, um aspecto importante a testar é a estabilidade da resposta do processo analítico, através de injeções de padrões ou químicos de calibração.

1.10. Legislação

A legislação sobre pesticidas representa um passo decisivo no controlo destes compostos nos alimentos. Na legislação estabelece-se o regime dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) de produtos fitofarmacêuticos permitidos na alimentação humana ou animal. Os LMR de resíduos de pesticidas são determinados através de aspectos como o conhecimento da dosagem aplicada no cultivo, de modelos estimados da ingestão de resíduos por classes de risco (por exemplo, crianças) e testes toxicológicos nos pesticidas para permitir a determinação de um DDA (Dose Diária Aceitável) [39, 40].

Actualmente, o documento válido para a Europa que define os LMR de pesticidas permitidos, no caso da fruta, é o Regulamento (EC) N° 839/2008 [41].

1.11. Objectivos do trabalho

A necessidade da melhoria da qualidade dos produtos alimentares conduziu a um aumento significativo do uso de pesticidas na agricultura. Com o aumento da consciência de que os pesticidas têm efeitos nefastos no homem, existe cada vez mais a preocupação de garantir que os produtos consumidos não são prejudiciais para a saúde. Desta forma, a análise de pesticidas nos alimentos representa um passo muito importante no controlo de resíduos de pesticidas.

Os métodos mais antigos de preparação das amostras, para a análise de pesticidas, tornam-se muito morosos e dispendiosos. Um novo método desenvolvido por Anastassiades *et al.* em 2003 [25], “QuEChERS”, apresenta-se como um método de fácil execução, rápido, económico, robusto e seguro na preparação da amostra para análise de múltiplos resíduos de pesticidas [24].

Neste trabalho, pretende-se quantificar os pesticidas presentes nas amostras de fruta. Para tal, procedeu-se à escolha da amostragem adequada aos lotes de fruta. De seguida, preparam-se as amostras pelo método “QuEChERS”. A validação do método de análise dos resíduos pesticidas foi realizada nas matrizes de maçã/pêra e morango. A identificação e quantificação foram feitas por GC-MS.

A aplicação dos pesticidas nos frutos e a sua permanência nestes, é um facto de preocupação alimentar. Assim, o descasque da fruta foi estudado de modo a verificar se contribui para a redução resíduos de pesticidas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes e Padrões de Pesticidas

Os reagentes e padrões de pesticidas encontram-se referidos e descritos no Anexo 1.

2.2. Equipamento GC-MS

O processo de validação e análise de pesticidas nas amostras foi realizado através da cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa. O cromatógrafo gasoso *Varian cp-3800* é constituído por um amostrador automático *CombiPal* com seringa de 10µL, Injector *Split* e *Splitless*, Coluna Capilar VF-5MS (30 Metros, 0,25mm ID*0,25µm) e um detector de massa acoplado *Varian-Saturn 2000 (Ion Trap)*.

2.3. Amostragem

Os planos de amostragem pretendem que o lote de um fornecedor seja analisado representativamente, isto é, a quantidade de amostras retirada de um lote têm de representar fidedignamente o total deste mesmo lote. Para tal, torna-se necessário ter em conta vários aspectos como a homogeneidade do lote, a nível do tamanho do fruto presente neste.

A amostragem foi estudada no pêssago, maçã e pêra.

De seguida são apresentados os documentos considerados na amostragem para cada tipo de fruto, como também considerações essenciais para se definir o tipo de amostragem a seguir.

2.3.1. Amostragem no Pêssego

Para a amostragem dos lotes de pêssago seguiram-se os seguintes documentos:

- **Documento SANCO/2007/3131:** Método de validação e procedimentos de controlo de qualidade para análises de resíduos de pesticidas nos alimentos e alimentação animal, de 31 de Outubro de 2007 [36];
Este documento indica que a amostragem no laboratório tem de estar de acordo com a Directiva 2002/63/EC.
- **Directiva 2002/63/EC de 11 de Julho 2002** que estabelece métodos de amostragem para o controlo oficial de resíduos de pesticidas nos produtos de origem vegetal e animal [22];

Esta Directiva refere que nos lotes de fruta de tamanho médio, de peso entre 25 e 250 g, tem de se retirar 1Kg de amostra com, pelo menos, 10 unidades.

- “*Guidelines for sampling soils, fruits, vegetables and grains for chemical residue*” de Maio de 2008[42].

Este documento indica a mesma amostragem referida na Directiva 2002/63/EC.

Os pêsegos revelaram-se de tamanho uniforme nos lotes de cada fornecedor. Deste modo, considerou-se que se estava perante uma amostragem com unidades homogéneas.

Por consulta dos documentos referidos admitiu-se como amostragem apropriada, retirar aleatoriamente 10 unidades de diferentes palettes, tendo que ter no mínimo 1 Kg de amostra. No caso de as 10 unidades não terem 1Kg, retiraram-se mais unidades até perfazer o peso pretendido.

2.3.2. Amostragem na Pêra

Na amostragem da pêra consultaram-se os mesmos documentos referidos na amostragem no pêsego e adicionalmente o *Decreto-lei n.º 144/2003 de 2 de Julho*, que estabelece o regime dos limites máximos de resíduos (LMR) de produtos fitofarmacêuticos permitidos nos produtos agrícolas de origem vegetal ou, ainda que ocasionalmente, à alimentação animal [10]. No caso da amostragem, este Decreto-lei indica a mesma forma de amostragem como apresentado na amostragem do pêsego.

No caso da pêra, existiam três tipos de lotes:

- 1) Lotes com pêra de tamanho homogéneo, ou seja, um só calibre;
- 2) Lotes com pêra de tamanho heterogéneo. As pêras estão em palettes separados, ou seja, os calibres estão separados;
- 3) Lotes com pêra de tamanho heterogéneo misturada nos palettes, ou seja, os calibres estão misturados.

Contudo, nos lotes com pêra de tamanho heterogéneo existiam 2 tipos de calibres de pêras. O procedimento adoptado para cada tipo de lote foi o seguinte:

- 1) Retiraram-se 10 unidades, aleatoriamente, de cada palette, no mínimo com 1Kg de amostra;

Nota: Se no total a amostra não tiver 10 unidades, têm de se recolher mais unidades até perfazer o peso pretendido.

Nas Figuras 4 e 5 estão representados os exemplos das amostragens nos lotes de pêra.

Exemplo de Amostragem nas Pêras de tamanho homogéneo e heterogéneo



Figura 4. Pêras de tamanho homogéneo



Figura 5. Pêras de tamanho heterogéneo

2.3.3. Amostragem na Maçã

Na amostragem da maçã consultaram-se os mesmos documentos referidos na amostragem no pêssigo e adicionalmente o *Decreto-lei n.º 144/2003 de 2 de Julho*.

No caso da maçã, existem três tipos de lotes:

- 1) Lotes com maçã de tamanho homogéneo, ou seja, um só calibre;
- 2) Lotes com maçã de tamanho heterogéneo. As maçãs estão em palettes separados, ou seja, os calibres estão separados;
- 3) Lotes com maçã de tamanho heterogénea misturada nos palettes, ou seja, os calibres estão misturados.

O procedimento adoptado para cada tipo de caso é o seguinte:

- 1) Retiraram-se 10 unidades, aleatoriamente, de cada palette, no mínimo com 1Kg de amostra;

Nota: Se no total a amostra não tiver 10 unidades, têm de se recolher mais unidades até perfazer o peso pretendido.

Nas Figuras 6 e 7 estão representados os exemplos das amostragens nos lotes de maçã.

Exemplo de Amostragem nas Maçãs de tamanho homogéneo e heterogéneo



Figura 6. Maçãs de tamanho homogéneo



Figura 7. Maçãs de tamanho heterogéneo

2.4. Preparação das amostras

Após definir-se o tipo de amostragem, procedeu-se à preparação das amostras. O procedimento adoptado, para se determinar a quantidade de amostra para preparação, foi definido no ponto 2.3.

Para se proceder à preparação das amostras de fruta utilizou-se o método QuEChERS. As amostras de fruta são bem lavadas. Trituraram-se as peças de fruta, pesaram-se na balança analítica 15 g de amostra e transferiu-se para um tubo de centrifuga. Posteriormente adicionou-se 15 mL de acetonitrilo acidificado (1% com ácido acético). Agitou-se o tubo no vórtex por um minuto. De seguida, adicionou-se ao tubo 6 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de acetato de sódio, agitando-se vertical e vigorosamente. Centrifugou-se durante 5 minutos a 4000 r.p.m. Retirou-se 3,00 mL de sobrenadante resultante da centrifugação e transferiu-se para um tubo de centrifuga. Adicionou-se 0,450 g de sulfato de magnésio e 0,150 g de PSA (Primary-Secondary Amine – adsorvente aminado) e agitou-se vertical e vigorosamente, centrifugando-se durante 5 minutos a 4000 r.p.m. Seguidamente retirou-se 1000 µL de sobrenadante para um frasco e adicionou-se a este 300 µL de acetonitrilo acidificado. Agitou-se no vórtex o frasco da amostra e colocou-se no *CombiPal* para se proceder à injeção automática de 9 µL de amostra.

2.5. Preparação de Soluções

2.5.1. Soluções de calibração de 0,4 e 4,0 ppm

Estas soluções são necessárias para a preparação dos padrões que constituem a recta de calibração. As soluções stock de pesticidas têm concentrações de 1000 ppm e 2000 ppm.

2.5.1.1. Solução de calibração de 4,0 ppm

Num balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 40 µL de cada solução stock dos pesticidas com concentração de 1000 ppm. Adicionou-se 20 µL de cada solução stock dos pesticidas com concentração de 2000 ppm. Perfez-se com acetonitrilo e homogeneizou-se a solução.

2.5.1.2. Solução de calibração de 0,4 ppm

Num balão volumétrico de 10 mL, transferiu-se 1 mL da solução de calibração de 4 ppm. Perfez-se com acetonitrilo e homogeneizou-se a solução.

2.5.2. Preparação de padrões de calibração

Para a preparação de 9 padrões de calibração pesaram-se duas amostras de 15 g de maçã ou morango biológico, consoante a matriz que se deseja avaliar. A escolha de amostras biológicas deveu-se ao facto de para a preparação de padrões de calibração ser necessário que a matriz seja isenta de resíduos de pesticidas, pois a contaminação tem de ser só resultante da adição feita no laboratório. Os frutos maçã e pêra,

na legislação estão inseridos no grupo de Frutos de Pomóideas, tendo assim matrizes com características semelhantes, pelo que é indiferente a utilização de um ou outro no estudo da validação do método de análise.

O procedimento de preparação da amostra foi semelhante ao descrito no ponto 2.4., com a diferença do ajuste das quantidades de sulfato de magnésio e PSA após a primeira centrifugação. Após este passo, retirou-se 10 mL de sobrenadante de cada tubo para dois tubos de centrifuga. Adicionou-se 1,500 g de sulfato de magnésio e 0,500 g de PSA em cada tubo e agitou-se vertical e vigorosamente. Centrifugou-se durante 5 minutos a 4000 r.p.m. Retirou-se 1 mL de sobrenadante para cada frasco.

Posteriormente cada frasco foi fortificado com volumes específicos das soluções de calibração de 4,0 e 0,4ppm. As adições das soluções de pesticida e de solvente para cada padrão estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Volumes necessários para a preparação dos padrões de calibração.

<i>Adição</i>	<i>Padrão 10ppb</i>	<i>Padrão 20ppb</i>	<i>Padrão 40ppb</i>	<i>Padrão 80ppb</i>	<i>Padrão 120ppb</i>	<i>Padrão 200ppb</i>	<i>Padrão 400ppb</i>	<i>Padrão 800ppb</i>	<i>Padrão 1200ppb</i>
Sobrenadante (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Solução de calibração 4,0 ppm (µL)	-	-	-	-	-	50	100	200	300
Solução de calibração 0,4 ppm (µL)	25	50	100	200	300	-	-	-	-
Solvente Acetonitrilo acidificado (µL)	275	250	200	100	-	250	200	100	-
Volume final (µL)	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300	1300

2.5.3. Preparação das amostras fortificadas de 20 e 200 ppb para ensaios de recuperação

Segundo Michelangelo Anastassiades (2005)[24], nos estudos de fortificação, deve-se evitar grandes variações de volume. Para uma amostra de 15 g não se deve ultrapassar uma fortificação de 750 µL. Deste modo, ao fortificar 15 g de amostra com as soluções de calibração de 0,4 e 4,0 ppm, obtiveram-se amostras fortificadas de 20 e 200 ppb, respectivamente.

Neste estudo necessitou-se de matriz biológica, pois pretende-se que a fortificação seja só devida à contaminação realizada no laboratório.

A cada amostra de 15 g de maçã ou morango biológico fortificou-se com o volume da solução calibração de 0,4 e 4,0ppm, como indicado na Tabela 2. O procedimento adoptado nestas amostras foi semelhante ao referido no ponto 2.4.

Materiais e métodos

Tabela 2. Volumes adicionados para preparação das fortificações 20 ppb e 200 ppb.

<i>Adição</i>	<i>Fortificação</i>	<i>Fortificação</i>
	<i>20ppb</i>	<i>200ppb</i>
Amostra inicial (mL)	15	15
Solução calibração 4,0 ppm (µL)	-	750
Solução calibração 0,4 ppm (µL)	750	-

2.7. Quantidades das amostras para a análise da quantidade de pesticidas no descasque da fruta

Nas Tabelas 3 e 4 apresentam-se as quantidades de cada amostra de fruta, pêra e maçã, para o estudo do efeito do descasque na quantidade dos pesticidas.

Tabela 3. Quantidades de cada amostra de pêra.

<i>Amostra</i>	<i>Pêra</i>	<i>m (± 0,1g)</i>	<i>Unidades</i>
A	Inteira	1285,5	10
	Polpa	957,3	
B	Casca	181,1	10
	Inteira (sem descasque)	1338,2	

Tabela 4. Quantidades de cada amostra de maçã.

<i>Amostra</i>	<i>Maçã</i>	<i>m (± 0,1g)</i>	<i>Unidades</i>
A	Inteira	1338,8	10
	Polpa	1057,6	
B	Casca	197,8	10
	Inteira (sem descasque)	1484,6	

2.8. Tratamento Estatístico dos Resultados

Os resultados deste trabalho foram tratados estatisticamente através do programa informático Microsoft Excel 2003.

3. Resultados e Discussão

As análises da fruta para a validação do método e estudo do efeito do descasque foram realizadas na empresa *Sumol+Compal*. A empresa dispõe do equipamento GC-MS (Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa) necessário para a concretização do objectivo do trabalho.

3.1. Validação do método na matriz Pêra/Maçã

A validação do método de análise de pesticidas na maçã e na pêra foi realizada na matriz de maçã biológica. Não se realizou a validação nas matrizes em separado, pois as matrizes destes dois frutos são considerados idênticas, ou seja, têm comportamentos semelhantes no processo validação.

3.1.1. Identidade/Selectividade do pesticida

A identidade de cada pesticida em avaliação foi verificada através da técnica cromatográfica GC-MS.

As soluções de mistura de pesticidas de 0,4 e 4,0 ppm são utilizadas na preparação dos padrões de pesticidas. Escolheu-se o padrão de maior concentração, neste caso 1200ppb, para se confirmar o tempo de retenção (t_R) de cada pesticida. Esta escolha deve-se ao facto de para maiores concentrações, se conseguirem obter cromatogramas mais nítidos, ou seja, os picos cromatográficos apresentam-se com maior intensidade.

Os tempos de retenção dos pesticidas em solução estão representados na Tabela 5.

3.1.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limiares analíticos foram calculados estatisticamente, de acordo com as seguintes condições [44]:

$$LD = \frac{3 \times S_{y/x}}{m}$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m}$$

Em que: LD é o Limite de Detecção, LQ é o Limite de Quantificação e $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e m é o declive da mesma.

Resultados e Discussão

Tabela 5. Dados da Gama de trabalho da recta de calibração dos pesticidas em estudo.

<i>Pesticida</i>	<i>t_{rel} (min.)⁽¹⁾</i>	<i>Gama de Trabalho Total (ppb)</i>	<i>LQ (ppb)</i>	<i>LD (ppb)</i>
Diclorvos	6,953	20 - 1200	190,532	57,160
Mevinfos	8,125	10 - 1200	57,576	17,273
Etoprofos	9,964	-	-	-
Difenilamina	9,955	10 - 1200	55,319	16,596
alfa-HCH	10,808	10 - 1200	28,042	8,413
Dimetoato	11,046	20 - 1200	87,387	26,216
beta-HCH	11,380	10-1200	60,527	18,158
Quintozeno	11,454	40 - 1200	74,555	22,367
Terbufos	11,519	10-1200	9,486	2,846
Lindano	11,567	10-1200	69,699	20,910
Diazinão	11,597	10-1200	48,728	14,618
Dissulfatão	11,951	10-1200	50,426	15,128
Clortalonil	11,980	10-1200	46,884	14,065
delta-HCH	12,241	10-1200	59,442	17,833
Paratião Metilo	13,105	40-1200	70,135	21,041
Metalaxil	13,281	10-1200	72,606	21,782
Carbaril	13,329	20-1200	142,140	42,642
Heptacloro	13,386	10-1200	41,085	12,325
Malatão	13,961	10-1200	30,287	9,086
Diclofluanida	14,000	10-1200	60,576	18,173
Clorpirifos	14,207	10-1200	62,862	18,859
Fentião	14,350	10-1200	35,919	10,776
Aldrina	14,406	10-1200	27,934	8,380
Paratião Etilo	14,445	20-1200	90,305	27,091
Clorfenvinfos	15,504	10-1200	107,926	32,378
Captana	15,867	200-1200	42,545	12,764
Folpeto	16,059	200-1200	1834,837	550,451
Cis-Clordano	16,697	10-1200	34,684	10,405
Endossulfão	16,745	-	-	-
Imazalil	17,088	400-1200	1852,800	555,840
P,P'-DDE	17,373	10-1200	63,198	18,959
Miclobutanil	17,503	20-1200	58,338	17,501
Bupirinato	17,551	10-1200	72,337	21,701
Cresoxim-Metilo	17,600	10-1200	87,570	26,271
Dieldrina	17,600	-	-	-
Etião	18,695	10-1200	41,337	12,401
4,4-DDD	18,772	10-1200	92,045	27,614
Endossulfão Sulfato	19,92	20-1200	79,202	23,760
4,4-DDT	20,021	40-1200	42,754	12,826
Tebuconazol	20,483	120-1200	621,833	186,550
Bifentrina	21,58	10-1200	80,194	24,058
Fosalona	23,034	20-1200	169,225	50,767
Azinfos-Metilo	23,265	200-1200	1334,549	400,365
Acrinatrina pico 1	23,744	80-1200	457,410	137,223
Acrinatrina pico 2	24,324	20-1200	38,364	11,509
Permetrina pico 1	26,273	80-1200	777,628	233,288

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>t_{ret} (min.)⁽¹⁾</i>	<i>Gama de Trabalho Total (ppb)</i>	<i>LQ (ppb)</i>	<i>LD (ppb)</i>
Permetrina peak2	26,618	10-1200	79,233	23,770

(1) De acordo com as condições de GC-MS utilizadas

Na Tabela 5 estão representados os tempos de retenção de cada pesticida, a gama de trabalho na validação do método de análise e os limiares analíticos associados.

A gama de trabalho total indica em que intervalo de concentrações se podem quantificar os pesticidas em análise.

Os pesticidas etoprofos, endossulfão e dieldrina não são avaliados por não se conseguirem distinguir cromatograficamente.

3.1.3. Gama de trabalho e Linearidade

De seguida, apresentam-se os dados referentes às gamas de trabalho das rectas de calibração de cada pesticida, mais especificamente, o desvio padrão relativo em percentagem do padrão de menor concentração quantificável pelo método e do padrão de 120ppb, o declive, ordenada na origem e o coeficiente de correlação da recta de calibração.

Tabela 6. Dados da Gama de trabalho dos primeiros 5 níveis da recta de calibração (LQ-120ppb).

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho</i>	<i>% RSD</i>	<i>%RSD</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R</i>
	<i>Recta 1 (ppb)</i>	<i>LQ</i>	<i>120 ppb</i>		<i>Origem</i>	
Diclorvos	20 – 120	6,43	13,94	417,549	45024,226	0,986
Mevinfos	10 – 120	18,06	6,89	576,788	3005,055	0,992
Etoprofos	-	-	-	-	-	-
Difenilamina	10 – 120	10,04	7,54	573,929	812,898	0,992
alfa-HCH	10 – 120	9,17	4,62	343,274	234,038	0,996
Dimetoato	20 – 120	6,34	17,84	92,210	1255,184	0,968
beta-HCH	10 – 120	14,4	6,2	223,405	161,337	0,988
Quintozeno	40 – 120	5,1	4,92	118,040	625,780	0,986
Terbufos	10 – 120	13,17	6,94	1864,995	-279,178	0,999
Lindano	10 – 120	16,38	6,63	301,000	91,923	0,988
Diazinão	10 – 120	17,9	4,78	574,193	1661,654	0,993
Dissulfatão	10 – 120	14,93	5,34	556,522	792,932	0,993
Clortalonil	10 – 120	8,47	12,46	97,455	-106,441	0,996
delta-HCH	10 – 120	14,96	11,11	221,270	169,563	0,994
Paratião Metilo	40 – 120	14,31	8,59	130,330	-1205,900	0,989
Metalaxil	10 – 120	16,24	8,92	321,194	-596,670	0,984
Carbaril	20 – 120	8,06	19,68	106,233	1881,205	0,990
Heptacoloro	10 – 120	16,35	5,62	292,540	235,470	0,995
Malatião	10 – 120	17,4	7,86	390,871	486,908	0,997
Diclofluanida	10 – 120	14,53	9,34	541,487	-303,478	0,993
Clorpirifos	10 – 120	16,8	8,29	292,804	-131,086	0,989
Fentião	10 – 120	13,78	7,63	987,661	3021,962	0,997
Aldrina	10 – 120	15,71	4,43	262,282	21,914	0,998

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho</i>	<i>% RSD</i>	<i>%RSD</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R</i>
	<i>Recta 1 (ppb)</i>	<i>LQ</i>	<i>120 ppb</i>			
Paratião Etilo	20 – 120	17,97	11,33	150,820	-64,388	0,993
Clorfenvinfos	10 – 120	17,25	10,98	466,973	-528,500	0,992
Captana	-	-	-	-	-	-
Folpeto	-	-	-	-	-	-
Cis-Clordano	10 – 120	15,25	7,83	843,645	19,882	0,997
Endossulfão	-	-	-	-	-	-
Imazalil	-	-	-	-	-	-
P,P'-DDE	10 – 120	8,27	8,34	530,104	314,486	0,993
Miclobutanil	20 – 120	11,94	23,53	125,520	496,560	0,989
Bupirimato	10 – 120	14,34	10,52	538,728	857,987	0,996
Cresoxim-Metilo	10 – 120	7,17	9,92	609,430	522,501	0,999
Dieldrina	-	-	-	-	-	-
Etião	10 – 120	19,03	10,63	1654,073	1785,047	0,997
4,4-DDD	10 – 120	16,65	9,34	894,306	3316,723	0,987
Endossulfão Sulfato	20 – 120	5,77	10	117,764	-123,676	0,989
4,4-DDT	40 – 120	10,31	5,3	354,190	-4365,000	0,999
Tebuconazol	-	-	-	-	-	-
Bifentrina	10 – 120	7,28	12,35	1569,538	-828,374	0,988
Fosalona	20 – 120	8,68	27,56	219,309	1550,007	0,999
Azinfos- Metilo	-	-	-	-	-	-
Acrinatrina pico 1	-	-	-	-	-	-
Acrinatrina pico 2	20 – 120	10,94	21,24	187,460	829,789	0,999
Permetrina pico 1	-	-	-	-	-	-
Permetrina peak2	10 – 120	13,87	19,25	284,726	523,966	0,993

Tabela 7. Dados da Gama de trabalho dos últimos 5 níveis da recta de calibração (120-1200ppb).

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho</i>	<i>% RSD</i>	<i>%RSD</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada</i>	<i>R</i>
	<i>Recta 2 (ppb)</i>	<i>120 ppb</i>	<i>1200 ppb</i>			
Diclorvos	120 - 1200	13,94	0,71	606,094	67261,214	0,989
Mevinfos	120 - 1200	6,89	2,24	747,540	-8763,600	0,999
Etoprofos	-	-	-	-	-	-
Difenilamina	120 - 1200	7,54	1,83	776,355	-32117,324	0,999
Alfa-HCH	120 - 1200	4,62	0,979	383,548	5041,593	0,996
Dimetoato	120 - 1200	17,84	1,3	236,528	-22005,974	0,993
Beta-HCH	120-1200	6,2	1,7	321,404	-10050,537	0,999
Quintozeno	120 - 1200	4,92	1,69	157,873	-3922,047	0,999
Terbufos	120 - 1200	6,94	0,69	2113,467	-443,245	0,999
Lindano	120 - 1200	6,63	2,69	330,636	3292,201	0,995
Diazinão	120 - 1200	4,78	1,74	486,193	27060,707	0,994
Dissulfatão	120 - 1200	5,34	2,41	684,419	-16581,291	0,999
Clortalonil	120 - 1200	12,46	1,68	183,630	-12483,000	0,997
delta-HCH	120 - 1200	11,11	1,72	324,857	-13318,898	0,999
Paratião Metilo	120 - 1200	8,59	1,58	333,667	-36826,452	0,994
Metalaxil	120 - 1200	8,92	1,48	429,069	-15626,817	0,999

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho Recta 2 (ppb)</i>	<i>% RSD 120 ppb</i>	<i>%RSD 1200 ppb</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada Origem</i>	<i>R</i>
Carbaril	120 - 1200	19,68	2,59	315,013	-24800,555	0,996
Heptacloro	120 - 1200	5,62	1,33	326,605	-2490,337	0,998
Malatião	120 - 1200	7,86	0,77	577,250	-23612,991	0,998
Diclofluanida	120 - 1200	9,34	1,16	676,969	-15791,537	0,999
Clorpirifos	120 - 1200	8,29	1,72	326,640	-2127,391	0,999
Fentião	120 - 1200	7,63	1,01	1389,221	-39645,378	0,999
Aldrina	120 - 1200	4,43	3,39	281,142	-240,043	0,997
Paratião Etilo	120 - 1200	11,33	1,5	343,112	-28106,896	0,999
Clorfenvinfos	120 - 1200	10,98	1,46	472,88	11613	0,993
Captana	200-1200	5,83	1,33	197,880	-47672,000	0,914
Folpeto	200-1200	21,36	3,23	116,090	-33538,000	0,907
Cis-Clordano	120 - 1200	7,83	1,73	870,992	3061,773	0,999
Endossulfão	-	-	-	-	-	-
Imazalil	400-1200	5,87	5,63	55,508	-20519,000	0,913
P,P'-DDE	120 - 1200	8,34	2,09	633,852	-12897,084	0,999
Miclobutanil	120 - 1200	23,53	2,72	346,921	-4435,076	0,999
Bupirimato	120 - 1200	10,52	1,74	589,970	-106,170	0,996
Cresoxim-Metilo	120 - 1200	9,92	2,34	707,832	-8081,744	0,997
Dieldrina	-	-	-	-	-	-
Etião	120 - 1200	10,63	1,47	2289,343	-60615,866	0,999
4,4-DDD	120 - 1200	9,34	1,56	1033,296	-2401,442	0,997
Endossulfão Sulfato	120 - 1200	10	3,2	150,911	-2954,633	0,999
4,4-DDT	120 -1200	5,29	2,01	675,128	-43324,557	0,998
Tebuconazol	120 - 1200	18,94	2,66	274,871	-30147,950	0,995
Bifentrina	120 - 1200	12,35	0,28	1956,322	-25706,529	0,998
Fosalona	120 - 1200	27,56	1,66	453,350	-34784,000	0,996
Azinfos- Metilo	200-1200	3,62	6,52	43,589	-3608,893	0,959
Acrinatrina pico 1	80 - 1200	17,58	1,78	51,763	-2141,053	0,994
Acrinatrina pico 2	120 - 1200	21,24	2,82	360,987	-16262,148	0,997
Permetrina pico 1	80 - 1200	20,29	6,12	199,836	3195,755	0,999
Permetrina pico 2	120 - 1200	19,25	0,51	497,834	-23456,931	0,999

Nas tabelas 6 e 7 está representada a divisão da recta de calibração total, numa gama de calibração inferior e superior. Esta decisão deveu-se ao facto de se ter verificado que com esta divisão se conseguir ter uma quantificação mais fidedigna, nomeadamente para os níveis de calibração para concentrações inferiores (10-120 ppb), pois estes tinham uma menor contribuição nos parâmetros da recta total em relação aos níveis de calibração mais concentrados (120-1200 ppb). Este facto, deve-se aos valores de concentração serem muito pequenos (análise vestigial) e a razão sinal ruído nesta zona ser muito elevada. Assim, a quantificação foi realizada através destas duas rectas, consoante a área do pico referente a cada pesticida, excluindo-se a avaliação através da recta de calibração total. Nas Figuras seguintes representa-se graficamente a diferença dos declives das rectas referente à gama inferior e superior.

Resultados e Discussão

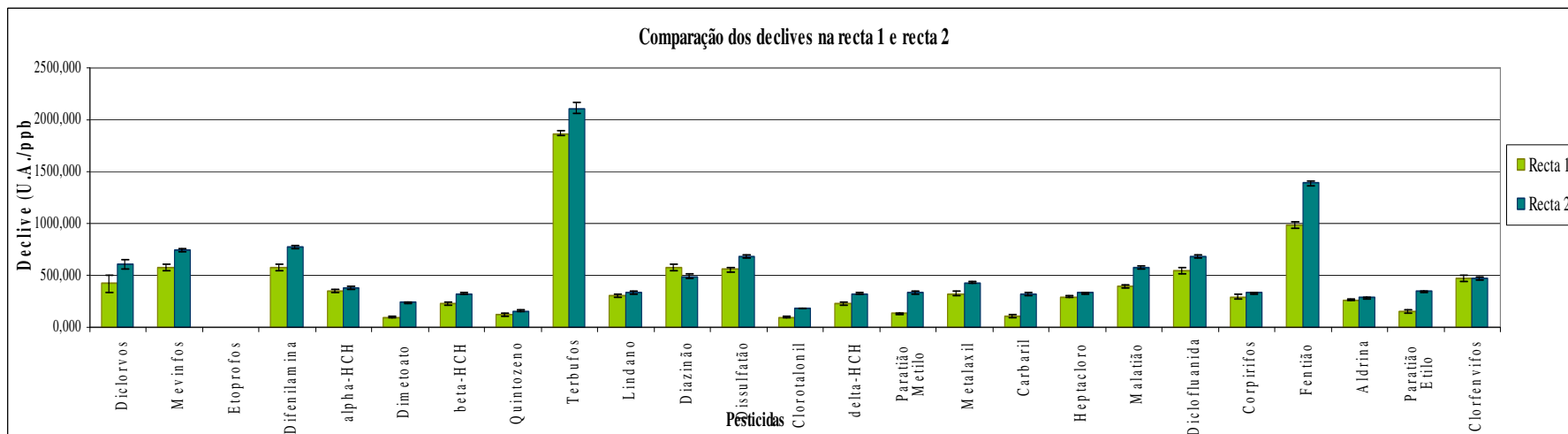


Figura 8. Comparação dos declives na recta 1 e recta 2.

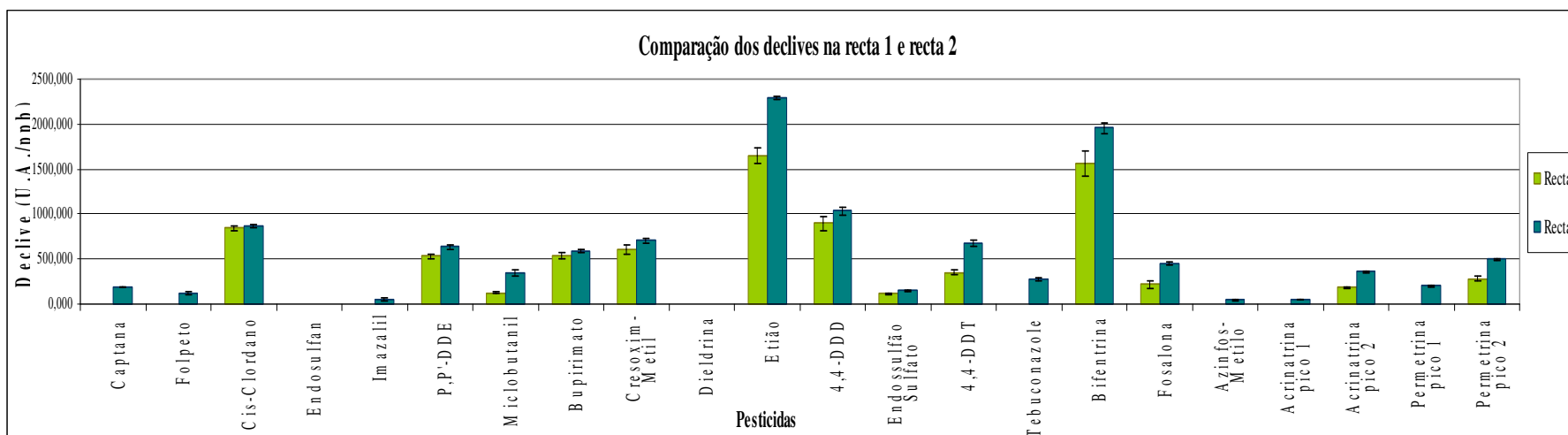


Figura 9. Comparação dos declives na recta 1 e recta 2.

Pelo critério definido no Documento N° SANCO/2007/3131 de 31 de Outubro de 2007, as percentagens de desvio padrão relativo numa análise de pesticidas, têm de ser inferiores a 20%. Em ambas as gamas de trabalho (Tabela 6 e 7) verificou-se este critério estipulado, exceção para os pesticidas fosadona e miclobutanil, que excedem os 20% de %RSD no padrão de 120ppb. Contudo, se se excluísse este padrão das rectas de calibração destes pesticidas, ficava-se com três padrões a constituir a recta de calibração 1 (LQ-120ppb). Assim, mantêm-se estes padrões que excedem a %RSD, admitindo-se que influenciam o resultado na quantificação de pesticidas nas amostras.

3.1.3.1. Verificação da Homocedasticidade das variâncias da recta de calibração

Para se determinar qual o melhor método de determinação dos parâmetros da recta de calibração é necessário avaliar se as variâncias entre os padrões da calibração são diferentes - Homocedasticidade. Para se verificar a Homocedasticidade das variâncias recorreu-se ao teste de Bartlett. A Tabela 8 indica o resultado obtido de χ^2 de cada recta de calibração.

Tabela 8. Teste de Bartlett para verificação da Homocedasticidade das rectas de calibração.

	Recta 1 (LQ-120ppb)		Recta 2 (120-1200ppb)	
	χ^2 Calculado	χ^2 Tabelado	χ^2 calculado	χ^2 Tabelado
Diclorvos	6,131	5,991	11,472	9,488
Mevinfos	16,301	9,488	5,755	9,488
Etoprofos	-	-	-	-
Difenilamina	16,828	9,488	18,157	9,488
alfa-HCH	14,603	9,488	21,176	9,488
Dimetoato	12,460	7,815	12,366	9,488
beta-HCH	10,135	9,488	20,528	9,488
Quintozeno	4,154	5,991	20,653	9,488
Terbufos	15,442	9,488	30,559	9,488
Lindano	8,270	9,488	52,412	9,488
Diazinão	11,557	9,488	14,512	9,488
Dissulfatão	11,642	9,488	19,834	9,488
Clortalonil	18,809	9,488	6,269	9,488
delta-HCH	17,712	9,488	14,233	9,488
Paratião Metilo	1,753	5,991	23,069	9,488
Metalaxil	20,655	9,488	15,046	9,488
Carbaril	6,162	5,991	14,375	9,488
Heptacloro	8,516	9,488	17,317	9,488
Malatião	18,176	9,488	25,412	9,488
Diclofluanida	12,756	9,488	10,078	9,488
Clorpirifos	11,694	9,488	19,917	9,488
Fentião	12,208	9,488	31,557	9,488
Aldrina	10,773	9,488	19,555	9,488
Paratião Etilo	7,470	9,488	17,291	9,488
Clorfenvinfos	26,699	9,488	4,355	9,488

Resultados e Discussão

	<i>Recta 1 (LQ-120ppb)</i>		<i>Recta 2 (120-1200ppb)</i>	
	$\chi^2_{\text{Calculado}}$	χ^2_{Tabelado}	$\chi^2_{\text{calculado}}$	χ^2_{Tabelado}
Captana	-	-	5,618	7,815
Folpeto	-	-	7,105	7,815
Cis-Clordano	14,865	9,488	14,325	9,488
Endossulfão	-	-	-	-
Imazalil	-	-	5,819	5,991
P,P'-DDE	14,228	9,488	15,683	9,488
Miclobutanil	7,525	7,815	12,931	9,488
Bupirimato	30,422	9,488	9,889	9,488
Cresoxim-Metilo	22,173	9,488	11,750	9,488
Dieldrina	-	-	-	-
Etião	20,708	9,488	16,487	9,488
4,4-DDD	19,756	9,488	13,163	9,488
Endossulfão Sulfato	12,549	7,815	10,310	9,488
4,4-DDT	2,793	7,815	13,430	9,488
Tebuconazol	-	-	10,291	7,815
Bifentrina	18,713	9,488	38,485	9,488
Fosalona	13,294	5,991	7,790	9,488
Azinfos- Metilo	-	-	63,535	9,488
Acrinatrina pico 1	-	-	48,712	9,488
Acrinatrina pico 2	6,795	5,991	15,308	9,488
Permetrina pico 1	-	-	65,324	11,070
Permetrina pico 2	17,663	9,488	42,194	9,488

Os valores a negrito na Tabela 8 indicam que as variâncias dos padrões das rectas de calibração são homogéneas devido aos seus valores de $\chi^2_{\text{calculado}}$ serem inferiores aos valores de χ^2_{Tabelado} . Assim, quando este facto se verifica, as rectas de calibração são avaliadas através de regressão linear não pesada, pois os valores em teste apresentam homocedasticidade.

Os outros pesticidas são avaliados através de regressão linear pesada, pois o teste de Bartlett às variâncias das suas rectas indica que estas não são homogéneas ($\chi^2_{\text{calculado}}$ superior a χ^2_{Tabelado}), não se verificando a homocedasticidade dos padrões das rectas de calibração.

3.1.3.2. Verificação do ajuste da recta de calibração

Para se avaliar a adequação das rectas apresentadas anteriormente, para a quantificação dos pesticidas, é necessário recorrer a uma análise de regressão da recta de calibração através de uma ANOVA [46].

Resultados e Discussão

Tabela 9. Exemplo dos dados fornecidos pela ANOVA na recta 1 do pesticida diclorvos.

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>G.L</i>	<i>MQ</i>	<i>F ajuste</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Factores	7422687855	2	3711343927	37,390	1,83x10 ⁻⁴	4,737
Residual	694814582,8	7	99259226,11			
Total	8117502438	9				

A Tabela 9 exemplifica a informação resultante no teste ANOVA. Verifica-se que a recta 1 (LQ-120ppb) do pesticida diclorvos está adequada para a sua determinação das concentrações neste intervalo de concentrações. Este facto deve-se a F_{ajuste} ser superior a $F_{crítico}$ que determina o ajuste desta recta.

Tabela 10. Avaliação da linearidade das rectas de calibração apresentadas nas tabelas 6 e 7.

<i>Pesticida</i>	<i>Recta 1 (LQ-120ppb)</i>			<i>Recta 2 (120-1200ppb)</i>		
	<i>Fajuste</i>	<i>Fcrítico</i>	<i>G.L.</i>	<i>Fajuste</i>	<i>Fcrítico</i>	<i>G.L.</i>
Diclorvos	37,390	4,737	(2,7)	900,264	3,357	(4,11)
Mevinfos	90,189	3,179	(4,13)	1613,767	3,357	(4,11)
Etoprofos	-	-	-	-	-	-
Difenilamina	182,910	3,112	(4,14)	509,573	3,259	(4,12)
alfa-HCH	186,287	3,112	(4,14)	863,800	3,357	(4,11)
Dimetoato	38,158	3,862	(3,9)	952,259	3,357	(4,11)
beta-HCH	232,500	3,357	(4,11)	505,505	3,259	(4,12)
Quintozeno	60,43105	4,737	(2,7)	518,568	3,259	(4,12)
Terbufos	200,724	3,179	(4,13)	579,209	3,357	(4,11)
Lindano	214,609	3,357	(4,11)	599,851	3,478	(4,10)
Diazinão	301,792	3,259	(4,12)	444,722	3,478	(4,10)
Dissulfatão	338,595	3,259	(4,12)	293,959	3,259	(4,12)
Clortalonil	79,217	3,179	(4,13)	1194,892	3,259	(4,12)
delta-HCH	74,544	3,179	(4,13)	609,663	3,259	(4,12)
Paratião Metilo	7,698	4,256	(2,9)	71,845	3,055	(4,15)
Metalaxil	175,095	3,179	(4,13)	572,769	3,357	(4,11)
Carbaril	4,921	4,737	(2,7)	855,156	3,357	(4,11)
Heptacloro	213,058	3,112	(4,14)	576,417	3,357	(4,11)
Malatião	102,411	3,179	(4,13)	397,555	3,259	(4,12)
Diclofluanida	165,739	3,259	(4,12)	1458,523	3,357	(4,11)
Clorpirifos	198,548	3,357	(4,11)	651,029	3,357	(4,11)
Fentião	116,006	3,259	(4,12)	635,273	3,478	(4,10)
Aldrina	247,032	3,112	(4,14)	409,379	3,357	(4,11)
Paratião Etilo	75,671	3,862	(3,9)	259,475	3,862	(3,9)
Clorfenvinfos	117,836	3,357	(4,11)	2323,382	3,478	(4,10)
Captana	-	-	-	1299,401	4,347	(3,7)
Folpeto	-	-	-	1112,677	4,067	(3,8)
Cis-Clordano	205,389	3,112	(4,14)	729,397	3,357	(4,11)
Endossulfão	-	-	-	-	-	-
Imazalil	-	-	-	422,682	6,944	(2,4)
P,P'-DDE	218,966	3,357	(4,11)	637,282	3,357	(4,11)
Miclobutanil	13,541	3,708	(3,10)	351,201	3,478	(4,10)
Bupirimato	147,243	3,357	(4,11)	725,119	3,357	(4,11)

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Recta 1 (LQ-120ppb)</i>			<i>Recta 2 (120-1200ppb)</i>		
	<i>Fajuste</i>	<i>Fcrítico</i>	<i>G.L.</i>	<i>Fajuste</i>	<i>Fcrítico</i>	<i>G.L.</i>
Cresoxim-Metilo	143,472	3,357	(4,11)	681,605	3,357	(4,11)
Dieldrina	-	-	-	-	-	-
Etião	104,302	3,179	(4,13)	608,550	3,357	(4,11)
4,4-DDD	176,275	3,259	(4,12)	860,421	3,357	(4,11)
Endossulfão Sulfato	104,023	3,862	(3,9)	1031,578	3,478	(4,10)
4,4-DDT	396,806	4,347	(3,7)	1204,666	3,633	(4,9)
Tebuconazol	-	-	-	2522,527	3,633	(4,9)
Bifentrina	130,673	3,478	(4,10)	826,316	3,478	(4,10)
Fosalona	22,024	4,737	(2,7)	954,327	3,633	(4,9)
Azinfos- Metilo	-	-	-	140,986	4,066	(3,8)
Acrinatrina pico 1	-	-	-	863,833	3,204	(5,11)
Acrinatrina pico 2	28,720	5,786	(2,5)	630,271	3,478	(4,10)
Permetrina pico 1	-	-	-	294,244	3,790	(6,15)
Permetrina pico 2	35,836	3,179	(4,13)	259,815	3,478	(4,10)

Pela análise da Tabela 10 verifica-se que F_{ajuste} é superior a $F_{crítico}$, o que significa que as rectas de calibração estão ajustadas para a determinação das concentrações dos pesticidas.

Contudo, alguns pesticidas na gama da recta 1 (LQ-120ppb), identificados a negrito na Tabela 10, têm valores de F_{ajuste} próximos do $F_{crítico}$, quando comparados com os restantes, o que poderá resultar numa quantificação menos fidedigna dos respectivos pesticidas.

3.1.4. Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada pelos valores da percentagem do desvio padrão relativo (%RSD) de cada padrão das rectas de calibração. Pelo critério definido no Documento N° SANCO/2007/3131 de 31 de Outubro de 2007 as percentagens de desvio padrão relativo numa análise de pesticidas têm de ser inferiores a 20%.

Assim, só se aceitaram como repetíveis os padrões com % RSD inferior a 20%. Todos aqueles que excediam este valor foram excluídos da recta de calibração.

3.1.5. Reprodutibilidade e Robustez

A reprodutibilidade do método foi avaliada através da execução da preparação dos padrões de 20 e 200ppb por dois operadores, mantendo as outras condições. De seguida, apresentam-se os gráficos que representam a reprodutibilidade do método.

Resultados e Discussão

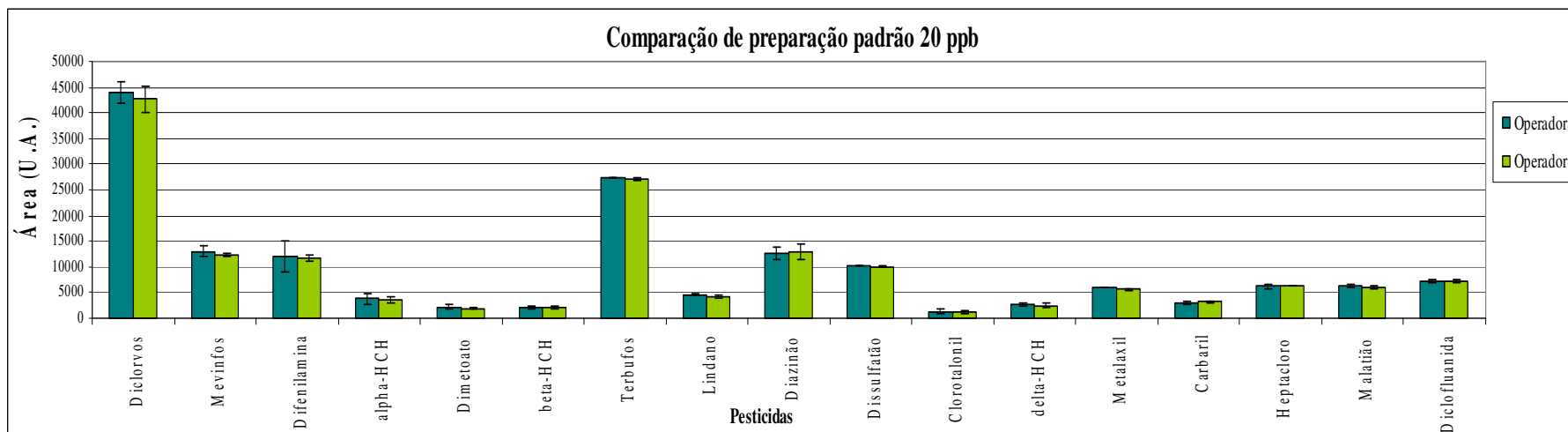


Figura 10. Gráfico da comparação das médias das áreas dos pesticidas no padrão de 20ppb preparado por dois operadores.

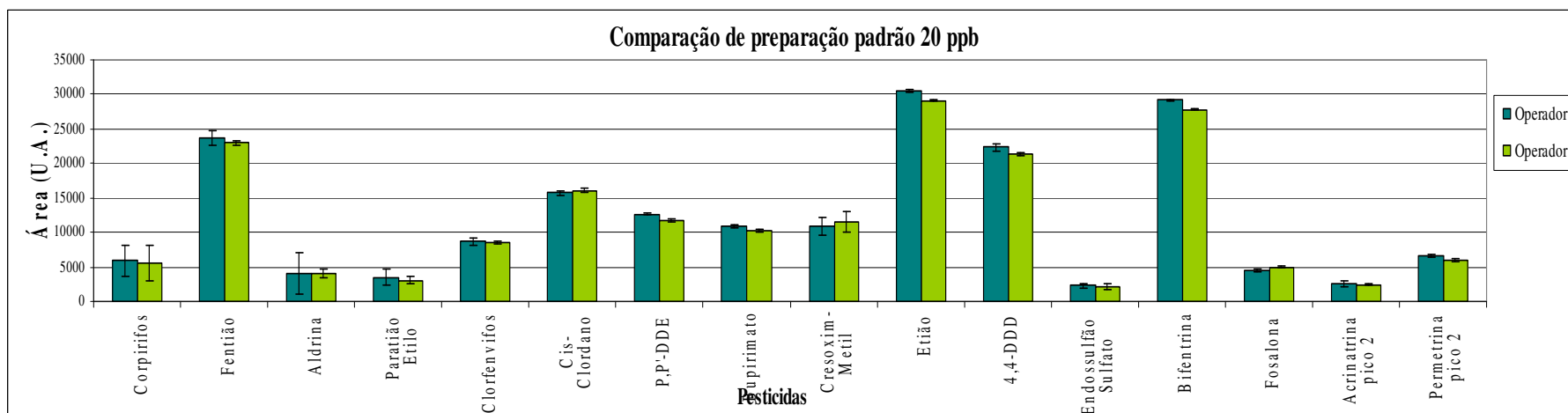


Figura 11. Gráfico da comparação das médias das áreas dos pesticidas no padrão de 20ppb preparado por dois operadores.

Resultados e Discussão

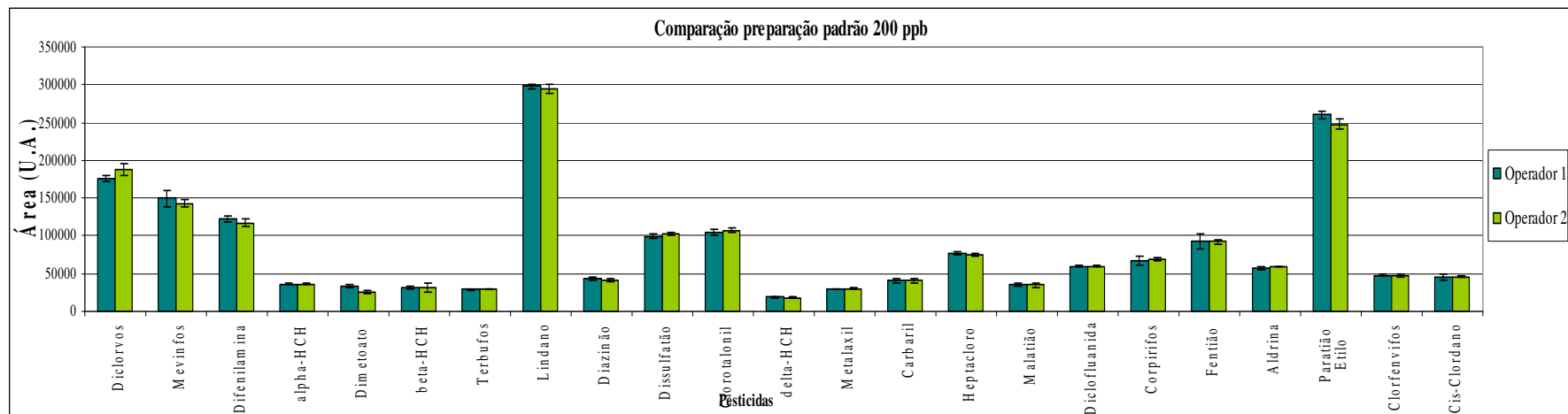


Figura 12. Gráfico da comparação das médias das áreas dos pesticidas no padrão de 200ppb preparado por dois operadores.

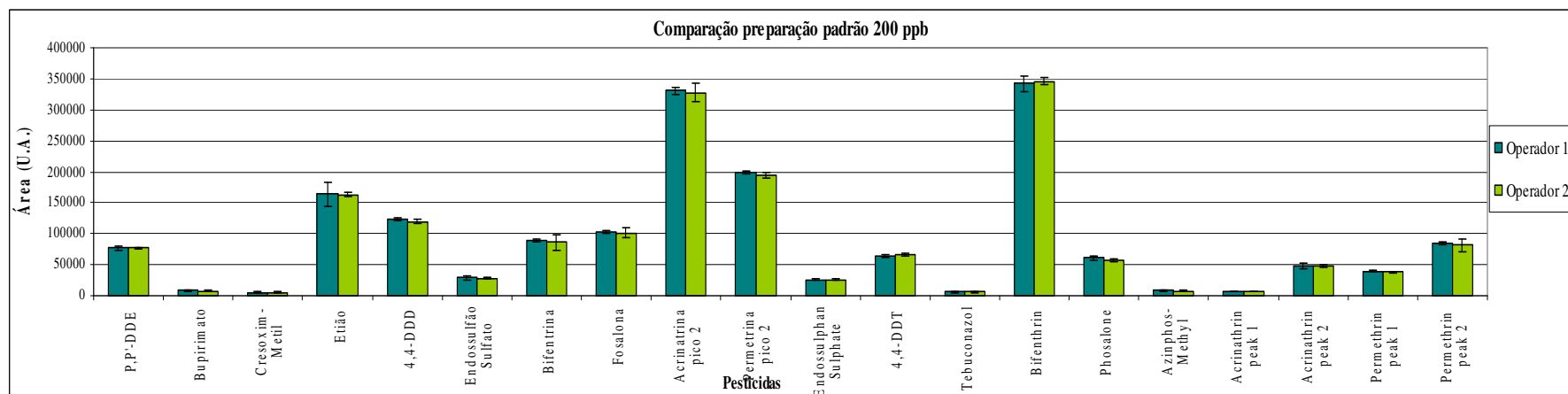


Figura 13. Gráfico da comparação das médias das áreas dos pesticidas no padrão de 200ppb preparado por dois operadores.

Resultados e Discussão

Pela análise das Figuras 10 e 11 verifica-se que o método é reprodutível no padrão de 20ppb, pois pela comparação das médias das áreas dos pesticidas, estas não apresentam diferenças no geral.

As Figuras 12 e 13 indicam o mesmo caso referido anteriormente, mas no caso do padrão de 200ppb.

De seguida apresenta-se na Tabela 11 e 12 o desvio padrão relativo em relação à média das áreas dos padrões de 20 e 200ppb, respectivamente, preparados por diferentes operadores.

Tabela 11. Percentagem do Desvio padrão relativo das médias das áreas dos padrões de 20 ppb, preparado por operadores diferentes.

<i>Pesticida</i>	<i>Área do operador 1 (média)</i>	<i>Área do operador 2 (média)</i>	<i>%RSD</i>
Diclorvos	43908	42761	1,871
Mevinfos	12995	12440	3,086
Difenilamina	11970,5	11640	1,980
Alfa-HCH	3834	3702	2,477
Dimetoato	2228	1893	11,496
Beta-HCH	2074	2035,5	1,325
Terbufos	27382	27080	0,784
Lindano	4563	4263,5	4,799
Diazinão	12707,5	12974	1,468
Dissulfatão	10230	10017	1,488
Clortalonil	1277	1137,5	8,171
Delta-HCH	2706,5	2517,5	5,116
Metalaxil	6010	5666,5	4,160
Carbaril	2989	3199	4,799
Heptaclo	6307	6388,5	0,908
Malatião	6310	6039	3,103
Diclofluanida	7217	7210,5	0,064
Chlorpyrifos	5870,5	5586	3,512
Fentião	23709	22991	2,174
Aldrina	4115	4013,5	1,766
Paratião Etilo	3477,5	3037	9,563
Clorfenvinfos	8731	8478	2,079
Cis-Clordano	15767	16086,5	1,418
P, P'-DDE	12682,5	11769,5	5,280
Bupirimato	10843	10161	4,592
Cresoxim-Metilo	10945	11591	4,054
Etião	30518	29116	3,324
4,4-DDD	22342,5	21274	3,464
Endossulfão Sulfato	2314	2131	5,822
Bifentrina	29168	27767	3,480
Fosalona	4543	4982	6,518
Acrinatrina pico 2	2603,5	2385	6,194
Permetrina pico 2	6608	5977	7,091

Pela análise da Tabela 11 verifica-se que o desvio padrão relativo entre as médias não ultrapassa os 11,5%, o que significa que existe uma boa reprodutibilidade na preparação do padrão de 20ppb.

Resultados e Discussão

Tabela 12. Percentagem do Desvio padrão relativo das médias das áreas dos padrões de 200 ppb, preparado por operadores diferentes.

<i>Pesticida</i>	<i>Área do operador 1 (média)</i>	<i>Área do operador 2 (média)</i>	<i>%RSD</i>
Diclorvos	176781	187742	4,252
Mevinfos	150083	143322	3,259
Difenilamina	122842	117650	3,053
alfa-HCH	36452	36392	0,116
Dimetoato	33187	25617,5	18,204
beta-HCH	31706	31693	0,029
Quintozeno	29427	29642	0,515
Terbufos	298063	294726	0,796
Lindano	42914	41939	1,625
Diazinão	99831	103116	2,289
Dissulfatão	105192	107333	1,425
Clortalonil	19216	18701	1,921
delta-HCH	29679	30271	1,397
Paratião Metilo	40758	40543	0,374
Metalaxil	77207	74632	2,398
Carbaril	34824	35014	0,385
Heptacloro	59812	60299	0,573
Malatião	67783	68859	1,114
Diclofluanida	93259	92306	0,726
Chlorpyrifos	58024	59690	2,002
Fentião	260425	247437	3,617
Aldrina	47646	48026	0,562
Paratião Etilo	45948	46084	0,209
Clorfenvinfos	76851	76926	0,069
Captana	8321	7640	6,034
Folpeto	5543	5535	0,102
Cis-Clordano	163518	162693	0,358
P,P'-DDE	123374	119304	2,372
Miclobutanil	29229	27984	3,077
Bupirinato	89360	86331	2,438
Cresoxim-Metilo	102524	101197	0,921
Etião	330318	327732	0,556
4,4-DDD	198336	194134,5	1,514
Endossulfão Sulfato	25796,5	25816	0,053
4,4-DDT	64367	66894	2,723
Tebuconazol	6500	6420	0,876
Bifentrina	341771	345428	0,753
Fosalona	60583	57485	3,711
Azinfos- Metilo	8369	7758	5,358
Acrinatrina pico 1	6811	6389	4,521
Acrinatrina pico 2	47512	47637	0,186
Permetrina pico 1	39589	37825	3,223
Permetrina pico 2	85291	81390	3,310

O desvio padrão relativo apresentado na Tabela 12 indica que a reprodutibilidade entre os operadores é aceitável, pois os valores de %RSD são baixos. O pesticida dimetoato é o único pesticida que apresenta um valor de %RSD mais elevado (18,204%), contudo é inferior a 20% sendo assim um valor aceitável.

Deste modo, pode considerar-se que o método é robusto pois apresenta boa reprodutibilidade na preparação de padrões por operadores diferentes.

3.1.6. Sensibilidade

A sensibilidade do método é avaliada através do declive das rectas de calibração. A um declive com um valor elevado corresponderá a uma maior sensibilidade do método.

No caso da validação do método de análise de pesticidas na matriz de maçã/pêra, existem diferenças nos valores dos declives nas gamas de calibração em estudo. Nas Tabelas 6 e 7, comparando no mesmo pesticida, verifica-se que os valores dos declives da gama 120-1200ppb são superiores à gama de 10-120ppb, devido a esta última estar numa zona de avaliação vestigial, tornando-se mais difícil a detecção dos pesticidas. Esta dificuldade de detecção está correlacionada com a menor sensibilidade do método para estes valores de concentração inferior. Contudo, vários pesticidas nesta gama 10-120ppb têm coeficientes de correlação bastante aceitáveis para uma análise vestigial, bem como a repetibilidade de cada padrão na recta de calibração (inferior a 20%).

3.1.7. Percentagens de Recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados a dois níveis, 20 e 200 ppb.

Pelo critério definido no Documento N° SANCO/2007/3131 de 31 de Outubro de 2007 as percentagens de recuperação aceitáveis numa análise de pesticidas têm de estar compreendidas entre 70-120% com um desvio padrão relativo inferior a 20%.

Tabela 13. Ensaio de recuperação do nível 20 ppb.

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho (ppb)</i>	<i>Área média Ensaio Recuperação 20 ppb</i>	<i>Área média Padrão Verificação 20 ppb</i>	<i>%RSD</i>	<i>% Recuperação 20 ppb</i>
Diclorvos	20 - 1200	40139	43908	6,342	91,416
Mevinfos	10 - 1200	12373	12995	3,468	95,214
Etoprofos	-	-	-	-	-
Difenilamina	10 - 1200	9312	11970,5	17,666	77,791
alfa-HCH	10 - 1200	3310	3834	10,373	86,333
Dimetoato	20 - 1200	1663	2228	20,535	74,641
beta-HCH	10-1200	1710	2074	13,604	82,449
Quintozeno	40 - 1200	-	-	-	-
Terbufos	10-1200	23522	27382	10,724	85,903
Lindano	10-1200	3660	4563	15,530	80,210
Diazinão	10-1200	11150,5	12707,5	9,229	87,747
Dissulfatão	10-1200	8316	10230	14,595	81,290
Clortalonil	10-1200	1111,5	1277	9,799	87,040
Delta-HCH	10-1200	2276	2706,5	12,219	84,094
Paratião Metilo	40-1200	-	-	-	-
Metalaxil	10-1200	5793	6010	2,600	96,389
Carbaril	20-1200	2686	2989	7,551	89,863
Heptacloro	10-1200	5189	6307	13,753	82,274

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho (ppb)</i>	<i>Área média Ensaio Recuperação 20 ppb</i>	<i>Área média Padrão Verificação 20 ppb</i>	<i>%RSD</i>	<i>% Recuperação 20 ppb</i>
Malatião	10-1200	5476	6310	10,007	86,783
Diclofluanida	10-1200	5984	7217	13,209	82,915
Chlorpyriphos	10-1200	5116	5870,5	9,712	87,148
Fentião	10-1200	19594	23709	13,439	82,644
Aldrina	10-1200	4245	4115	2,199	103,159
Paratião Etilo	20-1200	2484	3477,5	23,568	71,431
Clorfenvinfos	10-1200	7312	8731	12,509	83,748
Captana	200-1200	-	-	-	-
Folpeto	200-1200	-	-	-	-
Cis-Clordano	10-1200	15136	15767	2,888	95,998
Endossulfão	-	-	-	-	-
Imazalil	400-1200	-	-	-	-
P,P'-DDE	10-1200	11628	12682,5	6,134	91,685
Miclobutanil	20-1200	-	-	-	-
Bupirimato	10-1200	9427	10843	9,879	86,941
Cresoxim-Metilo	10-1200	9835	10945	7,554	89,858
Dieldrina	-	-	-	-	-
Etião	10-1200	27997	30518	6,093	91,739
4,4-DDD	10-1200	21317	22342,5	3,322	95,410
Endossulfão Sulfato	20-1200	1910	2314	13,526	82,541
4,4-DDT	40-1200	-	-	-	-
Tebuconazol	120-1200	-	-	-	-
Bifentrina	10-1200	27403	29168	4,412	93,949
Fosalona	20-1200	4616	5610	13,747	82,282
Azinfos- Metilo	200-1200	-	-	-	-
Acrinatrina pico 1	80-1200	-	-	-	-
Acrinatrina pico 2	20-1200	2345	2603,5	7,388	90,071
Permetrina pico 1	80-1200	-	-	-	-
Permetrina pico 2	10-1200	5523	6608	12,649	83,581

As percentagens de recuperação do nível de concentração 20 ppb encontram-se no intervalo definido pelo documento SANCO, com %RSD inferior a 20%. Muitos dos pesticidas não apresentam valores de percentagens de recuperação devido à sua gama de trabalho não incluir o padrão de 20ppb.

Tabela 14. Ensaio Recuperação do nível 200 ppb.

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho (ppb)</i>	<i>Área média Ensaio Recuperação 200 ppb</i>	<i>Área Padrão Verificação 200 ppb</i>	<i>%RSD</i>	<i>% Recuperação 200 ppb</i>
Diclorvos	20 - 1200	169798	176781	2,849	96,050
Mevinfos	10 - 1200	137129,5	150083	6,378	91,369
Etoprofos	-	-	-	-	-
Difenilamina	10 - 1200	121494	122842	0,780	98,903
Alfa-HCH	10 - 1200	34479,5	36452	3,933	94,589

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho (ppb)</i>	<i>Área média Ensaio Recuperação 200 ppb</i>	<i>Área Padrão Verificação 200 ppb</i>	<i>%RSD</i>	<i>% Recuperação 200 ppb</i>
Dimetoato	20 - 1200	35788,5	33187	5,334	107,839
Beta-HCH	10-1200	31818,5	31706	0,250	100,355
Quintozeno	40 - 1200	29004	29427	1,024	98,563
Terbufos	10-1200	294885	298063	0,758	98,934
Lindano	10-1200	39790	42914	5,342	92,720
Diazinão	10-1200	101040,5	99831	0,852	101,212
Dissulfatão	10-1200	104693	105192	0,336	99,526
Clortalonil	10-1200	18480,5	19216	2,759	96,172
Delta-HCH	10-1200	29750	29679	0,169	100,239
Paratião Metilo	40-1200	42055	40758	2,215	103,182
Metalaxil	10-1200	75290,5	77207	1,777	97,518
Carbaril	20-1200	38961,5	34824	7,930	111,881
Heptacloro	10-1200	55666	59812	5,077	93,068
Malatião	10-1200	68152,5	67783	0,384	100,545
Diclofluánida	10-1200	96617,5	93259	2,501	103,601
Chlorpyrifos	10-1200	57975,5	58024	0,059	99,916
Fentião	10-1200	268813,5	260425	2,242	103,221
Aldrina	10-1200	44556	47646	4,740	93,515
Paratião Etilo	20-1200	45038	45948	1,414	98,020
Clorfenvinfos	10-1200	74540	76851	2,159	96,993
Captana	200-1200	9979	8321	12,813	119,925
Folpeto	200-1200	5597	5543	0,686	100,974
Cis-Clordano	10-1200	158702,5	163518	2,114	97,055
Endossulfão	-	-	-	-	-
Imazalil	400-1200	-	-	-	-
P,P'-DDE	10-1200	117884,5	123374	3,218	95,551
Miclobutanil	20-1200	26233,5	29229	7,638	89,752
Bupirimato	10-1200	90733	89360	1,078	101,536
Cresoxim-Metilo	10-1200	103794	102524	0,871	101,239
Diêdrina	-	-	-	-	-
Etião	10-1200	337515,5	330318	1,524	102,179
4,4-DDD	10-1200	195902	198336	0,873	98,773
Endossulfão Sulfato	20-1200	25011,5	25796,5	2,185	96,957
4,4-DDT	40-1200	65008,5	64367	0,701	100,997
Tebuconazol	120-1200	6247	6500	2,807	96,108
Bifentrina	10-1200	338408,5	341771	0,699	99,016
Fosalona	20-1200	66706,5	60583	6,803	110,108
Azinfos- Metilo	200-1200	6610	8369	16,607	78,982
Acinatrina pico 1	80-1200	9331	6811	22,078	136,999
Acinatrina pico 2	20-1200	48174	47512	0,978	101,393
Permetrina pico 1	80-1200	37682,5	39589	3,489	95,184
Permetrina pico 2	10-1200	88319,5	85291	2,467	103,551

Resultados e Discussão

As percentagens de recuperação do nível 200 ppb encontram-se no intervalo definido como aceitável pelo documento SANCO, com %RSD inferior a 20%, exceptuando-se o pesticida acrinatrina pico 1 que também excede o desvio padrão relativo admissível. Nas Figuras seguintes evidencia-se este facto.

Resultados e Discussão

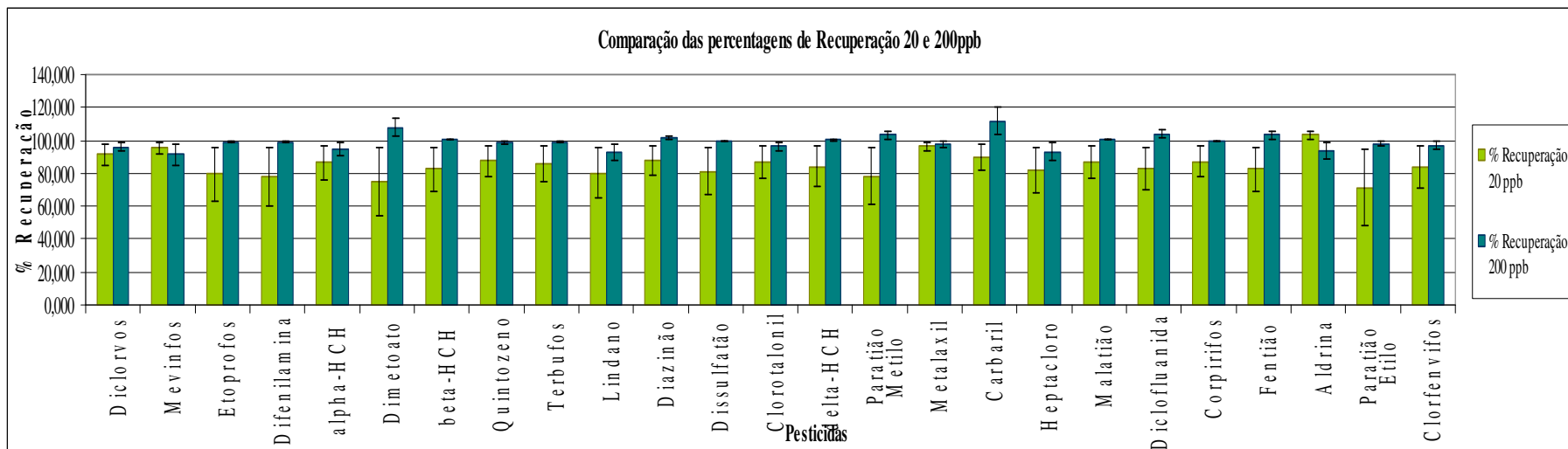


Figura 14. Comparação das percentagens de recuperação a 20 e 200ppb.

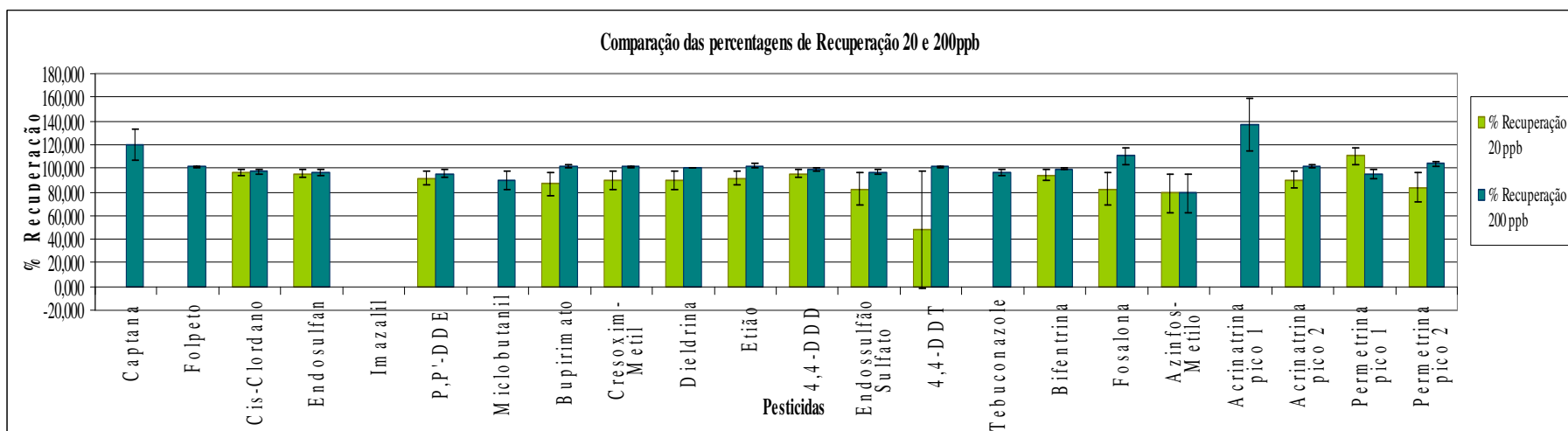


Figura 15. Comparação das percentagens de recuperação de 20 e 200ppb.

3.2. Validação do método na matriz Morango

A validação do método de análise de pesticidas no morango, foi realizada na matriz de morango biológico.

3.2.1. Identidade/Selectividade dos pesticidas

A identidade de cada pesticida em avaliação foi verificada através da técnica cromatográfica GC-MS.

Nesta validação o número de pesticidas em análise foi aumentado. Introduziram-se mais 6 pesticidas: vinclozolina, procimidona, tiabendazole, fludioxonil, propargite e cipermetrina.

Para determinar se cada pesticida era analisável por GC-MS, preparou-se uma solução de padrão de 1200ppb com os novos pesticidas em teste. Todos os picos cromatográficos destes pesticidas foram identificados com facilidade, em exceção dos pesticidas tiabendazole e cipermetrina. Para se verificar esta situação com mais detalhe, analisaram-se estes pesticidas, em frascos separados, com a concentração de 2 ppm num mililitro de acetonitrilo acidificado. Neste caso observaram-se os picos em causa, embora com pouca intensidade. Assim, conclui-se que os seis novos pesticidas introduzidos para a validação do método são analisáveis por GC-MS.

Contudo, analisaram-se os pesticidas tiabendazole e cipermetrina com a concentração de 2ppm num mililitro de matriz de morango, para verificar se a baixa intensidade dos pesticidas se mantinha quando analisados na matriz de morango. Os cromatogramas obtidos são os seguintes apresentados na Figura 16.

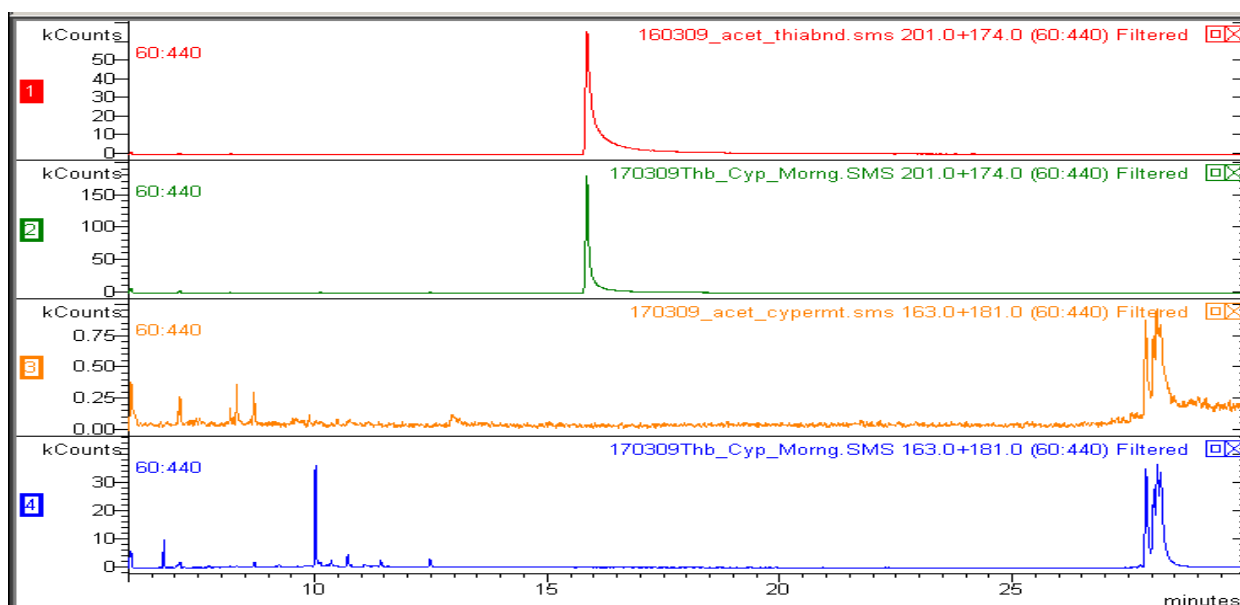


Figura 16. Cromatogramas da análise dos pesticidas Tiabendazole (tr=16 minutos) e Cipermetrina (tr=28 minutos) em acetonitrilo acidificado e em matriz de morango.

Na Figura 16, o 1º cromatograma corresponde ao pesticida tiabendazole em acetonitrilo acidificado e o 2º cromatograma corresponde ao pesticida tiabendazole na matriz de morango. Observa-se que a mesma

concentração deste pesticida, neste caso 2 ppm, tem comportamentos diferentes em matrizes distintas, isto é, a matriz de morango melhora a análise do pesticida pois o sinal deste pesticida aumenta consideravelmente nesta matriz em relação ao acetonitrilo acidificado.

O 3º cromatograma corresponde ao pesticida cipermetrina em acetonitrilo acidificado e o 4º cromatograma corresponde ao pesticida cipermetrina na matriz de morango. Observa-se, como no pesticida descrito anteriormente, que a matriz de morango aumenta o sinal do analito.

Em suma, a matriz de morango melhora o sinal de ambos os pesticidas, confirmando-se o efeito de matriz na análise destes pesticidas.

A determinação do t_R foi feita do mesmo modo como descrito no ponto 3.1.1. Identidade e Selectividade dos Pesticidas.

Os tempos de retenção dos pesticidas em solução estão representados na Tabela 15.

3.2.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação são determinados como descrito no ponto 3.1.2. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

Tabela 15. Dados da recta de calibração para o morango.

<i>Pesticida</i>	<i>t_{ret} (min.)⁽¹⁾</i>	<i>Gama de Trabalho Total (ppb)</i>	<i>LQ (ppb)</i>	<i>LD (ppb)</i>
Diclorvos	6,92	10 - 1200	50,079	15,024
Mevinfos	8,10	10 - 1200	56,396	16,919
Etoprofos	9,90	10 - 1200	8,002	2,401
Difenilamina	9,91	10 - 1200	54,840	16,452
alfa-HCH	10,76	10 - 1200	45,977	13,793
Dimetoato	11,01	80 - 1200	2209,816	662,945
beta-HCH	11,33	20-1200	37,484	11,245
Quintozeno	11,40	10 - 1200	36,977	11,093
Terbufos	11,46	10-1200	33,450	10,035
Lindano	11,52	10-1200	56,043	16,813
Diazinão	11,54	10-1200	19,961	5,988
Dissulfatão	11,89	10-1200	44,932	13,480
Clortalonil.	11,92	10-1200	24,468	7,340
delta-HCH	12,19	10-1200	3,698	1,109
Vinclozolina	12,94	10-1200	81,560	24,468
Paratião Metilo	13,05	40-1200	185,872	55,762
Metalaxil	13,24	10-1200	95,405	28,621
Carbaril	13,27	80-1200	2590,016	777,005
Heptacoloro	13,32	10-1200	44,081	13,224
Malatião	13,91	10-1200	228,511	68,553
Diclofluanida	13,94	10-800	14,721	4,416
Clorpirifos	14,14	10-1200	17,921	5,376
Fentião	14,28	10-1200	29,952	8,986
Aldrina	14,34	10-1200	26,178	7,853

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>t_{ret} (min.)⁽¹⁾</i>	<i>Gama de Trabalho Total (ppb)</i>	<i>LQ (ppb)</i>	<i>LD (ppb)</i>
Paratião Etilo	14,38	10-1200	84,370	25,311
Clorfenvinfos	15,45	10-1200	354,037	106,211
Procimidona	15,79	10-1200	57,512	17,254
Tiabendazole	-	-		
Captana	15,83	200-1200	764,768	229,431
Folpeto	15,99	200-1200	20766,801	6230,040
Cis-Clordano	16,63	10-1200	24,431	7,329
Endossulfão	16,65	10-1200	111,224	33,367
Fludioxonil	17,09	120-1200	1359,803	407,941
Imazalil	17,02	200-1200	192642,588	57792,776
P,P'-DDE	17,30	10-1200	41,101	12,330
Miclobutanil	17,46	10-1200	79,378	23,813
Bupirimato	17,49	20-1200	71,758	21,527
Cresoxim-Metilo	17,54	10-1200	68,215	20,465
Dieldrina	17,52	10-1200	70,823	21,247
Etião	18,63	10-1200	42,901	12,870
4,4-DDD	18,70	10-1200	70,880	21,264
Endossulfão Sulfato	19,86	10-1200	34,797	10,439
4,4-DDT	19,95	10-1200	32,595	9,778
Propargite	20,42	10-1200	61,962	18,589
Tebuconazol	20,42	200-1200	528,801	158,640
Bifentrina	21,54	10-1200	56,628	16,988
Fosalona	22,97	10-1200	16,694	5,008
Azinfos- Metilo	23,20	200-1200	0,009	0,003
Acrinatrina pico 1	23,69	400-1200	0,008	0,002
Acrinatrina pico 2	24,27	80-1200	679,251	203,775
Permetrina pico 1	26,19	10-800	106,410	31,923
Permetrina pico 2	26,57	10-1200	83,844	25,153
Cipermetrina	27,87	80-1200	6888,266	2066,480

(1) De acordo com as condições de GC-MS utilizadas

Na Tabela 15 estão representados os tempos de retenção de cada pesticida, a gama de trabalho na validação do método de análise e os limiares analíticos associados.

A gama de trabalho total indica em que intervalo de concentrações se podem quantificar os pesticidas em análise.

O pesticida tiabendazole é o único pesticida que não se vai analisar nesta validação. Isto deve-se à recta de calibração não estar adequada para a análise com este método, como apresentado na Tabela 18.

3.2.3. Gama de trabalho e Linearidade

De seguida, apresentam-se os dados das gamas de trabalho das rectas de calibração de cada pesticida, mais especificamente, o desvio padrão relativo em percentagem do padrão de menor concentração quantificável pelo método e do padrão de 120ppb, o declive, ordenada na origem e o coeficiente de correlação da recta de calibração (R).

Tabela 16. Recta de calibração para os pesticidas estudados na matriz de morango para os primeiros 5 níveis (LQ-120ppb)

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho Recta 1 (ppb)</i>	<i>% RSD LQ</i>	<i>%RSD 120</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada Origem</i>	<i>R</i>
Diclorvos	10 - 120	15,30	3,73	421,353	3123,307	0,996
Mevinfos	10 - 120	15,73	12,96	243,190	-161,616	0,997
Etoprofos	10 - 120	18,63	7,18	252,980	-297,340	1,000
Difenilamina	10 - 120	18,97	5,00	440,399	3385,186	0,992
alfa-HCH	10 - 120	13,87	3,03	220,926	-294,919	0,994
Dimetoato	-	-	-	-	-	-
beta-HCH	20 - 120	11,46	3,31	145,940	132,320	0,998
Quintozeno	10 - 120	11,12	8,42	117,430	102,645	0,998
Terbufos	10 - 120	3,13	6,22	1421,568	-817,348	1,000
Lindano	10 - 120	12,39	6,31	229,559	349,732	0,993
Diazinão	10 - 120	2,86	4,06	473,530	1179,876	0,999
Dissulfatão	10 - 120	5,42	4,70	505,855	791,982	1,000
Clortalonil	10 - 120	10,87	7,99	67,951	233,118	1,000
delta-HCH	10 - 120	19,75	5,05	155,970	364,065	1,000
Vinclozolina	10 - 120	11,86	6,27	217,987	919,315	0,993
Paratião Metilo	-	-	-	-	-	-
Metalaxil	10 - 120	14,39	16,18	97,497	-201,696	0,999
Carbaril	-	-	-	-	-	-
Heptaclo	10 -120	14,17	5,19	206,056	-331,430	0,995
Malatião	10 - 120	13,88	4,01	372,144	-910,966	0,973
Diclofluánida	10 - 120	16,37	4,85	323,609	-73,288	1,000
Clorpirifos	10 - 120	6,66	5,74	225,127	297,112	0,991
Fentião	10 - 120	8,47	4,56	780,654	3586,027	0,998
Aldrina	10 - 120	10,38	3,39	244,655	561,070	0,998
Paratião Etilo	10 - 120	17,96	11,07	153,114	-437,031	0,991
Clorfenvinfos	10 - 120	6,41	16,25	142,490	-489,191	0,9885
Procimidona	10 - 120	19,11	8,27	354,208	1401,594	0,993
Tiabendazole	-	-	-	-	-	-
Captana	-	-	-	-	-	-
Folpeto	-	-	-	-	-	-
Cis-Clordano	10 - 120	12,81	4,92	686,123	2221,769	0,998
Endossulfão	10 - 120	19,19	8,83	61,136	140,274	0,991
Fludioxonil	-	-	-	-	-	-
Imazalil	-	-	-	-	-	-
P,P'-DDE	10 - 120	11,60	6,22	445,795	2176,888	0,996
Miclobutanil	10 - 120	15,60	14,85	402,089	-349,501	0,993
Bupirimato	20 - 120	10,29	14,60	363,860	2279,900	0,985

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho Recta 1 (ppb)</i>	<i>% RSD LQ</i>	<i>%RSD 120</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada Origem</i>	<i>R</i>
Cresoxim-Metilo	10 - 120	10,56	7,13	525,606	1620,911	0,991
Dieldrina	10 - 120	10,16	7,13	506,454	1445,694	0,991
Etião	10 - 120	8,29	7,59	1123,863	896,936	0,996
4,4-DDD	10 - 120	9,72	8,42	755,385	3520,466	0,992
Endossulfão Sulfato	10 - 120	14,32	7,26	67,102	431,043	0,998
4,4-DDT	10 - 120	8,40	3,29	208,259	-14,781	0,997
Propargite	10-120	3,40	7,79	268,846	1339,526	0,990
Tebuconazol	-	-	-	-	-	-
Bifentrina	10-120	16,21	8,58	1031,304	871,186	0,995
Fosalona	10-120	19,67	17,59	69,223	82,349	1,000
Azinfos- Metilo	-	-	-	-	-	-
Acrinatrina pico 1	-	-	-	-	-	-
Acrinatrina pico 2	-	-	-	-	-	-
Permetrina pico 1	10-120	17,75	9,16	105,343	-353,762	0,982
Permetrina pico 2	10-120	13,59	0,70	224,650	-176,930	0,987
Cipermetrina	-	-	-	-	-	-

Tabela 17. Recta de calibração para os pesticidas estudados na matriz de morango para os primeiros 5 níveis (120-1200ppb)

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho Recta2 (ppb)</i>	<i>% RSD 120</i>	<i>%RSD 1200</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada Origem</i>	<i>R</i>
Diclorvos	120-1200	3,73	10,59	443,667	-2589,601	0,995
Mevinfos	120-1200	12,96	20,03	465,890	-33482,204	0,994
Etoprofos	120-1200	7,18	12,91	275,436	-2924,089	0,997
Difenilamina	120-1200	5,00	14,33	747,610	-43831,112	0,991
alfa-HCH	120-1200	3,03	9,97	287,019	-9473,067	0,994
Dimetoato	120-1200	15,62	12,51	97,222	-7308,890	0,959
beta-HCH	120-1200	3,31	23,78	189,950	-5421,971	0,997
Quintozeno	120-1200	8,42	9,81	134,208	-4437,629	0,995
Terbufos	120-1200	6,22	10,86	1556,462	-24029,517	0,995
Lindano	120-1200	6,31	15,53	284,302	-8914,579	0,992
Diazinão	120-1200	6,34	11,55	495,299	-3658,018	0,994
Dissulfatão	120-1200	4,70	14,74	513,379	-4764,109	0,996
Clortalonil	120-1200	7,99	8,51	121,290	-6519,193	0,987
delta-HCH	120-1200	5,05	21,16	205,010	-5914,855	0,996
Vinclozolina	120-1200	6,27	19,05	242,448	-5288,046	0,999
Paratião Metilo	120-1200	9,82	12,75	334,972	-32675,648	0,992
Metalaxil	120-1200	16,18	18,81	190,894	-13428,044	0,992
Carbaril	120-1200	13,02	12,38	155,983	-11113,158	0,962
Heptaclo	120-1200	5,19	13,64	237,270	-5654,103	0,998
Malatião	120-1200	4,01	9,90	373,385	-13660,096	0,993
Diclofluanida	120-800	4,85	15,30	371,342	-6423,967	0,996
Clorpirifos	120-1200	5,74	15,05	263,165	-5626,026	0,993
Fentião	120-1200	4,56	17,81	999,159	-28897,970	0,999
Aldrina	120-1200	3,39	8,77	242,121	-627,007	0,998

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho Recta2 (ppb)</i>	<i>% RSD 120</i>	<i>%RSD 1200</i>	<i>Declive</i>	<i>Ordenada Origem</i>	<i>R</i>
Paratião Etilo	120-1200	11,07	9,28	288,304	-20884,396	0,996
Clorfenvinfos	120-1200	16,25	12,06	282,205	-24713,600	0,993
Procimidona	120-1200	8,27	18,92	526,415	-20129,427	0,9977
Tiabendazole	Qualitativo	-	-			-
Captana	200 - 1200	18,97	20,10	77,075	-4324,064	0,990
Folpeto	200 - 1200	21,05	18,58	18,235	-1587,046	0,983
Cis-Clordano	120-1200	4,92	16,45	703,630	-2062,429	0,999
Endossulfão	120-1200	8,83	16,69	54,051	-87,925	0,988
Fludioxonil	120-1200	4,19	13,36	209,241	-23498,810	0,988
Imazalil	200-1200	12,81	6,03	2,805	-430,610	0,993
P,P'-DDE	120-1200	6,22	18,33	533,691	-10076,034	0,999
Miclobutanil	120-1200	14,85	11,12	460,645	-19546,697	0,996
Bupirimato	120-1200	14,60	11,38	477,202	-18867,826	0,996
Cresoxim-Metilo	120-1200	7,13	21,75	639,720	-18590,456	0,998
Dioldrina	120-1200	7,13	17,24	614,740	-18549,819	1,000
Etião	120-1200	7,59	9,75	1498,791	-45708,932	0,998
4,4-DDD	120-1200	8,42	12,05	946,671	-27702,889	0,997
Endossulfão Sulfato	120-1200	7,26	18,41	94,110	-2870,081	0,997
4,4-DDT	120-1200	3,29	13,68	392,293	-21783,579	0,992
Propargite	120-1200	7,79	10,45	365,810	-11891,753	0,997
Tebuconazol	200-1200	13,26	20,04	12,204	-1916,500	0,995
Bifentrina	120-1200	8,58	8,44	1432,294	-	0,998
					101573,203	
Fosalona	120-1200	17,59	15,00	304,875	-30373,146	0,987
Azinfos- Metilo	800-1200	9,38	3,88	30,521	-17144,000	1,000
Acrinatrina pico 1	400-1200	20,49	22,74	10,616	286,830	1,000
Acrinatrina pico 2	120-1200	11,35	12,88	27,049	1933,559	0,990
Permetrina pico 1	120-1200	9,16	14,89	163,342	-10848,697	0,996
Permetrina pico 2	120-1200	0,70	10,17	357,683	-19585,165	0,988
Cipermetrina	120-1200	13,00	14,53	73,318	-1534,907	0,986

Nas tabelas 16 e 17 está representada a divisão da recta de calibração total, numa gama inferior e numa gama superior. Esta decisão deveu-se ao facto de se ter verificado que com esta divisão se conseguiu ter uma quantificação mais fidedigna, nomeadamente para os níveis de calibração para concentrações inferiores (10-120 ppb), pois estes tinham uma menor contribuição nos parâmetros da recta total em relação aos níveis de calibração mais concentrados (120-1200 ppb). Este facto deve-se aos valores de concentração serem muito pequenos (análise vestigial) e a razão sinal ruído nesta zona ser muito elevada. Assim, a quantificação foi realizada através destas duas rectas, consoante a área do pesticida, excluindo-se a avaliação através da recta de calibração total. Nas Figuras seguintes representa-se graficamente a diferença dos declives da Recta 1 e da Recta 2.

Resultados e Discussão

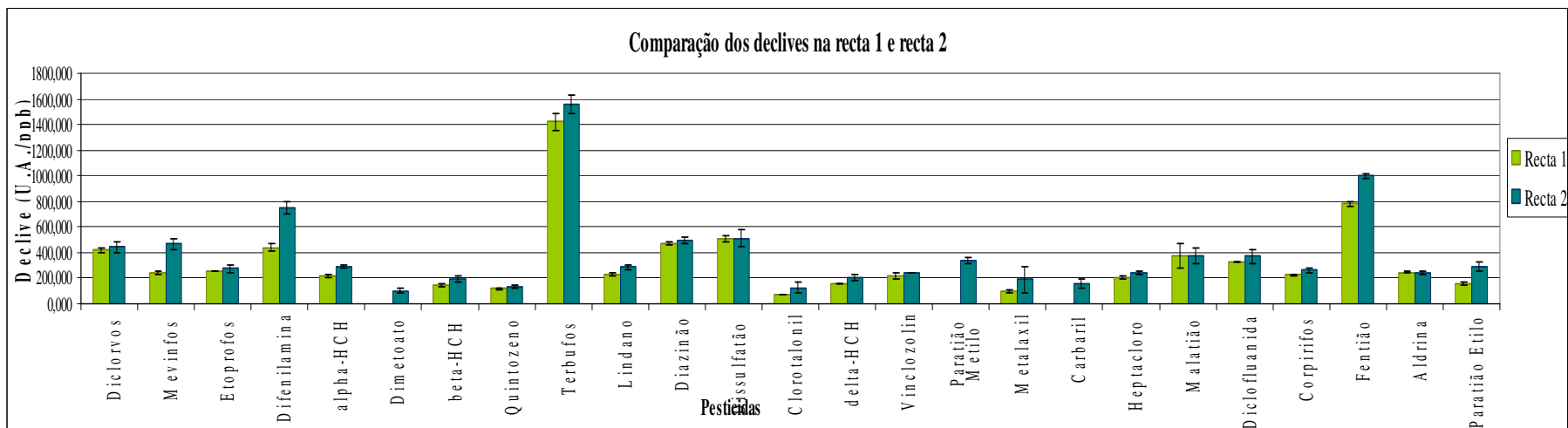


Figura 17. Comparação dos declives nas rectas de calibração 1 e 2 na matriz de morango.

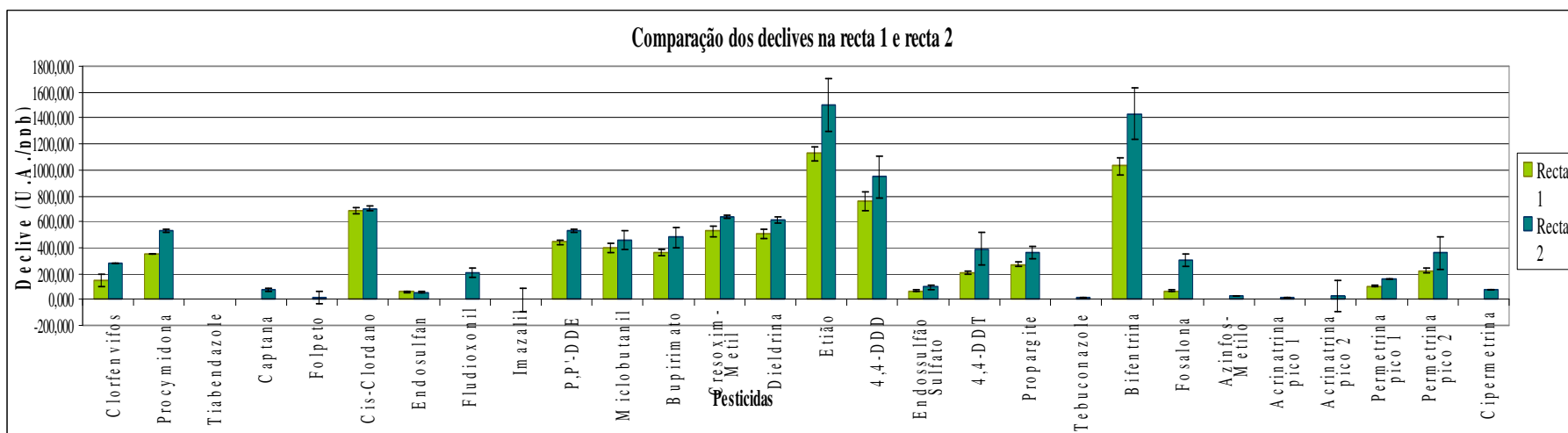


Figura 18. Comparação dos declives nas rectas de calibração 1 e 2 na matriz de morango.

3.2.3.1. Verificação da Homocedasticidade das variâncias da recta de calibração

Para se determinar qual o melhor método de determinação dos parâmetros da recta de calibração é necessário avaliar se as variâncias entre os padrões da calibração são diferentes - Homocedasticidade. Para se verificar a Homocedasticidade das variâncias recorreu-se ao teste de Bartlett. A Tabela 18 indica o resultado obtido de χ^2 de cada recta de calibração.

Tabela 18. Teste de Bartlett para verificação da Homocedasticidade das rectas de calibração.

Pesticida	Recta 1 (LQ-120ppb)		Recta 2 (120-1200ppb)	
	χ^2 calculado	χ^2 Tabelado	χ^2 calculado	χ^2 Tabelado
Diclorvos	12,854	9,488	29,218	9,488
Mevinfos	10,242	7,815	22,433	7,815
Etoprofos	11,493	7,815	22,504	7,815
Difenilamina	10,630	9,488	36,568	9,488
alfa-HCH	20,239	9,488	33,916	9,488
Dimetoato	-	-	26,200	11,070
beta-HCH	1,593	5,991	40,848	9,488
Quintozeno	9,552	9,488	30,417	9,488
Terbufos	36,570	9,488	26,077	9,488
Lindano	14,751	9,488	25,685	9,488
Diazinão	30,491	9,488	18,142	9,488
Dissulfatão	30,375	9,488	35,404	9,488
Clortalonil.	18,144	7,815	21,587	7,815
delta-HCH	13,101	7,815	36,034	9,488
Vinclozolina	21,659	9,488	29,762	9,488
Paratião Metilo	-	-	35,133	11,070
Metalaxil	9,026	7,815	30,944	7,815
Carbaril	-	-	26,966	11,070
Heptacloro	17,349	9,488	28,443	9,488
Malatião	28,159	9,488	29,963	9,488
Diclofluanida	18,118	7,815	29,488	7,815
Clorpirifos	22,157	9,488	27,776	9,488
Fentião	26,660	7,815	33,986	9,488
Aldrina	15,702	9,488	25,529	9,488
Paratião Etilo	13,452	7,815	25,858	9,488
Clorfenvinfos	26,552	7,815	13,959	7,815
Procimidona	15,731	9,488	32,937	9,488
Tiabendazole	-	-	-	-
Captana	-	-	7,210	5,991
Folpeto	-	-	45,198	5,991
Cis-Clordano	25,313	9,488	34,246	9,488
Endossulfão	10,545	9,488	19,822	9,488
Fludioxonil	-	-	8,206	5,991

Resultados e Discussão

Pesticida	Recta 1 (LQ-120ppb)		Recta 2 (120-1200ppb)	
	$\chi^2_{\text{calculado}}$	χ^2_{Tabelado}	$\chi^2_{\text{calculado}}$	χ^2_{Tabelado}
Imazalil	-	-	0,615	5,991
P,P'-DDE	22,320	9,488	31,330	9,488
Miclobutanil	13,599	9,488	25,712	9,488
Bupirimato	4,094	7,815	25,936	9,488
Cresoxim-Metilo	25,181	9,488	33,597	9,488
Dieldrina	26,012	9,488	33,594	9,488
Etião	21,353	7,815	26,362	7,815
4,4-DDD	24,839	9,488	25,539	7,815
Endossulfão Sulfato	15,623	7,815	35,664	7,815
4,4-DDT	20,533	9,488	44,070	9,488
Propargite	18,971	9,488	18,041	9,488
Tebuconazol	-	-	5,592	5,991
Bifentrina	11,860	7,815	26,085	9,488
Fosalona	23,663	5,991	29,939	7,815
Azinfos- Metilo	-	-	0,002	3,841
Acrinatrina pico 1	-	-	1,128	3,841
Acrinatrina pico 2	-	-	24,507	11,070
Permetrina pico 1	9,887	7,815	25,976	9,488
Permetrina pico 2	4,132	7,815	29,954	9,488
Cipermetrina	-	-	38,270	11,070

Os valores a negrito na Tabela 18 indicam que as variâncias dos padrões das rectas de calibração são homogéneas devido aos seus valores de $\chi^2_{\text{calculado}}$ serem inferiores aos valores de χ^2_{Tabelado} . Assim, quando este facto se verifica, as rectas de calibração são avaliadas através de regressão linear, pois os valores em teste apresentam homocedasticidade.

Os outros pesticidas são avaliados através de regressão linear pesada, pois o teste de Bartlett às variâncias das suas rectas, indica que estas não são homogéneas ($\chi^2_{\text{calculado}}$ superior a χ^2_{Tabelado}), não se verificando a homocedasticidade dos padrões das rectas de calibração.

Nas Tabelas 16 e 17 os valores de declive e ordenada na origem já estão de acordo com o resultado do teste de Bartlett.

3.2.3.2. Verificação do ajuste da recta de calibração

Para se avaliar a adequação das rectas apresentadas anteriormente, para a quantificação dos pesticidas, é necessário recorrer a uma análise de regressão da recta de calibração através de uma ANOVA.

Resultados e Discussão

Tabela 19. Avaliação da linearidade das rectas de calibração na matriz do morango apresentadas nas tabelas 16 e 17.

<i>Pesticida</i>	<i>Recta 1 (LQ-120ppb)</i>			<i>Recta 2 (120-1200ppb)</i>		
	<i>Fajuste</i>	<i>Fiab</i>	<i>GL</i>	<i>Fajuste</i>	<i>Fiab</i>	<i>GL</i>
Diclorvos	254,447	3,112	(4,14)	182,375	3,179	(4,13)
Mevinfos	97,014	3,587	(3,11)	15,915	3,587	(3,11)
Etoprofos	176,892	3,587	(3,11)	138,834	3,490	(3,12)
Difenilamina	269,804	3,179	(4,13)	99,608	3,259	(4,12)
Alfa-HCH	397,438	3,179	(4,13)	230,746	3,259	(4,12)
Dimetoato	-	-	-	141,546	3,204	(5,11)
Beta-HCH	790,362	4,737	(2,7)	38,057	3,259	(4,12)
Quintozeno	157,758	3,179	(4,13)	100,710	3,179	(4,13)
Terbufos	223,217	3,112	(4,14)	165,824	3,112	(4,14)
Lindano	217,668	3,112	(4,14)	80,460	3,259	(4,12)
Diazinão	168,889	3,112	(4,14)	142,026	3,179	(4,13)
Dissulfatão	242,999	3,112	(4,14)	97,491	3,112	(4,14)
Clortalonil.	171,657	3,490	(3,12)	371,469	3,862	(3,9)
Delta-HCH	190,464	3,587	(3,11)	48,442	3,112	(4,14)
Vinclozolina	133,404	3,179	(4,13)	51,693	3,259	(4,12)
Paratião Metilo	-	-	-	108,022	3,106	(5,12)
Metalaxil	51,190	4,347	(3,7)	68,938	3,478	(4,10)
Carbaril	-	-	-	147,567	3,204	(5,11)
Heptaclo	302,398	3,112	(4,14)	118,245	3,112	(4,14)
Malatião	178,314	3,179	(4,13)	146,045	3,357	(4,11)
Diclofluanida	334,444	3,490	(3,12)	108,781	3,708	(3,10)
Clorpirifos	170,823	3,179	(4,13)	93,555	3,179	(4,13)
Fentião	206,898	3,490	(3,12)	63,463	3,357	(4,11)
Aldrina	317,425	3,179	(4,13)	233,717	3,357	(4,11)
Paratião Etilo	186,518	3,587	(3,11)	154,424	3,478	(4,10)
Clorfenvinfos	74,592	3,862	(3,9)	133,349	4,347	(3,7)
Procimidona	88,658	3,179	(4,13)	64,495	3,259	(4,12)
Tiabendazole	-	-	-	3,452	7,709	(1,4)
Captana	-	-	-	21,269	5,143	(2,6)
Folpeto	-	-	-	16,327	4,459	(2,8)
Cis-Clordano	196,543	3,112	(4,14)	74,661	3,179	(4,13)
Endossulfão	87,965	3,478	(4,10)	57,544	3,357	(4,11)
Fludioxonil	-	-	-	57,928	6,944	(2,4)
Imazalil	-	-	-	296,144	5,786	(2,5)
P,P'-DDE	120,811	3,179	(4,13)	59,789	3,112	(4,14)
Miclobutanil	69,508	3,357	(4,11)	129,278	3,259	(4,12)
Bupirimato	44,965	3,862	(3,9)	126,392	3,259	(4,12)
Cresoxim-Metilo	106,342	3,179	(4,13)	44,188	3,179	(4,13)
Dieldrina	106,675	3,179	(4,13)	67,622	3,179	(4,13)
Etião	308,770	3,587	(3,11)	310,560	3,708	(3,10)
4,4-DDD	110,154	3,112	(4,14)	180,840	3,490	(3,12)
Endossulfão Sulfato	116,968	3,587	(3,11)	80,174	3,587	(3,11)
4,4-DDT	107,616	3,259	(4,12)	127,725	3,357	(4,11)
Propargite	47,981	3,633	(4,9)	140,071	3,633	(4,9)
Tebuconazol	-	-	-	32,116	6,944	(2,4)
Bifentrina	232,753	3,708	(3,10)	225,566	3,357	(4,11)
Fosalona	94,512	4,103	(2,10)	68,176	3,862	(3,9)
Azinfos- Metilo	-	-	-	206,459	18,513	(1,9)
Acinatrina pico I	-	-	-	39,483	10,128	(1,3)

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Recta 1 (LQ-120ppb)</i>			<i>Recta 2 (120-1200ppb)</i>		
	<i>Fajuste</i>	<i>Ftab</i>	<i>GL</i>	<i>Fajuste</i>	<i>Ftab</i>	<i>GL</i>
Acrinatrina pico 2	-	-	-	94,017	3,326	(5,10)
Permetrina pico 1	172,292	3,862	(3,9)	90,018	3,633	(4,9)
Permetrina pico 2	6019,202	4,066	(3,8)	93,176	3,633	(4,9)
Cipermetrina	-	-	-	116,942	3,106	(5,12)

Pela análise da Tabela 19 verifica-se que F_{ajuste} é superior a $F_{crítico}$, o que significa que as rectas de calibração estão ajustadas para a determinação das concentrações dos pesticidas. O único pesticida que não apresenta este facto é o pesticida tiabendazole, que é retirado da validação do método na matriz de morango.

3.2.4. Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada pelos valores da percentagem do desvio padrão relativo (%RSD) de cada padrão das rectas de calibração. Pelo critério definido no Documento N° SANCO/2007/3131 de 31 de Outubro de 2007 as percentagens de desvio padrão relativo numa análise de pesticidas têm de ser inferiores a 20%.

Assim, só se aceitaram como repetíveis os padrões com % RSD inferior a 20%. Todos aqueles que excediam este valor foram excluídos da recta de calibração.

3.2.5. Sensibilidade

No caso da validação do método de análise de pesticidas na matriz de morango, existem diferenças nos valores de declives nas gamas das rectas de calibração. Nas Figuras 15 e 16 comparando no mesmo pesticida, verifica-se que os valores dos declives da gama 120-1200ppb são superiores à gama de 10-120ppb, devido a esta última estar numa zona de avaliação vestigial, tornando-se mais difícil a detecção dos pesticidas. Esta dificuldade de detecção está correlacionada com a menor sensibilidade do método para estes valores concentração inferior. Contudo, vários pesticidas nesta gama 10-120ppb têm coeficientes de correlação bastante aceitáveis para uma análise vestigial, bem como a repetibilidade de cada padrão na recta de calibração (inferior a 20%).

3.2.6. Percentagens de Recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados a dois níveis, 20 e 200 ppb.

Pelo critério definido no Documento N° SANCO/2007/3131 de 31 de Outubro de 2007 as percentagens de recuperação aceitáveis numa análise de pesticidas têm de estar compreendidas entre 70-120% com um desvio padrão relativo inferior a 20%.

Resultados e Discussão

Tabela 20. Percentagens de recuperação 20ppb

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho (ppb)</i>	<i>Área média Ensaio Recuperação 20 ppb</i>	<i>Área média</i>		
			<i>Padrão Verificação 20 ppb</i>	<i>%RSD</i>	<i>% Recuperação 20 ppb</i>
Diclorvos	10 - 1200	11368,00	14918,67	19,10	76,20
Mevinfos	10 - 1200	4800,50	6590,33	22,22	72,84
Etoprofos	10 - 1200	4855,00	4751,00	1,53	102,19
Difenilamina	10 - 1200	10216,50	13174,00	17,88	77,55
alfa-HCH	10 - 1200	3587,00	4146,33	10,23	86,51
Dimetoato	80 - 1200	-	-	-	-
beta-HCH	20-1200	2314,50	2801,00	13,45	82,63
Quintozeno	10 - 1200	1986,00	2588,67	18,63	76,72
Terbufos	10-1200	17518,50	22344,00	17,12	78,40
Lindano	10-1200	4114,00	5903,33	25,26	69,69
Diazinão	10-1200	8735,50	11429,33	18,89	76,43
Dissulfatão	10-1200	10570,00	12779,67	13,38	82,71
Clortalonil.	10-1200	1018,00	1613,67	32,01	63,09
delta-HCH	10-1200	2532,00	3689,00	26,30	68,64
Vinclozolina	10-1200	3889,50	5053,00	18,40	76,97
Paratião Metilo	40-1200	-	-	-	-
Metalaxil	10-1200	1333,00	1444,00	5,65	92,31
Carbaril	80-1200	-	-	-	-
Heptacloro	10-1200	3250,00	4331,67	20,18	75,03
Malatião	10-1200	4238,00	5183,00	14,19	81,77
Diclofluanida	10-1200	4698,00	7015,00	27,98	66,97
Clorpirifos	10-1200	3816,50	5166,67	21,26	73,87
Fentião	10-1200	16919,00	22118,33	18,84	76,49
Aldrina	10-1200	4632,50	5398,00	10,79	85,82
Paratião Etilo	10-1200	2475,00	2774,67	8,07	89,20
Clorfenvinfos	10-1200	2094,00	2508,33	12,73	83,48
Procimidona	10-1200	7805,00	8811,67	8,57	88,58
Tiabendazole	-	-	-	-	-
Captana	200-1200	-	-	-	-
Folpeto	200-1200	-	-	-	-
Cis-Clordano	10-1200	12054,00	15988,00	19,84	75,39
Endossulfão	10-1200	1164,00	1362,33	11,10	85,44
Fludioxonil	120-1200	-	-	-	-
Imazalil	200-1200	-	-	-	-
P,P'-DDE	10-1200	10062,50	12159,33	13,34	82,76
Miclobutanil	10-1200	5784,00	7305,00	16,43	79,18
Bupirimato	20-1200	5667,00	7381,00	18,58	76,78
Cresoxim-Metilo	10-1200	8292,50	12279,00	27,41	67,53
Dieldrina	10-1200	8743,00	12063,33	22,57	72,48
Etião	10-1200	15260,00	21340,00	23,49	71,51
4,4-DDD	10-1200	16597,00	21228,33	17,32	78,18
Endossulfão Sulfato	10-1200	1228,00	1880,00	29,67	65,32
4,4-DDT	10-1200	3244,00	4181,33	17,85	77,58
Propargite	10-1200	4387,50	6964,33	32,10	63,00

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho (ppb)</i>	<i>Área média</i>		<i>%RSD</i>	<i>% Recuperação 20 ppb</i>
		<i>Ensaio Recuperação 20 ppb</i>	<i>Padrão Verificação 20 ppb</i>		
Tebuconazol	200-1200	-	-	-	-
Bifentrina	10-1200	12013,00	21757,00	40,81	55,21
Fosalona	20-1200	895,00	1526,67	36,89	58,62
Azinfos- Metilo	200-1200	-	-	-	-
Acrinatrina pico 1	400-1200	-	-	-	-
Acrinatrina pico 2	80-1200	-	-	-	-
Permetrina pico 1	10-800	993,00	2056,00	49,30	48,30
Permetrina pico 2	10-1200	2853,00	4360,50	65,43	65,43
Cipermetrina	80-1200	-	-	-	-

Tabela 21. Percentagens de recuperação 200ppb.

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho</i>	<i>Área média</i>		<i>%RSD</i>	<i>% Recuperação 200 ppb</i>
		<i>Ensaio Recuperação 200 ppb</i>	<i>Padrão Verificação 200 ppb</i>		
Diclorvos	10 - 1200	124298,00	126591,00	1,29	98,19
Mevinfos	10 - 1200	64920,00	96706,00	27,81	67,13
Etoprofos	10 - 1200	60417,00	49184,33	14,49	122,84
Difenilamina	10 - 1200	123415,00	125465,67	1,17	98,37
alfa-HCH	10 - 1200	47258,00	46700,00	0,84	101,19
Dimetoato	80 - 1200	13346,00	22319,33	35,58	59,80
beta-HCH	20-1200	34299,00	33789,50	1,06	101,51
Quintozeno	10 - 1200	22419,00	22471,67	0,17	99,77
Terbufos	10-1200	228695,00	170232,33	20,73	134,34
Lindano	10-1200	53097,00	54132,00	1,37	98,09
Diazinão	10-1200	106068,50	85731,67	15,00	123,72
Dissulfatão	10-1200	120079,00	105247,33	9,31	114,09
Clortalonil.	10-1200	13740,00	27749,00	47,75	49,52
delta-HCH	10-1200	34915,00	40238,00	10,02	86,77
Vinclozolina	10-1200	43954,00	41704,50	3,71	105,39
Paratão Metilo	40-1200	37233,00	43491,00	10,96	85,61
Metalaxil	10-1200	22849,00	18431,00	15,14	123,97
Carbaril	80-1200	21178,00	39706,50	43,04	53,34
Heptacloro	10-1200	45695,00	34680,33	19,38	131,76
Malatão	10-1200	50771,00	53431,00	3,61	95,02
Diclofluanida	10-1200	62060,00	73827,67	12,25	84,06
Clorpirifos	10-1200	45914,00	34847,33	19,38	131,76
Fentião	10-1200	206763,00	215619,00	2,97	95,89
Aldrina	10-1200	46113,00	46584,67	0,72	98,99
Paratão Etilo	10-1200	35538,50	36593,00	2,07	97,12
Clorfenvinfos	10-1200	48325,00	37441,00	17,95	129,07
Procimidona	10-1200	94458,00	96747,67	1,69	97,63
Tiabendazole	Qualitativo	-	-	-	-
Captana	200-1200	-	-	-	-
Folpeto	200-1200	1377,00	2635,67	44,36	52,24
Cis-Clordano	10-1200	132195,00	134184,33	1,06	98,52

Resultados e Discussão

<i>Pesticida</i>	<i>Gama de Trabalho</i>	<i>Área média Ensaio Recuperação 200 ppb</i>	<i>Área média Padrão Verificação 200 ppb</i>	<i>%RSD</i>	<i>% Recuperação 200 ppb</i>
Endossulfão	10-1200	13111,00	11003,33	12,36	119,15
Fludioxonil	120-1200	9976,00	22811,50	55,36	43,73
Imazalil	200-1200	-	-	-	-
P,P'-DDE	10-1200	116329,00	100418,00	10,38	115,84
Miclobutanil	10-1200	68918,50	67881,33	1,07	101,53
Bupirinato	20-1200	69978,00	67885,00	2,15	103,08
Cresoxim-Metilo	10-1200	106038,00	101527,33	3,07	104,44
Dieldrina	10-1200	106038,00	101521,33	3,08	104,45
Etião	10-1200	214550,00	164386,33	18,72	130,52
4,4-DDD	10-1200	188702,00	179208,00	3,65	105,30
Endossulfão Sulfato	10-1200	12625,00	19712,67	31,00	64,05
4,4-DDT	10-1200	51835,00	46243,67	8,06	112,09
Propargite	10-1200	57630,00	65193,50	8,71	88,40
Tebuconazol	200-1200	1178,00	922,50	17,20	127,70
Bifentrina	10-1200	228929,00	168005,00	21,71	136,26
Fosalona	20-1200	22237,00	34041,50	29,66	65,32
Azinfos- Metilo	200-1200	-	-	-	-
Acrinatrina pico 1	400-1200	-	-	-	-
Acrinatrina pico 2	80-1200	-	-	-	-
Permetrina pico 1	10-800	25089,00	23702,50	4,02	105,85
Permetrina pico 2	10-1200	59323,00	57533,50	103,11	103,11
Cipermetrina	80-1200	13218,00	10429,50	126,74	126,74

Nas Tabelas 20 e 21 verifica-se que alguns pesticidas não apresentam percentagens de recuperação entre 70-120% (valores a negrito). As percentagens de desvio padrão relativo do estudo, são também elevadas nestes casos, o que pode justificar esta situação de percentagens de recuperação inferiores a 70 % e superiores a 120%.

Alguns pesticidas não apresentam percentagem de recuperação associada, visto que, a sua gama de trabalho não inclui a concentração do padrão em estudo ou está no limiar da gama de trabalho.

As Figuras seguintes representam graficamente a situação descrita anteriormente.

Resultados e Discussão

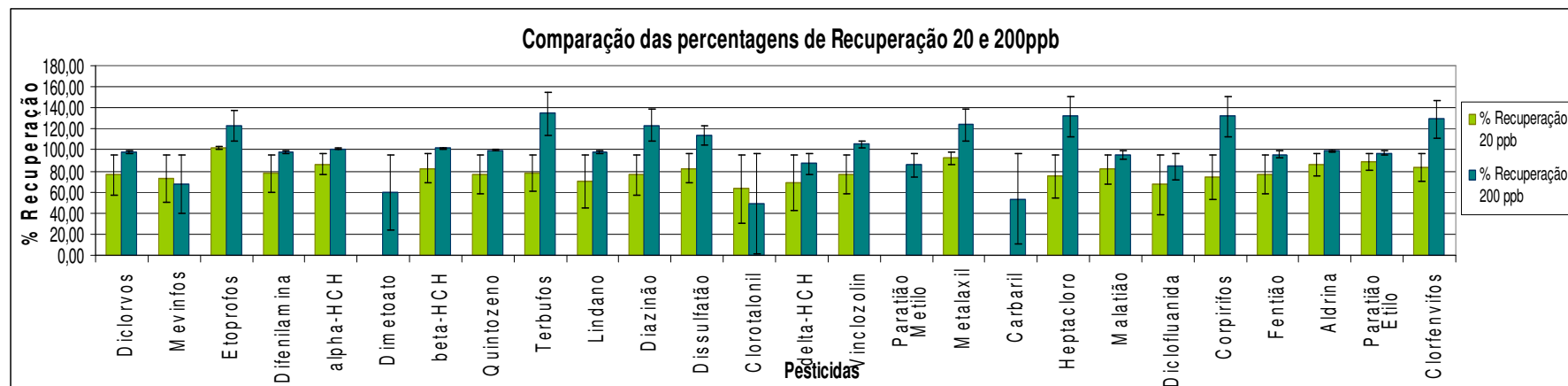


Figura 19. Gráfico da comparação das percentagens de Recuperação a 20 e 200ppb.

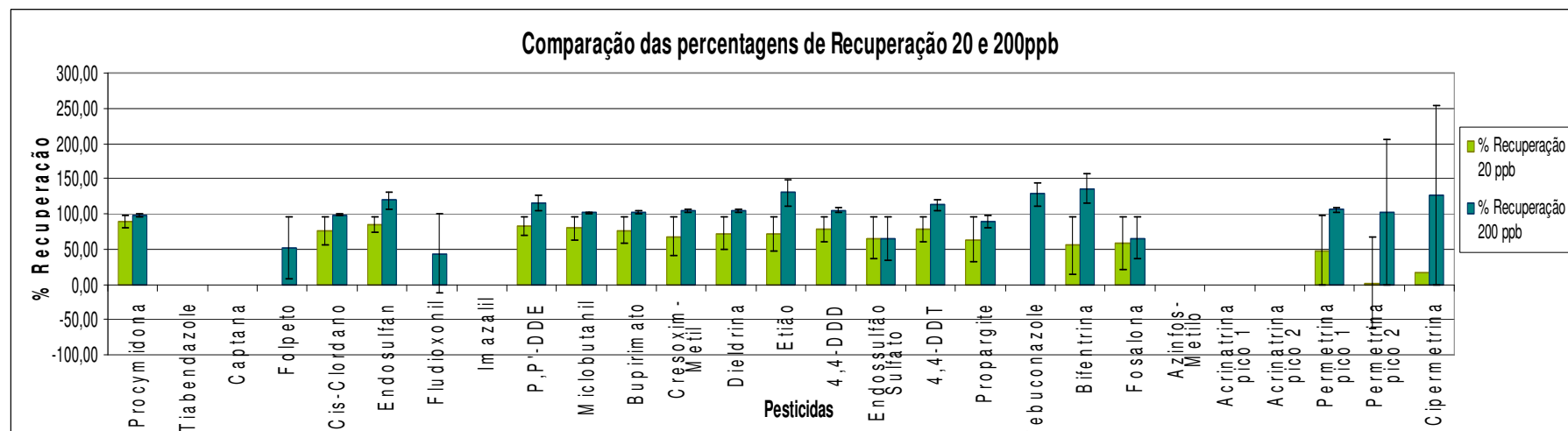


Figura 20. Gráfico da comparação das percentagens de Recuperação a 20 e 200ppb.

Resultados e Discussão

Com este estudo das percentagens de recuperação do método, quando avaliado na matriz de morango, determina-se que vários pesticidas poderão não estar aptos a serem analisados por este método. As suas percentagens de recuperação são inferiores ou superiores ao intervalo admitido como aceitável pelo documento SANCO, o que pode levar a erros na sua quantificação com este método, nesta matriz.

Como os pesticidas nesta situação, não têm o mesmo comportamento de percentagem de recuperação, ou seja, as percentagens no padrão de 20 e 200ppb são diferentes, não se pode concluir que existe sempre a mesma eficiência na extração do pesticida na matriz durante a execução do método.

Em suma, estes pesticidas com valores de percentagens de recuperação fora do intervalo 70-120% não apresentam uma boa fiabilidade dos resultados obtidos, pois existe um grande erro associado na extração do pesticida da matriz de morango.

3.3. Estudo da eficácia do descasque da fruta na redução de pesticidas

Actualmente, cada vez mais existe a noção de que é essencial o descasque da fruta para consumo directo, devido à aplicação de pesticidas antes e após colheita da fruta. Os pesticidas presentes no fruto podem ser reduzidos através do descasque deste, pois a casca do fruto pode impedir a parcial ou total passagem do pesticida para o seu interior [45, 20].

3.3.1. Determinação da concentração dos pesticidas na polpa e na casca da pêra

Na determinação da concentração dos pesticidas nos componentes da pêra analisaram-se os pesticidas presentes na pêra inteira, na polpa e na casca da pêra. As análises foram realizadas em duas amostras de pêra, ou seja, numa amostra determinou-se a concentração dos pesticidas na pêra inteira, com o objectivo de se conhecerem quais os pesticidas possíveis de se encontrarem numa pêra, e noutra amostra a pêra foi descascada para se determinarem as concentrações dos pesticidas na polpa e na casca desta.

Os valores de pesticidas determinados estão representados na Tabela 22. Os pesticidas na Tabela 22 foram os únicos possíveis de quantificar, pois os restantes encontravam-se inferiores ao limite de quantificação.

Tabela 22. Tabela resumo dos resultados na pêra

Pesticida	Concentração	Concentração	Concentração
	Pêra inteira (ppb)	Polpa Pêra (ppb)	Casca Pêra (ppb)
Difenilamina	1226,263	507,614	13116,999
Chlorpyriphos	-	-	4,434
Malatião	1,198	-	-
Folpeto	415,870	-	1268,836
Imazalil	511,530	-	5340,119

3.3.1.1. Quantificação da Incerteza associada à concentração determinada

Após a determinação da concentração de cada pesticida nos componentes da pêra, é necessário calcular a incerteza associada a cada concentração determinada [46].

Os intervalos de confiança foram calculados estatisticamente, de acordo com as seguintes condições:

$$x_0 \pm t \cdot s_{x_0}$$

Onde, x_0 é a concentração calculada, t o valor de t para $n-2$ graus de liberdade a 95% de confiança, e s_{x_0} é o valor do desvio padrão estimado de x_0 .

Na Tabela 23 apresenta-se os intervalos de confiança associados às concentrações apresentadas na Tabela 22.

Resultados e Discussão

Tabela 23. Determinação dos intervalos de confiança de cada concentração determinada na pêra.

<i>Pesticida/ Condições</i>	X_0 (ppb)	$t \cdot S_{x_0}$ (ppb)
Difenilamina na pêra inteira	1226,263	25,090
Difenilamina na polpa da pêra	507,614	22,345
Difenilamina na casca da pêra	13116,999	216,764
Clorpirifos na casca da pêra	4,434	11,821
Malatião na pêra inteira	1,198	6,378
Folpeto na pêra inteira	415,870	316,547
Folpeto na casca da pêra	1268,836	481,952
Imazalil na pêra inteira	511,530	953,757
Imazalil na casca da pêra	5340,119	6707,472

Como se verifica na Tabela 23 existem alguns casos onde o limite de confiança é superior ao valor de x_0 . Deste modo, tem que se proceder a um teste de significância para se verificar se o valor de concentração determinado é significativamente diferente zero [46].

Tabela 24. Teste de significância dos resultados das concentrações.

<i>Pesticida/Condições</i>	$t_{Calculado}$	$t_{Tabelado}$	<i>Observação</i>
Clorpirifos na casca da pêra	2,066	4,300	Não há diferença significativa
Malatião na pêra inteira	0,844	12,710	Não há diferença significativa
Imazalil na pêra inteira	9,640	12,710	Não há diferença significativa
Imazalil na casca da pêra	17,527	4,300	Há diferença significativa

Pela análise da tabela 24 as concentrações determinadas dos pesticidas clorpirifos na casca da pêra, malatião na pêra inteira e imazalil na pêra inteira não são significativamente diferentes de zero, ou seja, não podem ser referidos como resultados fieis para serem apresentados neste estudo. Deste modo, o único pesticida em que a sua concentração é considerada como significativamente diferente de zero, é o pesticida Imazalil determinado na casca da pêra.

Na tabela seguinte, apresentam-se os valores de concentração e respectivo intervalo de confiança de cada determinação. Nesta tabela estão excluídos os pesticidas indicados na Tabela 23 cujos valores não são significativamente diferentes de zero.

Resultados e Discussão

Tabela 25. Tabela das determinações das concentrações determinadas e respectivos intervalos de confiança.

<i>Pesticida/ Condições</i>	X_0 (ppb)	$t \cdot S_{x_0}$ (ppb)
Difenilamina na pêra inteira	1226,263	25,090
Difenilamina na polpa da pêra	507,614	22,345
Difenilamina na casca da pêra	13116,999	216,764
Folpeto na pêra inteira	415,870	316,547
Folpeto na casca da pêra	1268,836	481,952
Imazalil na casca da pêra	5340,119	6707,472

3.3.1.2. Determinação da quantidade de pesticida numa peça de fruta

Após a determinação de cada pesticida na pêra, é pertinente estimar a quantidade ingerida por peça de fruta. Na Tabela 26 apresenta-se os valores por Kg de pêra.

Tabela 26. Valores de concentrações de pesticidas em mg/kg pêra.

<i>Pesticida/ Condições</i>	<i>Concentração (mg/kg pêra)</i>
Difenilamina na pêra inteira	1,226
Difenilamina na polpa da pêra	0,508
Difenilamina na casca da pêra	13,117
Folpeto na pêra inteira	0,416
Folpeto na casca da pêra	1,269
Imazalil na casca da pêra	5,340

Considerando os valores das pesagens de fruta apresentados na Tabela 3 e a homogeneidade do tamanho das pêras em análise, as quantidades em mg de cada pesticida numa peça de fruta são as seguintes apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27. Quantidade de pesticida nos componentes de uma pêra.

<i>Pesticida</i>	<i>Quantidade numa Pêra (mg)</i>	<i>Quantidade na Polpa de uma Pêra (mg)</i>	<i>Quantidade na Casca de uma Pêra (mg)</i>
Difenilamina	0,287	0,0486	0,237
Folpeto	0,0230	-	0,0230
Imazalil	0,0967	-	0,0967

A quantidade de pesticida presente numa pêra representada na Tabela 27 resulta da soma das quantidades presentes na polpa e casca desta.

Na Tabela 28, estão expressos os valores da redução dos pesticidas através do descasque em percentagem.

Resultados e Discussão

Tabela 28. Percentagem de redução dos pesticidas do descasque.

<i>Pesticida</i>	<i>Quantidade numa Pêra (mg)</i>	<i>Quantidade na Casca de uma Pêra (mg)</i>	<i>% Redução</i>
Difenilamina	0,287	0,237	83
Folpeto	0,0230	-	100
Imazalil	0,0967	-	100

Pela análise da Tabela 28 verifica-se que o descasque da pêra permite uma redução em 69% do pesticida difenilamina. No caso dos pesticidas folpeto e imazalil atinge-se uma redução de 100% destes, está-se perante uma redução totalmente eficaz deste pesticida através do descasque da pêra.

De seguida, apresenta-se graficamente a comparação das quantidades dos pesticidas difenilamina, folpeto e imazalil nos componentes da pêra.

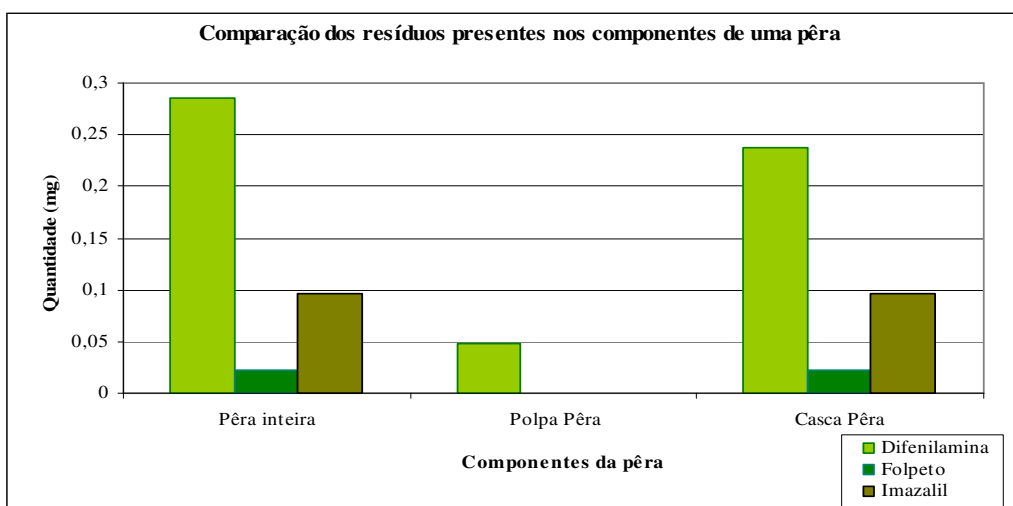


Figura 21. Gráfico da compara o dos resíduos nos componentes de uma p era.

Diariamente o consumo de várias peças de fruta expõe-nos a resíduos de pesticidas como comprovado anteriormente. Na Tabela 29 apresenta-se a previsão do consumo de pesticida difenilamina em algumas peças de p era ingeridas por dia.

Tabela 29. Previsão do consumo do pesticida Difenilamina na p era

<i>Consumo</i>	<i>Quantidade. Difenilamina na P�era Inteira (mg)</i>	<i>Quantidade Difenilamina na Polpa P�era (mg)</i>
1 Peça por dia	0,287	0,0486
2 Peças por dia	0,574	0,0972
3 Peças por dia	0,861	0,146

Resultados e Discussão

Na Tabela 29 verifica-se nitidamente que o consumo de pêra por descascar representa uma maior exposição à difenilamina, pois uma única peça de fruta por descascar contém, aproximadamente, o mesmo teor deste pesticida que se consome em 6 pêras descascadas.

3.3.2. Determinação da concentração dos pesticidas na polpa e casca da maçã

Na determinação da concentração dos pesticidas nos componentes da maçã analisaram-se os pesticidas presentes na maçã inteira, na polpa e na casca da maçã. As análises foram realizadas em duas amostras de maçã, ou seja, numa amostra determinaram-se as concentrações dos pesticidas possíveis de existirem na maçã inteira e noutra amostra a maçã foi descascada e determinaram-se as concentrações dos pesticidas na polpa e na casca desta. Os valores de pesticidas determinados estão representados na Tabela 30. Os pesticidas na Tabela 30 foram os únicos possíveis de quantificar, pois os restantes encontravam-se inferiores ao limite de quantificação.

Tabela 30. Tabela resumo dos resultados da maçã

Pesticida	Concentração	Concentração	Concentração
	Maçã inteira (ppb)	Polpa Maçã (ppb)	Casca Maçã (ppb)
Difenilamina	31,702	16,884	514,953
Chlorpyrifos	22,980	2,212	294,703
Imazalil	-	-	731,606

3.3.2.1. Quantificação da Incerteza associada à concentração determinada

A quantificação da incerteza associada foi calculada consoante o apresentado anteriormente no ponto 3.3.1.1.

Tabela 31. Determinação dos intervalos de confiança de cada concentração determinada na maçã.

Pesticida/ Condições	x_0 (ppb)	$t \cdot s_{x_0}$ (ppb)
Difenilamina na maçã inteira	31,702	7,640
Difenilamina na polpa da maçã	16,884	9,687
Difenilamina na casca da maçã	514,953	22,332
Clorpirifos na maçã inteira	22,980	8,668
Clorpirifos na polpa da maçã	2,212	12,008
Clorpirifos na casca da maçã	294,703	136,306
Imazalil na casca da pêra	731,606	746,999

Como se verifica na Tabela 31 existem alguns casos onde o intervalo de confiança é superior ao valor de x_0 e alguns valores de x_0 são inferiores ao limite de quantificação determinado para o pesticida. Deste modo, tem que se proceder a um teste de significância para se verificar se o valor de concentração determinado em cada pesticida é significativamente diferente de zero [46].

Resultados e Discussão

Tabela 32. Teste de significância dos resultados das concentrações.

<i>Pesticida/Condições</i>	$t_{Calculado}$	$t_{Tabelado}$	<i>Observação</i>
<i>Difenilamina na maçã inteira</i>	32,321	2,57	Há diferença significativa
<i>Difenilamina na polpa da maçã</i>	9,600	4,300	Há diferença significativa
<i>Clorpirifos na maçã inteira</i>	20,652	2,57	Há diferença significativa
<i>Clorpirifos na polpa da maçã</i>	1,015	4,3	Não há diferença significativa

Pela análise da tabela 32 as concentrações determinadas dos pesticidas difenilamina na maçã inteira, difenilamina na polpa da maçã e clorpirifos na maçã inteira são significativamente diferentes de zero, ou seja, podem ser referidos como resultados fiéis para serem apresentados neste estudo. Deste modo, o único pesticida em que a sua concentração não é significativamente diferente de zero, é o pesticida clorpirifos determinado na polpa da maçã.

Na tabela seguinte, apresentam-se os valores de concentração e respectivo intervalo de confiança de cada determinação. Nesta tabela estão excluídos os pesticidas indicados na Tabela 33 cujos valores não são significativamente diferentes de zero.

Tabela 33. Tabela das determinações das concentrações determinadas e respectivos limites de confiança.

<i>Pesticida/ Condições</i>	X_0 (ppb)	$t \cdot S_{x_0}$ (ppb)
<i>Difenilamina na maçã inteira</i>	31,702	7,640
<i>Difenilamina na polpa da maçã</i>	16,884	9,687
<i>Difenilamina na casca da maçã</i>	514,953	22,332
<i>Clorpirifos na maçã inteira</i>	22,980	8,668
<i>Clorpirifos na casca da maçã</i>	294,703	136,306
<i>Imazalil na casca da maçã</i>	731,606	746,999

3.3.1.2. Determinação da quantidade de pesticida numa peça de fruta

Após a determinação de cada pesticida na maçã, é pertinente estimar a quantidade ingerida por peça de fruta. Na Tabela 34 apresentam-se os valores por Kg de maçã.

Tabela 34. Valores de concentrações de pesticidas em mg/kg maçã.

<i>Pesticida/ Condições</i>	<i>Concentração (mg/kg pêra)</i>
<i>Difenilamina na maçã inteira</i>	0,0317
<i>Difenilamina na polpa da maçã</i>	0,0169
<i>Difenilamina na casca da maçã</i>	0,515
<i>Clorpirifos na maçã inteira</i>	0,0230
<i>Clorpirifos na casca da maçã</i>	0,294
<i>Imazalil na casca da pêra</i>	0,732

Considerando os valores das pesagens de fruta apresentados na Tabela 4 e a homogeneidade do tamanho das maçãs em análise, as quantidades em *mg* de cada pesticida numa peça de fruta são as seguintes apresentadas na Tabela 35.

Tabela 35. Quantidade de pesticida nos componentes de uma maçã

<i>Pesticida</i>	<i>Quantidade numa Maçã (mg)</i>	<i>Quantidade na Polpa de uma Maçã (mg)</i>	<i>Quantidade na Casca de uma Maçã (mg)</i>
Difenilamina	0,0120	0,00178	0,0102
Clorpirifos	0,00581	-	0,00581
Imazalil	0,0145	-	0,0145

A quantidade de pesticida presente numa maçã representada na Tabela 35 resulta da soma das quantidades presentes na polpa e casca desta.

Na Tabela 36, estão expressos os valores da redução dos pesticidas através do descasque em percentagem.

Tabela 36. Percentagem de redução dos pesticidas do descasque.

<i>Pesticida</i>	<i>Quantidade numa Maçã (mg)</i>	<i>Quantidade na Casca de uma Maçã (mg)</i>	<i>% Redução</i>
Difenilamina	0,0120	0,0102	85
Clorpirifos	0,00581	-	100
Imazalil	0,0145	-	100

Pela análise da Tabela 36 verifica-se que o descasque da maçã permite uma redução em 85% do pesticida difenilamina. No caso dos pesticidas clorpirifos e imazalil atinge-se uma redução de 100% destes, está-se perante uma redução totalmente eficaz destes pesticidas através do descasque da pêra.

De seguida, apresenta-se graficamente a comparação das quantidades dos pesticidas difenilamina, clorpirifos e imazalil nos componentes da maçã.

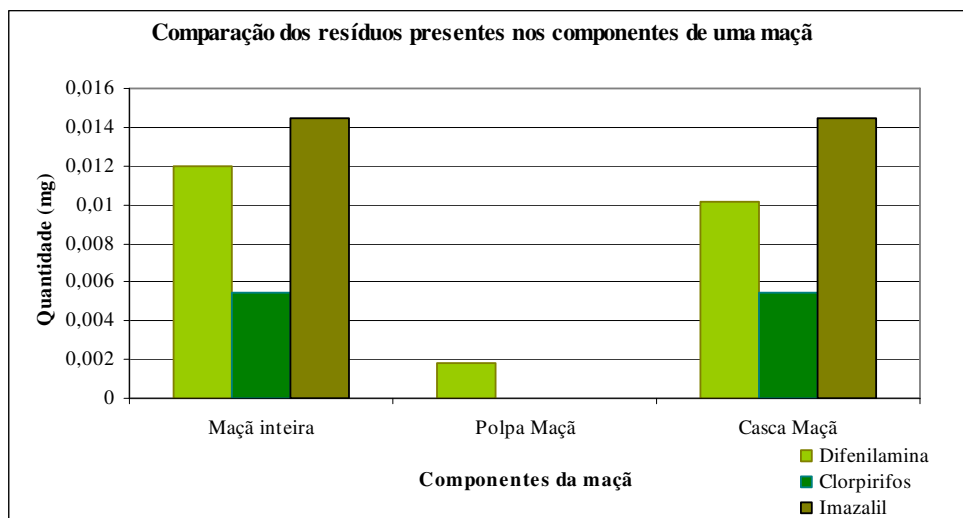


Figura 22. Gráfico de comparao dos resíduos presentes nos componentes de uma maça.

Diariamente o consumo de várias peças de fruta expõe-nos a resíduos de pesticidas como comprovado anteriormente. Na Tabela 36 apresenta-se a previsão do consumo de pesticida difenilamina em algumas peças de maça ingeridas por dia.

Tabela 37. Previsão do consumo do pesticida Difenilamina na maça.

Consumo	Quantidade Difenilamina na Maça	
	Inteira (mg)	Polpa Maça (mg)
1 Peça por dia	0,0120	0,00178
2 Peças por dia	0,0240	0,00356
3 Peças por dia	0,0360	0,00534

Na Tabela 37 visualiza-se nitidamente que o consumo de maça por descascar representa uma maior exposio   difenilamina, pois uma única peça de fruta por descascar cont m, aproximadamente, o mesmo teor deste pesticida que se consome em 5 maas descascadas.

3.4. Efeito de Matriz

Como descrito no ponto 3.3. *Validação do método na matriz do morango*, verificou-se que existia diferença dos resultados quando os pesticidas eram analisados no solvente acetonitrilo ou na matriz de morango. Deste modo, após a validação do método nas matrizes da pêra/maçã e morango fez-se a comparação dos resultados entre matrizes.

Nas Figuras seguintes apresentam-se graficamente a diferença dos declives das rectas de calibração nas matrizes pêra/maçã e morango.

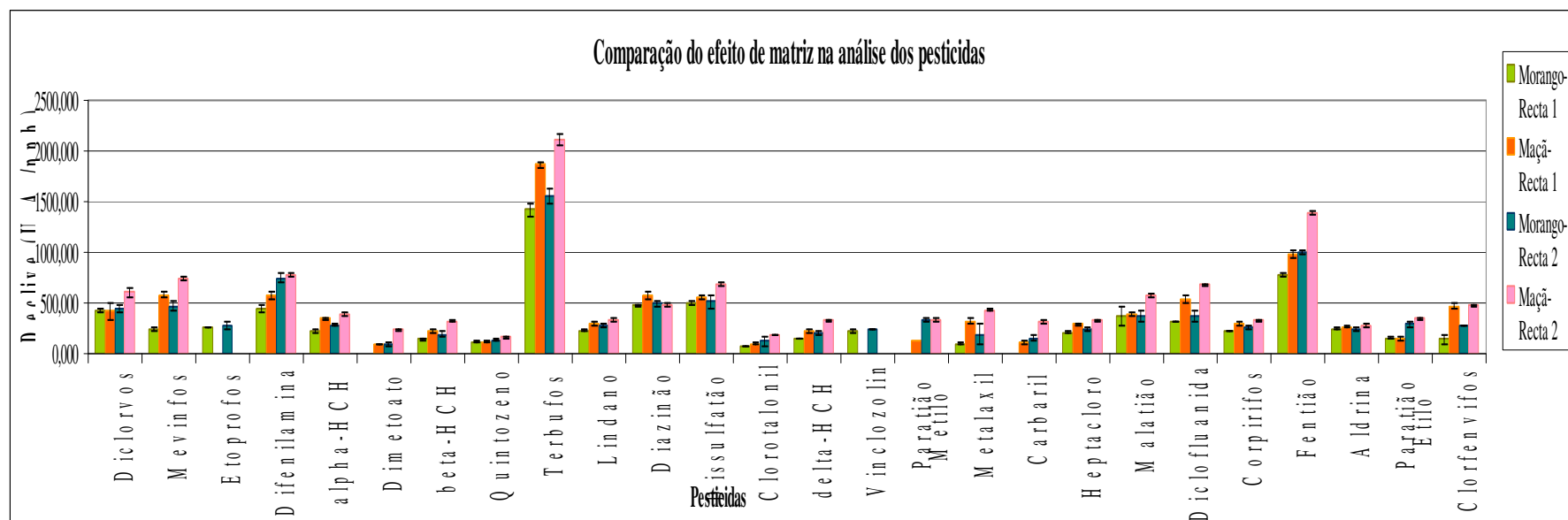


Figura 23. Comparação do efeito de matriz na análise dos pesticidas nas matrizes de morango e pêra/maçã.

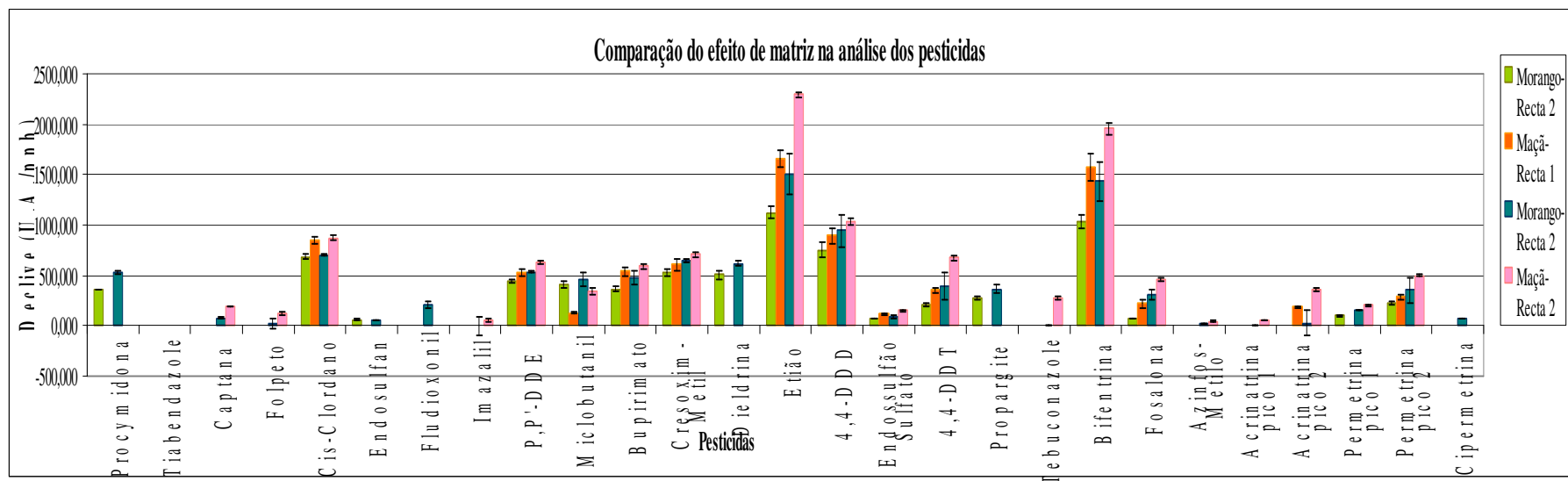


Figura.24. Comparação do efeito de matriz na análise dos pesticidas nas matrizes de morango e pêra/maçã.

Pela análise das Figuras 22 e 23 conclui-se que existe diferença ao analisar os pesticidas na matriz de morango ou na matriz pêra/maçã. Os declives das análises na matriz de morango sempre inferiores aos na matriz pêra/maçã. Esta situação pode dever-se ao facto da validação na matriz de morango não ter tido resultados aceitáveis nas percentagens de recuperação. Assim, os pesticidas presentes nesta matriz não são extraídos eficazmente.

Os pesticidas vinclozoline, pocimidona, tiabendazole, fudioxonil, propargite e cipermetrina só são observados na matriz do morango, visto que foram introduzidos na validação do método no morango, na matriz de pêra/maçã estes pesticidas não são analisados.

Em suma, a matriz onde se analisam os pesticidas é influenciada para os resultados obtidos.

4. Conclusão

Neste trabalho pretendeu-se quantificar os pesticidas presentes nas amostras de fruta. O método “QuEChERS” foi o usado para a preparação das amostras. A identificação e quantificação dos pesticidas foram realizadas através de GC-MS. Estudou-se também a redução de resíduos de pesticidas presentes na fruta, através do descasque.

Para se iniciar este processo, foi necessário definir o tipo de amostragem a seguir. Os lotes de fruta apresentavam homogeneidade no tamanho das frutas, como também dois tipos de calibre. Assim, definiu-se que existia homogeneidade do tamanho da fruta nos lotes. A amostragem foi determinada pela consulta dos documentos: *Documento SANCO/2007/3131*, *Directiva 2002/63/EC de 11 de Julho 2002*, *Guidelines for sampling soils, fruits, vegetables and grains for chemical residue*, *Decreto-lei n.º 144/2003 de 2 de Julho*, onde ambos definiam que a amostragem adequada para os lotes de pêsego, maçã e pêra era retirar 1Kg de amostra, com pelo menos 10 unidades.

A validação do método na matriz de pêra/maçã mostrou-se satisfatória, pois apresentou bons resultados nos requisitos pretendidos na validação de métodos. Nesta matriz, o método exibiu boa repetibilidade entre padrões, a reprodutibilidade entre operadores é aceitável e as percentagens de recuperação inseridas no intervalo admitido pela SANCO, em excepção do pesticida acrinatrina pico 1. A maioria das variâncias dos padrões nas rectas de calibração não apresentava homocedasticidade, sendo os valores da recta de calibração avaliados através de regressão linear pesada. Pela avaliação da adequação das rectas de calibração para analisar os analitos, estas mostraram-se adequadas para o objectivo. A sensibilidade do método mostrou diferenças entre as rectas das gamas LQ-120ppb e 12-1200ppb, assim avaliou-se estas duas gamas em separado para uma quantificação mais fidedigna. Em suma, o método é válido para a análise de pesticidas na matriz de pêra e maçã.

A validação do método na matriz de morango apresentou boas repetibilidades nos padrões, as rectas estavam adequadas para a quantificação dos pesticidas, em excepção do pesticida tiabendazole. Avaliou-se a maior parte dos pesticidas através da regressão linear pesada, pois as suas variâncias dos padrões da recta de calibração apresentavam heterocedasticidade. A sensibilidade nesta matriz apresentou a mesma situação descrita na validação na pêra maçã, avaliando-se as duas gamas em separado. As percentagens de recuperação em alguns pesticidas não se revelaram com bons resultados, devido aos seus valores estarem fora dos parâmetros determinados pela SANCO. Nestes pesticidas não se pode admitir que a sua extracção da matriz seja eficaz e assim a sua quantificação não é fidedigna.

Após a validação do método de análise, com a comparação dos resultados, nomeadamente a sensibilidade das rectas de calibração entre matrizes, determinou-se que existe diferença na análise dos pesticidas em diferentes matrizes. A sensibilidade na matriz de pêra/maçã mostrou-se superior à sensibilidade na matriz de morango. Este facto poderá dever-se aos maus resultados das percentagens de recuperação nesta matriz.

Conclusão

A determinação da concentração dos pesticidas na polpa e na casca da fruta foi um dos objectivos principais do trabalho. As matrizes testadas foram a da pêra e da maçã, onde se verificou que através do processo de descasque houve uma importante redução do consumo de pesticidas. Ao descascar a pêra, o pesticida difenilamina apresentou uma redução de 83%, enquanto que a redução dos pesticidas folpeto e imazalil foi total. Na maçã, verificou-se que a difenilamina apresentou uma redução de 85% e os pesticidas clorpirifos e imazalil foram reduzidos na sua totalidade. Concluiu-se também, no caso do pesticida difenilamina, que ao consumir 1 pêra ou maçã por descascar ingere-se a mesma quantidade de resíduos deste pesticida do que em 3 peças de pêra ou maçã descascadas.

5. Bibliografia

- [1] Amaro, P. (2006). *As características toxicológicas dos pesticidas, em Portugal em 2005*. ISA/Press.
- [2] Belitz, H., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). In *Food Chemistry* (pp. 474-490). Berlin: Springer.
- [3] Picó, Y, Farré, M., Soler, C., Barceló, D. (2007). *Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadropole time-of-flight mass spectrometry Imazalil as a case study of quantification*. *Journal of Chromatography A*, 1176, 123-134.
- [4] Jeyaratnam, J. (1990). *World Health statistics Quarterly*. Volume 43, No 3, 139-144.
- [5] Dijk, H., Pul, W., & Voogt, P. (1999). *Fate of Pesticides in the Atmosphere*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.
- [6] Roberts, T., Kearney, P (1995). *Environmental Behaviour of Agrochemicals*. 2ª Edição. England: John Wiley & Sons.
- [7] González, R., Frenich, A., Vidal, J. (2008). *Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. *Talanta*, 76, 211-225.
- [8] EURACHEM Guide (1998), *The fitness for purpose of Analytical Methods, A laboratory Guide to the method validation and related topics*. Edição 1, Reino Unido.
- [9] Beier, R., & Stanker, L. (1996). *Immunoassays for Residue Analysis*. ACS Symposium Series 621.
- [10] Nollet, L. (1996). In *Handbook of Food Analysis* (pp. 1461-1527). New York: Food Science and Technology.
- [11] Waxman, M. (1998). *Agrochemicals and pesticide safety handbook*. Lewis Publishers.
- [12] Dijk, H., & Guicherit, R. (1999). *Atmospheric dispersion of current-use pesticides: A review of the evidence from monitoring studies*. pp. 21-70.
- [13] *Observatoire des Résidues de Pesticides*. (2009). Obtido em 12 de Março de 2009, de <http://observatoire-pesticides.gouv.fr/>

Bibliografia

- [14] Guicherit, R., Bakker, D., Voogt, P., Berg, F., Dijk, H., & Pul, A. (1999). *Environmental risk assessment for pesticides in the atmosphere*. The results of an international workshop. pp. 5-19.
- [15] Dijk, H., Pul, W., & Voogt, P. (1999). *Atmospheric transport of pesticides: Assessing environmental risks*. pp. 3-4.
- [16] Fong, W., Moye, H., Seiber, J., & Toth, J. (1999). *Pesticide Residues in Foods: Methods, Techniques and Regulations*. New York: Wiley-Interscience Publication.
- [17] Kirchner, M., Húsková, R., Matisová, E., Mocák, J. (2008). *Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants*. Journal of Chromatography A, 1186, 271-280.
- [18] Mansour, S. (2004). *Pesticide exposure- Egyptian scene*. Toxicology, 198, 91-115.
- [19] Liu, Z.; Wang, C. (2007). *Foliar uptake of pesticides- Present status and future challenge*. Pesticide-Biochemistry & Physiology, 87, 1-8.
- [20] Kaushik, G., Satya, S., I., Naik, S.N. (2009). *Food processing a tool to pesticide residue dissipation-A review*. Food Research International. 42, 26-40.
- [21] Som, R. (1996). *Practical Sampling Techniques*. New York: Marcel Dekker.
- [22] Directiva 2002/63/EC, *Establishing Community methods for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin and repealing Directive 79/700/EEC*. de 11 de Julho de 2002.
- [23] Thompson, S. (2002). *Sampling*. New York: Wiley - Interscience publication.
- [24] Anastassiades, M. (2005). *QuEChERS – Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticides Residues in Low-Fat Products*.
- [25] Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. (2003). *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, Vol. 86, 412-431.
- [26] Lehotay, S. (2004). *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) approach for determining Pesticide Residues*, 1-23.
- [27] García-Reyes, J.; Ferrer, C.; Ramos, M.; Díaz, A.; Alba, A. (2007). *Determination of pesticide residues in olive oil and olives*. Trends in Analytical Chemistry, 26, 239-251.

Bibliografia

- [28] Cunha, S.; Fernandes, J.; Alves, A.; Oliveira, M. (2009). Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. *Journal of Chromatography A*, 1216, 119-126.
- [29] Vogel, I., & Mendham, J. (2002). *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC Editora.
- [30] Harris, D. (2005). *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC.
- [31] Chapman, J. (1993). *Practical Organic Mass Spectrometry*, 2ª Edição, Wiley & Sons.
- [32] Chiaradia, M.; Collins, C.; Jardim, I. (2008). *O estado da arte da cromatografia associada à Espectrometria de massas acoplada à Espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos nos alimentos*. *Química Nova*, 1-14.
- [33] Skoog, D. (1998). *Principles of Instrumental Analysis*. Philadelphia, Saunders College Publishing.
- [34] Stajnbaher, D.; Zupancic-Kralj; L. (2008). *Optimisation of programmable temperature vaporizer-based large volume injection for determination of pesticide residues in fruits and vegetables using a gas chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1190, 316-326.
- [35] Krueve, A.; Kunnapas, A.; Herodes, K. (2008). *Matrix effect in pesticide multi residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58-66.
- [36] SANCO (2007). *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*.
- [37] PALCAN (2006). *Guidance for the validation of the test methods*.
- [38] Thompson, M.; Wood, R. (1999). *Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories*. IUPAC
- [39] Europeu, C. P. (2008). Obtido em 11 de Abril de 2009, de EUR-Lex: <http://europa.eu.int/eur-lex/lex/pt/index.htm>
- [40] *Health and Safety Executive* (2009). Obtido em 20 Maio de 2009 de, http://www.pesticides.gov.uk/food_safety.asp?id=2686
- [41] Regulamento (CE) N° 839/2008 da Comissão de 31 de Julho de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia*.

Bibliografia

[42] *Guidelines for Sampling soils, fruits, vegetables and grains for chemicals residue*, de Maio 2008.

[43] Decreto-lei nº144/2003, de Julho de 2003.

[44] Gonçalves, M. ; Camões, M. ; Paiva, J. ; Benoliel, M. ; Carneiro, R. (2004). *Validação do método de determinação simultânea dos iões brometo e bromato por cromatografia iónica em águas de consumo humano*. Química Nova, 3, 503-507.

[45] Borges, J., Cabrera, J.; Delgado, M. ; Suárez, E. ; Saúco, V. (2009). *Analysis of pesticide residues in bananas harvested in the Canary Islands (Spain)*. Food Chemistry, 113, 313-319.

[46] Miller, J. ; Miller, J. (1993). *Statistics for Analytical Chemistry*. 3ª Edição, Ellis Horward PTR Prentice Hall

[47] *Introduction to EC pesticides residues legislation* (2009). Obtido em 23 de Maio de 2009 de, <http://ec.europa.eu>

Bibliografia

6. Anexo 1 - Pesticidas e Reagentes

Tabela 38. Tabela dos pesticidas usados no trabalho

<i>Pesticida</i>	<i>Tipo pesticida</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>CAS</i>
Diclorvos	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	62-73-7
Mevinfos	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	7786-34-7
Etoprofos	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	13194-48-4
Difenilamina	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	122-39-4
alfa-HCH	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	319-84-6
Dimetoato	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	60-51-5
beta-HCH	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	319-85-7
Quintozeno	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	82-68-8
Terbufos	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	13071-79-9
Lindano	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	58-89-9
Diazinão	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	333-41-5
Dissulfatão	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	298-04-4
Clortalonil	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	1897-45-6
delta-HCH	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	319-86-8
Paratião Metilo	Insecticida	100mg	Sig-Ald	298-00-0
Metalaxil	Fungicida	100 mg	Sig-Ald	57837-19-1
Carbaril	Insecticida	250mg	Sig-Ald	63-25-2
Heptacloro	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	76-44-8
Malatião	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	121-75-5
Diclofluanida	Fungicida/Acaricida	250 mg	Sig-Ald	1085-98-9
Chlorpyrifos	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	2921-88-2
Fentião	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	55-38-9
Aldrina	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	309-00-2
Paratião Etilo	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	56-38-2
Clorfenvinfos	Insecticida	250mg	Sig-Ald	470-90-6
Captana	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	133-06-2
Folpeto	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	133-07-3
Cis-Clordano	Insecticida	10mg	Sig-Ald	225-825-5
Endossulfão	Insecticida	250mg	Sig-Ald	115-29-7
Imazalil	Fungicida	100 mg	Sig-Ald	35554-44-0
P,P'-DDE	Fungicida	250mg	Sig-Ald	72-55-9
Miclobutanil	Fungicida	100 mg	Sig-Ald	88671-89-0
Bupirimato	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	41483-43-6
Cresoxim-Metilo	Fungicida	100 mg	Sig-Ald	143390-89-0
Diêdrina	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	60-57-1
Etião	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	563-12-2
4,4-DDD	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	72-54-8
Endossulfão Sulfato	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	1031-07-8
4,4-DDT	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	50-29-3

Anexo 1

Tebuconazol	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	107534-96-3
Bifentrina	Insecticida	100mg	Sig-Ald	82657-04-3
Fosalona	Insecticida	100mg	Sig-Ald	2310-17-0
Azinfos- Metilo	Insecticida	250mg	Sig-Ald	86-50-0
Acrinatrina	Insecticida	100mg	Sig-Ald	101007-06-1
Permetrina	Insecticida	250 mg	Sig-Ald	52645-53-1
Tiabendazole	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	148-79-8
Cipermetrina	Insecticida	100 mg	Sig-Ald	52315-07-8
Vinclozolina	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	50471-44-8
Procimidona	Fungicida	250 mg	Sig-Ald	32809-16-8
Fludioxonil	Fungicida	100 mg	Sig-Ald	131341-86-1
Propargite	Fungicida	100 mg	Sig-Ald	2312-35-8

Tabela 39. Reagentes usados no trabalho.

<i>Reagente</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>CAS</i>
PSA bonded silica	100g	Sig-Ald	PSA
Methanol (da gama PESTANAL)	1 L	Sig-Ald	67-56-1
Acetonitrile (da gama PESTANAL)	1L	Sig-Ald	75-05-8
sodium acetate	500 g	Sig-Ald	127-09-3
tolueno (gama pestanal)	1 L	Sig-Ald	108-88-3
Magnesium sulfate anhydrous	500 mg	Sig-Ald	7487-88-9