

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS ITAQUI  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AZOXISTROBINA EM  
VINHOS PRODUZIDOS NA FRONTEIRA OESTE DO RS EMPREGANDO HPLC-  
DAD**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**DÓRIS GRÖEHS  
Itaqui, RS, Brasil  
2013**

**DÓRIS GRÖEHS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AZOXISTROBINA  
EM VINHOS PRODUZIDOS NA FRONTEIRA OESTE DO RS EMPREGANDO  
HPLC-DAD**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Orientador: Miriane Lucas Azevedo

Co-orientador: Osmar Damian Prestes

Itaqui, RS, Brasil

2013

GRÖEHS, Dóris. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AZOXISTROBINA EM VINHOS PRODUZIDOS NA FRONTEIRA OESTE DO RS EMPREGANDO HPLC-DAD. 43p.

Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Ciência e tecnologia de alimentos Universidade Federal do Pampa, Abril de 2013. Orientação: Miriane Lucas Azevedo

1.VINHOS. 2. RESÍDUO DE FUNGICIDADA. 3. QuEChERS. I. AZEVEDO, MIRIANE. Título. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AZOXISTROBINA EM VINHOS PRODUZIDOS NA FRONTEIRA OESTE DO RS EMPREGANDO HPLC-DAD

**DÓRIS GRÖEHS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE AZOXISTROBINA  
EM VINHOS PRODUZIDOS NA FRONTEIRA OESTE DO RS EMPREGANDO  
HPLC-DAD**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em:  
Banca examinadora:

---

Profa Dra. Miriane Lucas Azevedo

Orientador

Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UNIPAMPA

---

Prof, Dr. Omar Damian Prestes

Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Maria

---

Profa Dra. Angelita Machado Leitão

Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UNIPAMPA

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus amados filhos Vinícius e Vítor, meus maiores incentivadores, ao meu querido Celso por sua compreensão, paciência e ombro forte, fonte inesgotável de apoio e para aqueles que não estão mais aqui (Vovô Osvaldo, minha Mãe Diva e irmã Dione) mas eu sei que se estivessem estariam cheios de orgulho neste momento e principalmente à Deus pai todo poderoso.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço aos Professores Osmar Damian Prestes e Miriane Lucas Azevedo, pela orientação e pelo apoio para que eu realizasse este trabalho.

Ao colega Volmir Apoli por ter me dado suporte neste trabalho com seus conhecimentos e ter dispensado muito do seu tempo na realização do mesmo.

Aos professores do curso, minha gratidão por terem nos instruído de forma tão dedicada.

Aos colegas pelo convívio e pelos momentos de amizade.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

*Ainda quando eu falasse todas as línguas dos homens e a língua dos próprios anjos, se eu não tiver amor, serei como o bronze que soa e o címbalo que retine; ainda quando eu tivesse o dom da profecia, que penetrasse todos os mistérios, e tivesse perfeita ciência de todas as coisas, ainda quando tivesse toda a fé possível, até o ponto de transportar montanhas se não tiver amor nada sou. (SÃO PAULO-  
EPÍSTOLA AOS CORÍNTIOS CAP. VIII, vv1a7).*

## RESUMO

### ANÁLISE DE RESÍDUO DE FUNGICIDA AZOXISTROBINA EM VINHOS PRODUZIDOS NA FRONTEIRA OESTE DO RS EMPREGANDO HPLC-DAD

DÓRIS GRÖEHS

Orientadora: Miriane Lucas Azevedo

Itaqui, 06 de maio de 2013

O Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro de vinhos, suco de uva e derivados, onde são elaborados, em média, 340 milhões de litros de vinhos e mostos por ano. Nos últimos três anos, um novo polo vitícola começa a surgir com investimentos na implantação de vinhedos de *Vitis vinífera*. A viticultura está sendo implantada em outros municípios não tradicionais como alternativa de diversificação de pequenas propriedades, principalmente na região do Alto Uruguai do Rio Grande do Sul. A obtenção de vinhos de boa qualidade e de inserção internacional necessita da realização de análises físico-químicas, estas são fundamentais para o monitoramento do processo e identificação de possíveis alterações. Entre as análises, destaca-se a determinação de resíduos de agrotóxicos, provenientes dos processos de cultivo da uva. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença do fungicida azoxistrobina em amostras de vinhos Cabernet Sauvignon proveniente da Fronteira-Oeste do RS empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD). O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é o método mais consolidado e seu uso em alimentos tem sido cada vez mais ampliado. As técnicas de Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida (HPLC) são as principais ferramentas aplicadas em análise de resíduos em alimentos e bebidas por permitir que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente. O método realizado foi aplicado na determinação de resíduos de azoxistrobina em 5 amostras de vinho tinto Cabernet Sauvignon de diferentes marcas provenientes de zonas de cultivo da Fronteira Oeste do RS safra 2011. Conforme os dados apresentados observa-se que não foram detectados (n.d.) resíduos de fungicida no método empregado, e que as amostras avaliadas estão de acordo com o Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Portanto, pode-se concluir que a aplicação deste agrotóxico está sendo realizada dentro do preconizado pelas Boas Práticas Agrícolas.

**Palavras-chave:** Enologia, Estrobilurinas, Cromatografia, QuEChERS.

## ABSTRACT

### ANÁLISE DE RESÍDUO DE FUNGICIDA AZOXISTROBINA EM VINHOS PRODUZIDOS NA FRONTEIRA OESTE DO RS EMPREGANDO HPLC-DAD

DÓRIS GRÖEHS

Orientadora: Miriane Lucas Azevedo

Itaqui, 06 de maio de 2013

The Rio Grande do Sul is the largest producer of wines, grape juice and derivatives, which are produced on average 340 million liters of wine and must annually. Over the past three years, a new polo vineyard begins to emerge with investments in deploying vineyards *V. vinifera*. The viticulture is being implemented in other municipalities nontraditional alternative diversification of small farms, mostly in the Upper Uruguay, Rio Grande do Sul Obtaining good quality wines and international integration requires the realization of physicochemical analyzes, these are fundamental for the process monitoring and identification of possible changes. Between analyzes, highlights the determination of pesticide residues, from the processes of grape growing due to increased production. The objective of this study is to evaluate the presence of the fungicide azoxystrobin in samples of wines from the Border West of the RS using high performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD). The QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Safe Ruggedand) is the most consolidated and its use in food has been increasingly expanded. The techniques of gas chromatography (GC) and liquid chromatography (HPLC) are the main tools applied to the analysis of residues in food and beverages for allowing confirmation and determination of a large number of compounds are performed simultaneously. The developed method was applied to the determination of residues of azoxystrobin in 5 samples of red wine Cabernet Sauvignon from different brands from growing areas of Western Border in RS. According to data presented notes that were not detected (nd) fungicide residues, and that the samples are evaluated according to the Maximum Residue Level (MRL) established by the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) 500 mg kg<sup>-1</sup>. Therefore, it can be concluded that the application of pesticides is being held within the one recommended by the Good Agricultural Practices.

**Keywords:** Enology, Strobirulin, Crotagraphyc, QuEChERS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:Fórmula estrutural da azoxistrobina .....	18
Figura 2: Representação dos picos cromatográficos obtidos para as 6 concentrações avaliadas na obtenção da linearidade e da faixa de trabalho.....	18

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro1:</b> Modalidade de emprego da azoxistrobina.....	18
<b>Quadro2:</b> Não detectado (nd) resíduos de azoxistrobina em 5 diferentes amostras de vinhos.....	27

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	4
2.1 Objetivo Geral.....	5
2.1 Objetivos específicos.....	5
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
3.1 Vinho.....	6
3.2 As regiões vitícolas.....	7
3.3 O estado e a arte do processo de vinificação.....	11
3.4 Doenças fúngicas.....	16
3.5 Fungicidas.....	16
3.5.1 Modo de ação e toxicidade.....	18
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Reagentes e Materiais.....	21
4.2 Instrumentação.....	21
4.3 Preparo das soluções de análise.....	21
4.4 Otimização do método cromatográfico.....	22
4.5 Método de extração.....	22
4.6 Validação do método.....	22
4.7 Metodologia.....	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	27
5.1 Linearidade e faixa de trabalho.....	27
5.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	27
5.2.1 Avaliação da exatidão do método.....	28
5.2.2 Avaliação da precisão intermediária do método.....	28
5.3 Aplicação do método em amostras reais.....	29
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	31
<b>7 REFERENCIAS</b> .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

A vitivinicultura ocupa, no Brasil, uma área de 82 mil hectares, com uma produção de 1,4 milhões de toneladas de uvas por ano. O Rio Grande do Sul é o maior produtor de vinhos, suco de uva e derivados, onde são elaborados, em média, 340 milhões de litros de vinhos e mostos por ano (MELLO, 2012).

A história da vitivinicultura do Rio Grande do Sul possui uma estreita relação com a colonização italiana estabelecida no estado, sobretudo na Serra Gaúcha e na região Central, a partir de 1875 (MENEGUZZO et al., 2006).

Condicionada pelo isolamento, em relação às principais regiões vitivinícolas do mundo, e pressionada pelas condições ambientais, por vezes inóspitas à videira, principalmente das cultivares de *Vitis vinifera*, esta vitivinicultura pioneira se manteve, até meados nos anos 1970, sem investimentos externos significativos. Com a globalização da economia brasileira, a partir dos anos 1980, e pressionada pela forte concorrência internacional, uma nova vitivinicultura, estabelecida numa base tecnológica moderna, diferentemente daquela tradicional (parte da Serra Gaúcha e Região Central), vem concentrando seus investimentos em regiões que apresentam vantagens comparativas relativamente àquela tradicional, neste contexto destacam-se como regiões já consolidadas: a Serra do Sudeste e a Campanha e, em fase inicial, mas com grande potencial, a região dos Campos de Cima da Serra e a fronteira oeste (MENEGUZZO et al., 2006).

Assim, a vitivinicultura do Rio Grande do Sul em 2010, apesar de sua tradição e dispersão, está estruturada com base nestes pólos produtores (MELLO, 2011). A obtenção de vinhos de boa qualidade e de inserção internacional necessita da realização de análises físico-químicas, estas são fundamentais para o monitoramento do processo e identificação de possíveis alterações. Entre as análises, destaca-se a determinação de resíduos de agrotóxicos, provenientes dos processos de cultivo da uva. O aumento da produção, no RS, foi motivado tanto pelo incremento na área plantada tanto na região tradicional como em novos pólos produtores como pelas excelentes condições climáticas (MELLO, 2011).

As condições meteorológicas exercem grande efeito no desenvolvimento e na produtividade do vinhedo, assim como na qualidade da produção. Essa influência ocorre em todos os estádios fenológicos da planta, desde o repouso vegetativo durante o inverno, passando pela brotação, floração, frutificação e crescimento das

bagas ao longo da primavera/verão, maturação no verão, e até a queda das folhas no outono. As condições do tempo também são determinantes para a ocorrência de pragas e doenças como, por exemplo, doenças fúngicas como óídio, míldio e podridão do cacho (MANDELLI et al., 2011).

Resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais são uma grande preocupação para os consumidores devido aos seus efeitos negativos na saúde, sendo os alimentos, uma das rotas mais comuns de exposição humana aos agrotóxicos (ZHANG et al., 2009). Exposições combinadas a diferentes resíduos de agrotóxicos podem ocorrer como consequência da ingestão de um simples alimento contendo multirresíduo ou de uma combinação de diversos produtos alimentícios, cada um contendo um ou mais tipos de resíduos (ZHANG et al., 2009).

As bebidas, como o vinho, estão também sob investigação com relação à ocorrência desses resíduos. Alguns estudos verificaram a redução dos níveis de resíduos de agrotóxicos devido às técnicas de processamento da uva, porém, mesmo com as etapas que ocorrem durante o processo de vinificação, os resíduos não são completamente removidos.

Os agrotóxicos pertencem à classe dos poluentes ambientais mais estudados atualmente, e sua determinação em diferentes matrizes se torna cada vez mais necessária, devido aos altos índices de alimentos contaminados por esses resíduos. No Brasil, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA), monitorou a qualidade de 18 espécies de alimentos em relação a resíduos de agrotóxicos. Neste estudo, os resultados mostraram irregularidades quanto ao uso de agrotóxicos nas lavouras, pois foram encontrados resíduos acima dos limites máximos de resíduos (LMR), bem como a detecção de ingredientes ativos não autorizados para determinada cultura (ANVISA, 2012).

É importante salientar que o vinho, mesmo se tratando de uma bebida muito bem apreciada e consumida pela população, não é monitorado no Brasil. Além disso, estudos que avaliam a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em vinhos são pouco encontrados na literatura científica (PRESTES et al., 2009).

O *Codex Alimentarius* possui três órgãos de assessoramento científico, sendo o JMPR - Comitê de Especialistas FAO/OMS sobre Resíduos de Pesticidas, responsável por realizar as avaliações sobre resíduos de pesticidas em alimentos e meio ambiente, e recomendar os Limites Máximos de Resíduos (LMR).

Para garantir a qualidade dos alimentos e bebidas, o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal (DIPOV) identifica as condições higiênico-sanitárias e a qualidade tecnológica dos 10 mil estabelecimentos produtores de bebidas, vinhos e vinagres, registrados no Ministério da Agricultura, por meio da Coordenação Geral de Vinhos e Bebidas (CGVB).

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) foi iniciado em 2001 pela ANVISA, com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. A ANVISA coordena o programa em conjunto com as vigilâncias sanitárias dos estados participantes, que realizam os procedimentos de coleta dos alimentos nos supermercados e de envio aos laboratórios para análise.

Para um controle eficaz, a quantificação de resíduos presentes nos vinhos é comparada com os limites máximos de resíduos legislados (LMR) para cada substância. Esses limites, tanto quanto o conhecimento científico, permitem garantir a segurança, a saúde do consumidor e a qualidade do vinho. O Limite Máximo de Resíduo (LMR) permitido é expresso em  $\text{mg.kg}^{-1}$  da cultura e a quantidade diária segura para o consumo (Ingestão Diária Aceitável-IDA) é expressa em  $\text{mg.kg}^{-1}$  de peso corpóreo (ANVISA 2010).

Os alimentos bem como as bebidas são considerados matrizes complexas, apresentam propriedades químicas distintas e baixa concentração de analitos, por isso, requerem uma etapa fundamental de preparo de amostra quando são analisados. Assim, para a determinação de fungicidas, faz-se necessário o emprego de métodos multirresíduo de fácil aplicação e de eficiência adequada para superar os limites impostos pela legislação.

Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a separação, identificação e quantificação desses compostos ganha grande destaque para que os limites de detecção e quantificação de tais métodos seja cada vez menor. O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) é o método mais consolidado e seu uso em alimentos tem sido cada vez mais ampliado. As técnicas de Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida (HPLC) são as principais ferramentas aplicadas em análise de resíduos em alimentos e bebidas por permitir que a confirmação e a determinação de um grande número de compostos sejam realizadas simultaneamente (PRESTES et al., 2009).

As técnicas cromatográficas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) permitem trabalhar nas mais exigentes situações com limites de detecção extremamente pequenos, permitindo a quantificação de traços (partes por bilhão ppb e partes por trilhão ppt) para diversos analitos de interesse (PRESTES et al.,2009).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a presença do fungicida azoxistrobina em amostras de vinhos Cabernet Sauvignon safra 2011 proveniente da Fronteira-Oeste do RS empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver um método empregando HPLC-DAD visando a determinação de resíduos de azoxistrobina em amostras de vinho;
- Avaliar as melhores condições de extração e limpeza dos extratos obtidos através da utilização do método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e de Extração em Fase Sólida (SPE);
- Validar e aplicar os procedimentos acima descritos em amostras reais de vinho provenientes de produtores da Fronteira-Oeste do RS.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Vinho

O vinho é o produto obtido pela vinificação/fermentação alcoólica, total ou parcial de uvas frescas, provenientes de vários tipos de castas (*Vitis Vinifera*), cujos bagos são esmagados, prensados ou transformados por outros processos tecnológicos permitidos por lei. É composto de: água, álcool etílico, ácidos orgânicos fixos (ácido tartárico), ácidos orgânicos voláteis (ácido acético), sais, glicerina (que confere a maciez e o aveludado), taninos, matéria corante, matérias minerais e azotadas, e vitaminas. Bebida adequada ao consumo apresenta aromas frutados e perfumados (RHODEN, 2005).

A palavra vinho tem origem etimológica no latim, *vinum*, que tanto pode significar "vinho" como "videira", que é genericamente, uma bebida alcoólica produzida por fermentação do sumo de uva (RHODEN, 2005)

O vinho possui uma longínqua importância histórica e remonta a diversos períodos da humanidade. Do ponto de vista histórico é impossível precisar a sua origem, pois o vinho nasceu antes da escrita. Os enólogos dizem que a bebida surgiu por acaso, talvez por um punhado de uvas amassadas esquecidas num recipiente, que sofreram posteriormente os efeitos da fermentação. O cultivo das videiras para a produção do vinho só foi possível com a sedentarização do homem.

Dados históricos revelam que a primeira introdução da videira no Brasil foi feita pelos colonizadores portugueses em 1532, através de Martin Afonso de Souza, na então Capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. A partir deste ponto e através de introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do país, sempre com cultivares de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e da Espanha. Nas primeiras décadas do século XIX, com a importação das uvas americanas procedentes da América do Norte, foram introduzidas as doenças fúngicas que levaram a viticultura colonial à decadência. A cultivar Isabel passou a ser plantada nas diversas regiões do país, tornando-se a base para o desenvolvimento da vitivinicultura comercial nos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Mais

tarde, a partir do início do século XX, o panorama da viticultura paulista mudou significativamente com a substituição da Isabel por Niágara e Seibel (EMBRAPA 2010).

No Estado do Rio Grande do Sul, foi incentivado o cultivo de castas viníferas através de estímulos governamentais. Nesse período a atividade vitivinícola expandiu-se para outras regiões do sul e sudeste do país, sempre em zonas com período hibernal definido e com o predomínio de cultivares americanas e híbridas. Entretanto, na década de 70, com a chegada de algumas empresas multinacionais na região da Serra Gaúcha e da Fronteira Oeste (município de Santana do Livramento), verificou-se um incremento significativo da área de parreirais com cultivares *V. vinífera* (EMBRAPA, 2008).

### **3.2 As regiões vitícolas**

A viticultura no Brasil ocupa uma área de 60.630 ha em 2012, segundo o IBGE. Situa-se entre o paralelo 30°S, no Estado do Rio Grande do Sul, e o paralelo 9°S, na Região Nordeste do país. Em função da diversidade ambiental, existem pólos com viticultura característica de regiões temperadas, com um período de repouso hibernal definido, polos em áreas subtropicais onde normalmente a videira é cultivada com dois ciclos anuais definidos em função de um período de temperaturas mais baixas no qual há risco de geadas; e pólos de viticultura tropical onde é possível a realização de podas sucessivas, com dois e meio a três ciclos vegetativos por ano.

No Estado do Rio Grande do Sul a principal região produtora é a da Serra Gaúcha, cujas coordenadas geográficas e indicadores climáticos médios são: latitude 29°S, longitude 51°W, altitude 600-800 m, precipitação 1700 mm distribuídos ao longo do ano, temperatura média 17,2°C e umidade relativa do ar 76%. Localizada no nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, é a maior região vitícola do país, com 51.152 hectares de vinhedos, segundo o Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul. Trata-se de uma viticultura de pequenas propriedades, com média de 15 ha de área total, sendo destes 40% a 60% de área útil e 2,5 ha de vinhedos, pouco mecanizada devido à topografia acidentada, onde predomina o uso da mão-de-obra familiar, cada propriedade dispondo em média de quatro pessoas. As condições ambientais determinam um período de repouso hibernal à videira (UVIBRA, 2012).

A poda é realizada em julho-agosto e a colheita está concentrada em janeiro e fevereiro. Cerca de 80% da produção é de uvas americanas (*V. labrusca*, *V. bourquina*) e híbridas, sendo a Isabel a cultivar de maior expressão. Dentre as viníferas brancas, destacam-se as cultivares Moscato Branco, Riesling Itálico, Trebbiano e Chardonnay, e, entre as tintas, as cultivares Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc e Tannat. A densidade de plantio situa-se entre 1600 a 3300 plantas por hectare e predomina o sistema de condução em latada ou pérgola (horizontal), proporcionando produção de 18 toneladas a 30 toneladas por hectare, de acordo com a cultivar e com a safra (EMBRAPA 2012).

As condições de temperatura e umidade durante a primavera e verão favorecem a incidência de doenças fúngicas, especialmente de antracnose (*Elsinoe ampelina*), míldio (*Plasmopara viticola*) e podridões do cacho, principalmente a causada por *Botrytis cinerea* (UVIBRA 2012).

A maior parte da uva colhida é destinada à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados. Uma pequena porcentagem da produção, especialmente de uvas americanas como Niágara Rosada e Isabel, é destinada ao mercado para consumo *in natura* (MELLO, 2011).

Embora a produção de vinhos, suco de uva e derivados da uva e do vinho também ocorra em outras regiões, a maior concentração está no Rio Grande do Sul, onde são elaborados, em média anual, 330 milhões de litros de vinhos e mostos, representando 95% da produção nacional (EMBRAPA 2012).

Ainda no Rio Grande do Sul, na região da Campanha Central, que tem como principal pólo produtor o município de Santana do Livramento, encontra-se um polo vitícola implantado e consolidado há mais de 20 anos, cujo perfil da propriedade difere daquela existente na região tradicional. Trata-se de um tipo de exploração empresarial em grandes áreas com uso intensivo de capital, tanto na mecanização quanto na contratação da mão-de-obra. A uva produzida neste pólo representa cerca de 15% da produção de uvas viníferas do estado (MELLO, 2012)

Nos últimos três anos, um novo polo vitícola começa a surgir com investimentos na implantação de vinhedos de *V. vinifera* feitos diretamente pelas empresas vinícolas tradicionais ou em parceria destas com agropecuaristas, destacando-se os municípios de Bagé e Candiota, na região da Campanha Meridional e Pinheiro Machado e Encruzilhada do Sul, na região da Serra do Sudeste. Além destes, a viticultura está sendo implantada em outros municípios não

tradicionais como alternativa de diversificação de pequenas propriedades, principalmente na região do Alto Uruguai do Rio Grande do Sul, onde a matriz produtiva com base na cultura de pequenas áreas de soja, trigo e milho tornou-se inviável (EMBRAPA, 2012).

As novas instalações da Vinícola Campos de Cima, em Itaqui RS no momento, 95% das obras da nova estrutura para vinificação de vinhos da Fronteira-Oeste já estão concluídas. O prédio moderno e preparado para a elaboração de mais de 80 mil litros de vinhos ao ano está situado na BR-472, no trevo de acesso a Itaqui, no 1º Distrito, as uvas são cultivadas nos 15 hectares de vinhedos da empresa, localizados em Maçambará, a cerca de 100 Km de Itaqui, na fronteira com a Argentina. Serão processadas na cantina de Itaqui as uvas Malbec, Merlot, Tannat, Shiraz e Cabernet Sauvignon.

Os espumantes desta safra seguirão sendo elaborados em parceria com a Vinícola Geisse, em Pinto Bandeira (RS), e as uvas Ruby Cabernet e Viognier serão vinificadas na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves (RS).

A vinícola terá uma área construída de 1.161 metros quadrados, que contará com adega, área de recepção das uvas, área industrial, área de recepção de visitantes, uma loja para venda direta ao público e um escritório da empresa (EMBRAPA UVA E VINHO, 2013).

Recentemente o panorama da Campanha Gaúcha mudou, influenciados pelos produtos de grande qualidade obtidos pelas empresas pioneiras e atraídos pela oferta de terras baratas e boas condições de solo e clima. Empresários do setor vinícola buscaram expandir negócios na fronteira agrícola da uva. Hoje em dia, a região conta com 16 vinícolas, de acordo com a Associação dos Produtores de Vinhos Finos da Campanha Gaúcha. São 1,3 mil hectares plantados em nove municípios por 150 produtores, responsáveis por 15% da produção brasileira de uvas viníferas. A produção que hoje representa 8 milhões de quilogramas por ano deve chegar a 15 milhões em cinco anos (EMBRAPA, 2012).

De acordo com os dados estatísticos disponíveis no portal do IBGE, em 2011, houve aumento de 12,97% na produção de uvas no Brasil. No entanto, não se verificou esse comportamento em todos os Estados.

A produção de vinhos, sucos e derivados do Rio Grande do Sul, em 2011, apresentou aumento de 39,68%, em relação ao ano anterior. Cabe mencionar que a produção do ano de 2010 havia sofrido redução devido a fatores climáticos. O maior

acréscimo ocorreu na produção de vinhos de mesa finos, elaborados a partir de uvas *Vitis vinifera*, 91,88% a mais que a quantidade produzida em 2010. Dentre o grupo desses vinhos, os tintos superaram em 111,41%, do volume produzido no ano anterior. Os vinhos de mesa (elaborados com uvas americanas e híbridas) aumentaram 32,04%, em 2011, e o suco de uva, que também utiliza esse grupo de uvas, apresentou aumento de 30,91% (IBGE 2012).

### **3.3 O estado e a arte do processo de vinificação**

O processo de vinificação inicia com a avaliação das condições sanitárias e de maturação das uvas após a colheita. Segue-se então o processo de desengaçamento e esmagamento. O desengaçamento consiste no processo de separação dos bagos e engaços, partes lenhosas do cacho que prendem os bagos. No esmagamento os bagos passam por uma prensa de borracha para romper sua casca e liberar o suco (SANTOS, 2006).

O processo de esmagamento pode ser substituído pela maceração carbônica onde, ao invés de uma prensa, é injetado gás carbônico em um tanque hermeticamente fechado. Em condições anaeróbicas, a baga sofre fermentação intracelular, em que o açúcar é transformado em álcool etílico e em outras substâncias (BERTAGNOLLI et al., 2007).

Este processo é recomendável quando se dispõe de uvas inteiras, baixo teor de tanino e elevada concentração de ácido málico, açúcar e antocianinas. Nesta fase, os constituintes da parte sólida da uva passam para a parte líquida do mosto através dos fenômenos de dissolução e difusão (RIZZON et al., 2001).

Após esta etapa é realizada a sulfitação, processo que consiste na adição de dióxido de enxofre gasoso, com solução aquosa de dióxido de enxofre, ou bissulfito de potássio com sulfito de amônio. Este processo tem como objetivo ativar a fermentação alcohólica, bloquear a ação de bactérias e impedir a oxidação do mosto (CURVELO, 2005).

O passo seguinte é a adição de leveduras da cepa *Saccharomyces cerevisiae*, caso necessário. A temperatura do mosto aumenta, pois a fermentação é um processo exotérmico e há produção de gás carbônico, que vai para a parte superior do tanque formando com as cascas uma parte sólida, denominada chapéu. O líquido próximo ao chapéu adquire cor, devido ao contato com as cascas.

O processo chamado de remontagem, rotação do mosto claro do fundo com o mosto próximo ao chapéu, permite a uniformização da cor.

Após este processo é feita a descuba: separação da parte sólida da líquida. A parte líquida é transferida para o tanque de fermentação malolática do vinho tinto processo no qual o ácido málico é transformado em ácido láctico com o objetivo de diminuir a acidez total. Logo a seguir, a parte líquida é submetida a nova decantação (RIZZON, 2006).

Após a descuba é realizada nova sulfitação e o vinho passa então para o processo de envelhecimento, quando o produto desejado é um vinho envelhecido

Os vinhos varietal, de um único tipo de uva, sofrem diretamente o engarrafamento. Em vinhos não varietais, é realizado o corte, que consiste na mistura de vinhos feitos de diferentes tipos de uvas, de modo a otimizar o produto final. No processo de fabricação de vinhos brancos antes da fermentação pode ser aplicado o processo de chaptalização, que é a adição de açúcar no mosto para que o vinho atinja o conteúdo alcoólico necessário para sua conservação. Na fabricação de vinhos brancos o mosto não é fermentado com as cascas, não adquirindo cor (RIZZON, 2006; SANTOS, 2006).

### **3.4 Doenças fúngicas**

#### **Míldio – *Plasmopara viticola***

Principal doença em áreas tropicais, o míldio, também conhecido como mofo ou mufa, é causado pelo pseudofungo *Plasmopara viticola* pode causar perdas de até 100% na produção. As condições climáticas ideais para o desenvolvimento da doença são temperaturas entre 18°C e 25°C e umidade relativa do ar acima de 60%. A presença de água livre na superfície dos tecidos vegetais, seja proveniente de chuvas, orvalho ou gutação, por um período mínimo de 2 horas, é indispensável para que ocorra a infecção, sendo a umidade relativa do ar acima de 95%, necessária para a produção de esporos.

O patógeno afeta todas as partes verdes da planta. Nas folhas, inicialmente aparecem manchas amareladas, translúcidas contra o sol, denominadas de “mancha de óleo”. Em condições de alta umidade relativa, na face inferior da folha, sob a mancha de óleo, observa-se um mofo branco que é a frutificação do pseudofungo. Em seguida, o tecido foliar afetado necrosa e, quando o ataque é muito intenso,

ocorre a desfolha precoce da planta. Os cachos são atacados desde antes da floração até o início da maturação. Quando o patógeno atinge as flores ou os frutos até o estágio de chumbinho, observa-se escurecimento do ráquis, o cacho pode ficar recoberto por uma massa branca, secar e cair. Nas bagas mais desenvolvidas, o fungo penetra pelos pedicelos e se desenvolve no seu interior, tornando-as escuras, duras, com superfície deprimida, destacando-se facilmente do cacho. A fase de maior susceptibilidade da cultura ao míldio compreende o período entre o início da brotação dos ramos até a fase “grão ervilha” (GIOVANNI, 2008).

### **Oídio – *Uncinula necator***

Conhecido também por cinza ou mufeta, o oídio, causado por *Uncinula necator* forma conidial *Oidium tuckeri* é uma doença importante quando ocorrem períodos secos. A germinação dos esporos é inibida pela presença de água livre na superfície das folhas e o crescimento micelial ocorrem mais rapidamente entre 21°C e 30°C, embora o fungo possa se desenvolver a temperaturas entre 6°C e 33°C.

O fungo desenvolve-se na superfície dos órgãos verdes das plantas como brotos, folhas e bagas, que ficam recobertos por um crescimento branco pulverulento, formando manchas difusas. Flores e bagas pequenas atacadas secam e caem. Outro sintoma típico é a rachadura das bagas mais desenvolvidas com exposição das sementes. Mesmo não ocorrendo fendilhamento, os cachos ficam depreciados, pois a superfície da baga fica manchada.

As cultivares de uvas finas, como a Itália e suas mutações, são mais suscetíveis ao oídio, enquanto as cultivares de uvas rústicas, como a Niágara Rosada, não apresentam problemas com a doença ( EMBRAPA UA E VINHO, 2008)

### **Antracnose – *Elsinoe ampelina***

A antracnose, também conhecida como varola, negrão, carvão e olho-de-passarinho, é causada pelo fungo *Elsinoe ampelina*, forma conidial *Sphaceloma ampelinum*. As condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do fungo são ventos frios e umidade relativa elevada. Temperaturas de 2°C a 32°C permitem que o patógeno cause infecção, embora a faixa de temperatura ótima para o seu desenvolvimento seja de 24°C a 26°C.

O fungo ataca todos os órgãos verdes da planta (folhas, gavinhas, ramos), inflorescências e frutos. Nos brotos, ramos e gavinhas, aparecem lesões arredondadas de coloração cinzenta no centro e bordos negros. Nas folhas, formam-se manchas escuras e circulares e, muitas vezes, o tecido necrótico desprende-se da lesão, que se transforma num pequeno furo. Caso as lesões ocorram nas nervuras, causam a deformação da folha. Nas bagas, manchas arredondadas tornam o tecido mumificado e escuro. O ataque do fungo na fase de floração causa escurecimento e destruição das flores (EMBRAPA UVA E VINHO, 2008).

### **Podridões do cacho**

As principais podridões do cacho são a podridão da uva madura e podridão ácida, que provocam perdas tanto na qualidade como na quantidade da uva produzida. Ferimentos nos frutos favorecem o estabelecimento dos patógenos e adubação nitrogenada em excesso favorece o desenvolvimento das podridões, pois proporciona alto vigor à planta. Essas doenças podem ocorrer simultaneamente no mesmo cacho e, normalmente, provocam murcha e mumificação das bagas. Alta umidade favorece o desenvolvimento e a esporulação dos fungos, que podem ser disseminados pela ação do vento, da chuva e de insetos.

A podridão da uva madura é causada pelo fungo *Glomerella cingulata*, forma conidial *Colletotrichum gloeosporioides*. Além de alta umidade, temperaturas entre 25°C e 30°C são condições favoráveis à ocorrência da doença.

A podridão da uva madura ou podridão de *Glomerella* tem, nos últimos anos, causado perdas expressivas na produção de uva para processamento na Serra Gaúcha. Como o nome indica, incide nas uvas maduras ou em processo de amadurecimento. A doença, até a safra de 2000/2001, ocorria nos vinhedos, porém a níveis relativamente baixos. Epidemias desta doença começaram a partir de mudanças por melhores padrões de qualidade do vinho, o que resultou em uvas com melhor maturação (maior °Brix), associadas à presença de condições climáticas altamente favoráveis a infecção pelo patógeno e a suscetibilidade deste estágio fenológico à doença. Embora as cultivares americanas e híbridas sejam atacadas, as viníferas são as que apresentam os maiores problemas. A doença é conhecida em outros países como “riperot”, é amplamente distribuída, ocorrendo mais

intensamente em regiões com clima quente e úmido durante a fase de maturação da uva, podendo continuar a causar dano mesmo depois da uva colhida.

Os principais sintomas, observados nos cachos no período da maturação ou em uvas colhidas, surgem como manchas circulares marrons avermelhadas sobre a película das bagas atacadas que, posteriormente, atingem todo o fruto, escurecendo-o. Em condições de alta umidade, aparecem as frutificações do fungo na forma de pontuações cinza-escuras, concêntricas, das quais exsuda uma massa rósea ou salmão que são os conídios fúngicos. Embora os sintomas tornem-se visíveis na uva madura, o fungo pode penetrar em todos os estádios de desenvolvimento do fruto, permanecendo latente até a fase de maturação.

A podridão ácida é causada por um complexo de microrganismos que inclui fungos, bactérias e leveduras presentes na superfície das plantas e sobre material em decomposição. As bagas afetadas pela podridão ácida inicialmente adquirem coloração marrom-clara e posteriormente escurecem. A polpa se decompõe, o suco começa escorrer pelo ferimento no qual se iniciou a podridão e contamina as bagas vizinhas. Após o escoamento do suco, as bagas secam e escurecem, permanecendo aderidas ao pedúnculo. Nos cachos doentes, observa-se a presença da mosca *Drosophila*, responsável pela disseminação dos microrganismos. Uma das características da podridão ácida é o odor de vinagre proveniente do ácido acético produzido pelas bactérias. Períodos quentes e chuvosos quando as uvas estão na fase de maturação, com teor de açúcar acima de 8%, favorecem a ocorrência da podridão ácida (GIOVANNI, 2008).

### **Ferrugem – *Phakopsora euvitis***

Causada pelo fungo *Phakopsora euvitis* Ono, a doença foi inicialmente detectada na Ásia e na América do Norte, sendo constatada pela primeira vez no Brasil no ano de 2001 em municípios da região norte do Estado do Paraná. Atualmente, no entanto, devido ao seu grande potencial de disseminação, a ocorrência do patógeno já se estendeu aos parreirais de outras regiões vitícolas do país. Ocorre, principalmente, em áreas tropicais e subtropicais onde a severidade da doença parece ser maior que nas regiões de clima temperado. Registros preliminares têm mostrado que cultivares europeias (*V. vinifera*) sofrem menos danos que as cultivares americanas e híbridas.

Os sintomas da ferrugem na videira são lesões amareladas a castanhas de várias formas e tamanhos nas folhas. Massas amarelo alaranjadas de uredosporos são produzidas na face inferior das folhas, com manchas escuras necróticas na face superior. Ataques severos do fungo causam senescência e queda prematura de folhas, prejudicando a maturação dos frutos e reduzindo o vigor das plantas no ciclo seguinte (EMBRAPA UVA E VINHO, 2008).

### **Requeima das folhas**

A requeima das folhas da videira foi observada pela primeira vez, em 1998, em uvas americanas (*Vitis labrusca* L.), no início da maturação dos frutos e, no ano seguinte, passou a ser constatada também nas cultivares de uvas finas (*Vitis vinifera* L.), durante o ciclo de formação. A requeima provoca a queda prematura de folhas e prejudica a maturação dos frutos, tornando os cachos inadequados para a comercialização. Além disso, compromete a formação e maturação dos ramos para o ciclo seguinte, devido ao menor acúmulo de reservas de carboidratos.

Os sintomas iniciais, em cultivares de *Vitis vinifera*, são lesões castanho claras com bordos escuros, podendo apresentar anéis concêntricos e halo amarelado bem visível. Em cultivares americanas e híbridas como Niágara Rosada, as manchas são bem definidas, de contorno irregular e coloração arroxeada na face superior das folhas que, em seguida, tornam-se necróticas e de coloração cinza-escura. Essas lesões, predominantes nos bordos foliares, aumentam rapidamente de tamanho e podem coalescer, cobrindo quase todo o limbo, o que provoca a morte e queda das folhas. A esses sintomas observados nas folhas de videiras, fungos do gênero *Alternaria* têm sido encontrados em constante associação, embora os testes de patogenicidade ainda não tenham sido concluídos (MELLO, 2012).

### **Doenças da madeira, declínio da videira ou botriodiplodiose – *Eutypalata*, *Botryosphaeria* spp.**

Declínio ou morte descendente é um termo que designa a morte lenta e gradual de plantas ou partes da planta provocada por agente biótico ou abiótico. Os principais agentes de declínio da videira identificados no Brasil são *Eutypa lata*

(forma conidial *Libertella blepharise* *Botryosphaeria* spp. (forma conidial *Botryodiplodia theobromae*).

Os fungos penetram pelos ferimentos das podas ou outras injúrias produzidas sobre as plantas, se desenvolvem numa ampla faixa de temperatura são favorecidos por alta umidade. O estresse hídrico e desequilíbrios nutricionais agravam a doença.

Os sintomas são retardamento da brotação após a poda; encurtamento dos internódios; folhas pequenas e mal formadas com pequenas necroses nas margens, redução drástica de vigor, superbrotamento, frutificação irregular e menor número de bagas, seca de ramos e morte da planta. Cancros formados nos ramos velhos e frutificações do fungo são importantes para o diagnóstico do agente causal. Um corte transversal do ramo na área afetada mostra um escurecimento em forma de “V”, contrastando com a parte ainda viva da madeira (EMBRAPA UVA E VINHO, 2008).

### **3.5 Fungicidas**

A utilização de pesticidas é ainda a estratégia mais difundida para o controle de pragas, sendo essa prática extensiva depois da II Guerra Mundial por causa da introdução do DDT, BHC, aldrina, dietilaldrina, endrina e 2,4-D. O baixo custo e a eficácia dessas substâncias químicas fizeram-nas muito populares entre os agricultores, iludidos por uma falsa sensação de segurança, aplicava-se liberadamente esses pesticidas para se obter ambientes livres de pragas. Esse uso indiscriminado teve como consequência o aparecimento de pragas resistentes aos pesticidas, contaminação de várias plantas e animais, intoxicação de trabalhadores rurais e consumidores e o aparecimento de resíduos de pesticidas em lugares inesperados tais como rios, reservatórios de água e poços domésticos. Esse fato resultou em uma reorientação da estratégia de controle da pragas para obtenção e uso de pesticidas mais específicos a alternativamente, de métodos de cultivo que prescindam do uso dos pesticidas, como por exemplo, o uso de feromônios e integração de pestes controle. No entanto, infelizmente, essas estratégias alternativas ainda não suplantam a necessidade de novas formulações de pesticidas para melhorar a produção da agricultura (SANTOS, 2002).

As formulações usadas na produção de pesticidas são desenvolvidas com propriedades específicas que são dependentes das estruturas químicas e características físicas dos constituintes. Conseqüentemente, diferentes classes de pesticidas podem ser usadas em combinações e, talvez em diferentes cultivos para aumentar o efeito desejado. Mesmo assim, ainda que usados corretamente, acidentes decorrentes do uso de pesticidas são comuns.

Muitas outras classes de pesticidas podem prejudicar o meio ambiente e provocar intoxicações graves nos seres vivos (WINTER, 2005).

Os mais novos pesticidas introduzidos no mercado têm como característica não terem elevada persistência no meio ambiente, mas por causa do grande consumo em plantações o monitoramento destes pesticidas em alimentos e bebidas é de especial importância. Muitas dessas novas formulações são fabricadas a partir de pesticidas naturais, como por exemplo, as estrobilurinas sintéticas, que foram produzidas a partir de estrobilurinas naturais, sendo esses compostos mais facilmente degradados em plantas, animais e água (CARVALHO, 2006).

Os pesticidas (fungicidas) da classe das estrobilurinas são substâncias naturais isoladas principalmente de cogumelos (basidiomicetes). Seu nome é derivado dos cogumelos do gênero *Strobilurus*. Estrobilurina-A foi o primeiro pesticida dessa classe e que foi isolado a partir de culturas de líquidos de *Strobilurus tenacellus* por ANKE et al. A partir desse estudo, muitos outros compostos naturais estrobilurinas foram isolados e identificados, sendo os mesmos nomeados em ordem de suas descobertas. Estrobilurina-A, Estrobilurina-B, Estrobilurina-C, etc. Todas as estrobilurinas naturais possuem a estrutura do acrilato (E)-3-metoxi-2-(5-fenilpenta-2,4-dienil) sendo que a diferença entre cada uma delas é decorrente dos tipos de substituintes do anel aromático nas posições (SANTOS, 2002).

As estrobilurinas naturais foram os compostos de partida para produção de estrobilurinas sintéticas que são mais aceitáveis e mais potentes quando usadas comercialmente na agricultura para controle de fungos. Pode-se dizer que as estrobilurinas sintéticas são compostos relativamente novos, pois o primeiro foi registrado em 1997, e até o momento, apenas oito estrobilurinas foram sintetizadas de forma eficiente para uso comercial (azoxistrobina, kresoxim-metil, trifloxistrobina, metominostrobin, fluoxastrobina, piraclostrobina, picoxistrobina e dimoxistrobina). O primeiro da classe a ser sintetizado e registrado foi a azoxistrobina e o mais recente

é a dimoxistrobina. A síntese desses pesticidas foi realizada focando principalmente substituições na estrutura (E)- $\beta$ -metoxiacrilato (WINTER, 2005).

### 3.5.1 Modo de ação e toxicidade

As estrobilurinas inibem a respiração celular ligando-se a um local específico nas mitocôndrias, o local de oxidação do quino I (ou do ubiquinol) do citocromo b, e desse modo a transferência de elétrons entre o citocromo b e c cessa, o que leva a diminuição da taxa de oxidação do NADH (dinucleotídeo de nicotinamina e adenina) e a síntese de ATP (adenosina trifosfato). Como consequência, a produção de como fungicidas inibidores de quinonas ( $Q_{0I}$ ), cuja característica importante é a ação rápida e concentrado no primeiro ciclo de vida dos fungos, isto é, no estágio de esporos. Por causa desse modo de ação diferenciado, as estrobilurinas são degradadas rapidamente nas plantas e nos compartimentos do meio ambiente (água e solo) a maioria dos fungicidas estrobilurinas tem um período residual de 21 dias (WINTER, 2005).

As quantidades esperadas para causar toxicidade aguda em indivíduos de 68 Kg seriam as seguintes: de 500 a 5.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (ingestão oral) , de 2.000 a 20.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (exposição cutânea) e de 2.0 a 20.0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (inalação). Até o ano de 2005 não havia relatos de efeitos teratogênicos e carcinogênicos decorrentes da exposição às estrobilurinas. Estes compostos são tóxicos para peixes e invertebrados aquáticos, por isso, a aplicação em torno de poços deve ser acompanhada de cuidados (OMAYE, 2004).

- Índice Monográfico A26 – Nome: Azoxistrobina
- Ingrediente ativo ou nome comum: AZOXISTROBINA (azoxystrobin)
- Sinonímia: ICIA5504, E5504, R 12 5504
- N° CAS: 131860-33-8
- Nome químico: methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate
- Fórmula bruta: C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>
- Fórmula estrutural:

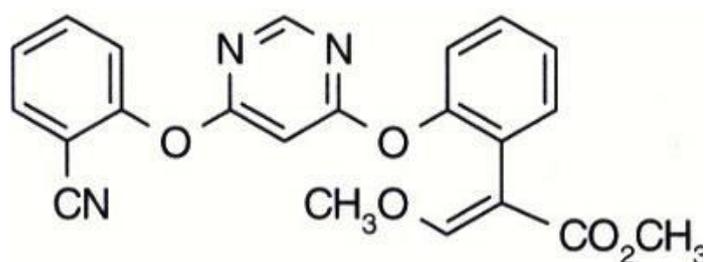


Figura 1: fórmula estrutural da azoxistrobina (EMBRAPA, 2013).

- Grupo químico: Estrobilurina
- Classe: Fungicida
- Classificação toxicológica: Classe III
- Uso agrícola: autorizado conforme indicado.
- Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, berinjela, beterraba, café, cana-de-açúcar, cebola, cenoura, cevada, citros, couve-flor, crisântemo, eucalipto, feijão, figo, girassol, goiaba, mamão, manga, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêssigo, pimentão, soja, tomate, trigo e uva.
- Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,02 mg.kg<sup>-1</sup> p.c.
- UNA = Uso Não Alimentar.
- Intervalo de segurança não determinado devido à modalidade de emprego.

Quadro 1: Modalidade de emprego da azoxistrobina (EMBRAPA 2013)

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg.kg <sup>-1</sup> )	Intervalo de Segurança
UVA	FOLIAR	0,5	7 DIAS

Resolução RE nº 446 de 10/02/10 (DOU de 11/02/10)

Resolução RE nº 1.833 de 22/04/10 (DOU de 23/04/10)

Resolução RE nº 4.412 de 15/10/12 (DOU de 16/10/12)

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Reagentes e Materiais**

Os reagentes químicos utilizados neste estudo são: acetonitrila e metanol, ambos grau UV/HPLC. A água empregada foi purificada com o sistema Direct-Q® UV3 sistema, resistividade 18,2 MW cm Ultrapurificador de água, Purelab, Made in Brazil. O padrão analítico fungicida azoxistrobina (MeCN), J.T. BAKER, grau HPLC, Made in México utilizado apresentava 99% de pureza. Na etapa de extração foram empregados sulfato de magnésio anidro, P.A. (Made in Japan) grau de pureza: 99,9%, acetato de sódio anidro P.A. (Made in México) grau de pureza: 100% e cloreto de sódio (Made in México) Grau de pureza: 100% também foram avaliados diferentes tipos de cartucho de SPE. Dentre os materiais empregados estão tubos de polipropileno, de 15 e 50 mL e vidraria de laboratório.

### **4.2 Instrumentação**

Procedimento experimental foi conduzido no Laboratório de Química da UNIPAMPA campus Itaquí RS.

Neste trabalho foram utilizados balança analítica Shimadzu, Made in Brazil com sensibilidade de 0,0001g e centrífuga Excelsa II, (Fanem), Made in Brazil com capacidade de rotação de 3500 rpm. O sistema HPLC-DAD empregado possui bomba quaternária, amostrador automático, forno termo controlado e detector DAD. Os espectros UV obtidos a 255nm. Colunas analíticas, contendo fase estacionária NSTC18, com dimensões (150 mm x 21 x 3 µm) e fase móvel em modo isocrático 80:20 acetonitrila/MeCN), J.T. BAKER, grau HPLC, Made in México: água, o tempo de corrida foi 6 min, o volume de injeção 10 µl e o fluxo 0,3 ml/min.

### **4.3 Preparo das soluções de análise**

As soluções de agrotóxicos foram individualmente preparadas dissolvendo o padrão analítico de azoxistrobina em acetonitrila de modo a obter concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup>. As soluções de trabalho preparadas a partir desta solução estoque

deconcentração 100 mg.L<sup>-1</sup>. Estas soluções utilizadas para os estudos de fortificação e preparo das soluções da curva analítica.

#### **4.4 Otimização do método cromatográfico**

Para escolher a composição da fase móvel, diferentes proporções de mistura de solventes (metanol, acetonitrila, água Milli-Q e água Milli-Q acidificada a pH 3,0 com ácido acético 1% e foram avaliadas. A escolha da taxa de fluxo foi baseado em testes experimentais de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>

#### **4.5 Método de extração**

O método extração Foi otimizado, após avaliação entre dois métodos: a) método QuEChERS que consiste na extração do agrotóxico após agitação com acetonitrila e posterior etapa de partição empregando sulfato de magnésio anidro e de acetato de sódio anidro; b) Extração em fase sólida, que consiste na extração/partição do analito de interesse com material polimérico de diferentes características.

#### **4.6 Validação do método:**

Depois de estabelecidas as melhores condições ométodo de determinação de resíduos de azoxistrobina em vinho foi validado. Entre os parâmetros de validação que foram determinados cita-se a linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ). Também foram avaliadas a exatidão e a precisão do método desenvolvido.

Foram utilizadas 5 amostras de vinhos tintos Cabernet Sauvignon de diferentes marcas, safra 2011, produzidos no município de Itaqui RS.

A preparação das amostras se deu da seguinte forma:

- 5mL de vinho + 5 mL de H<sub>2</sub>O + Agitação 30 seg. em Vortex;
- 10 mL de acetronitrila + 1 min agitação em vortex;
- 4 g sulfato magnésio +1,7 g de acetato de sódio + 1 min. Agitação em vortex;
- Centrifugação 8 min.3.500 rpm;

- retirados 4 mL sobrenadante;
- Adicionados 100 mg PSA + 500 mg Cl\* + 600 mg Sulfato de magnésio;
- Agitação 1 min em vortex;
- 8 min em centrífuga velocidade 3.500 rpm;
- Sobrenadante = vial.

#### 4.7 Metodologia

Em 2003, Anastassiades e seus colaboradores, com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS, sendo que a pronúncia deve ser "*catchers*". Esse método, que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro e explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna. Durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas (MARJORS, 2001).

Baseado em dados da literatura, a quantidade de amostra escolhida no desenvolvimento do método QuEChERS foi de 10 g, sendo esta considerada ideal quando comparada a quantidades de 15 a 100 g normalmente utilizadas em outros métodos multirresíduo (ARREBOLA et. al, 2003)

A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de pesticidas com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e *clean-up*, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, além de observar a legislação ambiental.

Os solventes mais utilizados para extração multirresíduo de pesticidas são: acetato de etila, acetona e acetonitrila, sendo que cada um destes apresenta vantagens e desvantagens.

Acetona e acetonitrila são miscíveis com água e promovem a extração em uma fase única quando em contato com a matriz. Quando uma extração é realizada com acetona há necessidade de adição de solventes apolares para que ocorra a

separação entre as fases orgânica e aquosa, o mesmo não é necessário quando se utiliza acetonitrila, uma vez que a adição de sais ao extrato faz com que ocorra tal separação (MASTOVSKÁ, 2004)

A utilização de acetonitrila, entretanto, possibilita a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos, e proporciona a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades (COOKE et. al., 2001)

Acetonitrila quando acidificada permite recuperações satisfatórias de pesticidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Uma outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*, LC) acoplada à espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*, MS) do que acetona e acetato de etila. Sendo assim, acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS, empregando-se 10 mL do solvente para 10 g de amostra, resultando uma relação 1 g de amostra por 1 mL de solvente, sem envolver etapa de evaporação. Este valor é considerado baixo se comparado a outros métodos de extração que normalmente apresentam uma relação entre amostra e solvente de 2 a 5 g.mL<sup>-1</sup> no extrato final. Porém, com a instrumentação analítica disponível atualmente, esta relação é considerada adequada uma vez que valores de LD entre 10 e 100 µg.kg<sup>-1</sup> são obtidos para a maioria dos pesticidas comumente analisados (ANASTASSÍADES et al., 2003).

A maioria dos métodos multirresíduo de preparo de amostra empregam *blenders*, como o Ultraturrax<sup>®</sup>, durante o procedimento de extração. Cooke e seus colaboradores (1999), desenvolveram um dos primeiros procedimentos de extração multirresíduo de 89 pesticidas em espinafre, laranja, tomate e pêssigo, fornecendo resultados satisfatórios comparáveis aos do método mini-Luke, que utiliza Ultraturrax<sup>®</sup>. O procedimento de agitação manual ou com auxílio do Vortex possui várias vantagens em relação à agitação mecânica, tais como, possibilidade de realizar a extração a campo; a extração ocorre em um único frasco fechado não expondo o analista, e possui rapidez, uma vez que não há necessidade de lavagem do homogeneizador entre extrações. Portanto, no desenvolvimento do método QuEChERS foi escolhida agitação utilizando Vortex (ANASTASSÍADES et al., 2003).

Métodos multirresíduo que utilizam acetonitrila, desenvolvidos até então, não empregam adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição. Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é

rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa.

A utilização de sais secantes para melhorar a recuperação de pesticidas polares foi descrita por Andersson e seus colaboradores (1991), os quais utilizaram sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). No desenvolvimento do método QuEChERS foi empregada uma mistura de 1 g de NaCl e 4 g de sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ). A escolha do  $\text{MgSO}_4$  foi devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45°C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares.

A etapa de *clean-up* é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico, uma vez que componentes não voláteis da matriz podem ficar aderidos no conjunto injetor-insersor e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções necessárias (ANASTASSÍADES et al., 2003).

Tradicionalmente as etapas de *clean-up* empregam SPE, a qual utiliza cartuchos ou colunas que contêm entre 250 e 1000 mg de sorvente. Esta técnica envolve operação manual, uso de diferentes solventes para lavagem do sorvente, etapas de evaporação e secagem. Muitos fatores afetam a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles o ajuste do sistema de vácuo e o fluxo dos solventes. Esta técnica quando automatizada requer manutenção frequente, além dos sistemas hoje disponíveis apresentarem um custo considerável.

Um novo método de *clean-up* denominado extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, D-SPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS, onde 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (*primary secondary amine*, PSA) e 150 mg de  $\text{MgSO}_4$ . Ao contrário dos métodos já existentes para *clean-up* com SPE que utilizam cartuchos ou colunas, a D-SPE permite que o *clean-up* e a redução de água residual sejam efetuados de uma forma rápida e simultânea. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de coextrativos polares. O sorvente retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (MARTINEZ, 2005;

GARRIDO, 2005). A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Um *clean-up* eficiente garante uma maior vida útil para os sensores, bem como para as colunas cromatográficas, reduzindo assim a contaminação do sistema cromatográfico (SHIMELLS et al, 2007)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Linearidade e faixa de trabalho

A Figura 2 apresenta os resultados obtidos a partir da curva analítica obtida na etapa de validação do método cromatográfico. Observa-se que os 6 pontos de concentração empregados na faixa de trabalho ( $5,0 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) apresentaram comportamento linear e coeficiente de determinação  $r^2 > 0,99$ . Assim, de acordo com a ANVISA e INMETRO estes resultados estão dentro dos limites aceitáveis para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

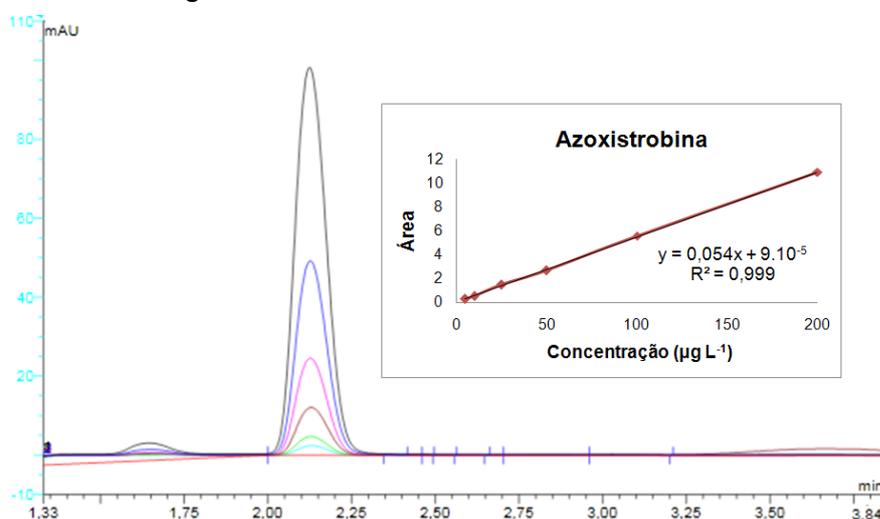


Figura 2: Representação dos picos cromatográficos obtidos para as 6 concentrações avaliadas na obtenção da linearidade e da faixa de trabalho.

### 5.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção do método ( $\text{LOD}_m$ ) foi obtido através da relação entre o sinal e o ruído ( $s/n$ ) do instrumento. Sendo definido como  $\text{LOD} = (3 \times s/n)$ . Por outro lado, o limite de quantificação do método foi definido como  $\text{LOQ} = (10 \times s/n)$ . Assim, definiu-se como LOQ a concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  e o valor de LOD a concentração de  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### **5.2.1 Avaliação da exatidão do método**

De acordo com Ribani e colaboradores (2007), os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios e recuperação e adição do padrão. Neste trabalho a exatidão foi avaliada em função dos ensaios de recuperação, onde diferentes níveis de concentração do analito foram empregados, já que a eficiência do método pode variar em função da quantidade da substância adicionada. O processo de extração das amostras foi realizado pelo método de QuEChERS. Na literatura para a validação de métodos cromatográficos, indica que os intervalos de recuperação aceitáveis para a determinação de resíduos devem estar entre 79 e 120% com precisão de até em torno de 20% (RIBANI et al., 2004; KURZ, 2007)

### **5.2.2 Avaliação da precisão intermediária do método**

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas.

A precisão instrumental e a precisão dos métodos foram adequadas para métodos que quantificam elementos traços em matrizes complexas como o vinho, uma vez que apresentaram valores do desvio padrão relativo (relative standard deviation)  $RSD < 20\%$  (RIBANI et al., 2007).

As vantagens do método estão inseridas no próprio nome em inglês significa rapidez, simplicidade, baixo custo, eficiência, robustez e confiabilidade. O método QuEChERS é aplicado a um amplo número de agrotóxicos incluindo agrotóxicos de caráter básico, ácidos e aqueles muito polares, fornece recuperações adequadas para agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas, devido a estas vantagens, o método tem sido amplamente aceito, e está sendo aplicado nos métodos oficiais da AOAC para análises de resíduos de agrotóxicos em frutas e alimentos.

Payá et al., em 2007, desenvolveram e validaram um método multirresíduo empregando o método QuEChERS para extração de 80 agrotóxicos. Trinta e oito foram quantitativamente recuperados das matrizes de limão, uva passa e pepino.

Banerjee et al., em 2007, validaram um método multirresíduo para análise de 82 agrotóxicos em uvas. Empregaram o método QuEChERS usando acetato de etila como solvente de extração e determinação por CL-EM/EM. eles obtiveram LQ menores de  $10\mu\text{g kg}^{-1}$ , com recuperações de 70 a 120% para a maioria dos agrotóxicos estudados.

### 5.3 Aplicação do método em amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado na determinação de resíduos de azoxistrobina em 5 amostras de vinho tinto Cabernet Sauvignon de diferentes marcas da safra de 2011, provenientes de zonas de cultivo da Fronteira Oeste do RS. Conforme os dados apresentados na Tabela 2 observa-se que não foram detectados (n.d.) resíduos de azoxistrobina. Assim, observa-se que as amostras avaliadas estão dentro o Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de  $500\mu\text{g kg}^{-1}$  de acordo com método empregado.

Quadro 2 : (n.d) Não detectado resíduos de azoxistrobina em 5 diferentes amostras de vinhos,,

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Azoxistrobina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais á concentração do analito em amostras em uma dada faixa de concentração. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear (r) e frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático, sendo recomendado pelo IMETRO e ANVISA valores de r acima de 0,90 até 0,99. Ensaio de proficiência empregando o método QuEChERS mostram que este método é robusto, sendo o método transferido com sucesso entre os laboratórios participantes. Nos Estados Unidos, este método foi adotado em 2007 como método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para a determinação de

resíduos de pesticidas em alimentos. O método QuEChERS também é considerado método oficial pelo *European Committee for Standardization*. Além disso, durante a 39ª sessão do Comitê de Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius* realizada em 2007, os Estados Unidos apresentaram a proposta de oficialização deste, como método padrão do *Codex Alimentarius* (AOAC, 2007).

De acordo com Jiménez et al. (2007), depois da vinificação a concentração de fungicidas diminui consideravelmente, principalmente nos vinhos que são mais clarificados, como é o caso dos brancos. No entanto, por vezes os seus metabolitos secundários podem ser encontrados no vinho. Em vinhos tintos, bem como em vinhos brancos, Cus et al. (2010) e Walorczyk et al. (2011) encontraram resíduos de agrotóxicos em vinhos .

Segundo Rodríguez et al. (2011), a adição de enzimas pectolíticas leva a uma diminuição do teor de resíduos de fungicidas devido à sua adsorção pelas partes sólidas. Otero et al. (2003) detectaram resíduos de ciprodinil e fludioxonil em uvas.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que o método QuEChERS empregado na extração das amostras para determinação de resíduo do princípio ativo azoxistrobina em vinhos é eficiente, rápido preciso e exato.

O limite de quantificação do método nas cinco amostras analisadas para o composto foi menor que os limites máximos de resíduos definidos pela legislação brasileira, ANVISA, para azoxistrobina em uvas, sendo este fato de suma importância, uma vez que o Brasil em 2008 assumiu a liderança mundial no consumo de agrotóxicos segundo o Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos.

Apesar dos resultados obtidos serem favoráveis quer aos produtores, quer ao consumidor final, é necessário desenvolver mais pesquisas relacionadas com a determinação de resíduos de agrotóxicos em vinhos, uma vez que estes, além de provocarem problemas enológicos, graves não são monitorizados no Brasil e podem colocar em risco a saúde dos consumidores.

## 7 REFERENCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. New York: Academic Press. 1997. 635p.

AMDERSON A.; PALSHEDEN, H.; FRENESIUSJ. **Anal Chem**1991, 339, 365.

ANASTASSÍADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J.; J. AOAC, Official Method 2007.01: Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate, AOAC International, 2007.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA CONTROLE DE AGROTOXICOS EM ALIMENTOS, relatório 2001-2004, Brasília, 2005.

ARREBOLA, F.J.; MARTINES, V.J.L.; SANCHEZ, M.; CASTELÓN Á.F.J. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 484, 167.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.

BANERJEE,K.; OULRKAR, D.P.; DASGUPTA, S.B.; PATIL,S.H.; SAVANT, R.;ADSULE,P.G.; Validation and uncertainty analysis of mutiresidue method for pesticides in grapes usisg ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatography. A.** 1173(2007)78

BERTAGNOLLI, S.M.; ROSSATO, S.B.; SILVA V.L.; CERVO,T.; SAUTTER, C.K.; Influência da irradiação ultravioleta nos níveis de resveratrol em vinhos de uva cabernet sauvignon v.195 n2 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Delegacia Federal da Agricultura de Santa Catarina. Cadastro vitícola do Vale do Rio do Peixe. Florianópolis: DAS: Epagri, 2001. 310 p.

CARVALHO F. Agriculture, Pesticides, Food Security and Food Safety, **Environmental science & policy** , 9, 2006: 685 – 687.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex Committee on Pesticide Residues, Codex Document CX/PR 07/39/06: Proposed draft revision of the list of methods for pesticide residue analysis at step 3, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>. Acesso em 13 de abril 2013.

COOKE, J.; BECKET, M. P.; RELIFORD B.; HAMMOCK, W.; ENGEL, M.; *J. AOAC Int* .2001, 82, 1419.

CURVELO G, A.S. Práticas enológicas internacionalmente reconhecidas. **Ciência e tecnologia de viticultura**. v 20, 2005.

CUS, F.; CESNICK, H.; BOLTA, S. V.GREGORIC, A. (2010). Pesticide residues in grapes and during vinification process, *Food Control*, **21**: 1512-1518.

EMATER. Rio Grande do Sul. Recomendações para o manejo das doenças fúngicas e insetos pragas da videira. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, Embrapa uva e vinho, 2003. 72p

EMBRAPA UVA E VINHO. **Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado, Doenças fúngicas e medidas de controle**. Bento Gonçalves. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibrida/UvaAmericanaHib/doenca.htm>. Acesso em: 14 de maio de 2013

EMBRAPA UVA E VINHO. Doenças fúngicas da videira e seu controle – tabela. Bento Gonçalves: Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/tabdoen.html>. Acesso em: 14 de maio de 2013

FAO (SD). Disponível em: [http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94\\_eva/disulfot.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/94_eva/disulfot.pdf). Acesso em: 21 de abril de 2013.

GIOVANNINI, E. **Produção de Uvas**: para vinho, suco e mesa. Belo Horizonte: Renascença. - 3ª Ed.- 2008. 362 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- 2012 Disponível em: [www.ibge.gov.br/home/..noticia](http://www.ibge.gov.br/home/..noticia). Acesso em: 02 de maio de 2013.

JIMENÉZ, J.J.; BERNAL, M.J.; NOZAL, M., J.TORBIO, L. (2007). Persistence and degradation of metalaxyl, lindane, fenvalerate and deltamethrin during the wine making process, **Food Chemistry**, 104: 216- 223.

KURZ, M., et al. Analysis of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques, **Mass Spectrometry Reviews**; v.25.p.900-916, 2006

MAJORS, R. E.; *LC GC Eur.* 2007, 25,

MANDELLI, F.; MONTEIRO, J. E. B. A.; TONIETTO, J.; SANTOS, H. P.; Condições meteorológicas e sua influência na vindima de 2011 no Rio Grande do Sul, 2011. **Comunicado técnico**, 108, 8 p.

MARTINEZ V, J. L.; GARRIDO; FRENICH, A.; **Pesticides Analysis in Biotechnology**, Humana Press: USA, 2005.

MASTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J.; J. Chromatographic method and spectrometric mass, A 2004, 1040, 259.

MELLO, L. M. R de. Cadastro Vitícola. In: CADASTRO Vitícola do Rio Grande do Sul-1995/2000. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho: Ibravin, 2001. 1 CD-ROM.

MELLO, L. M. R de. Competitividade e reconversão: avaliação da vitivinicultura da serra gaúcha frente ao mercosul e a abertura de mercado. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999. 74 p. Relatório de andamento do Subprojeto 05.0.94.004.12.

MELLO, L. M. R., **Vitivinicultura brasileira: panorama 2012**. EMBRAPA, 2012. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2012.pdf>. Acesso Janeiro de 2013.

MENEGUZZO J., MANFROI L., RIZZON L. A., **Sistema de Produção do Vinho Tinto**. EMBRAPA, Sistema de Produção, 12, 2006. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinho/SistemaProducaoVinhoTinto/index.htm>. Acesso em janeiro de 2013.

OMAYE S. T **Food and Nutritional Toxicology**. CRC Press LLC, Boca Raton, EUA, 2004 p: 231-239.

PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B. ; OLIVA, J.; BARBRA, A. Analysis of pesticides residues using The QuEChERS, pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, 389(2007)1697.

PEARSON, R. C.; GOHEEN, A. C. **Compendium of grape disease**. St. Paul: APS, 1994. 93 p.

PORTAL ANVISA.  
[gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos](http://gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos)  
. Acesso em Janeiro de 2013.

PRESTES O. D., FRIGGI C. A., ADAIME M. B., ZANELLA R., *QuEChERS* - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, **Quím. Nova**, 32, 2009, 1620-1634.

RHODEN, K.K. Desenvolvimento e validação do Método multiresíduo Empregando CG-EDC E CG-MS para Investigação de Pesticidas em Morango, Maçã e Uva. Dissertação de mestrado. UFSM. 132p. 2005.

RIBANI, M. et al. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, V.1153, p. 36-57, 2007.

RIBEIRO, I. J. A.; POMMER, C. V. **Uva**: tecnologia de produção: pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 525-567.

RIZZON, L A ; MIELE, A.A.; MENEGUZZO, J.; ZANUZ M,C. Avaliação de uva Isabel para elaboração de vinho tinto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v 34 n7 1999.

RIZZON, L A ; MIELE, A.A.; MENEGUZZO, J.; ZANUZ M,C.Avaliação da cultivar cabernet franc para elaboração de vinho tinto. **Ciência e tecnologia de alimentos**. v21, 2001.

RIZZON, L. A.; MANFROI, L. Sistema de produção de vinho tinto. Bento Gonçalves: Embrapa uva e vinho - Sistemas de produção, 2006.

RODRIGUÉZ, R. M.; GRANDE, B. G. GANDARA, J.S.I. Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new active substances against downy mildew, **Food Chem.**, 125: 549-560. 2001.

SANTOS, S. **A Química dos Insecticidas-Parte I**. Boletim de Química 2002 – SPQ, 85, disponível em [http://www.spq.pt/boletim/boletim\\_view.asp?nr=85](http://www.spq.pt/boletim/boletim_view.asp?nr=85).

SANTOS, J.I.C. Vinhos: o essencial %th São Paulo Ed. SENAC 2006.

SHIMELIS, O.; YANG, Y.; STEMERSON, K.; KANEKO, T.; YE, M.; *J. Chromatographic liquid* , A 2007, 1165, 18.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.;GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças fúngicas. In: FAJARDO, T. V. M. **Uva para processamento**: fitossanidade. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 11-44. (Série Frutas do Brasil, 35) União Brasileira de Vitivinicultura – Uvibra, Instituto Brasileiro do Vinho – Ibravin.

WINTER, C.,K. Pesticides in Food. ZE (Eds.) **Toxins in Food**.CRC Press LLC, Boca Raton, EUA, 2005 pp: 251-267.

ZHANG K.,WONG J.W., HAYWARD D.G., SHELADIA P., KRYNITSKY A.J., SCHENCK F.J., WEBSTER M.G., AMMANN J.A., EBELER S.E., Multiresidue pesticide analysis off winesby dispersive solid-phase extraction and ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** 27, 2009, 4019-4029.