

ALESSANDRA APARECIDA ZINATO RODRIGUES

**EFICIÊNCIA DE PROCESSAMENTOS QUÍMICOS E FÍSICOS NA
REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM HORTALIÇAS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R696e
2016
Rodrigues, Alessandra Aparecida Zinato, 19-
Eficiência de processamentos químicos e físicos na
remoção de resíduos de agrotóxicos em hortaliças / Alessandra
Aparecida Zinato Rodrigues. – Viçosa, MG, 2016.
xi, 84f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fungicidas. 2. Hortaliças - Contaminação. 3. Hortaliças
- Desinfecção e desinfetantes. 4. Ozônio. 5. Extração (Química).
6. Cromatografia a gás. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 632.952

ALESSANDRA APARECIDA ZINATO RODRIGUES

**EFICIÊNCIA DE PROCESSAMENTOS QUÍMICOS E FÍSICOS NA
REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM HORTALIÇAS**

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

APROVADA: 14 de julho de 2016.

Laércio Zambolim

Anízio Márcio de Faria

André Fernando de Oliveira
(Coorientador)

Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

*A Deus,
Aos meus pais João e Olímpia,
Ao meu esposo José Mariano
Aos meus filhos: Maria Cecília e Felipe*

*Com muito amor e carinho,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar, me dar sabedoria, tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar perante às dificuldades.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo incentivo e por me ampararem nos momentos difíceis. Obrigada pelos ensinamentos e preces que ajudaram a nutrir as minhas forças e vencer todos os obstáculos que surgiram nesta missão.

Ao meu esposo, José Mariano, pessoa maravilhosa, que me incentiva, me cobra, me corrige, me fortalece, me completa. Obrigada por todo apoio, amor e paciência.

Aos meus filhos, Maria Cecília e Felipe, duas pérolas raras que conquistei durante o período do doutorado. Mamãe ama muito vocês!

Aos meus irmãos Giovane e Gislene, pelo amor, paciência, amizade e apoio.

À minha sogra, cunhados, primos, tios e amigos que de alguma forma me ajudaram ou mesmo torceram por mim.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), particularmente ao Departamento de Química, pela recepção e oportunidade de desenvolvimento do trabalho de pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, por ser esta pessoa maravilhosa, pelos seus incentivos, carinho, amizade, aprendizagem, fazendo com que está difícil jornada se tornasse mais leve.

Aos meus coorientadores: Antônio Augusto Neves e André Fernando de Oliveira pela amizade, incentivo, ajuda e ensinamentos transmitidos.

Aos professores Anízio Márcio de Faria e Laércio Zambolim pela sua disponibilidade em compor a banca examinadora, pela avaliação da tese e grande enriquecimento do trabalho.

Ao Laboratório de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFV, por ter cedido as amostras de pimentão e ao Sítio Gameleira pelas amostras de tomate.

Aos técnicos de laboratório da UFV: Lucas Henrique Figueiredo Prates (Engenharia Agrícola), Nivaldo Sergio Milagres (Fitopatologia), e Ricardo Martins (Química) pela ajuda na execução dos experimentos. À Jéssika Faêda de Freitas e Fernanda Fernandes Heleno pela amizade e pela valiosa contribuição neste trabalho.

Aos antigos e recentes amigos do Laboratório de Química Analítica (LAQUA) com os quais convivi durante este tempo. Tenho um carinho especial por vocês!

A todos os estagiários, funcionários, colegas e professores da Universidade Federal de Viçosa, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Meu muito obrigada por tudo!!!

BIOGRAFIA

ALESSANDRA APARECIDA ZINATO RODRIGUES, filha de João Medeiros Rodrigues e Olímpia Maria Zinato Rodrigues, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 07 de março de 1975.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se como bacharel em março de 2001.

Em março de 2008, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa. Defendeu sua dissertação em fevereiro de 2010.

Em novembro de 2011 obteve o título de Licenciada em Química pela Universidade Católica de Brasília.

Em agosto de 2011, iniciou o doutorado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	4
CAPÍTULO 1 - REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM TOMATE POR PROCESSAMENTOS DOMÉSTICOS CLÁSSICOS E SEUS EFEITOS SOBRE A QUALIDADE DO PRODUTO.....	6
1.0. INTRODUÇÃO.....	6
2.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1. Reagentes e soluções	9
2.2. Colheita e aplicação dos fungicidas nos tomates.....	9
2.3. Lavagem dos tomates	10
2.4. Avaliação do processo de descascamento de tomates.....	10
2.5. Extração e análise.....	10
2.5.1. Extração.....	10
2.5.2. Análise por CG/DCE.....	11
2.6. Validação dos métodos.....	12
2.7. Efeito dos diferentes processos de lavagem na qualidade dos frutos de tomates.....	13
2.7.1. Perda de massa.....	14
2.7.2. Avaliação da cor.....	14
2.7.3. Sólidos solúveis.....	14
2.7.4. Acidez titulável.....	14
2.7.5. Medida de pH.....	15
2.7.6. Acido ascórbico.....	15
2.8. Análise estatística.....	15
3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1. Validação dos métodos analíticos.....	16
3.2. Efeito de diferentes processos de lavagem na remoção de resíduos de agrotóxicos.....	19

3.3. Distribuição dos agrotóxicos no tomate – Efeito do descascamento.....	22
3.4. Influência dos processos de lavagem sobre a qualidade dos tomates.....	23
4.0. CONCLUSÃO.....	25
5.0. REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 2 - REMOÇÃO DE CONTAMINANTES EM TOMATE E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS FRUTOS.....	
1.0. INTRODUÇÃO	29
2.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1. Reagentes	32
2.2. Aplicação dos fungicidas dos nos tomates	32
2.3.Método para determinação da concentração do ozônio.....	33
2.3.1. Experimento 1. Imersão em água borbulhada com O ₃	33
2.3.2. Experimento 2. Imersão em água ozonizada.....	34
2.3.3. Experimento 3. Imersão em água pura e em água com detergente...	35
2.4. Extração dos resíduos de agrotóxicos.....	36
2.5. Condições cromatográficas.....	36
2.6. Validação dos métodos.....	37
2.7. Qualidade dos tomates após tratamentos.....	37
2.8. Análise estatística.....	38
3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.1. Validação dos métodos analíticos.....	38
3.2. Remoção dos resíduos de fungicidas em tomate.....	39
3.3. Degradação dos agrotóxicos.....	44
3.4. Avaliação da qualidade dos tomates.....	45
4.0. CONCLUSÃO.....	48
5.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO 3 - ESTRATÉGIAS PARA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM PIMENTÕES E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE.....	
1.0. INTRODUÇÃO.....	52
2.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1. Reagentes.....	54
2.2. Plantio e aplicação dos fungicidas nos pimentões.....	54

2.3. Estratégias para remoção de resíduos de agrotóxicos.....	55
2.4. Extração e análise cromatográfica.....	58
2.5. Validação dos métodos.....	59
2.6. Efeito dos tratamentos na qualidade dos pimentões	65
2.7. Análise estatística.....	61
3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1. Validação dos métodos analíticos.....	61
3.2. Efeito dos tratamentos na qualidade dos pimentões.....	65
3.3. Degradação dos agrotóxicos.....	71
3.4. Efeito dos tratamentos na qualidade dos pimentões.....	72
4.0. CONCLUSÃO.....	75
5.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
CONCLUSÕES FINAIS.....	80
APÊNDICE.....	81

RESUMO

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Eficiência de processamentos químicos e físicos na remoção de resíduos de agrotóxicos em hortaliças.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Antônio Augusto Neves e André Fernando de Oliveira

A segurança alimentar é um dos grandes interesses do público, principalmente quando está associada à presença de agrotóxicos em alimentos. Com o objetivo de avaliar a eficiência de algumas técnicas de remoção de resíduos de agrotóxicos em alimentos consumidos *in natura*, amostras de frutos de tomate e de pimentão foram pulverizadas com soluções de azoxistrobina e difenoconazol (agrotóxicos sistêmicos) e clorotalonil (agrotóxico de contato). Os frutos foram imersos em água destilada e diferentes soluções de lavagem, a 25 °C (bicarbonato de sódio 1,5% e 5%, ácido acético 0,15% e 5%, hipoclorito de sódio 0,04% e 1%, detergente 0,25% e 1%, água ozonizada a 1 e 3 mg L⁻¹ e em água borbulhada continuamente com ozônio 1 e 3 mg L⁻¹) por 30 min. Os resíduos de agrotóxicos dos frutos de tomate e pimentão e das soluções de lavagem foram extraídos por técnicas de extração e partição em baixa temperatura (ELL/PBT e ESL/PBT) previamente validadas e analisados por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (CG/DCE). Para os frutos de tomates foi avaliado também o descascamento como uma técnica de remoção de agrotóxicos. O processo de descascamento removeu em média 88%, 79% e 68% dos resíduos de clorotalonil, difenoconazol e azoxistrobina, respectivamente, confirmando a maior presença destes na pele do fruto. Dentre todos os tratamentos utilizados neste estudo, a água borbulhada com ozônio no maior nível de concentração (3 mg L⁻¹) proporcionou uma melhor eficiência de remoção dos três agrotóxicos nos frutos de tomate e pimentão, sendo removido em média 69 % da azoxistrobina, 77 % do difenoconazol e 88 % do clorotalonil. A solução

de uso doméstico que teve melhor eficiência foi a solução de bicarbonato de sódio 5%. Devido a sua natureza não sistêmica, o clorotalonil foi o composto que apresentou uma maior porcentagem de redução após a imersão em diferentes soluções em ambos os frutos. De forma geral, os tratamentos dos frutos de tomate e pimentão com soluções ácidas e alcalinas e oxidantes podem efetivamente minimizar os resíduos de agrotóxicos, sendo mais eficientes que a simples lavagem com água pura. As alterações físico-químicas dos frutos de tomate e pimentão tratados foram avaliadas ao longo de 13 dias de armazenamento. Os parâmetros de qualidade mais afetados foram a perda de massa, acidez e cor. Os maiores danos nos frutos foram causados pelas soluções no maior nível de concentração.

ABSTRACT

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Efficiency of chemical and physical processing in the removal of pesticide residues in vegetables.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisers: Antônio Augusto Neves and André Fernando de Oliveira

Food security is one of the great interests of the public, especially when it is associated with the presence of pesticides in food. In order to assess the efficiency of some pesticide residue removal techniques in fresh food, fruit samples of tomato and bell pepper were sprayed with solutions of azoxystrobin, difenoconazole (both systemic pesticides) and chlorothalonil (contact pesticide). The fruits were immersed in distilled water and in various cleaning solutions, 25 °C (sodium bicarbonate 1.5% and 5%, acetic acid 0.15% and 5%, sodium hypochlorite 0.04% and 1%, detergent 0.25% and 1%, ozonated water at 1 and 3 mg L⁻¹ and water continuously bubbled with ozone 1 and 3 mg L⁻¹) for 30 min. The pesticide residues in fruit of tomatoes and peppers and in wash solutions were extracted by techniques of extraction with low temperature partition (LLE/LTP and SLE/LTP), which were previously validated, and analyzed by gas chromatography with electron capture detector (GC -ECD). For the tomato fruits, it was also evaluated peeling as a pesticide removal technique. The peeling process removed an average of 88%, 79% and 68% of chlorothalonil, difenoconazole and azoxystrobin residues, respectively, confirming the higher presence thereof in the fruit skin. Among all treatments employed in this study, the water bubbled with ozone in the higher concentration level (3 mg L⁻¹) afforded a better removal efficiency of the three pesticides in tomatoes and bell peppers, being removed on average 69% of azoxystrobin, difenoconazole of 77 % and 88% of chlorothalonil. The household solution that had better efficiency was the solution of sodium bicarbonate 5%. Because of its non-systemic nature, chlorothalonil was the compound that had a higher percentage reduction after immersion in different solutions in both fruits. In general, the

treatment of tomato fruits and bell peppers with acids, alkalis and oxidants can effectively minimize pesticide residues, more efficient than simple washing with pure water. The physicochemical changes on tomato and bell pepper treated were evaluated over 13 days of storage. The quality parameters that were most affected were the weight loss, acidity and color of fruits. The greatest damage on fruits were caused by solutions in the higher concentration level.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos alimentos que consumimos está presente uma enorme variedade de substâncias químicas, como aquelas essenciais para a manutenção da saúde, como vitaminas, minerais e proteínas, e algumas potencialmente tóxicas, como resíduos de agrotóxicos, micotoxinas, aditivos e metais pesados. A falta de algum nutriente ou a presença excessiva no alimento de substâncias tóxicas pode significar um risco à saúde humana (JARDIM & CALDAS, 2009).

Os agrotóxicos são empregados em larga escala na agricultura visando manter a produtividade das culturas. Assim, a utilização das Boas Práticas Agrícolas (BPA), a certificação e a punição com multas podem contribuir para a diminuição da exposição do consumidor e do aplicador à essas substâncias tóxicas, responsáveis por sérias doenças, bem como minimizar seus efeitos adversos ao ecossistema (WU et al. 2007; PASSOS & REIS, 2013).

Dessa forma, a obtenção de alimentos saudáveis e de boa qualidade é uma exigência crescente atual, sendo necessária técnicas efetivas que garantam a eficiência dos processos envolvidos. Uma das preocupações do consumidor está relacionada com a contaminação dos alimentos por resíduos de agrotóxicos, uma vez que estes têm sido encontrados de forma irregular em muitos produtos frescos, cozidos ou processados (KEIKOTLHAILE & SPANOGHE & STEURBAUT, 2010). Neste contexto, os Limites Máximos de Resíduos (LMR) correspondem à maior concentração que o agrotóxico pode estar presente nos alimentos sem causar malefícios à saúde humana, sendo expressos em mg kg^{-1} de alimento (COOPER & DOBSON, 2007).

Afim de contornar essa situação de insegurança alimentar, no Brasil foi criado dois programas nacionais de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo MAPA (JARDIM & CALDAS, 2012).

Segundo análise de amostras coletadas em todas as 26 unidades da Federação do Brasil, realizadas pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA, um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros

está contaminado pelos agrotóxicos (Anvisa, 2011). Assim, nos últimos anos, o pimentão foi o alimento que apresentou maior índice de irregularidades para resíduos de agrotóxicos no Brasil. Das amostras analisadas pelo PARA em 2008, 2009, 2010 e 2011 respectivamente 65%, 80%, 92% e 90% apresentaram resultados insatisfatórios para essa cultura devido ao uso indiscriminado e aplicabilidade indevida. O tomate, que já esteve no topo do ranking, hoje, tem seu nível de contaminação reduzida. Das amostras de tomates analisadas pelo PARA em 2008, 2009, 2010 e 2011 respectivamente 18%, 33%, 16% e 12%)apresentaram resultados insatisfatórios (PASSOS & REIS, 2013).

Embora tenha sido assumido por muitos anos que a lavagem de frutas e hortaliças antes do consumo reduz a quantidade de resíduos de agrotóxicos, esta abordagem necessita de confirmação laboratorial (KROL et al., 2000). Há indícios que resíduos superficiais são passíveis de operações de lavagem simples, enquanto que resíduos sistêmicos e lipofílicos presentes em tecidos dos vegetais são pouco afetados (AHMED et al., 2011). Procedimentos de lavagem dos alimentos são normalmente realizadas em água corrente ou imersão em água à temperaturas moderadas. Detergentes, hipoclorito de sódio, bicarbonato, vinagre, cloreto de sódio ou ozônio podem ser adicionados à água de lavagem para melhorar a eficiência do procedimento de lavagem (ONG et al., 1996). Os efeitos da lavagem vão depender das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, como a sua solubilidade em água, taxa da constante hidrolítica, a volatilidade e o coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$), em conjunto com a localização física e idade dos resíduos, temperatura da água e do tipo de lavagem (KAUSHIK et al., 2009; LING et al., 2011).

Dentre os procedimentos de lavagem citados, a ozonização parece ser uma alternativa segura e eficaz para remoção de resíduos de agrotóxicos. O ozônio, é um forte oxidante, sendo eficaz contra vários tipos de microrganismos em frutas e legumes. O ozônio, é relativamente estável no ar, mas altamente instável na água, decompondo-se em muito curto espaço de tempo. Ele não pode ser armazenado e deve ser gerado de forma contínua. O único produto do ozônio, quando se decompõe, é o oxigênio, por isso, os produtos alimentares tratados com ozônio são livres de resíduos do descontaminante (KIM et al., 1999).

Nos processos de oxidação com ozônio em meio aquoso podem ocorrer dois procedimentos, a reação direta, quando o ozônio reage diretamente com os

compostos orgânicos, ou a reação indireta quando ocorre a decomposição do ozônio e os radicais hidroxila, formados reagem com os compostos orgânicos (VIDAL, 2003). Entre os compostos que reagem com ozônio por reação direta estão aqueles que contêm duplas ligações (C = C), grupos funcionais específicos (OH, CH₃, OCH₃) e átomos que possuem uma densidade de carga negativa (N, P, O e S). A reação indireta não é seletiva, uma vez que pode facilmente e rapidamente reagir com muitos compostos presentes na água por meio do radical OH • (E₀ = 2,80 V) (LUIZ et al., 2010).

O ozônio pode ser produzido, principalmente pelos métodos fotoquímico, de descarga elétrica e eletroquímico. Dentre esses processos, o que utiliza descarga elétrica (também conhecido por efeito corona) é o mais utilizado pela maioria dos ozonizadores comerciais, principalmente pelo fato de se obter maior taxa de conversão do oxigênio em ozônio com menor custo (ALMEIDA et al., 2004).

No entanto, o ozônio não pode ser considerado universalmente benéfico aos alimentos pois em altas concentrações pode afetar a qualidade nutricional e sensorial, alterando o sabor e a coloração do produto alimentício. Estudos têm sido realizados para definir o tipo de aplicação de ozônio, seja por fumigação ou imersão em água ozonizada para isto, é necessário levar em consideração o binômio tempo x concentração diante da exposição do produto a ser tratado (COELHO et al., 2015).

Em virtude do alto consumo das hortaliças (tomate e pimentão), ingeridos pela população em geral e diante das irregularidades apresentadas pelo PARA nos últimos anos, estes vegetais foram selecionados para o estudo afim de que pudesse ser verificado a eficiência de processos na remoção/redução de resíduos de agrotóxicos nestas culturas. Dois fungicidas sistêmicos (azoxistrobina e difenoconazol) e um por ação de contato (clorotalonil) foram selecionados para este estudo. Estes compostos são autorizados pela ANVISA para o controle de doenças e pragas na cultura de pimentão e tomate, sendo aplicados via foliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A., RANDHAWA, M. A., YUSUF, M. J., KHALID, N. Effect of processing on pesticide residues in food crops - A review. **Journal of Agriculture Research** , v.49, p. 379-390, 2011.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos. **Química Nova**, v.27, p.818- 824, 2004.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. RDC n. 28, de 09 de agosto de 2010. Regulamento técnico para o ingrediente ativo endosulfan em decorrência da reavaliação toxicológica. Brasília, 2011.
- COELHO, C. C. S.; FREITAS-SILVA, O.; CAMPOS, R. D. S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. Ozonização Como tecnologia pós-Colheita na Conservação de frutas e hortaliças: Uma Revisão. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 369-375, 2015.
- COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, v.26, n.9, p.1337-1348, 2007.
- JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substancias químicas potencialmente tóxicas na dieta e Os Riscos Para Saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, 1898-1909, 2009.
- JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.
- KAUSHIK, G.; SATYA, S.; NAIK, S.N. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 26-40, 2009.
- KEIKOTLHAILE, B. M.; SPANOGHE, P.; STEURBAUT. W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: a meta-analysis approach. **Food and Chemical Toxicology**, v 48, n.1, p. 1-6, 2010.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.
- KROL, W. J.; ARSENAULT, T. L.; PYLYPIW, H. M.; INCORVIA MATTINA, M. J. Reduction of pesticide residues on produce by rinsing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, p.4666-70, 2000.
- LING, Y.; WANG, H.; YONG, W.; ZHANG, F.; SUN, L.; YANG, M. L. The effects of washing and cooking on chlorpyrifos and its toxic metabolites in vegetables. **Food Control**, v. 22, n. 1, p. 54-58, 2011.
- LUIZ, D. B.; GENENA, A. K.; VIRMOND, E.; JOSÉ, H. J.; MOREIRA, R. F.; GEBHARDT, W.; SCHRÖDER, H. F. Identification of degradation products of erythromycin A arising from ozone and advanced oxidation process treatment. **Water Environment Research**, v. 82, n. 9, p. 797-805, 2010.

ONG, K. C.; CASH, J. N.; ZABIK, M. J.; SIDDIQ, M.; JONES, A. L. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce, **Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 153-160, 1996.

PASSOS F. R.; DOS REIS, M. R. Resíduos de agrotóxicos em Alimentos de Origem vegetal: Revisão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 23, p. 49-58, 2013.

VIDAL, F. J. R. **Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización**. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 253 p., 2003.

WU, J.; LUAN, T.; LAN, C.; HUNG, LO, T. W.; CHAN, G. Y. S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water, **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 466-472, 2007.

Remoção de resíduos de agrotóxicos em tomate por processamentos domésticos clássicos e seus efeitos sobre a qualidade do produto

1.0. INTRODUÇÃO

Na alimentação humana os vegetais são considerados como uma importante fonte de minerais, micronutrientes, vitaminas, antioxidantes, fitoesteróis e fibras alimentares (AKHTAR et al., 2010; TYAGI et al., 2012). Apesar dos benefícios à saúde, o consumo de frutas e hortaliças contaminadas com resíduos de agrotóxicos tem causado preocupação aos consumidores (KEIKOTLHAILE et al., 2010). Essa preocupação está relacionada ao conhecido efeito tóxico dessas substâncias e o consequente efeito à saúde humana. Esses efeitos vão desde os efeitos em curto prazo, tais como dores de cabeça e náuseas até os efeitos crônicos como câncer, desregulação endócrina, doenças mentais e cardiovasculares, disfunções na reprodução humana (CLAEYS et al., 2011; MOSTAFALOU & ABDOLLAHI, 2013).

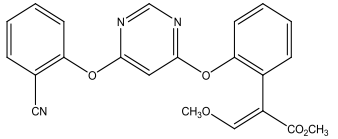
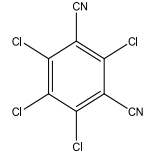
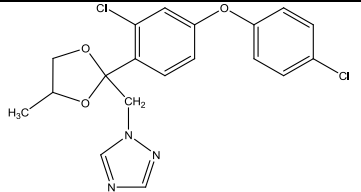
A aplicação indiscriminada dessas substâncias na agricultura, associada ao desrespeito aos períodos de carência, tem colocado no mercado alimentos contaminados com resíduos de agrotóxicos em concentrações acima dos limites máximos estabelecidos pelas agências e normas reguladoras (CHEN et al., 2011; TAHIR et al., 2011). Ainda que haja um movimento para a implantação de boas práticas agrícolas (BPA), com a certificação de produtos agrícolas (ZAMBOLIM, 2009), ainda são encontradas contaminações frequentes em alguns alimentos. Relatórios apresentados pelo programa brasileiro de avaliação de segurança alimentar de hortifrutigranjeiros (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos da ANVISA) têm mostrado que o pimentão e o tomate estão na lista dos alimentos mais contaminados por resíduos de agrotóxicos no Brasil, por vários anos consecutivos (JARDIM et al., 2012).

Atualmente, a obtenção de alimentos saudáveis e de boa qualidade tem sido uma exigência crescente. Assim, além da necessidade do incentivo governamental e conscientização dos produtores em relação às Boas Práticas Agrícolas, é importante explorar estratégias que contornem essa situação da insegurança alimentar, de forma a remover estes compostos dos alimentos e minimizar os impactos sobre a saúde e o meio-ambiente (WU et al., 2007).

Normalmente a lavagem dos vegetais é o primeiro passo realizado antes de processos como descascamento, cozimento e secagem, sendo prevalente na maioria dos ambientes domésticos e industriais. Dessa maneira, é importante avaliar se essas técnicas comuns de processamento de alimentos podem reduzir substancialmente os resíduos de agrotóxicos. Alguns trabalhos têm apontado algum sucesso nessa direção (JURASKE et al., 2007; TYAGI et al., 2012; DA COSTA et al., 2014). *A priori*, o processo de lavagem é utilizado para reduzir a contaminação dos alimentos por poeira, resíduos animais, microrganismos, etc. Esse processo, pode também contribuir para a redução da contaminação por agrotóxicos localizados na superfície dos alimentos. O descascamento, por outro lado, pode reduzir também a contaminação proveniente dos agrotóxicos que penetraram nas primeiras camadas dos alimentos (ABOU-ARAB, 1999). A remoção destes resíduos nos alimentos através do processo de lavagem depende de uma variedade de fatores, tais como as propriedades físico-químicas do agrotóxico, a natureza da fruta ou do legume, a etapa de processamento e do tempo de contato com a solução de lavagem, da solubilidade do agrotóxico em água, da temperatura da água e do tipo de lavagem (HOLLAND et al., 1994; KAUSHIK et al., 2009; LIANG et al., 2012). Uma questão relevante que tem sido abordada é se os métodos utilizados na remoção de resíduos de agrotóxicos afetam as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos (HELENO et al., 2015). Dessa forma é importante considerar alternativas para a remoção destes compostos que garantam a segurança alimentar e manutenção da qualidade dos alimentos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de diferentes processos de lavagem utilizando soluções ácidas, alcalinas e oxidantes para redução da contaminação de tomates por resíduos de agrotóxicos, bem como avaliar a qualidade dos frutos tratados. Dois fungicidas sistêmicos, azoxistrobina e difenoconazol e um de contato, o clorotalonil, que são aplicados rotineiramente na cultura de tomate foram selecionados para este estudo (ANVISA, 2015) (Tabela 1.1). A qualidade dos frutos de tomate após tratamento com as diferentes soluções teve suas características físico-químicas avaliadas ao longo de 13 dias de armazenamento.

Tabela 1.1. Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol

Agrotóxico	Estrutura Química	Grupo Químico	Modo de ação	^a LMR/ (mg kg ⁻¹)	^b Solubilidade / (mg L ⁻¹)	^c log K _{ow}	Pressão de Vapor (at 25 °C) / mPa
azoxistrobina		estrobilurina	sistêmico	¹ 0,5 / ² 3,0 / ³ n.f	6,7	2,50	1,10 x 10 ⁻⁷
clorotalonil		isofaltonitrila	contato	¹ 3,0 / ² 2,0 / ³ 5,0	0,81	2,94	0,076
difenoconazol		triazol	sistêmico	¹ 0,1 / ² 0,5 / ³ 0,5	15	4,36	3,33 x 10 ⁻⁵

^a Limite Máximo de Resíduo (LMR) no ¹ Brasil, ² União Europeia e ³ Codex Alimentarius, ^b solubilidade em água 20 °C; ^c coeficiente de partição octanol-água em pH 7 (20 °C), n.f. não fornecido.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Soluções-padrão estoque dos princípios ativos azoxistrobina (99,9% m/m), clorotalonil (99,3% m/m) e difenoconazol (97,0% m/m) adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) foram preparadas em acetonitrila na concentração de 1000,0 mg L⁻¹ e armazenadas em freezer à temperatura de - 20 °C. A partir da diluição da solução estoque foi preparada no mesmo solvente uma solução de trabalho contendo os três agrotóxicos. As concentrações dos princípios ativos nesta solução foram de 10,0 mg L⁻¹ para clorotalonil; 20,0 mg L⁻¹ para azoxistrobina e 50,0 mg L⁻¹ para o difenoconazol. Uma solução de bifentrina (92,2% m/m) da FMC (Brasil) a 50,0 mg L⁻¹ utilizada como padrão interno foi preparada em acetonitrila (Vetec/HPLC - Duque de Caxias, Brasil). A pulverização dos tomates foi realizada com uma solução aquosa contendo os produtos comerciais Amistar WG[®] (500 g/kg de azoxistrobina), Bravonil 500[®] (500 g/L de clorotalonil) e Score[®] (250 g/L de difenoconazol), produzidos pela Syngenta (São Paulo, Brasil) na dose recomendada pelo fabricante. Para os estudos de lavagem foram preparadas soluções em diferentes concentrações de: ácido acético (99,7% v/v, Isofar, Duque de Caxias, Brasil), bicarbonato de sódio (100,0% m/v, Farmax, Divinópolis, Brasil) e hipoclorito de sódio (4-6% v/v, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Para análise de qualidade dos tomates foram utilizados: ácido sulfúrico (96,0% v/v, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), iodeto de potássio (99,0% v/v, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), e amido solúvel (99,6% v/v, Êxodo Científica, Hortolândia, Brasil), hidróxido de sódio (99,0% v/v, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e fenolftaleína (> 99% v/v, Merck, Darmstadt, Alemanha).

2.2. Colheita e aplicação dos fungicidas nos tomates

Amostras de tomates hidropônicos, do tipo Caqui Salada da variedade *Compack*, isentos de agrotóxicos, foram adquiridas diretamente de um produtor da região de Viçosa, MG, Brasil. Logo após a colheita, os tomates foram acondicionados em caixas de polietileno e conduzidos ao Laboratório de Química Analítica (LAQUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde os experimentos foram realizados.

No laboratório, os tomates foram selecionados em função da uniformidade de tamanho e grau de maturação, sendo posteriormente limpos com toalhas de papel, para remover sujidades em sua superfície. Os tomates (\pm 350 frutos) foram

pulverizados com a solução aquosa (1 L) contendo 0,16 g L⁻¹ de azoxistrobina, 4,0 mL L⁻¹ de clorotalonil e 0,50 mL L⁻¹ de difenoconazol e deixados em ambiente ventilado por 12 h para secagem e aderência dos princípios ativos.

2.3. Lavagem dos tomates

Inicialmente os frutos foram previamente pulverizados: o primeiro lote contendo 36 tomates foram usados como controle e o segundo, contendo 252 tomates, os quais foram submetidos aos diferentes processos de lavagem (tratamento). Para cada tratamento, três grupos de 12 unidades de tomates pulverizados foram imersos, separadamente, por 30 min em 3,0 L de água destilada ou nas diferentes soluções aquosas. As seguintes soluções foram empregadas: ácido acético (0,15% e 5%); bicarbonato de sódio (1,5% e 5%) e hipoclorito de sódio (0,04% e 1%). Após o processo de lavagem, os tomates foram secos em ambiente ventilado por 1 h, pesados em balança analítica, homogeneizados e submetidos à extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT). Ao final de cada ensaio, as amostras de água ou das soluções aquosas de lavagem foram recolhidas e submetidas ao método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT). Todos os procedimentos de extração (tomates e soluções aquosas) foram realizados em triplicata. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE).

2.4. Avaliação do processo de descascamento de tomates

Neste estudo foram empregados tomates (32) pulverizados com 1 L de solução contendo os princípios ativos: azoxistrobina (0,16 g L⁻¹), clorotalonil (4,0 mL L⁻¹) e o difenoconazol (0,50 mL L⁻¹). Desses, oito frutos foram mantidos como controle (tomate inteiro com pele e polpa) e três grupos de oito tomates foram descascados com uma faca, separando a pele da polpa. Os tomates do grupo controle, as peles e as polpas de cada grupo foram pesados e separadamente homogeneizados e submetidos à ESL/PBT e análise por CG/DCE.

2.5. Extração e análise

2.5.1. Extração

As amostras de tomate (tomate inteiro, pele e polpa) foram fracionadas, homogeneizadas em um processador doméstico (Walita, São Paulo) e armazenadas em potes de plásticos, no freezer a -20 °C.

Para extração dos analitos foi empregada a técnica ESL/PBT descrita por Pinho et al (2010a) para determinação de agrotóxicos em tomate modificada. Uma massa de 4,0000 g de amostra foi transferida para um frasco de vidro transparente (22 mL) e adicionados 4,0 mL de solvente extrator (acetonitrila). A mistura foi agitada em *vórtex* (Unique, Maxiclean 750) por 1 min, posteriormente centrifugada (FANEM – modelo 206 MP, São Paulo, Brasil) por 3 min a 560 g e deixadas em freezer (Consul, model 280, São Paulo, Brasil) a aproximadamente -20 °C por 6 h. Após este período, foi obtido um sistema bifásico que consistia em uma fase sólida congelada (fase aquosa e a matriz) e uma fase líquida sobrenadante (solução de acetonitrila). Um volume de 1,8 mL do sobrenadante foi transferido para um vial contendo 0,100 mg L⁻¹ de bifentrina usada como padrão interno.

Para extração dos agrotóxicos em água ou soluções de lavagem, foi empregada a técnica ELL/PBT modificada. Um volume de 4,00 mL de amostra foi agitado com 4,00 mL de acetonitrila em mesa agitadora por 15 min à 175 rpm. Posteriormente a solução foi levada ao freezer (-20 °C) por 2 h para a separação de fases aquosa e orgânica. Em seguida, 1,80 mL de fase orgânica (sobrenadante) contendo os analitos foram transferidos para um vial contendo o padrão interno e analisado por CG-DCE (GOULART et al., 2010).

2.5.2. Análise por CG/DCE

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (modelo GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector por captura de elétrons (DCE), auto injetor AOC - 20i. A separação cromatográfica dos analitos foi realizada em uma coluna capilar HP-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), com fase estacionária composta de 5% fenil e 95% dimetilsiloxano (30 m x 0,25 mm d.i. e 0,10 µm de espessura do filme) empregando o nitrogênio (99,999%, Air Products, São Paulo, Brasil) como gás de arraste num fluxo de 1,2 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 280 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 150 °C (1 min) com rampa de aquecimento de 40 °C min⁻¹ até atingir 290 °C min⁻¹, sendo esta temperatura mantida por 4,5 min. O volume de amostra injetado no cromatógrafo foi 1 µL a uma razão de *split* de 1:5. O tempo total de análise foi de 9,5 min. As corridas foram gerenciadas pelo software GCsolution (Shimadzu, Kyoto, Japão). A identificação de compostos em extratos orgânicos das matrizes foi efetuada por comparação do tempo de retenção com padrões. As curvas

analíticas foram obtidas pelo método de superposição de matriz, sendo usada a razão entre a área de cada analito e do padrão interno como resposta.

2.6. Validação dos métodos analíticos

Na etapa de validação dos métodos de extração e análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE) foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão/recuperação e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Os procedimentos realizados para a validação dos métodos foram avaliados de acordo com as recomendações da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) e outras publicações (ANVISA, 2003c; SANCO, 2009).

A seletividade dos métodos foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos obtidos após a extração de amostras de água e tomate isentas dos agrotóxicos em estudo, com os cromatogramas dos extratos obtidos das matrizes fortificadas. As amostras foram submetidas aos procedimentos de ELL/PBT e ESL/PBT, respectivamente.

Os LD e LQ para os métodos propostos para as amostras de água e tomate foram determinadas considerando o valor de três e dez vezes à área do sinal da linha de base (ruído), respectivamente. As amostras foram fortificadas com concentrações crescentes dos analitos, deixadas em repouso durante 3 h e extraídas pelos métodos correspondentes a cada matriz.

A linearidade dos métodos foi determinada pela injeção de extratos obtidos de amostras de água e tomate fortificadas em concentrações distintas dos agrotóxicos clorotalonil, difenoconazol e azoxistrobina (1LQ, 2,5LQ, 5LQ, 10LQ, 25 LQ, 50 LQ, 75 LQ, 100 LQ e 150 LQ), sendo o primeiro nível equivalente ao LQ e todos os outros níveis, múltiplos dele. Todas as soluções desses ensaios foram preparadas em triplicatas e duas injeções foram feitas em cada um dos níveis de concentração. Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando as razões das áreas dos analitos e do padrão interno com as concentrações mencionadas. A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de determinação (R^2) obtidos pelas regressões lineares e pelos resíduos das curvas analíticas.

Para a avaliação da exatidão dos métodos (ELL/PBT e ESL/PBT) foram realizados ensaios de recuperação. Amostras de água e tomate (triplicatas) foram fortificadas nos 3 níveis de concentração (1LQ, 2,5LQ e 5LQ) para cada um dos

compostos estudados. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação.

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária e expressa pelo coeficiente de variação (CV). Para determinar a repetitividade e precisão intermediária, as amostras foram fortificadas em seis replicatas e em três concentrações diferentes para ambos os métodos de extração em estudo (Tabela 1.2). A precisão intermediária foi avaliada pelo mesmo analista, utilizando o mesmo instrumento e em diferentes dias (dia 1, dia 3 e dia 5).

Tabela 1.2. Concentrações de cada agrotóxico para os ensaios de precisão intermediária e repetitividade relacionados aos métodos ELL/PBT e ESL/PBT para as amostras de água ($\mu\text{g L}^{-1}$) e frutos de tomate ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

Matrizes (métodos)	azoxistrobina	clorotalonil	Difenoconazol
Água (ELL-PBT)	7,99; 19,97 e 39,95	2,33; 5,83 e 11,65	13,98; 34,95 e 6,99
Tomate (ESL-PBT)	3,33; 8,32 e 16,65	1,33; 3,33 e 6,65	8,32; 20,8 e 41,60

2.7. Efeito dos diferentes processos de lavagem na qualidade das hortaliças

Amostras de tomate *in natura* que passaram pelos diferentes processos de lavagem e amostras sem lavagem (controle) foram armazenadas em B.O.D. (Lucadema, Brasil), a 23 ± 1 °C por 13 dias. Todos os tomates (± 290 frutos) foram identificados em lotes, pesados, acondicionados em bandejas de poliestireno e as características qualitativas dos frutos foram avaliadas periodicamente (1^o, 5^o; 9^o e 13^o). Os parâmetros de qualidade avaliados foram: perda de massa, teores de sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável (AT), pH, intensidade da cor (croma), diferença total de cor (ΔE) e ácido ascórbico. No primeiro dia e em intervalos de 3 dias foram recolhidas três amostras de cada lote e submetidas à análises físico-químicas de acordo com os métodos recomendados pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.7.1. Perda de massa

A perda de massa dos frutos armazenados na B.O.D. durante o período de 13 dias foi acompanhada pela medida de massa dos tomates em uma balança analítica (Sartorius, Göttingen, Alemanha), com resolução de 0,1 mg. A variação foi expressa em percentual de perda em relação à massa inicial.

2.7.2. Avaliação da cor

A avaliação da cor dos tomates foi realizada com o auxílio de um colorímetro Minolta (NJ, EUA) modelo CR 400, usando o sistema CIE (*Comission Internationale de l'Eclairage*) com uma leitura direta da reflectância da coordenadas "L*" (luminosidade), "a*" (de verde a vermelho) e "b*" (de azul para amarelo). Com os valores de coordenadas destes, foi possível gerar parâmetros relacionados com a saturação de cor, o chroma (Equação 1.1), (MACDOUGALL, 2002) e à diferença de cor ΔE (Equação 1.2) (MEIR et al., 1992; MACDOUGALL, 2002).

$$\text{Croma} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Equação 1.1})$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Equação 1.2})$$

2.7.3. Sólidos solúveis (SS)

Os teores de sólidos solúveis das polpas nos tomates foram determinadas por refratometria, de modo que era depositado três gotas do suco dos frutos sobre a superfície de leitura do refratômetro digital modelo PAL-1 Atago (Tóquio, Japão). Os resultados foram expressos em °Brix (g/100 mL).

2.7.4. Acidez total titulável (AT)

Acidez total nos tomates (soluções claras ou levemente coloridas), foi determinada por volumetria tendo como indicador a fenolftaleína. Para essa análise, 5,00 g de polpa homogeneizada foi diluída com 50,0 mL de água destilada e titulada com solução padronizada de hidróxido de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ até coloração rósea persistente.

Os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico por 100 g de polpa (Equação 1.3).

$$\text{g de ácido cítrico/100 g} = 0,6404 \frac{V}{m} \quad (\text{Equação 1.3})$$

onde:

V = volume da solução de NaOH (mL) gasto na titulação; e

m = massa da amostra (g).

2.7.5. Medida do pH

A medida de pH foi realizada por imersão direta do eletrodo de vidro sensível a H⁺ nas amostras de tomate preparadas para determinação da acidez total titulável (2.7.4) A determinação do pH das polpas foi efetuada utilizando-se pHmetro de bancada digital Homis, MPA 210 (Brasil).

2.7.6. Ácido ascórbico

Para determinação do teor de ácido ascórbico, os frutos de tomate foram fracionados e triturados no processador doméstico. 10,0 g de polpa dos frutos foram retiradas e homogeneizadas em 50,0 mL de água destilada. Adicionou-se 10,0 mL de solução de ácido sulfúrico a 20% (v/v), 1,0 mL de solução de iodeto de potássio a 10% (m/v) e 1,0 mL da solução de amido a 1% (m/v). Titulou-se com solução de iodato de potássio 0,02 mol L⁻¹, até o aparecimento da coloração azulada. Este método baseia-se na oxidação do ácido ascórbico pelo iodato de potássio. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido ascórbico por 100 g de amostra (Equação 1.4).

$$\text{mg de ácido ascórbico/100 g} = \frac{100 \times V \times f}{m} \quad (\text{Equação 1.4})$$

onde:

f = fator estequiométrico = 8,806;

V = volume da solução de iodato de potássio (mL) e

m = massa da amostra (g).

2.8. Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados para um nível de 95% de confiança. A eficiência dos processos de lavagem foi comparada pelos testes t-Student unicaudal (95% de confiança), após comparação das estimativas do desvio-padrão pelo teste F-Snedecor. A comparação entre si desses tratamentos foi realizada com análises de variância (ANOVA), com teste *post-hoc* Tukey, a 5% usando o *software* Statistica 12.0 (StatSoft Corp., Tulsa, EUA). Para comparar a alteração da qualidade dos processos de lavagem com o controle foi utilizado o teste de Dunnett.

1.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.1. Validação dos métodos analíticos

Os métodos ELL/PBT para determinação dos agrotóxicos em solução aquosa e ESL/PBT para os tomates inteiros, peles e polpa foram validados e os resultados estão adequados, de acordo com as normas de validação de diversos órgãos regulatórios (ANVISA, 2003b; ICH, 2005; SANCO, 2009). Os principais resultados são apresentados na Tabela 1.3.

Comparando os cromatogramas (Figura 1.1 e 1.2) observa-se que não há picos coincidentes entre a matriz original (branco) e a matriz fortificada. Desta forma, não foram observados interferentes no tempo de retenção dos compostos estudados, comprovando a seletividade dos métodos.

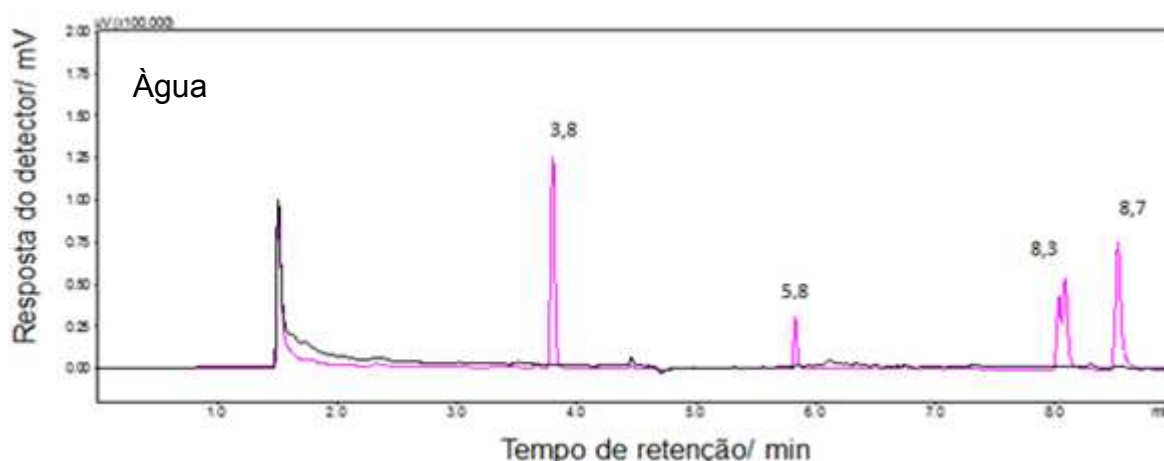


Figura 1.1. Cromatograma do extrato obtido da matriz água isenta de agrotóxicos (---) e do extrato da matriz água (- - -) contendo os agrotóxicos clorotalonil a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 3,8 \text{ min}$); bifentrina (padrão interno) a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 5,8 \text{ min}$), difenoconazol a $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 8,3 \text{ min}$) e azoxistrobina a $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 8,7 \text{ min}$). As amostras foram submetidas ao método ELL-PBT utilizando acetonitrila como solvente extrator e analisadas por CG-DCE.

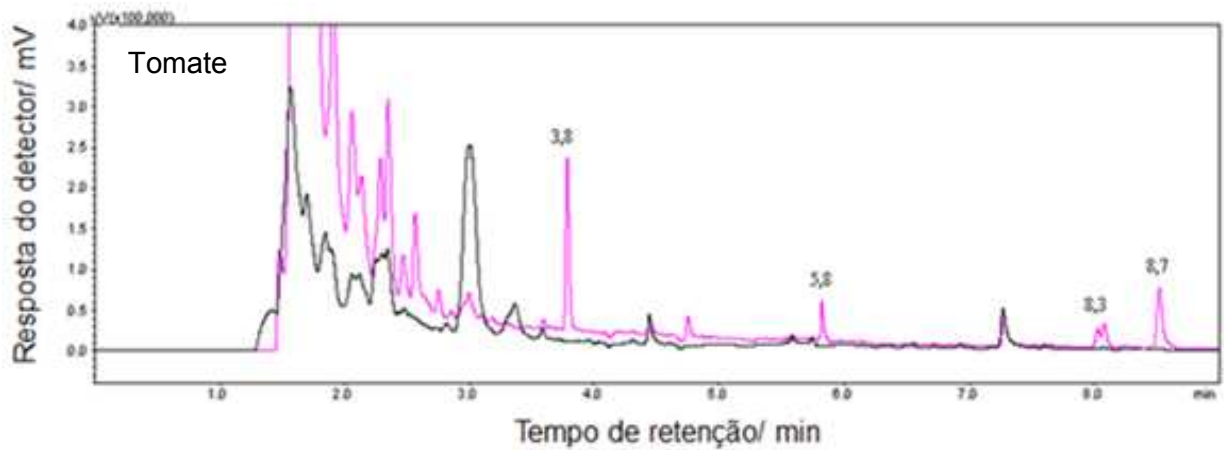


Figura 1.2. Cromatograma do extrato obtido da matriz tomate isenta de agrotóxicos (---) e do extrato da matriz tomate (- - -) contendo os agrotóxicos clorotalonil a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 3,8$ min); bifentrina (padrão interno) a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 5,8$ min), difenoconazol a $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 8,3$ min) e azoxistrobina a $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 8,7$ min).

Para ambas as matrizes (Tabela 1.3.), os três analitos apresentaram recuperações na faixa de 85% a 110% e limites de detecção variando de $0,7$ a $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para água e de $0,40$ a $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para tomate. A linearidade foi estudada usando o método de superposição de matriz com soluções preparadas pela fortificação da água ou do tomate em nove níveis de concentração dos analitos, que variaram entre $1 \times \text{LQ}$ e $150 \times \text{LQ}$. Foram obtidos coeficientes de determinação (R^2) superiores a $0,99$ e distribuição uniforme dos resíduos, indicando que os ajustes dos modelos podem ser aplicados (Apêndice D). Os coeficientes de variação para os ensaios de precisão intermediária e repetitividade foram menores que 10%. Ainda que a precisão dos métodos (ESL/PBT e ELL/PBT) tenham sido similares, a matriz tomate apresentou um efeito de matriz mais acentuado, o que pode ser observado pelo aumento da sensibilidade analítica e consequente diminuição dos limites de detecção de todos os analitos. Esse efeito de matriz em tomate por CG/DCE foi estudado por Pinho et al. (2010b) e Souza et al. (2012), que observaram a ação de coextrativos do tomate, aumentando a resposta cromatográfica de agrotóxicos. Isto ocorre porque, quando uma solução padrão de agrotóxicos com baixa concentração em solvente puro é injetado, uma quantidade significativa dos analitos é retida na interface do insertor (*liner* ou tubo de vidro), obtendo-se assim uma resposta cromatográfica inferior. Quando os extratos com a mesma concentração são analisados, co-extrativos das matrizes ocupam os locais ativos do insertor e apenas uma quantidade desprezível do analito é adsorvido, que conduz a um aumento significativo na resposta cromatográfica (SOUZA et al., 2012).

Tabela 1.3. Figuras de mérito para os métodos ELL/PBT e ESL/PBT. Recuperação (n=6) e precisão (repetitividade, n=6; e precisão intermediária, n=18) para os agrotóxicos extraídos de amostras de água e tomate e análise por CG/DCE.

Compostos	Curva analítica		Faixa linear/ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R^{2c}	dpr ^d /($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LD ^e / ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ^f / ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	NF ^g / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$R^h \pm DP^i$ / %	Intra- dia CV ^j / %	Inter-dia CV / %	
	A ^s	B ^b										
Água (ELL/PBT)*	azoxistrobina	0,0135	0,1091	8,0 - 1200	0,9921	0,4907	2,4	7,99	7,99	90,90 \pm 0,01	7,23	7,70
									19,97	109,81 \pm 0,02	3,03	6,33
									39,95	103,83 \pm 0,05	7,19	6,98
	clorotalonil	0,1043	0,1798	2,3 - 350	0,9929	1,0548	0,7	2,33	2,33	93,34 \pm 0,01	7,23	8,78
									5,83	89,34 \pm 0,03	5,74	6,58
									11,65	98,55 \pm 0,04	3,67	3,90
difenoconazol	0,0092	0,0212	14,0 - 2100	0,9913	0,6205	4,2	13,98	13,98	94,90 \pm 0,02	3,67	5,94	
								34,95	90,09 \pm 0,02	7,29	6,55	
								6,99	103,84 \pm 0,04	3,03	7,22	
Tomate (ESL/PBT)*	azoxistrobina	0,0124	2,0398	3,33 - 333,0	0,9905	0,5180	1,0	3,33	3,33	91,76 \pm 0,09	6,12	6,42
									8,32	103,51 \pm 0,04	3,50	4,33
									16,65	87,65 \pm 0,27	8,60	8,78
	clorotalonil	0,0353	0,8388	1,33 - 199,5	0,9906	0,2347	0,4	1,33	1,33	105,72 \pm 0,03	8,43	9,23
									3,33	88,65 \pm 0,04	6,70	6,59
									6,65	85,23 \pm 0,03	8,37	6,71
difenoconazol	0,0342	1,5134	8,32 - 832	0,9904	0,5748	2,5	8,32	8,32	93,85 \pm 0,06	7,43	8,76	
								20,80	103,44 \pm 0,06	6,16	6,72	
								41,60	94,78 \pm 0,04	6,10	6,96	

^aInclinação (S); ^bIntercepto (B); ^cCoefficiente de determinação; ^d Desvio padrão dos resíduos; ^eLimite de detecção; ^fLimite de quantificação; ^gNível de Fortificação; ^hRecuperação; ⁱDesvio padrão e ^jCoefficiente de variação. *Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT) e extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT)

3.2. Efeito de diferentes processos de lavagem na remoção de resíduos de agrotóxicos

O processo de lavagem de frutas e verduras em ambiente doméstico com o intuito de remover contaminações biológicas e de resíduos de agrotóxicos é necessária. Relatórios apresentados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) têm mostrado que um elevado número de amostras de frutas e hortaliças não está em conformidade com relação ao nível de contaminação. Essa não conformidade está relacionada à presença de resíduos de agrotóxicos acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira (ANVISA, 2014), como também, à presença de agrotóxicos não autorizados para aquelas culturas.

Vários procedimentos para remoção desses resíduos em alimentos têm sido propagados (com maior facilidade devido à era digital, via internet), sem um respaldo científico adequado. Para avaliar alguns desses procedimentos, foram testadas três classes de soluções de uso doméstico: ácida (soluções de ácido acético a 0,15 e 5%); alcalina (bicarbonato de sódio a 1,5% e 5%) e oxidante (hipoclorito de sódio a 0,04 e 1% correspondendo a 400 mg Cl L⁻¹ e 10.000 mg Cl L⁻¹).

A Tabela 1.4 são apresentadas as concentrações dos resíduos de azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol em amostras de tomate (controle e tratamento), água, soluções de lavagem e as percentagens dos agrotóxicos removidas pelos tratamentos.

A imersão em água favoreceu a remoção dos três agrotóxicos do tomate. A eficiência de remoção foi maior para o clorotalonil (44%) do que para a azoxistrobina (26%) que, por sua vez, foi maior que a do difenoconazol (17%).

Dentre as soluções de imersão utilizadas, verificou-se que estas removeram significativamente (teste t unicaudal e teste de Dunnett), mais moléculas de agrotóxicos que a água. Para distinguir a ordem de eficiência das soluções de imersão, foi utilizada ANOVA com teste *post hoc* de Tukey.

A solução de bicarbonato 5% removeu maior quantidade do clorotalonil (83%), do que as demais soluções. As soluções de ácido acético 5% e de bicarbonato 1,5% removeram uma quantidade menor (entre 68 e 72%) de clorotalonil, porém foi maior que a remoção por imersão em água, de acordo com teste Tukey com *post hoc* da ANOVA.

Apenas a solução de ácido acético 5% removeu uma quantidade significativamente maior de azoxistrobina (43%) do que a simples imersão em água.

Para o difenoconazol, as soluções de ácido acético 5%, hipoclorito 1% e bicarbonato 5% removeram significativamente mais agrotóxico que a imersão em água (entre 42 e 47%).

Tabela 1.4. Redução dos resíduos de agrotóxicos em tomates após diferentes tipos de lavagens (a 25 °C)

Agrotóxicos	Tratamentos	Quantidade no fruto \pm SD /($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Quantidade na sol. de lavagem \pm SD /($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Redução (%)	Comparação tratamento com a água*
Azoxistrobina	Controle (fruto)	106 \pm 3	-----	-----	
	H ₂ O	79 \pm 5a	25 \pm 2	26	
	CH ₃ COOH (0.15%)	71 \pm 10ab	32 \pm 7	33	não significativo
	CH ₃ COOH (5%)	61 \pm 5b	43 \pm 9	43	Significativo
	NaHCO ₃ (1.5%)	83 \pm 4a	23 \pm 7	22	não significativo
	NaHCO ₃ (5%)	72 \pm 3ab	30 \pm 2	32	não significativo
	NaClO (0.04%)	84 \pm 3a	16 \pm 8	21	não significativo
	NaClO (1%)	74 \pm 4ab	19 \pm 5	30	não significativo
Clorotalonil	Controle (fruto)	1627 \pm 23	-----	-----	
	H ₂ O	911 \pm 12a	668 \pm 9	44	
	CH ₃ COOH (0.15%)	717 \pm 47ab	883 \pm 12	56	não significativo
	CH ₃ COOH (5%)	528 \pm 60b	1044 \pm 7	68	não significativo
	NaHCO ₃ (1.5%)	455 \pm 21bc	1088 \pm 8	72	Significativo
	NaHCO ₃ (5%)	270 \pm 69c	1280 \pm 11	83	Significativo
	NaClO (0.04%)	893 \pm 89a	619 \pm 16	45	não significativo
	NaClO (1%)	726 \pm 39ab	756 \pm 8	55	não significativo
Difenoconazol	Controle (fruto)	127 \pm 3	-----	-----	
	H ₂ O	106 \pm 2a	17 \pm 4	17	
	CH ₃ COOH (0.15%)	91 \pm 3a	26 \pm 5	28	não significativo
	CH ₃ COOH (5%)	74 \pm 1b	34 \pm 8	42	Significativo
	NaHCO ₃ (1.5%)	83 \pm 3ab	35 \pm 1	35	não significativo
	NaHCO ₃ (5%)	68 \pm 5b	39 \pm 6	47	Significativo
	NaClO (0.04%)	86 \pm 5ab	25 \pm 2	32	não significativo
	NaClO (1%)	73 \pm 7b	33 \pm 5	43	Significativo

Média das triplicatas \pm SD (desvio padrão). Valores acompanhados com a mesma letra nas colunas indica que não há diferença significativa entre os tratamentos (Tukey, $p \leq 0,05$).

Observou-se, portanto, que apenas o ácido acético 5% removeu mais de 40% de todos agrotóxicos. O hipoclorito não removeu significativamente os agrotóxicos, com exceção da solução 1%, que removeu difenoconazol com a mesma eficiência que outras soluções. Já o bicarbonato, mesmo a sua solução mais concentrada removeu azoxistrobina, entretanto, esta solução removeu difenoconazol em proporção similar à das outras soluções. Além disso, as soluções de bicarbonato foram responsáveis pela maior remoção do clorotalonil (83% com solução de 5% e 72,0% com solução de 1,5%).

Desses, o hipoclorito aumentou significativamente apenas a remoção de difenoconazol em relação à imersão de água, e com a mesma eficiência que o ácido acético 5%. É importante observar que essa concentração de hipoclorito utilizada é muito elevada, cerca de duas vezes a concentração de águas sanitárias comerciais.

Observou-se também que ocorreu um aumento gradual na redução dos resíduos dos agrotóxicos à medida que se aumentou a concentração da solução de lavagem. Comportamento semelhante foi reportado por LIANG et al, (2012) e RANDHAWA et al, (2014).

O difenoconazol apesar de possuir maior solubilidade em água (15 mg L^{-1}) que a azoxistrobina ($6,7 \text{ mg L}^{-1}$) e que o clorotalonil ($0,81 \text{ mg L}^{-1}$) não foi o agrotóxico mais removido pelos diferentes processos de lavagem. Na verdade, esta falta de correlação também foi observada por (BOULAID et al., 2005; CENGIZ et al., 2007, SATPATHY et al., 2011). Essa ordem de remoção, por outro lado, está correlacionada com os coeficientes de partição ($\log K_{ow}$) dos analitos. Para o clorotalonil, o $\log K_{ow}$ (igual a 2,94) é da mesma ordem de grandeza da azoxistrobina (2,50), porém menor que aquele observado para o difenoconazol (4,36), explicando a menor liberação desse último para a solução de lavagem (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Bonnechère et al. (2012), que observaram uma menor redução dos resíduos de propamocarbe (11%), um produto sistêmico de alta solubilidade (solubilidade de $900.000 \text{ mg L}^{-1}$, $\log K_{ow} = 0,84$), em comparação com a iprodiona (48%) um agrotóxico de contato de menor solubilidade, mas maior $\log K_{ow}$ (solubilidade de $12,2 \text{ mg L}^{-1}$, $\log K_{ow} = 3,0$) em hortaliças submetidas a lavagem por imersão em água de torneira.

Além disso, o modo de ação do agrotóxico deve ser levado em consideração. O fato do clorotalonil ser um produto classificado como de contato, enquanto que os outros são de ação sistêmica pode ter favorecido a sua maior liberação. Os resíduos dos agrotóxicos de modo de ação por contato ficam preferencialmente na superfície do tomate, enquanto que resíduos dos produtos sistêmicos tendem a se mover para camadas mais profundas dos vegetais (AHMED et al., 2011). Portanto, agrotóxicos sistêmicos com alta solubilidade em água, mas com $\log K_{ow}$ baixo têm menor tendência de serem removidos de frutas e hortaliças. Para estudar esta hipótese foi avaliada a distribuição dos agrotóxicos na polpa e na pele dos tomates.

A diferença nos protocolos dos ensaios dificulta a comparação entre os trabalhos encontrados na literatura. Por exemplo, Kong et al. (2012) relataram que tomates lavados por 10 min em água corrente apresentaram uma diminuição de 16%

dos resíduos de difenoconazol, enquanto que, no presente trabalho, o estudo foi realizado com imersão por 30 minutos em água destilada, com remoção de 17%. *A priori*, a padronização dos experimentos com água corrente exige o controle da vazão, dentre outras variáveis. HENDAWI, et al (2013) por outro lado, obtiveram 30% de remoção de imidacloprid, quando tomates foram lavados por 3 minutos em água corrente. Os tomates foram colocados em uma peneira de plástico e lavados com água da torneira por 30 s, com rotação leve com a mão. O processo de lavagem reduziu 27% do resíduo de clorpirifós em couve-flor, 25% em tomate, 24% em batata e 18% em berinjela (RANDHAWA et al., 2007).

3.3. Distribuição dos agrotóxicos no tomate – Efeito do descascamento

Foi analisada a pele do tomate, obtida por descascamento, assim como a polpa (Figura 1.3). Para todos os agrotóxicos, a quantidade relativa foi maior na pele do que na polpa, sendo maior para o clorotalonil (88% na pele); difenoconazol (79%) e azoxistrobina (68%), ainda que a polpa tenha uma massa muito superior à de pele.

Esses resultados estão de acordo com os trabalhos de XU et al., (2012) que observaram uma baixa permeação destes compostos para a polpa de uvas. Cerca de 84% dos resíduos de azoxistrobina, 93% de clorotalonil e 98% de difenoconazol foram encontrados distribuídos nas peles das uvas.

Resultados similares foram encontrados na literatura, onde o descascamento levou a uma remoção de 98% dos resíduos de clorprofame (não sistêmico) em batatas (LENTZA-RIZOS & BALOKAS et al., 2001). Os níveis de redução de resíduos de clorpirifós, cipermetrina e etilenobisditiocarbamatos em aspargos após o processo de descascamento foram 73%, 75% e 77% respectivamente (CHAVARRI et al., 2005).

A dissipação dos agrotóxicos após a sua aplicação depende de diversos fatores, incluindo tipo de plantas, formulação química, método de aplicação, condições climáticas, fenômenos físico ambiental (principalmente a volatilização) e degradação química, em que a luz solar desempenha um papel proeminente (HENDAWI et al., 2013; TOMER et al., 2013).

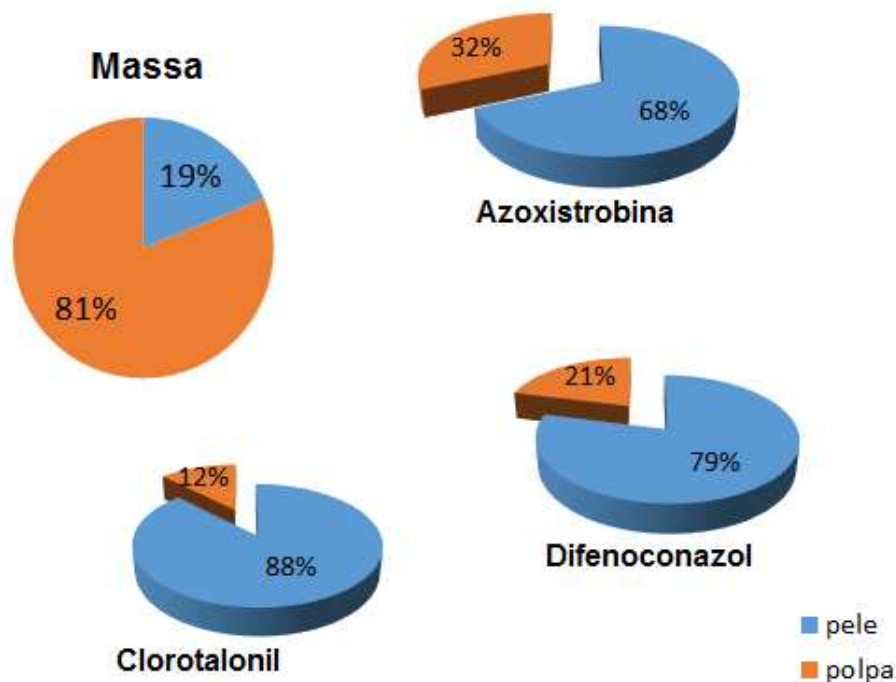


Figura 1.3. Distribuição dos agrotóxicos nos frutos de tomate.

3.4. Influência dos processos de lavagem sobre a qualidade dos tomates

Amostras controle (pulverizados com azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol sem tratamento) e as amostras pulverizadas com agrotóxicos e submetidas aos diversos processos de lavagem foram armazenadas em B.O.D. a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Periodicamente, no 1^o, 5^o, 9^o e 13^o dia, foram avaliados os parâmetros de qualidade: teores de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$), acidez titulável (AT), pH, perda de massa, intensidade da cor (croma) e diferença total de cor (ΔE) e ácido ascórbico. Na Tabela 1.4 estão descritas as médias das quatro avaliações dos parâmetros de qualidade submetidos à análise de variância (ANOVA), e Teste de Dunnett para comparar os diferentes tratamentos com o controle.

No geral, todos os tratamentos de lavagem alteraram significativamente a qualidade dos tomates. As lavagens que causaram maiores alterações significativas foram as lavagens com ácido acético e hipoclorito 1%.

O ácido acético 5% melhorou significativamente a remoção dos três agrotóxicos em relação à imersão em água. Este resultado sugere uma modificação da superfície da pele do tomate, uma vez que os agrotóxicos estudados não apresentam comportamento ácido-base de Bronsted e, portanto, não há formação de espécies iônicas, que permitiria uma maior remoção para a solução aquosa.

Tabela 1.4. Valores médios dos parâmetros de qualidade dos tomates armazenados em B.O.D. a 23 °C ± 1 - acidez titulável (g de ácido cítrico/100 g de polpa), sólido solúveis (°Brix), coroma, % perda de massa, potencial hidrogeniônico (pH), variação da cor e Vitamina C (mL de ácido ascórbico /100 g de polpa).

Tratamentos	Análises de qualidade						
	Acidez	Brix	Croma	Perda de peso	pH	Varição da cor	Vit C
Controle	0,53 ± 0,15	3,77 ± 0,16	35,13 ± 0,13	5,1 ± 0,65	4,25 ± 0,03	7,99 ± 0,54	21,58 ± 0,14
H ₂ O	0,55 ± 0,11	3,97 ± 0,09	31,82 ± 0,16*	4,75 ± 1,15	4,20 ± 0,04	7,43 ± 0,56	22,96 ± 0,09
CH ₃ COOH (0,15%)	0,57 ± 0,08*	3,81 ± 0,14	40,01 ± 0,08*	7,11 ± 0,64	4,16 ± 0,01	7,56 ± 0,73	18,46 ± 0,15*
CH ₃ COOH (5%)	0,59 ± 0,08*	3,54 ± 0,16	36,57 ± 0,15	8,28 ± 0,57*	4,18 ± 0,04	10,66 ± 0,63	17,72 ± 0,24*
NaHCO ₃ (1,5%)	0,58 ± 0,07*	3,44 ± 0,13	39,17 ± 0,10*	7,68 ± 0,56	4,18 ± 0,03	7,10 ± 0,54	19,45 ± 0,22
NaHCO ₃ (5%)	0,58 ± 0,05*	3,55 ± 0,14	36,06 ± 0,15	8,36 ± 0,57*	4,17 ± 0,04	7,34 ± 0,58	19,36 ± 0,14
NaClO (0,04%)	0,58 ± 0,07*	3,77 ± 0,13	37,0 ± 0,08	6,66 ± 0,65	4,33 ± 0,02	6,82 ± 0,60	21,29 ± 0,21
NaClO (1%)	0,58 ± 0,04*	4,02 ± 0,11	37,70 ± 0,17	10,44 ± 0,51*	4,32 ± 0,01	11,69 ± 0,81*	21,50 ± 0,16

*Valores destacados em uma mesma coluna diferem significativamente do controle pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$). Valores médios das características qualitativas dos tomates ao longo do armazenamento (1^o, 5^o; 9^o e 13^o dia) ± coeficiente de variação.

As alterações na qualidade dos tomates lavados com hipoclorito 1% ocorreram, provavelmente, devido ao elevado potencial oxidante do hipoclorito, causando danos à membrana, e desta maneira, permitindo a maior liberação de água (observada pela perda de peso significativa). A oxidação de licopenos e outros corantes também pode ter ocorrido, causando variação na cor.

4.0. CONCLUSÃO

Soluções de ácido acético 5% removeram mais de 40% de todos agrotóxicos, independente do seu modo de ação. As soluções de bicarbonato foram responsáveis pelas maiores remoções de clorotalonil (83% de clorotalonil com solução de 5% e 72% de clorotalonil com solução de 1,5%). Embora a solubilidade do agrotóxico na água seja um fator importante durante a operação de lavagem, a correlação entre a solubilidade dos agrotóxicos e porcentagem de remoção não foi observada neste estudo.

Em geral, os tratamentos de lavagem não alteraram a qualidade dos tomates durante o período de 13 dias de armazenamento. As lavagens que causaram maiores alterações nos frutos foram as lavagens com ácido acético (0,15% e 5%) e hipoclorito a 1%. Os parâmetros de qualidade mais afetados foram a acidez, cor e perda de peso. Observou-se também que a maioria dos agrotóxicos está na pele (68 a 88%) e que os agrotóxicos sistêmicos (azoxistrobina e difenoconazol) apresentaram maior migração para a polpa.

5.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB, A. A. K. Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 509-514, 1999.

AKHTAR, M. S.; ISRAR, B.; BHATTY, N.; ALI, A. Effect of cooking on soluble and insoluble oxalate contents in selected Pakistani vegetables and beans. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 1, p. 241-249, 2011.

AHMED, A., RANDHAWA, M. A., YUSUF, M. J., KHALID, N. Effect of processing on pesticide residues in food crops - A review. **Journal of Agriculture Research**, v.49, p. 379-390, 2011.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Monografias de agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Asuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>. Acesso em: 20 set 2015.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2014. Agrotóxicos e Toxicologia. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f7285680463435ca839cbfec1b28f937/PARA+Resul+dados2012B+Resumido-14-11-14.pdf?MOD=AJPERES>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução, n. 899. 2003, p.

BONNECHÈRE, A.; HANOT, V.; JOLIE, R.; HENDRICKX, M.; BRAGARD, C.; BEDORET, T.; VAN LOCO, J. Effect of household and industrial processing on levels of five pesticide residues and two degradation products in spinach. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 397-406, 2012.

BOULAID, M.; AGUILERA, A.; CAMACHO, F.; SOUSSI, M.; VALVERDE, A. Effect of household processing and unit-to-unit variability of pyrifenoxy, pyridaben, and tralomethrin residues in tomatoes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4054-4058, 2005.

CENGIZ, M. F.; CERTEL, M.; KARAKAŞ, B.; GÖÇMEN, H. Residue contents of captan and procymidone applied on tomatoes grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1611-1619, 2007.

CHAVARRI, M. J.; HERRERA, A.; ARIÑO, A. The decrease in pesticides in fruit and vegetables during commercial processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 205-211, 2005.

CHEN, C.; QIAN, Y.; CHEN, Q.; TAO, C.; LI, C.; LI, Y. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. **Food Control**, v. 22, n.7, p. 1114-1120, 2011.

CLAEYS, W. L.; SCHMIT, J. F.; BRAGARD, C.; MAGHUIN-ROGISTER, G.; PUSSEMIER, L.; SCHIFFERS, B. Exposure of several Belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. **Food Control**, v. 22, n. 3, p. 508-516, 2011.

COSTA CABRERA, L.; MELLO, L. L.; BADIÁLE-FURLONG, E.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Efeito do processamento industrial e doméstico de alimentos nos níveis de

resíduos de agrotóxicos. ***Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia***, v. 2, n. 4, p. 43-52, 2014.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, J. H.; DE ASSIS, TC, & DE QUEIROZ, M. E. L.. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. ***Acta Analytica Chimica***, v. 671, n. 1, p. 41-47, 2010.

HENDAWI, M. Y.; ROMEH, A. A.; MEKKY, T. M. Effect of food processing on residue of imidacloprid in strawberry fruits. ***Journal of Agricultural Science and Technology***, v. 15, n. 5, p. 951-959, 2013.

HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. FARONI, L. R. A.; SOUSA, F. A.; OLIVEIRA, A. F. **Ozone Treatment for the Removal of Residual Chlorothalonil and Effects on the Quality of Table Grapes**. ***J. Braz. Chem. Soc.***, v. 26, n. 4, p. 687-694, 2015.

HOLLAND, P. T.; HAMILTON, D.; OHLIN, B.; SKIDMORE, M. Pesticides report 31: Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products (technical report). ***Pure and applied chemistry***, v. 66, n. 2, p. 335-356, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1020 p.

ICH. **Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. 2005.

JARDIM, A. N., & CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010, ***Food Control***, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

JURASKE, R.; ANTÓN, A.; CASTELLS, F.; HUIJBREGTS, M.A.J. Human intake fractions of pesticides via greenhouse tomato consumption: comparing model estimates with measurements for Captan, ***Chemosphere***, v. 67, n. 6, p. 1102-1107, 2007.

KAUSHIK, G.; SATYA, S.; NAIK, S.N. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – A review. ***Food Research International***, v.42: 26–40, 2009.

KEIKOTLHAILE, B. M.; SPANOGHE, P.; STEURBAUT, W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: a meta-analysis approach. ***Food and Chemical Toxicology***, v. 48, n. 1, p. 1-6, 2010.

KONG, Z.; DONG, F.; XU, J.; LIU, X.; LI, J.; LI, Y. ZHENG, Y. Degradation of acephate and its metabolite methamidophos in rice during processing and storage. ***Food Control***, v. 23, n. 1, p. 149-153, 2012.

LENTZA-RIZOS, C.; BALOKAS, A. Residue levels of chlorpropham in individual tubers and composite samples of postharvest-treated potatoes. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 49, n. 2, p. 710-714, 2001.

LIANG, Y., WANG, W., SHEN, Y., LIU, Y., & LIU, X. J. Effects of home preparation on organophosphorus pesticide residues in raw cucumber. ***Food Chemistry***, v.133, n.3, p. 636-64, 2012.

LING, Y., WANG, H., YONG, W., ZHANG, F., SUN, L., YANG, M.L. The effects of washing and cooking on chlorpyrifos and its toxic metabolites in vegetables. **Food Control**, v. 22, p. 54-58, 2011.

MACDOUGALL, D. B. **Color in food: improving quality**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. 388 p.

MEIR, S.; PHILOSOPH-HADAS, S.; GLOTER, P.; AHARONI, N. Nondestructive assessment of chlorophyll content in watercress leaves by a tristimulus reflectance colorimeter. **Postharvest Biology and Technology**, v.2, n. 2, p. 117-124, 1992.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157-177, 2013..

^aPINHO, G. P.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251-256, 2010.

^BPINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L.; STARLING, M. A. V. Influência dos constituintes químicos dos extratos de Diferentes Matrizes na Resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010

RANDHAWA, M. A.; ANJUM, F. M.; A. S. I, M. R., BUTT, M. S.; AHMED, A.; RANDHAWA, M. S. Removal of endosulfan residues from vegetables by household processing **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 66, n. 10, p. 849, 2007.

RANDHAWA, M. A.; ANJUM, M. N.; SADIQ BUTT, M.; YASIN, M.; IMRAN, M. Minimization of Imidacloprid Residues in Cucumber and Bell Pepper Through Washing with Citric Acid and Acetic Acid Solutions and Their Dietary Intake, **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 5, p. 978-986, 2014.

SANCO : Procedures Method validation and quality control for Pesticide residue analysis in food and Food , Document No. SANCO / 10684/2009 . Legal Deposit : AL - 1133-2009.

SATPATHY, G; TYAGI, Y.K.; GUPTA, R. K. Removal of organophosphorus (OP) pesticide residues from vegetables using washing solutions and boiling. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 2, p. 69, 2011.

SOUSA, F. A.; COSTA, A. I. G.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; TEÓFILO, R. F.; NEVES, A. A.; DE PINHO, G. P. Evaluation of matrix effect on the GC response of eleven pesticides by PCA. **Food Chemistry** , v. 135, n. 1, p.179-185, 2012.

TAHIR .A, I.; AHMAD, S.; TAHIR, Determination of pesticide residues in fruits of Nawabshah district, Sindh, Pakistan., **Pak. J. Bot**, v. 43, n. 2, p. 1133-1139, 2011.

TOMER, V.; SANGHA, J. K. Vegetable Processing At Household Level: Effective Tool Against Pesticide Residue Exposure. *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, v. 6, n. 2, p 43-53, 2013.

TYAGI, Y. K., SATPATHY, G., GUPTA, R. K. Removal of Organophosphorus (OP) Pesticide Residues from Vegetables Using Washing Solutions and Boiling,. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 2, p. 69, 2012.

WU, J.; LUAN, T.; LAN, C.; LO, T. W. H.; CHAN, G. Y. S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 466-472, 2007.

XU, X. M.; YU, S.; LI, R.; FAN, J.; CHEN, S. H.; SHEN, H. T.; REN, Y. P. Distribution and migration study of pesticides between peel and pulp in grape by online gel permeation chromatography–gas chromatography/mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 135, n. 1, p. 161-169, 2012.

ZAMBOLIM. L. Boas práticas para uma agricultura sustentável. In: Ciência que protege a agricultura. Especial Andef 35 anos, 46p. 2009.

Remoção de contaminantes em tomate e sua influência na qualidade dos frutos

1.0. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos tem sido a principal estratégia de controle e prevenção de pragas durante o cultivo e após a colheita, mantendo a produtividade e a qualidade da produção agrícola (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2008). Entretanto, quando as doses e os intervalos de segurança de aplicação dos agrotóxicos não são respeitados, estes podem oferecer riscos, tanto para o meio ambiente como para a saúde pública (KEIKOTLHAILE et al., 2010; AI-DABBAS et al., 2014; CASSAL et al., 2014). A exposição dos seres humanos aos agrotóxicos pode acontecer durante a aplicação dos mesmos e de maneira mais ampla pela ingestão dos alimentos (especialmente frutas e legumes) contaminados. Essa forma de contato corresponde a cinco vezes mais do que outras vias (CLAEYS et al., 2011).

Dentre os vegetais consumidos, o fruto do tomate (*Lycopersicon esculentum*) é mundialmente um dos mais importantes componentes da dieta humana, onde é consumido *in natura*, cozido ou processado. Além das propriedades nutricionais básicas, o tomate é um alimento funcional, devido às suas moléculas antioxidantes tais como ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides (licopeno), flavonóides e ácidos fenólicos (MENEZES FILHO & DÓREA, 2006; ANDRADE et al., 2011). Por outro lado, a cultura do tomate é muito susceptível ao ataque de pragas e doenças necessitando da aplicação dos agrotóxicos em vários estágios do cultivo, podendo assim gerar resíduos indesejáveis que podem permanecer no fruto mesmo após a colheita. No Brasil, os fungicidas azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol (Figura 2.1) são indicados para estes fins (ANVISA).

Dessa forma, a presença destes compostos na dieta tem causado preocupação na população, pois é praticamente impossível para o consumidor reconhecer um produto que recebeu a pulverização de produtos não permitidos ou além do limite autorizado (JARDIM & CALDAS, 2012).

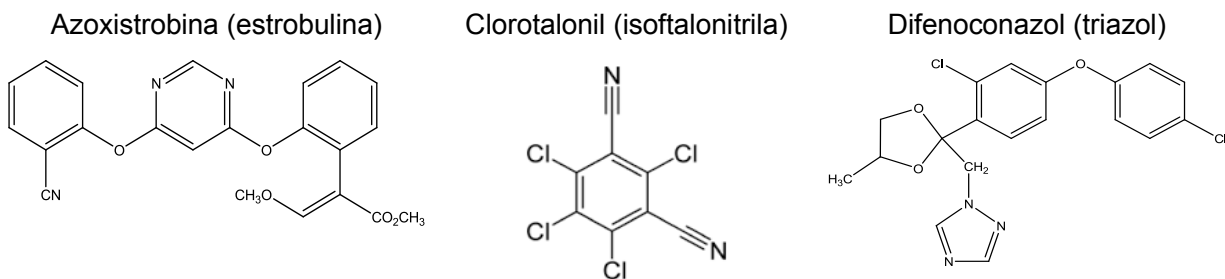


Figura 2.1. Estruturas químicas e classificação dos fungicidas azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol

Na literatura, vários procedimentos domésticos, como lavagem com água pura e com solução de detergente (SHEIKH et al., 2012; MIRANI et al., 2012), com solução de ácido acético e bicarbonato de sódio (LIANG et al., 2012; TYAGI et al., 2012), hipoclorito de sódio (PUGLIESE et al., 2004) e ozônio (IKEURA et al., 2011, 2013; HELENO et al., 2016) têm sido reportados como medidas eficazes na remoção de resíduos de agrotóxicos em vários vegetais.

Dentre os procedimentos empregados para a descontaminação de produtos alimentares, a utilização de ozônio (O₃) tem sido investigada como uma alternativa promissora, pois apresenta uma série de vantagens como alta reatividade, penetrabilidade e decomposição espontânea sem deixar resíduos, podendo, assim, ser usado sem risco de toxidez para os consumidores (KIM et al, 1999). O ozônio é capaz de oxidar uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos em fase gasosa, de substrato sólidos e em soluções aquosas, seja por ataque direto, ou através de um mecanismo envolvendo o radical hidroxila (MISRA, 2015). Entretanto, se o O₃ for usado de forma inadequada pode vir causar perdas na qualidade nutricional e sensorial do vegetal. Essas alterações vão depender da composição química do vegetal, das condições do tratamento e da dosagem do ozônio a ser utilizada (KARACA & VELIOGLU, 2007).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de dois procedimentos doméstico convencionais (lavagem com água e lavagem com solução de detergente) e dois tratamentos mais modernos utilizando o ozônio (água ozonizada e borbulhamento contínuo do ozônio em água) na remoção/degradação dos resíduos de azoxistrobina e difenoconazol (agrotóxicos sistêmicos) e clorotalonil (agrotóxico de contato) em frutos

de tomate. Aliado a isso, as características físico-químicas dos tomates foram monitoradas ao longo de 13 dias de armazenamento a 23 °C, afim de verificar se ocorreu perda da qualidade dos frutos após diferentes tratamentos.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Padrões analíticos de azoxistrobina (99,9% m/m), clorotalonil (99,3% m/m) e difenoconazol (97,0% m/m) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e bifentrina (92,2% m/m) usada como padrão interno foi adquirida da FMC (São José dos Campos, Brasil). Soluções-padrão estoques desses analitos, na concentração de 1000,0 mg L⁻¹, foram preparadas pela solubilização dos padrões com o solvente acetonitrila. A partir da diluição da solução estoque foi preparada no mesmo solvente uma solução de trabalho contendo os três agrotóxicos. As concentrações dos princípios ativos nesta solução foram de 10,0 mg L⁻¹ para clorotalonil; 20,0 mg L⁻¹ para azoxistrobina e 50,0 mg L⁻¹ para o difenoconazol. Estas soluções foram armazenadas em *freezer* à temperatura de aproximadamente -20 °C. A pulverização dos tomates foi realizada com uma solução aquosa contendo os produtos comerciais Amistar WG[®] (500 g/kg de azoxistrobina), Bravonil 500[®] (500 g/L de clorotalonil) e Score[®] (250 g/L de difenoconazol), produzidos pela Syngenta (São Paulo, Brasil). Os seguintes reagentes foram utilizados no experimento: amido solúvel (99,6% v/v, Êxodo Científica, Brasil), ácido sulfúrico (96,0% v/v, Vetec, Brasil), fenolftaleína (> 99% v/v, Merck, Alemanha), iodeto de potássio (99,0% v/v, Vetec, Brasil) e hidróxido de sódio (99,0% v/v, Vetec, Brasil), tiosulfato de sódio (99,0% v/v, Itália), detergente líquido ypê (tensoativo aniônico) tendo como princípio ativo o linear alquil benzeno sulfonato de sódio (São Paulo, Brasil)

2.2. Aplicação dos fungicidas nos frutos de tomates

Para a realização do experimento, amostras de frutos de tomate hidropônico, do tipo Caqui Salada da variedade *Compack*, isentos de agrotóxicos, foram adquiridas da região de Viçosa, MG, Brasil. Recém colhidos, os tomates (250 frutos) foram limpos com toalhas de papel, acondicionados em caixas de polietileno e conduzidos ao Laboratório de Química Analítica (LAQUA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A aplicação

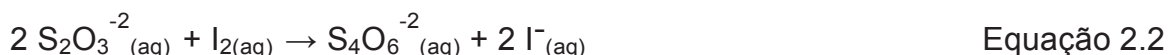
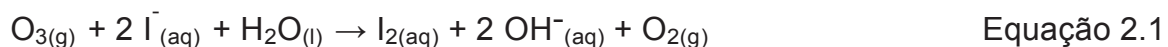
dos produtos comerciais contendo os princípios ativos (0,16 g L⁻¹ de azoxistrobina e 0,50 mL L⁻¹ de difenoconazol - produtos sistêmicos) e (4,0 mL L⁻¹ de clorotalonil – produto de contato) foi realizada seguindo a recomendação do fabricante Syngenta. As doses foram diluídas em 1,0 L de água e a calda aplicada nos frutos com pulverizador manual. Os frutos contaminados foram deixados em ambiente ventilado por 12 h para secagem e aderência dos princípios ativos.

2.3. Método para determinação da concentração de ozônio

Inicialmente os tomates foram separados em três grupos: tomates isentos de agrotóxicos (branco); tomates contaminados (controle) e tomates contaminados e submetidos aos diferentes tratamentos.

Para os experimentos de ozonização dos frutos, o ozônio foi obtido de um gerador de ozônio desenvolvido pela empresa Ozone & Life (São José dos Campos, Brasil). Para a geração do ozônio utilizou-se o gás oxigênio (Linde Gases, Canoas, Brasil, 99,5% de pureza, que recebe uma descarga por barreira dielétrica (DBD).

A concentração do gás ozônio produzido foi determinada pelo método iodométrico (APHA, 2005). Nesse método o ozônio é borbulhado numa solução acidificada de iodeto de potássio (KI) 20 g L⁻¹, por 30 s., onde o íon iodeto se oxida a iodo, e a quantidade de iodo formado é titulada com solução padronizada de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 5,00 x 10⁻³ mol L⁻¹ (Equações 2.1 e 2.2), usando uma suspensão de amido (5 g L⁻¹) como indicador, até o desaparecimento da coloração azul.



2.3.1. Experimento 1 - Imersão em água borbulhada com O₃

Um recipiente cilíndrico de PVC (diâmetro igual a 20 cm e altura igual a 65 cm) contendo 5,0 L de água destilada pura (mantida a 10 °C) foi utilizado para imersão dos frutos de tomate. Através de um dispersor em espiral, localizado na parte inferior do

recipiente, o ozônio foi borbulhado na água, nas concentrações de 1 e 3 mg L⁻¹, com fluxo contínuo de 2,00 L min⁻¹. À medida que o ozônio percorria o dispersor, o gás era expelido através dos furos presentes em toda extensão do espiral fazendo com que a água contida no interior do recipiente fosse borbulhada continuamente e a concentração do ozônio dissolvido permanecesse constante. Somente após a saturação da água pelo ozônio, os tomates (12 frutos), pulverizados com os fungicidas em estudo foram imersos na solução e mantidos por um período de 30 min (Figura 2.2). A concentração de saturação da água foi de 0,1 e 0,8 mg L⁻¹ para as concentrações borbulhadas de 1 e 3 mg L⁻¹, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

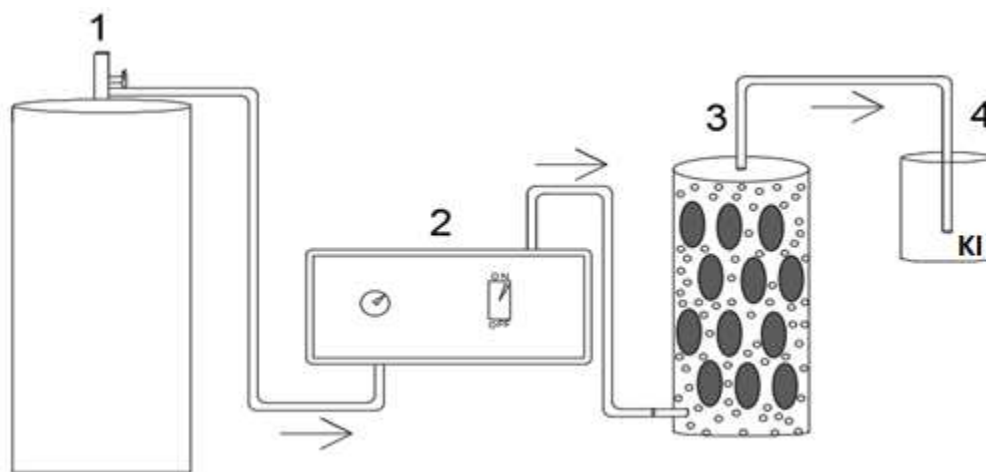


Figura 2.2. Diagrama esquemático para tratamento dos frutos de tomate utilizando água borbulhada com ozônio. Oxigênio (1), ozonizador (2), Tanque de lavagem dos frutos (3) e unidade de destruição de ozônio em excesso (4).

2.3.2. Experimento 2 - Imersão em água ozonizada

Para promover a ozonização e saturação da água destilada a ser utilizada no tratamento, utilizou-se 7,0 L de água destilada pura divididos em dois recipientes de PVC: um tanque de borbulhamento e um tanque de lavagem. Através de um cilindro poroso, posicionado na parte inferior do tanque de borbulhamento, o ozônio foi injetado na água, nas concentrações de 1 e 3 mg L⁻¹, com fluxo contínuo de 2,00 L min⁻¹. À medida que o ozônio percorria o cilindro, o gás era injetado na água contida

no interior do recipiente garantindo uma uniformização da ozonização da água, assim a concentração do ozônio dissolvido permanecia constante (Figura 2.3). Durante o processo de saturação da água pelo ozônio, a água ozonizada era continuamente bombeada para o tanque de lavagem. Os tanques de lavagem e borbulhamento foram dispostos de forma que o retorno da água, após passar pelo tanque de lavagem para o tanque de borbulhamento, ocorresse através de escoamento natural por força da gravidade e o volume de água ozonizada no tanque de borbulhamento fosse mantido em 2,0 L. A concentração de saturação da água foi 0,08 e 0,7 mg L⁻¹ para as concentrações borbulhadas de 1 e 3 mg L⁻¹, respectivamente. Após a saturação da água do sistema, amostras de tomate (12 frutos) pulverizadas com os fungicidas em estudo foram acondicionadas no tanque de lavagem. A lavagem dos frutos com recirculação de água ocorreu durante 30 min. A temperatura da foi mantida a 10 ° C ao longo do experimento. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

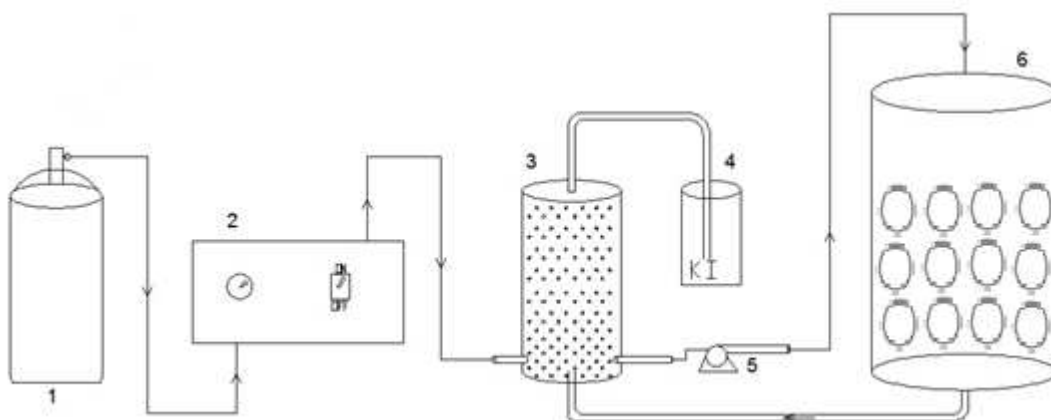


Figura 2.3. Diagrama esquemático para tratamento dos tomates utilizando água ozonizada. Oxigênio (1); ozonizador (2); tanque de borbulhamento; (3), unidade de destruição de ozônio (4) bomba (5) e tanque de lavagem dos frutos (6). Fonte: adaptado de HELENO et al., 2016.

2.3.3. Experimento 3 - Imersão em água pura e em água com detergente

Para cada tratamento, três grupos de 12 unidades de tomates pulverizados com os agrotóxicos em estudo foram imersos, separadamente, por 30 min em 5,0 L de água destilada e nas soluções de detergente (0,25% e 1%), comumente utilizados em ambientes domésticos.

Após cada experimento (com ozônio, água pura e soluções de detergente) os tomates foram secos em ambiente ventilado por 1 h, pesados, homogeneizados em um mixer (Walita, São Paulo, Brasil) e submetidos à extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT). Ao final de cada ensaio (30 min), as amostras de água ou das soluções aquosas de detergente e ozônio foram recolhidas e submetidas ao método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT). Todos os procedimentos de extração para quantificação dos agrotóxicos (em tomates e em soluções aquosas) foram realizados em triplicata. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE).

2.4. Extração dos resíduos de agrotóxicos

Os agrotóxicos foram extraídos das amostras de tomates triturados usando a técnica ESL/PBT e da água/soluções de lavagem (detergente e ozônio) pela técnica ELL/PBT, adaptadas de Pinho et al. (2010) e Goulart et al. (2010), respectivamente

A técnica ESL/PBT consistiu na adição de 4,0 mL de acetonitrila a 4,0000 g de amostra de frutos de tomate. A mistura foi agitada em *vórtex* (Unique, Maxiclean 750) por 1 min e, em seguida centrifugada (FANEM – modelo 206 MP) por 3 min a 560 g e deixada em freezer (Cônsul, modelo 280, São Paulo, Brasil) a aproximadamente -20 °C por 6 h para a separação das fases. Do sobrenadante, uma alíquota de 1,8 mL do extrato foi transferida para um vial contendo 0,100 mg L⁻¹ de bifentrina usada como padrão interno.

A técnica ELL/PBT adaptada de Goulart et al., (2010) empregada consistiu na adição de 4,0 mL de acetonitrila a 4,00 mL de amostra. A mistura foi agitada em mesa agitadora por 15 min à 175 rpm. Posteriormente a solução foi levada ao freezer (-20 °C) por 2 h para a separação das fases aquosa e orgânica. Em seguida, 1,80 mL de fase orgânica (sobrenadante) contendo os analitos foram transferidos para um vial contendo o padrão interno. Ambos extratos foram analisados por CG/DCE.

2.5. Condições cromatográficas

O sistema de análise consistiu de um cromatógrafo a gás da Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo GC-2014, equipado com um detector por captura de elétrons (DCE) e um auto injetor AOC-20i. Para separação cromatográfica dos analitos, utilizou-se uma coluna capilar HP-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) com fase estacionária composta de

5% de difenil e 95% de dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm, 0,1 µm espessura de filme), e nitrogênio como gás de arraste (1,2 mL min⁻¹). Injetou-se 1 µL de extrato/solução padrão no cromatógrafo, na razão de 1:5, nas seguintes condições cromatográficas: temperatura do injetor de 280 °C e do detector em 300°C, e a da coluna (iniciando a 150 °C/1min), sendo aquecida a uma taxa de 40 °C min⁻¹ até 290 °C. A coluna foi mantida nessa temperatura por 4,5 min. O tempo total de análise foi de 9,5 min. As corridas foram gerenciadas pelo software GC solution (Shimadzu, Japão). Os agrotóxicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos presente nos extratos das amostras com o tempo de retenção dos padrões. A quantificação foi feita empregando o método de superposição de matriz (RIBANI *et al.*, 2004).

2.6. Validação dos métodos

Alguns parâmetros analíticos da ESL/PBT e ELL/PBT incluindo seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão/recuperação foram avaliados conforme sugerido pelos protocolos das principais agencias regulatórias (ANVISA, 2003; ICH, 2005; SANCO, 2009). Os procedimentos empregados para cada figura de mérito estão descritos com maior detalhe no capítulo 1.

2.7. Qualidade dos tomates após tratamentos

Amostras tratadas (imersão em água, solução de detergente e em solução de ozônio) e as amostras controle (sem tratamento) foram armazenadas em câmaras B.O.D. (Lucadema, São Paulo, Brasil), a 23 ± 1 °C por 13 dias. Periodicamente, no 1^o, 5^o, 9^o e 13^o dia após tratamento, foram avaliados os parâmetros de qualidade: teores de sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável (AT), pH, perda de massa, intensidade da cor (croma), diferença total de cor (ΔE) e ácido ascórbico. Em cada bandeja foram acondicionados 12 frutos e em cada intervalo de tempo foi retirado 3 frutos para realização das análises (triplicatas).

As características físico-químicos de qualidade dos tomates foram determinadas de acordo com os métodos recomendados pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). A perda de massa (balança Sartorius BP 2215, Göttingen, Germany) foi determinada em porcentagem, considerando-se a diferença entre a massa inicial do fruto e aquela obtida

a cada intervalo de tempo de amostragem. A acidez foi determinada por titulação do suco da polpa com uma solução padronizada de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH e a medição do pH (Homis MPA 210, São Paulo, Brasil) foi realizado por imersão do eletrodo na amostra de tomate preparada para determinar a acidez. Os teores de sólidos solúveis foram determinados com um refratômetro digital modelo PAL-1 Atago (Tokyo, Japão). A vitamina C foi determinada pelo teor de ácido ascórbico e a amostra foi titulada com solução de iodato de potássio. A avaliação da cor dos tomates foi realizada com o auxílio de um colorímetro Minolta (EUA) modelo CR 400, usando o sistema CIE (Comission Internationale de l'Eclairage) com uma leitura direta da reflectância das coordenadas "L*" (luminosidade), "a*" (de verde a vermelho) e "b*" (de azul para amarelo). Com os valores destas coordenadas, foi possível gerar parâmetros relacionados com a saturação de cor, o chroma e da diferença total de cor (MEIR et al., 1992; MACDOUGALL, 2002). Maiores detalhes sobre os procedimentos de determinação da qualidade dos frutos estão descritos no capítulo 1.

2.8. Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados para um nível de 95% de confiança. A eficiência dos tratamentos foi comparada pelos testes t-Student unicaudal (95% de confiança), após comparação das estimativas do desvio-padrão pelo teste F-Snedecor. A comparação entre si desses tratamentos foi realizada com análises de variância (ANOVA), com teste *post-hoc* Tukey, a 5% usando o *software* Statistica 12.0 (StatSoft Corp., Tulsa, EUA). Para comparar a alteração da qualidade de frutos de tomates tratados com o controle foi utilizado o teste de Dunnett.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação dos métodos analíticos

Os métodos ELL/PBT para determinação dos agrotóxicos em solução aquosa e ESL/PBT para os frutos de tomates foram validados e os resultados estão de acordo com as normas de validação exigidas (Tabela 1.2 – pg 18). Não foram observados interferentes no tempo de retenção dos compostos estudados, comprovando a seletividade dos métodos. Os LD e LQ para os métodos propostos para as amostras de água e tomate foram determinados considerando o valor de três e dez vezes a área do

sinal da linha de base (ruído). Os LD para a ELL/PBT dos agrotóxicos azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol em água foram 2,4; 0,7 e 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, já para a ESL/PBT dos agrotóxicos em tomate foram 1,0; 0,4 e 2,5 respectivamente. A taxa de recuperação para ambas as matrizes apresentaram recuperações na faixa de 85% a 110% e os coeficientes de variação para os ensaios de precisão intermediária e repetitividade foram menores que 10% para os três agrotóxicos. A linearidade dos métodos foi avaliada analisando-se extratos obtidos a partir da ESL/PBT (amostra de tomate) e ELL/PBT (amostra de água) que foram fortificadas em nove níveis de concentração dos analitos (variaram entre 1 x LQ e 150 x LQ). Os coeficientes de determinação (R^2) para as curvas analíticas dos três agrotóxicos em ambas matrizes foram superiores a 0,99.

3.2. Remoção dos resíduos de fungicidas em tomates

A segurança alimentar é um dos grandes interesses do público, principalmente quando está associado à presença de agrotóxicos nos alimentos. Com o intuito de avaliar a eficiência de algumas técnicas de remoção de resíduos de agrotóxicos nos alimentos consumidos *in natura*, amostras de tomate foram contaminadas com azoxistrobina, difenoconazol e clorotalonil e imersas em água destilada, solução de detergente (0,25% e 1%) e em soluções oxidantes (água ozonizada e água borbulhada continuamente com ozônio (1 e 3 mg L^{-1}).

As amostras (tomate e soluções de lavagem) foram submetidas aos métodos ESL/PBT e ELL/PBT e os extratos obtidos analisados por CG/DCE. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados foram submetidos à análise estatística (teste t Student unicaudal). As porcentagens de remoção dos agrotóxicos nos frutos foram calculadas em relação à quantidade do agrotóxico contida na amostra controle (sem tratamento).

A concentração média dos fungicidas encontrada nos frutos antes da submissão aos tratamentos foi de 115 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para azoxistrobina, 1823 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para clorotalonil e 139 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o difenoconazol. Nas figuras 2.4 a 2.6 estão apresentadas as porcentagens dos resíduos que ficaram retidas no fruto, na água/solução de lavagem e a porcentagem de degradação dos analitos.

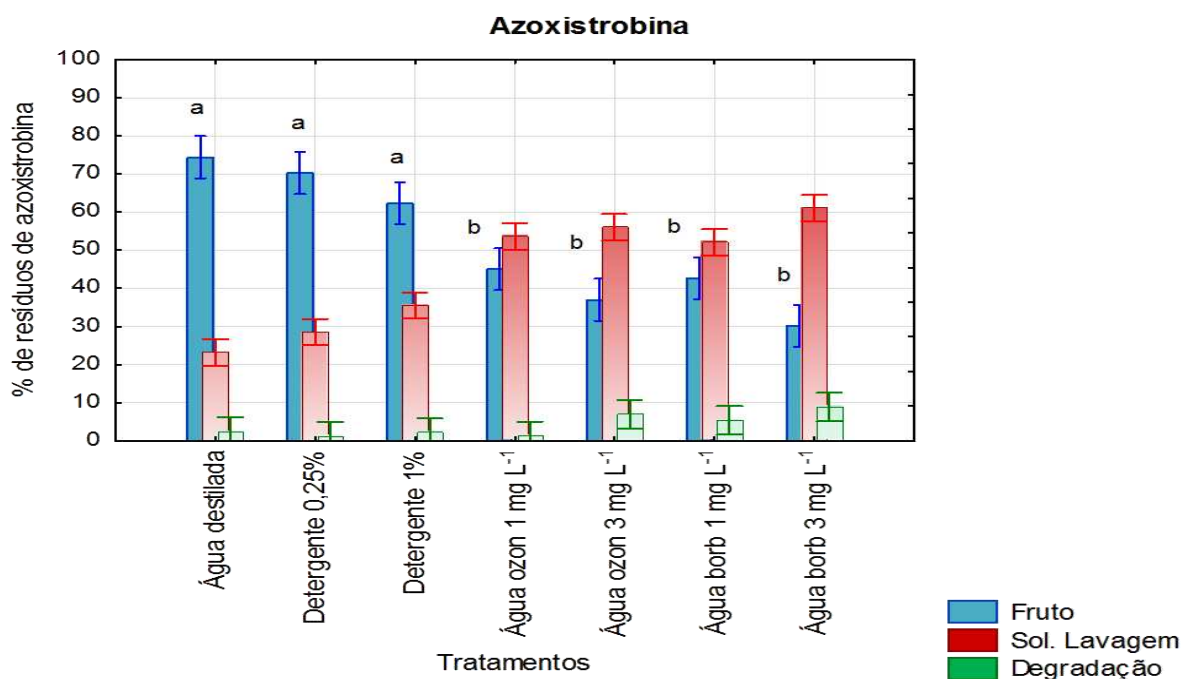


Figura 2.4. Porcentagem de resíduos de azoxistrobina após utilizar diferentes tratamentos em frutos de tomate. As barras de erro indicam erro padrão das medições em níveis ($n = 3$). Letras iguais não diferem entre si com teste de Tukey com *post-hoc* da ANOVA ($p < 0,05$).

A diferença entre a quantidade de agrotóxicos no controle e a soma das quantidades no fruto e no líquido de lavagem foi considerada como degradação. Os maiores valores foram encontrados para as soluções oxidantes (O_3).

A imersão em água favoreceu a remoção dos três agrotóxicos do tomate. O difenoconazol foi removido em 17%, a azoxistrobina em 26% e o clorotalonil em 44%. Os tratamentos com ozônio e solução de detergente foram mais efetivos na minimização da contaminação do que a água pura.

A água borbulhada com ozônio 3 mg L^{-1} foi o tratamento mais eficiente para remoção de todos os compostos, obtendo uma redução de 70% da azoxistrobina, 77% do difenoconazol e 90% dos resíduos de clorotalonil. A água borbulhada na concentração de 1 mg L^{-1} removeu uma quantidade menor dos resíduos (entre 57 e 76%).

Os tratamentos com água ozonizada e água borbulhada nas concentrações de 1 e 3 mg L^{-1} removeram uma quantidade maior dos resíduos de azoxistrobina (entre 55 e 70%), e diferiram significativamente de lavar os frutos com água pura ou solução de detergente, de acordo com teste Tukey com *post hoc* da ANOVA (Figura 2.4)

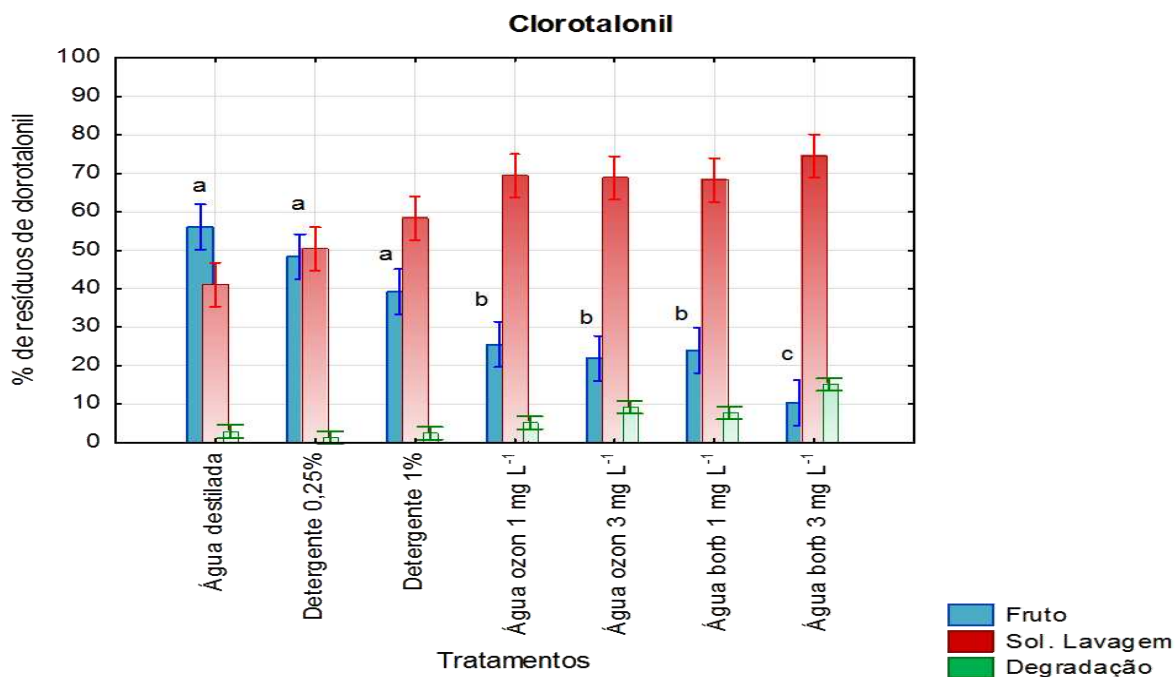


Figura 2.5. Porcentagem de resíduos de clorotalonil após utilizar diferentes tratamentos em frutos de tomate. As barras de erro indicam erro padrão das medições em níveis ($n = 3$). *Letras iguais não diferem entre si com teste de Tukey com post-hoc da ANOVA ($p < 0,05$).*

Para o clorotalonil, (Figura 2.5.) o uso do ozônio nas concentrações de 1 e 3 mg L⁻¹ também apresentaram diferenças significativas em comparação com a imersão em água e solução de detergente, alcançando uma eficiência de remoção que variou de 75 a 90%. Ainda para o clorotalonil, não ocorreu diferença significativa quando se utilizou água ozonizada nos dois níveis de concentração e água borbulhada a 1 mg L⁻¹, removendo em média 76,2% dos resíduos. Estes resultados corroboram com os de Heleno et al, (2016), onde alcançaram em seus estudos com água ozonizada a 3 mg L⁻¹ sem ajuste de pH, uma remoção média de 75,6% dos resíduos de clorotalonil em batatas. Nos tratamentos com a solução tampão a pH 4, 7 e 9, com ozônio, a remoção foi de 74%, 70% e 72%, respectivamente. Os resultados mostraram que os tratamentos de lavagem com ozônio, independentemente do pH, foram mais eficazes do que os tratamentos de lavagem sem ajuste do pH.

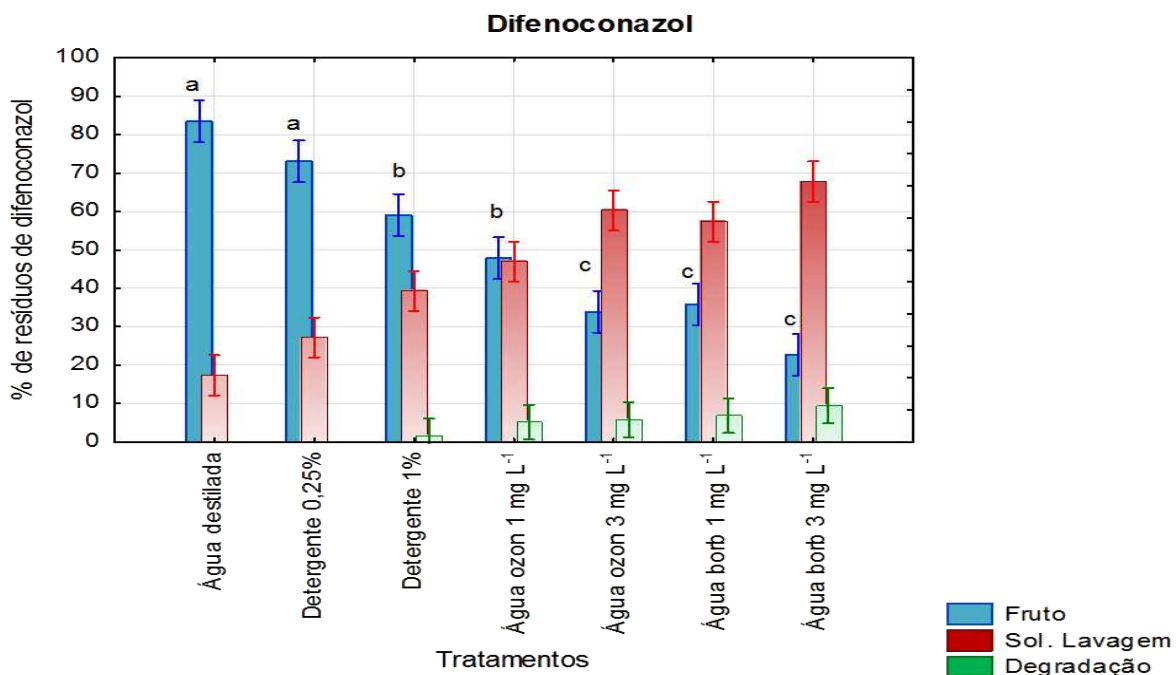


Figura 2.6. Porcentagem de resíduos de difenoconazol após utilizar diferentes tratamentos em frutos de tomate. As barras de erro indicam erro padrão das medições em níveis ($n = 3$). Letras iguais não diferem entre si com teste de Tukey com post-hoc da ANOVA ($p < 0,05$).

Não há diferença significativa em deixar os frutos de tomates imersos por 30 min em solução de detergente ou em água pura, com exceção da solução de 1%, que obteve uma maior eficiência de remoção do difenoconazol. Quando se utilizou a solução de detergente a 1% foram removidos 38%; 41% e 61% dos resíduos de azoxistrobina, difenoconazol e clorotalonil, respectivamente.

Os detergentes químicos são substâncias surfactantes com propriedades anfífilas, ou seja, apresentam em sua estrutura molecular uma parte polar (parcialmente hidrofílico) e outra apolar (parcialmente hidrofóbica). Sua dupla natureza facilita converter o composto solúvel em gordura em composto solúvel em água (SHEIKH, et al., 2012). Devido a esta propriedade, era esperado uma maior porcentagem de remoção dos compostos em estudo. Uma sugestão para aumentar essa eficiência de remoção dos resíduos seria aliada à imersão dos frutos na solução de detergente, esfregá-los com uma esponja.

Em geral, em todos os tratamentos, o clorotalonil mostrou ser mais facilmente removido dos tomates do que o difenoconazol, que por sua vez foi mais removido do que a azoxistrobina. Os frutos de tomate são cobertos por uma camada de cera e tem uma

pele fina. O clorotalonil por ter uma natureza não sistêmica foi removido com uma maior eficiência em relação aos demais compostos, pois sugere que ele tenha ficado mais aderido à camada de cera do fruto (resíduo extracuticular) enquanto que o difenoconazol e a azoxistrobina que são sistêmicos podem ter sido rapidamente absorvidos e serem dissolvidos na camada cerosa da casca do fruto, migrando-se para dentro da polpa, tornando a sua eliminação dificultada (ABOU-ARAB et al., 1999).

Em seus estudos, Ikeura et al, (2011) demonstraram que o uso de microbolhas de ozônio na concentração de 2 mg L^{-1} foi mais eficaz na redução do fenitrothion em alface do que em tomates cereja usando as mesmas condições experimentais. Uma mais provável explicação para a menor redução dos resíduos de fenitrothion no tomate cereja é que O_3 e os radicais hidroxila dissolvidos são mais difíceis de penetrar através do pericarpo espesso do tomate cereja, diminuindo as chances de alcançar os tecidos internos. É também possível que os radicais hidroxila e O_3 fossem dissolvidos/inativados pelo contato com o pericarpo. No presente trabalho, quando se aumentou a concentração do ozônio de 1 mg L^{-1} para 3 mg L^{-1} em ambas as formas de tratamento obteve-se uma melhor remoção dos resíduos contaminantes dos frutos de tomate (às vezes não significativo).

Wang et al., (2013) em seus experimentos demonstraram que a solubilidade do clorotalonil era independente do aumento da concentração do detergente que utilizava. Neste mesmo estudo frutos de tomate cereja foram imersos em soluções de 50 mg L^{-1} , 500 mg L^{-1} e 5 g L^{-1} de dois detergentes diferentes. Com estas soluções, as percentagens de remoção de clorotalonil (agrotóxico de contato, solubilidade de $0,81 \text{ mg L}^{-1}$, $\log K_{ow} = 2,94$) usando o detergente A (produto de limpeza multiuso com tensoativo biodegradável) foram 46%, 61% e 80% e para o clorpirifós (sistêmico, solubilidade de $1,05 \text{ mg L}^{-1}$, $\log K_{ow} = 4,7$) foram 16%, 21% e 42%. Para o detergente B (produto com surfactante de alta eficiência) a remoção após a lavagem foi 45%, 61% e 58% para o clorotalonil e 15%, 24% e 42% para o clorpirifós. O clorpirifós é mais lipofílico do que o clorotalonil, pois apresenta um valor maior do K_{ow} , dificultando assim a sua remoção. Portanto, o clorotalonil foi removido mais eficientemente do que clorpirifós, devido à seu menor valor de K_{ow} e também por ser um composto de ação por contato, apesar do clorpirifós apresentar uma solubilidade mais elevada. Isto indica que o caráter lipofílico de agrotóxico foi mais decisivo, mostrando a solidez da combinação de compostos em superfícies do tomate.

3.3. Degradação dos agrotóxicos

Para distinguir entre a quantidade de agrotóxicos que foi degradado daquele que permaneceu na solução de imersão, as quantidades adicionadas dos analitos aos frutos (determinados em frutos sem a etapa de imersão) foram comparadas com as quantidades dos analitos no fruto após a imersão e com as quantidades que ficaram retidas na solução.

Uma maior degradação foi alcançada quando os frutos foram imersos (30 min) nas soluções mais concentradas, principalmente quando se utilizou o tratamento com ozônio (Figura 2.4 a 2.6). O tratamento com a água ozonizada e o borbulhamento com ozônio em água no maior nível de concentração causaram respectivamente uma degradação de 9% e 15% da quantidade inicialmente presente do clorotalonil. Para a azoxistrobina e difenoconazol estes tratamentos apresentaram degradação média de 6 e 9%, respectivamente.

O ozônio é um gás fortemente oxidante e conhecido pelo seu alto poder de desinfecção. Os fungicidas azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol apresentam em suas estruturas moleculares anéis aromáticos e/ou radicais com duplas ligações (Figura 2.1). Desta forma, o ozônio reage com as moléculas dos agrotóxicos, interagindo com as duplas ligações e cadeias aromáticas. A grande vantagem do ozônio é que ao reagir ou degradar essas moléculas ele não deixa resíduos no alimento, uma vez que o seu produto de degradação é o oxigênio (VON GUNTEN, 2003).

Uma das preocupações com a saúde quanto ao uso de oxidantes para degradar agrotóxicos é a formação de intermediários tóxicos. Tem sido relatado que, para alguns agrotóxicos organofosforados (ataque oxidante inicial parece estar no grupo $P = S$) os produtos de degradação por oxidantes apresentam uma maior toxicidade do que os próprios compostos originais (WU et al., 2007).

Em contrapartida, a eficácia de vários tratamentos, incluindo a ozonização, sobre a degradação de mancozeb e seu metabolito etilenotiouréia (ETU) em maçãs foi determinada por Hwang et al., (2002). Os resíduos de Mancozeb foram reduzidos de 56-97% com o tratamento ozônio (1-10 mg L⁻¹). Também foi relatado que o ETU, um composto relacionado ao surgimento de câncer na tireoide, além da suspeita de causar

mutações e terem efeitos teratogênicos (LEMES, 2003) foi completamente removido usando 1 e 3 mg L⁻¹ de ozônio.

3.4. Avaliação da qualidade dos tomates

Amostras controle (sem tratamento) e as amostras pulverizadas com agrotóxicos e submetidas aos tratamentos com ozônio e soluções de detergentes foram armazenadas em B.O.D. a 23 ± 1 °C. Periodicamente, no 1^o, 5^o, 9^o e 13^o dia foram avaliados os parâmetros de qualidade: teores de sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável (AT), pH, perda de massa (PM), intensidade da cor (croma) e diferença total de cor (ΔE) e ácido ascórbico. Na Tabela 2.1 está descrita as médias das quatro avaliações dos parâmetros de qualidade submetidos à análise de variância (ANOVA), e Teste de Dunnett para comparar os diferentes tratamentos com o controle.

Diante dos resultados deste estudo pode-se observar que os tratamentos com detergente (0,25% e 1%) não diferiram significativamente da amostra controle, exceto na intensidade de cor.

Observou-se um aumento na perda de massa nos frutos de pimentão (tratados e controle) durante o período de armazenamento, porém, com diferentes intensidades. Os tratamentos com ozônio na concentração de 1 mg L⁻¹ proporcionaram um efeito significativo de forma positiva nos tomates, visto que a perda de massa foi aproximadamente a metade quando comparada com os outros tratamentos e amostra controle. A perda de massa é decorrente dos processos transpiratórios e respiratórios e pode levar ao murchamento e perda da qualidade dos frutos, diminuindo a sua aceitabilidade comercial (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

A acidez titulável dos frutos foi alterada de forma significativa quando se utilizou o tratamento com água borbulhada 3 mg L⁻¹. Esse acréscimo de acidez nos frutos pode ter sido causado pelas condições gasosas (elevação de CO₂ e redução da concentração de O₂) durante o período de armazenamento, podendo estes afetar o sistema de enzima glicolítica, resultando numa acumulação de ácidos (DE SOUZA et al., 1999).

Todos os tratamentos aplicados diferiram de forma significativa ($P < 0,05$) das amostras controle em relação ao croma durante o período de armazenamento. O parâmetro de cromaticidade (croma) representa a intensidade de cor ou saturação. Assim, quanto maior a croma, mais saturado e mais intensa será a cor (BORGUINI &

SILVA, 2005). Estes resultados são condizentes com Heleno et al., (2014) que observaram uma diferença significativa deste parâmetro em amostras de morangos tratadas com ozônio, onde ocorreu uma redução da cor vermelha dos frutos.

O ácido ascórbico é um dos mais importantes parâmetros de valor nutricional das frutas e legumes (TIGIST et al, 2013). Neste estudo não foi observado diferença significativa dos seus teores em amostras tratadas e não tratadas de tomate. Zhang et al., (2005) também não observaram um efeito significativo entre o conteúdo de vitamina C em amostras de aipo tratadas e não tratadas com água ozonizada.

Tabela 2.1. Valores médios dos parâmetros de qualidade dos tomates armazenados em B.O.D. a 23 °C ± 1 - acidez titulável (g de ácido cítrico/100 g de polpa), sólido solúveis (°Brix), cor, % perda de massa, pH, variação da cor e Vitamina C (mL de ácido ascórbico /100 g de polpa).

Tratamentos	Análises de qualidade						
	Acidez	Brix	Croma	Perda de massa	pH	Varição da cor	Vitamina C
Controle	0,35 ± 0,06	4,81 ± 0,12	20,72 ± 0,13	5,77 ± 0,66	4,5 ± 0,02	4,28 ± 0,58	35,22 ± 0,28
Sol. detergente 0,25%	0,34 ± 0,07	4,62 ± 0,14	22,17 ± 0,11*	4,37 ± 0,54	4,48 ± 0,17	5,30 ± 0,42	33,17 ± 0,25
Sol. detergente 1%	0,35 ± 0,13	4,73 ± 0,11	22,18 ± 0,10*	5,49 ± 0,35	4,47 ± 0,24	4,58 ± 0,55	33,30 ± 0,15
Água ozonizada 1 mg L ⁻¹	0,33 ± 0,08	4,48 ± 0,16	22,61 ± 0,14*	2,75 ± 0,59*	4,55 ± 0,16	7,54 ± 0,88*	32,06 ± 0,28
Água ozonizada 3 mg L ⁻¹	0,36 ± 0,10	4,70 ± 0,17	21,70 ± 0,11*	6,32 ± 0,58	4,50 ± 0,04	4,14 ± 0,40	31,51 ± 0,34
Água borbulhada 1 mg L ⁻¹	0,34 ± 0,08	4,35 ± 0,13	23,52 ± 0,09*	2,72 ± 0,66*	4,57 ± 0,03	6,32 ± 0,71	30,51 ± 0,29
Água borbulhada 3 mg L ⁻¹	0,42 ± 0,03	4,31 ± 0,16	22,61 ± 0,14*	5,36 ± 0,60	4,37 ± 0,04	4,92 ± 0,61	28,10 ± 0,25

* Valores destacados em uma mesma coluna diferem significativamente do controle pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$). Valores médios (n=3) das características qualitativas dos tomates ao longo do armazenamento (1^o, 5^o; 9^o e 13^o dia) ± coeficiente de variação.

4.0. CONCLUSÃO

Os tratamentos com detergente e ozônio foram eficientes na remoção dos resíduos dos fungicidas em tomates, sendo a porcentagem de remoção proporcional à concentração da solução utilizada. O tratamento de hortaliças com ozônio demonstrou ser uma alternativa promissora na remoção de agrotóxicos. Aliado a isso, o ozônio tem a vantagem de ser um forte agente antimicrobiano e oxidante sem deixar resíduos prejudiciais à saúde quando é utilizado de forma adequada.

Desse modo, a água borbulhada com ozônio 3 mg L⁻¹ foi o tratamento mais eficiente para remoção dos compostos, obtendo uma redução de 70% da azoxistrobina, 77% do difenoconazol e 90% dos resíduos de clorotalonil.

O parâmetro de qualidade que mais foi afetado de forma negativa foi o croma. O uso de água ozonizada e borbulhada 1 mg L⁻¹ proporcionou um efeito benéfico aos frutos, uma vez que reduziu a perda de massa durante o período de armazenamento. A aplicação do ozônio durante o processamento e/ou estocagem aumenta a vida de prateleira dos produtos, porém é importante considerar a concentração aplicada, pois se esta for elevada pode causar danos nos frutos.

5.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB , A.A.K. Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. **Food Chemistry** 65, 509-514, 1999.

AL-DABBAS, M. M.; SHADERMA, A. M.; AL- ANTARY, T. M. Effect of Ozonation Treatment on Methomyl, Oxamyl and Carbosulfan Residues Removal in Tomato Juice . **Life Science Journal**, v. 11, n. 2, p. 68-73, 2014.

ANDRADE, G. C.; FREGUGLIA, R. M.; FURLANI, R. P.; TORRES, N. H.; TORNISIELO, V. L.. Determination of pesticide residues in tomato using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 9, p. 1701-1708, 2011.

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias de agrotóxicos**. Monografias de agrotóxicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>. Acesso em: 20 set de 2014.

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE nº 899, 29 de maio de 2003. ANVISA. Brasil. 2003.

APHA; AWWA; WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington: American Public Health Association, 937 p., 2005.

BORGUINI, R.G; SILVA, M.V. Características físico-químicas e sensorias do tomate (*Lycopersicon esculentum*) produzido por cultivo orgânico em comparação ao convencional. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 4, p. 355-361, 2009.

CASSAL, V.B., AZEVEDO, L. F., FERREIRA, R. P., SILVA, D. G., SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, v. 18, n.1, p.437-445, 2014.

CHITARRA, M. I. F. & CHITARRA A B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005, 320p.

CLAEYS, W. L.; SCHMIT, J. F.; BRAGARD, C.; MAGHUIN-ROGISTER, G.; PUSSEMIER, L.; SCHIFFERS, B. Exposure of several Belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. **Food Control**, v. 22, n. 3, p. 508-516, 2011.

DE SOUZA, A. L. B.; SCALON, S. P. Q.; CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Post-harvest application of CaCl₂ in strawberry fruits (*Fragaria ananassa* Dutch cv. Segnoia): Evaluation of fruit quality and post-harvest life. **Revista Ciência Agrotécnica**, v. 23, p. 841-848, 1999.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. M.; RIAL-OTERO, R.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. **Food Chemistry**, v.107, n.3, p.1342-1347, 2008.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, J. H.; DE ASSIS, T. C.; DE QUEIROZ, M. E. L. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Acta Analytica Chimica** , v. 671, n. 1, p. 41-47, 2010.

HELENO, F. F., DE QUEIROZ, M. E. L., FARONI, L. R., NEVES, A. A., DE OLIVEIRA, A. F., COSTA, L. P., & PIMENTA, G. G. Aqueous ozone solutions for pesticide removal from potatoes. *Food Science and Technology International*, p. 1082013216651179, 2016.

HELENO, F. F.; DE QUEIROZ, M. E. L.; NEVES, A. A.; FREITAS, R. S.; FARONI, L. R. A.; DE OLIVEIRA, A. F. Effects of ozone fumigation treatment on the removal of residual difenoconazol from strawberries and on their quality. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 2, p. 94-101, 2014.

HWANG, E.S.; CASH, J.N.; ZABIK, M.J. Degradation of Mancozeb and Ethylenethiourea in Apples Due to Postharvest Treatments and Processing. **Journal of food science**, v. 67, n. 9, p. 3295-3300, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1020 p.

IKEURA, H.; HAMASAKI, S.; TAMAKI, M. Effects of ozone microbubble treatment on removal of residual pesticides and quality of persimmon leaves. **Food chemistry**, v. 138, n. 1, p. 366-371, 2013.

IKEURA, H.; KOBAYASHI, F.; TAMAKI, M. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. **Journal of hazardous materials**, v. 186, n. 1, p. 956-959, 2011.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1)**; ICH: London, 2005.

JARDIM, A. N.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010, **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

KARACA, H.; VELIOGLU, Y. S. Ozone applications in fruit and vegetable processing. **Food Reviews International**, v. 23, n. 1, p. 91-106, 2007.

KEIKOTLHAILE, B.M.; SPANOGHE, P.; STEURBAU, P.W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 1-6, 2010.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. .E.; DAVE, S. Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review. **Journal of Food Protection®**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999.

LEMES, V. R. R. Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiouréia (ETU) em fruta e sua implicação na saúde pública e ambiental. 2003. 129f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2003.

LIANG, Y.; WANG, W.; SHEN, Y.; LIU, Y.; LIU, X. J. Effects of home preparation on organophosphorus pesticide residues in raw cucumber. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 636-640, 2012.

MACDOUGALL, D. B. **Color in food: improving quality** .Cambrige: Woodhead Publishing Limited, 2002. 388 p.

MEIR, S.; PHILOSOPH-HADAS, S.; GLOTER, P.; AHARONI, N. Nondestructive assessment of chlorophyll content in watercress leaves by atristimulus reflectance colorimeter. **Postharvest Biology and Technology**, v.2, n. 2, p. 117-124,

1992.

MENEZES FILHO, A.; NAVICKIENE, S.; DÓREA, H. S. Development of MSPD method for the determination of pesticide residues in tomato by GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 874-879, 2006.

MIRANI, B. N.; SHEIKH, S. A.; NIZAMANI, S. M.; CHANNA, M. J.; PANHWAR, A. A. The Effectiveness of Traditional Food Processing On Bitter Gourd Peel. **Journal of Biology and Life Sciences**, v. 3, n. 2, p. 5-12, 2012.

MISRA, N. N. The contribution of non-thermal and advanced oxidation technologies towards dissipation of pesticide residues. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 229-244, 2015.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251-256, 2010.

PUGLIESE, P.; MOLTO, J. C.; DAMIANI, P.; MARIN, R.; COSSIGNANI, L.; MANES, J. Gas chromatographic evaluation of pesticide residue contents in nectarines after non-toxic washing treatments. **Journal of Chromatography A**, v. 1050, n. 2, p. 185-191, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SANCO : **Procedures Method validation and quality control for Pesticide residue analysis in food and Food** , Document No. SANCO / 10684/2009 . Legal Deposit : AL - 1133-2009.

SHEIKH, S. A.; SHAHNAWAZ, M.; NIZAMANI, S. M.; LAGHARI, M.; PANWAR, A.; ABBAS, S. Impact of traditional processing on pesticide residues in onion. **International Journal of Modern Research and Reviews**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2012.

TIGIST, M., WORKNEH, T. S., WOLDETSADIK, K. Effects of variety on the quality of tomato stored under ambient conditions. **Jounal Food Sci Technol.** 50 (3): 477-486, 2013.

TYAGI, Y. K.; SATPATHY, G.; GUPTA, R. K. Removal of Organophosphorus (OP) Pesticide Residues from Vegetables Using Washing Solutions and Boiling, **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 2, p. 69, 2011.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v. 37, n. 7, p. 1443-1467, 2003.

WANG, Z.; HUANG, J.; CHEN, J.; LI, F. Effectiveness of dishwashing liquids in removing chlorotalonil and chlorpyrifos residues from cherry tomatoes. **Chemosphere**, v. 92, n. 8, p. 1022-1028, 2013.

WU, J.; LUAN, T.; LAN, C.; LO, T. W. H.; CHAN, G. Y. S.. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 466-472, 2007.

ZHANG, L.; LU, Z.; YU, Z.; GAO, X. Preservation Fresh-cut Celery by Treatment of Ozonated Water. **Food Control**, v. 16, n. 3, p. 279-283, 2005.

Estratégias para remoção de resíduos de agrotóxicos em pimentões e avaliação da qualidade

1.0. INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) se destaca por ser uma das hortaliças de maior importância econômica e social no Brasil em razão de sua forte participação na culinária doméstica e empresarial (HENZ et al., 2007). O pimentão é rico em vitamina C. Quando maduro é excelente fonte de vitamina A, além de ser fonte de cálcio, fósforo, ferro, vitaminas do complexo B e carotenoides (REIFSCHNEIDER, 2000). Entretanto, a cultura do pimentão é frequentemente atacada por inúmeras pragas e doenças, fazendo com que grandes quantidades de agrotóxicos sejam empregadas para minimizar estes problemas (MOURA et al., 2016).

Apesar das restrições e regulamentações, formulações químicas contendo princípios ativos sistêmicos e de contato destinados a outras culturas têm sido aplicados indevidamente em plantas de pimentão. Além disso, para o controle de pragas em períodos mais curtos, os agricultores têm aplicado doses mais altas do que as recomendadas pelos órgãos de segurança, aliado ao desrespeito dos períodos de carência (Dossiê Abrasco, 2012). Assim, nos últimos anos, o pimentão vem sendo considerado o grande vilão da olericultura brasileira. Esse problema teve início em 2008 com a divulgação do relatório do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa, contendo os resultados da contaminação química de alimentos, no qual o pimentão foi o primeiro colocado da lista, com 64,36% de amostras insatisfatórias. Nos anos seguintes, o percentual aumentou, alcançando, em 2010, o pico de 91,8% (JARDIM et al., 2012).

Diante deste cenário, existe grande chance de que alimentos contaminados cheguem à mesa do consumidor com níveis superiores aos considerados seguros à saúde humana. Para controlar os níveis de resíduos de agrotóxicos, órgãos nacionais e internacionais estabelecem os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para diversos tipos de alimentos (JARDIM et al., 2009; CHEN et al., 2011). Assim, as pessoas que comerem pequenas quantidades destes produtos químicos em sua dieta não estarão em risco, desde que a ingestão esteja abaixo dos limites de segurança (SHEIKH et al., 2012).

Existe uma evidência crescente na ligação da exposição de agrotóxicos com a incidência de doenças crônicas em humanos, incluindo o câncer, Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, diabetes, envelhecimento, doenças cardiovasculares e doença renal crônica (MOSTAFALOU & ABDOLLAHI, 2013)

De encontro à essa situação, o manejo integrado de pragas (MIP) parece ser uma boa alternativa, uma vez que busca produzir com qualidade, utilizando métodos alternativos na tentativa de reduzir o uso de agrotóxicos, visando assim a preservação da saúde da população e a sustentabilidade do sistema (ZAMBOLIM, 2002).

Além da priorização de métodos ecologicamente mais seguros na agricultura, com menores efeitos colaterais no meio ambiente e na saúde pública, medidas eficazes para remoção dos resíduos de agrotóxicos dos alimentos devem ser implementadas a fim de minimizar a contaminação (KEIKOTLHAILE, SPANOGHE & STEURBAU, 2010).

Técnicas de processamento de alimentos, tais como lavagem, descascamento, moagem, cozimento, secagem, fermentação, infusão e oxidação química levam a uma redução significativa dos resíduos de agrotóxicos. Além disso, a associação desses processos tem um efeito cumulativo podendo levar a uma maior redução desses resíduos (GEISMAN et al., 1975).

Muitos tipos de resíduos químicos de agrotóxicos podem ser degradados durante o tratamento por calor, vapor, luz, e em condições ácida ou alcalina (KARACA & VELIOGLU, 2007). As alterações nos atributos sensoriais ou físico-químicos após diversificados tratamentos vão depender principalmente da composição química do alimento, do tipo de molécula do agrotóxico e das condições do tratamento (BAJWA & SANDHU, 2014).

Assim, existe uma necessidade crescente de informações sobre os efeitos de vários processos sobre o destino de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes tratamentos utilizando soluções neutras, ácidas, alcalinas e oxidantes na remoção dos resíduos de azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol em pimentões. A qualidade dos pimentões após tratamento com as diferentes soluções teve suas características físico-químicas avaliadas ao longo de 13 dias de armazenamento.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Soluções-padrão estoque de azoxistrobina (99,9% m/m), clorotalonil (99,3% m/m) e difenoconazol (97,0% m/m) adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) foram preparadas em acetonitrila na concentração de 1000,00 mg L⁻¹ e armazenadas em freezer à temperatura de - 20 °C. A partir da diluição da solução estoque foi preparada no mesmo solvente uma solução de trabalho contendo os três agrotóxicos. As concentrações dos princípios ativos nesta solução foram de 10,00 mg L⁻¹ para clorotalonil; 20,00 mg L⁻¹ para azoxistrobina e 50,00 mg L⁻¹ para o difenoconazol. Uma solução de bifentrina (92,2% m/m) da FMC (Brasil) a 50,00 mg L⁻¹ utilizada como padrão interno foi preparada em acetonitrila.

A pulverização dos pimentões foi realizada com uma solução aquosa contendo os produtos comerciais Amistar WG[®] (500 g/kg de azoxistrobina), Bravonil 500[®] (500 g/L de clorotalonil) e Score[®] (250 g/L de difenoconazol), produzidos pela Syngenta (São Paulo, Brasil) na dose recomendada pelo fabricante.

Os seguintes reagentes foram utilizados no experimento: ácido acético (99,7% v/v, Isofar, Brasil), bicarbonato de sódio (100,0% m/v, Farmax, Brasil), hipoclorito de sódio (4-6% v/v, Vetec, Brasil), amido solúvel (99,6% v/v, Êxodo Científica, Brasil), ácido sulfúrico (96,0% v/v, Vetec, Brasil), fenolftaleína (> 99% v/v, Merck, Alemanha), iodeto de potássio (99,0% v/v, Vetec, Brasil) e hidróxido de sódio (99,0% v/v, Vetec, Brasil), tiosulfato de sódio (99,0% v/v, Itália) e detergente líquido (tensoativo aniônico) tendo como princípio ativo o linear alquil benzeno sulfonato de sódio (São Paulo, Brasil).

2.2. Plantio e aplicação dos fungicidas nos pimentões

Pimentões da variedade *Magali* foram cultivados no Campo Experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil. O experimento de campo foi conduzido em dois períodos: fevereiro a maio 2014 e janeiro a abril de 2015. Após o crescimento e maturação dos pimentões (\pm 500 frutos) preparou-se 1,0 L de solução aquosa dos produtos comerciais: Amistar WG, Bravonil 500 e Score contendo os princípios ativos azoxistrobina (0,16 g L⁻¹), clorotalonil (4,0 mL L⁻¹) e o difenoconazol (0,30 mL L⁻¹), que foram pulverizados nas plantas na concentração recomendada pelo fabricante Syngenta.

Dezoito horas após a aplicação do produto comercial, os frutos no estágio de maturação verde foram colhidos, acondicionados em sacos de polietileno, identificados e transportados imediatamente para o Laboratório de Química Analítica (LAQUA) da UFV para serem submetidos aos diferentes tratamentos e análise de qualidade. Algumas dessas amostras foram submetidas a ESL/PBT, e os extratos analisados por GC/ECD para determinar a concentração dos fungicidas nos frutos antes dos diferentes tratamentos (controle). É importante lembrar que antes da aplicação do produto químico foram recolhidas algumas amostras de frutos isentos dos princípios ativos que foram utilizados como testemunha (branco).

2.3. Estratégias para remoção de resíduos de agrotóxicos

Vários tratamentos foram aplicados nas amostras de pimentão pulverizados com os fungicidas, afim de avaliar a eficiência na remoção dos resíduos de azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol nos frutos. Inicialmente as hortaliças foram separadas em quatro grupos: pimentões isentos de agrotóxicos (branco); pimentões pulverizados com agrotóxicos (controle), pimentões pulverizados e submetidos aos diferentes tratamentos de lavagem (grupo 3) e pimentões pulverizados submetidos aos tratamentos com ozônio (grupo 4). Na figura 3.1 está descrito os principais procedimentos utilizados neste estudo, com as respectivas concentrações das soluções utilizadas.

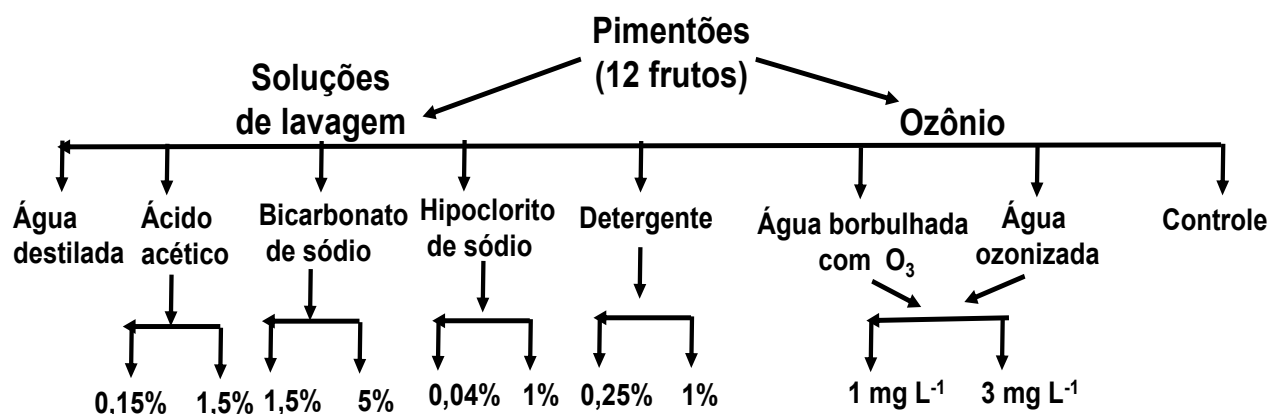


Figura 3.1. Diferentes tratamentos utilizados na remoção de resíduos de agrotóxicos em pimentões.

Para cada tratamento de lavagem (grupo 3) realizado em triplicata, três lotes de 12 unidades de pimentão pulverizados com os agrotóxicos em estudo foram imersos separadamente, por 30 min em 4,0 L de água destilada pura ou de diferentes soluções aquosas (ácido acético, bicarbonato de sódio, hipoclorito de sódio e detergente) em dois níveis de concentrações distintas (Figura 3.1).

Para o tratamento com ozônio também foram utilizados 12 frutos em cada procedimento (grupo 4) e os experimentos foram realizados em triplicatas

O ozônio foi obtido de um gerador de ozônio desenvolvido pela empresa Ozone & Life (São José dos Campos, Brasil). Para a geração do ozônio utilizou-se como insumo o gás oxigênio (Linde Gases, Canoas, Brasil, 99,5% de pureza). O método iodométrico foi utilizado para quantificar a concentração do gás ozônio (APHA *et al.*, 2005). Nesse método o ozônio é borbulhado numa solução acidificada (2,5 mL de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1}) de KI 20 g L^{-1} . A quantidade de iodo formado é titulada com solução padronizada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a 5,00 10^{-3} mol L^{-1} , usando suspensão de amido (5 g L^{-1}) como indicador. A saturação do ozônio em cada solução foi determinada medindo a concentração de ozônio em intervalos regulares, até que se mantivesse constante.

No tratamento utilizando água borbulhada com ozônio (Figura 3.2), as amostras de pimentão contaminadas (12 frutos) com o fungicida foram imersas em 7,0 L de água destilada, mantida a 10 °C em um recipiente cilíndrico de PVC (altura igual a 65 cm e diâmetro igual a 20 cm). O ozônio foi borbulhado na água, nas concentrações de 1 e 3 mg L^{-1} , através de um dispersor em espiral, localizado na parte inferior do recipiente, com fluxo contínuo de 2,00 L min^{-1} durante 30 min.

À medida que o ozônio percorria o dispersor, o gás era expelido através dos furos presentes em toda extensão da espiral, fazendo com que a água contida no interior do recipiente fosse borbulhada uniformemente e a concentração do ozônio dissolvido permanecesse constante. Após a saturação da água pelo ozônio, os frutos ficaram imersos durante 30 min. A concentração de saturação da água foi de 0,1 e 0,8 mg L^{-1} para as concentrações borbulhadas de 1 e 3 mg L^{-1} , respectivamente.

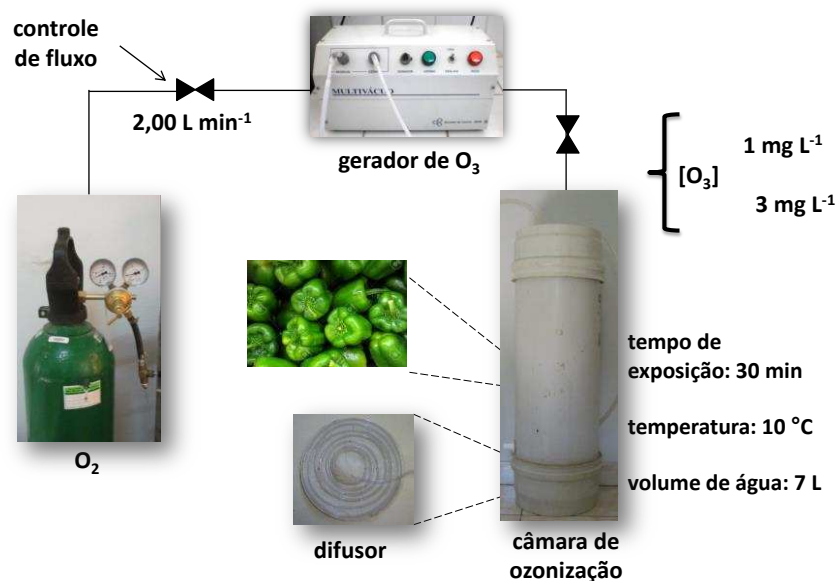


Figura 3.2. Esquema do borbulhamento de ozônio em pimentões

Fonte: adaptado de Heleno et al., 2013.

No segundo tratamento com ozônio, afim de promover a ozonização e saturação da água destilada a ser utilizada no procedimento, utilizou-se $9,0 \text{ L}$ de água destilada pura divididos em dois recipientes de PVC: um tanque de borbulhamento ($2,0 \text{ L}$) e um tanque de lavagem dos frutos ($7,0 \text{ L}$). Através de um cilindro poroso (difusor de bolhas para melhorar a transferência de massa da fase gasosa para fase líquida) posicionado na parte inferior do tanque de borbulhamento, o ozônio foi injetado na água, nas concentrações de 1 e 3 mg L^{-1} , com fluxo contínuo de $2,00 \text{ L min}^{-1}$.

À medida que o ozônio percorria o cilindro, o gás era injetado na água contida no interior do recipiente garantindo uma maior uniformização da ozonização da água, de modo que a concentração do ozônio dissolvido permanecesse constante. Durante o processo de saturação da água pelo ozônio, a água ozonizada era continuamente bombeada para o tanque de lavagem. A concentração de saturação da água foi $0,08$ e $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ para as concentrações borbulhadas de 1 e 3 mg L^{-1} , respectivamente. Após a saturação da água do sistema, amostras de pimentão (12 frutos) contaminadas com os fungicidas em estudo foram acondicionadas no tanque de lavagem. A lavagem dos frutos com recirculação de água ocorreu durante 30 min . A temperatura do tratamento com água borbulhada e água ozonizada com ozônio foram mantidas a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ao longo do experimento. Todos

os procedimentos foram realizados em triplicata.

Após a aplicação dos diferentes tratamentos, os frutos foram secos em ambiente ventilado por 1 h. Amostras controle (contaminadas com os agrotóxicos e sem tratamento) e as amostras tratadas foram pesadas em balança analítica (Sartorius, Alemanha), trituradas em *mixer* (Walita, São Paulo, Brasil) até total homogeneização, armazenadas em potes de plásticos, no freezer (Cônsul, modelo 280, São Paulo, Brasil) a -20 °C e submetidas à extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT). Ao final de cada ensaio, as amostras de água ou das soluções em que os frutos contaminados foram imersos (30 min) foram recolhidas e submetidas ao método extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT). Todos os procedimentos de extração (de pimentões e de soluções aquosas) foram realizados em triplicata. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE).

2.4. Extração e análise cromatográfica

Os resíduos de azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol foram extraídos das amostras de pimentão pelo método descrito por LIBARDI et al., (2016), com algumas modificações. Neste método 4,0000 g de amostras de pimentão foram submetidas à extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) com 4,0 mL de acetonitrila (solvente extrator). A mistura foi agitada por 10 min em mesa agitadora (Tecnal TE 420, Brasil), a 25 °C e 200 rpm, seguida de centrifugação (FANEM – modelo 206 MP) por 3 min a 560 g e deixadas em freezer a aproximadamente -20 °C por 6 h para separação das fases. Do sobrenadante, uma alíquota de 1,8 mL do extrato foi transferida para um vial contendo 0,100 mg L⁻¹ de bifentrina usada como padrão interno.

Para extração dos agrotóxicos em água ou soluções de lavagem, foi empregada a técnica ELL/PBT modificada. Nesta técnica volume de 4,00 mL de amostra é agitado com 4,00 mL de acetonitrila em mesa agitadora por 15 min à 175 rpm. Posteriormente a solução é levada ao freezer (-20 °C) por 2 h para a separação de fases aquosa e orgânica. Em seguida, 1,80 mL de fase orgânica (sobrenadante) contendo os analitos foram transferidos para um vial contendo o padrão interno e analisado por CG-DCE (GOULART et al., 2010).

Os resíduos dos agrotóxicos foram detectados e quantificados utilizando um cromatógrafo a gás (modelo GC-2014, Shimadzu, Japão) equipado com detector

por captura de elétrons (DCE), e auto injetor AOC-20i. A separação cromatográfica dos analitos foi conduzida em coluna capilar HP-5 (Agilent Technologies, EUA), com fase estacionária composta de 5% de fenil e 95% de dimetilssiloxano (30 m × 0,25 mm, 0,1 µm de espessura de filme), usando nitrogênio (Air Products, Brasil, 99,999% de pureza) como gás de arraste na vazão de 1,2 mL min⁻¹. Para determinação dos compostos após extração por ESL/PBT e ELL/PBT, a temperatura do injetor e do detector foram mantidas em 280 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 150 °C (1 min) com rampa de aquecimento de 40 °C min⁻¹ até atingir 290 °C min⁻¹, sendo esta temperatura mantida por 4,5 min. As injeções foram feitas com divisão de fluxo (*split*) de 1:5, o volume injetado foi de 1,0 µL e o tempo total de análise foi de 9,5 min. As corridas foram gerenciadas pelo software GCsolution (Shimadzu, Japão). Os compostos foram identificados por comparação do tempo de retenção do pico presente nos extratos das amostras com o tempo de retenção dos padrões e quantificado pelo método de superposição de matriz.

2.5. Validação dos métodos

Parâmetros analíticos dos métodos, incluindo seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão/ recuperação foram avaliados de acordo com as recomendações da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) e outras publicações (Anvisa, 2003; Sanco, 2009).

Os LD e LQ para os métodos propostos para as amostras de água e tomate foram determinados considerando o valor de três e dez vezes a área do sinal da linha de base (ruído), respectivamente. A linearidade foi estudada usando o método de superposição de matriz com soluções preparadas pela fortificação da água ou do pimentão em nove níveis de concentração dos analitos, que variaram entre 1 x LQ e 150 x LQ. Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas, relacionando a razão entre as áreas dos analitos e do padrão interno com as concentrações mencionadas. A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de determinação (R^2) obtidos pela regressão linear e pelos resíduos das curvas analíticas. A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária. A precisão intermediária foi avaliada pelo mesmo analista, utilizando o mesmo instrumento e em diferentes dias (dia 1, dia 3 e dia 5).

A repetitividade e exatidão foram determinadas a partir de ensaios de recuperação em que quantidades conhecidas de analito foram adicionadas a amostra em seis replicatas de três níveis de concentrações diferentes. Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação.

2.6. Efeito dos tratamentos na qualidade dos pimentões

Amostras controle e amostras que passaram por diferentes tratamentos foram armazenadas em B.O.D. (Lucadema, Brasil), a 23 ± 1 °C por 13 dias. Periodicamente, no 1^o, 5^o, 9^o e 13^o dia, foram avaliados os parâmetros de qualidade: teores de sólidos solúveis - °Brix (SS), acidez titulável (AT), pH, perda de massa, ácido ascórbico (vitamina C), intensidade da cor (croma) e diferença total de cor (ΔE). Os teores de SS, AT, pH, perda de massa e vitamina C foram determinados de acordo com os métodos recomendados pelo Instituto Adolfo Lutz (2005). No capítulo 1 as análises de qualidade estão descritas com maiores detalhes.

A acidez titulável nos pimentões foi determinada por titulação de 50 mL de suco do fruto para pH 8,2 usando solução padronizada de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e expressa como porcentagem de ácido cítrico. A medida de pH foi feita por imersão direta do eletrodo na amostra de pimentão preparada para determinação da acidez em um medidor digital de pH (Homis MPA 210, Brasil).

A perda de massa foi acompanhada através da pesagem dos pimentões em uma balança analítica (Sartorius, Alemanha) com resolução de 0,1 mg. Os teores de SS foram determinados com um refratômetro digital modelo PAL-1 Atago (Tóquio, Japão).

O teor de ácido ascórbico dos frutos baseia-se na oxidação do ácido ascórbico pelo iodato de potássio durante processo de titulação até o aparecimento da coloração azulada. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido ascórbico por 100 g de amostra.

A avaliação da cor dos frutos foi realizada com o auxílio de um colorímetro Minolta (Ramsey, EUA) modelo CR 400 (iluminante C e ângulo 10°) pelo sistema CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*), com leitura direta de reflectância das coordenadas "L*" (luminosidade), "a*" (de verde a vermelho) e "b*" (de azul a amarelo). Com os valores dessas coordenadas foi possível calcular parâmetros relacionados à saturação da cor, croma (Equação 3.1) e

à diferença total de cor, ΔE (Equação 3.2) (Meir *et al.*, 1992; Macdougall, 2002).

$$\text{Croma} = \sqrt{(a^*{}^2 + b^*{}^2)} \quad (\text{Equação 3.1})$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Equação 3.2})$$

2.7. Análise estatística

A eficiência dos diferentes tratamentos foi comparada pelos testes t-Student unicaudal (95% de confiança), após comparação das estimativas do desvio-padrão pelo teste F-Snedecor. A comparação entre si desses tratamentos foi realizada com análises de variância (ANOVA), com teste *post-hoc de* Tukey usando o *software* Statistica 12.0 (StatSoft Corp., Tulsa, EUA). Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo. Para comparar a alteração dos frutos de pimentão após os tratamentos com os frutos controle foi utilizado o teste de Dunnett.

3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação dos métodos analíticos

A seletividade dos métodos (ESL/PBT e ELL/PBT) foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos da matriz água e pimentão isenta de agrotóxicos, com cromatogramas das matrizes fortificadas com os princípios ativos em estudo. A análise das amostras em branco não apresentaram interferentes no tempo de retenção dos compostos estudados, comprovando boa seletividade dos métodos (Figura 3.1 e 3.2).

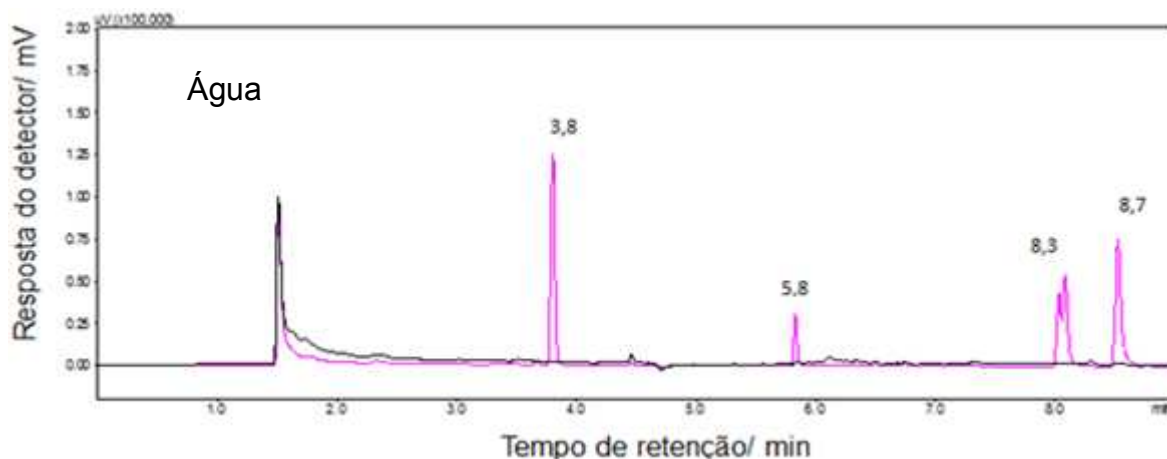


Figura 3.1. Cromatograma do extrato obtido da matriz água isenta de agrotóxicos (---) e do extrato da matriz água (—) contendo os agrotóxicos clorotalonil a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 3,8 \text{ min}$); bifentrina (padrão interno) a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 5,8 \text{ min}$), difenoconazol a $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 8,3 \text{ min}$) e azoxistrobina a $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 8,7 \text{ min}$). As amostras foram submetidas ao método ELL-PBT utilizando acetonitrila como solvente extrator e analisadas por CG-DCE.

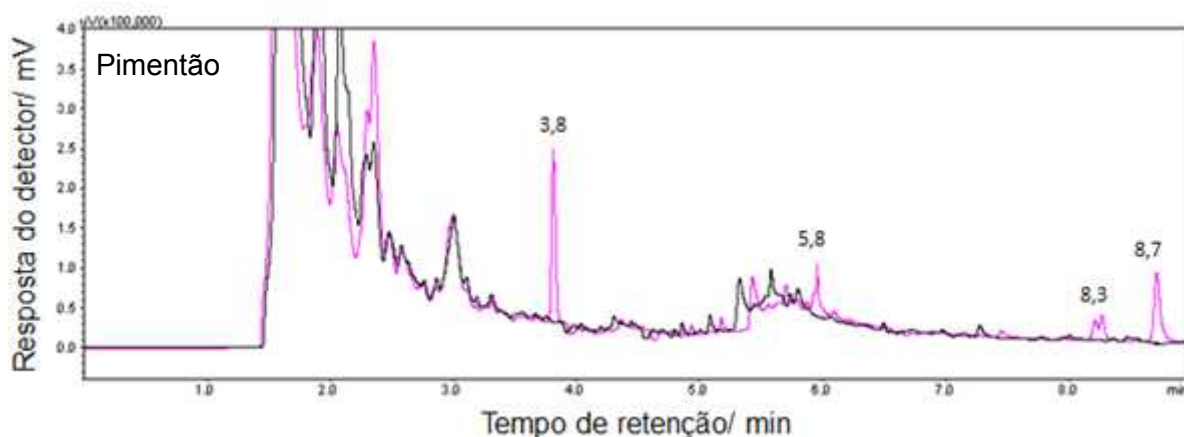


Figura 3.2. Cromatograma do extrato obtido da matriz pimentão isenta de agrotóxicos (---) e do extrato da matriz pimentão (—) contendo os agrotóxicos clorotalonil a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 3,8 \text{ min}$); bifentrina (padrão interno) a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 5,8 \text{ min}$), difenoconazol a $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 8,3 \text{ min}$) e azoxistrobina a $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($t_R = 8,7 \text{ min}$). As amostras foram submetidas ao método ELL-PBT utilizando acetonitrila como solvente extrator e analisadas por CG-DCE.

Para avaliar a linearidade dos métodos, foi obtida a equação da curva analítica por meio de regressão linear. Observando os resultados nota-se que todas as curvas analíticas apresentaram boa linearidade do método na faixa de concentração estudada, pois apresentaram coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99. Entretanto, apenas o coeficiente de determinação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva analítica, dessa forma a linearidade dos métodos foi também avaliada através do gráfico de resíduos.

No Apêndice D é apresentada os gráficos de resíduos da regressão linear obtidos para as substâncias estudadas. Os resíduos apresentaram distribuição uniforme, onde não foram observados valores discrepantes em nenhuma situação apresentada, o que é um indicativo que o ajuste de modelo pode ser aplicado para todos os compostos em estudo, indicando um comportamento homocedástico.

Os limites de detecção variaram de 0,7 a 4,2 para ELL/PBT de agrotóxicos em água e de 1,1 a 3,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a ESL/PBT de agrotóxicos em pimentão. Os coeficientes de variação para os ensaios de precisão intermediária e repetitividade foram menores que 11%. A taxa de recuperação obtida para os métodos ELL-PBT e ESL-PBT apresentaram valores de recuperação (82% a 110%) e CV ($\leq 10\%$) estando dentro da faixa recomendada pelos órgãos reguladores. Para a análise dos resíduos de agrotóxicos, o procedimento analítico, deverá ser capaz de recuperar, em cada nível de fortificação, 70% -120%, em média, com uma precisão de CV $< 20\%$ (ICH, 2005).

Tabela 3.1. Figuras de mérito para os métodos ELL/PBT e ESL/PBT. Recuperação (n=6) e precisão (repetitividade, n=6; e precisão intermediária, n=18) para os agrotóxicos extraídos de amostras de água e pimentão e análise por CG/DCE.

Compostos	Curva analítica		Faixa linear/ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R^{2c}	$dpr^d/(\mu\text{g kg}^{-1})$	$LD^e / (\mu\text{g kg}^{-1})$	$LQ^f / (\mu\text{g kg}^{-1})$	$NF^g / (\mu\text{g L}^{-1})$	$R^h \pm DP^i / \%$	Intra- dia CV ^j / %	Inter-dia CV / %	
	A ^s	B ^b										
Água (ELL/PBT)*	azoxistrobina	0,0135	0,1091	8,0 - 1200	0,9921	0,4907	2,4	7,99	7,99	90,90 \pm 0,01	7,23	7,70
									19,97	109,81 \pm 0,02	3,03	6,33
									39,95	103,83 \pm 0,05	7,19	6,98
	clorotalonil	0,1043	0,1798	2,3 - 350	0,9929	1,0548	0,7	2,33	2,33	93,34 \pm 0,01	7,23	8,78
									5,83	89,34 \pm 0,03	5,74	6,58
									11,65	98,55 \pm 0,04	3,67	3,90
difenoconazol	0,0092	0,0212	14,0 - 2100	0,9913	0,6205	4,2	13,98	13,98	94,90 \pm 0,02	3,67	5,94	
								34,95	90,09 \pm 0,02	7,29	6,55	
								6,99	103,84 \pm 0,04	3,03	7,22	
Pimentão (ESL/PBT)*	azoxistrobina	0,0275	1,2181	8,86 - 1298,7	0,9948	0,8797	2,6	8,86	8,86	91,72 \pm 0,01	7,43	7,80
									22,11	108,87 \pm 0,16	9,36	11,39
									44,30	98,19 \pm 0,11	5,27	5,38
	clorotalonil	0,0499	1,1875	3,67 - 549,45	0,9920	0,8415	1,1	3,67	3,67	82,37 \pm 0,09	8,34	11,31
									9,17	108,34 \pm 0,11	5,32	6,03
									18,35	93,75 \pm 0,02	5,50	5,67
difenoconazol	0,0137	2,0311	11,65-1747,5	0,9909	0,7820	3,5	11,65	11,65	91,94 \pm 0,02	6,40	8,80	
								29,13	107,01 \pm 0,07	4,42	9,01	
								58,25	99,93 \pm 0,01	2,52	8,03	

^aInclinação (S); ^bIntercepto (B); ^cCoefficiente de determinação; ^d Desvio padrão dos resíduos; ^eLimite de detecção; ^fLimite de quantificação; ^gNível de Fortificação; ^hRecuperação; ⁱDesvio padrão e ^jCoefficiente de variação. *Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL/PBT) e extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT)

3.2. Efeito de diferentes tratamentos na remoção de resíduos de agrotóxicos

Diante do cenário do grande nível de contaminação dos alimentos por resíduos de agrotóxicos, principalmente em frutos de pimentão, este estudo apresenta várias estratégias para remoção de contaminantes em hortaliças, podendo ser usadas tanto em ambientes domésticos como industrial, minimizando o risco de contaminação, beneficiando assim a saúde humana.

Para avaliar alguns desses procedimentos, foram testadas quatro classes de soluções: neutra (soluções de detergente 0,25 e 1%); ácida (ácido acético a 0,15 e 5%); alcalina (bicarbonato de sódio a 1,5% e 5%) e oxidante (hipoclorito de sódio a 0,04 e 1%, água borbulhada continuamente com ozônio e água ozonizada 1 e 3 mg L⁻¹).

Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE) e os dados foram submetidos à análise estatística. As porcentagens de remoção dos resíduos de agrotóxicos nos pimentões após diferentes tratamentos foi calculada em relação à quantidade dos princípios ativos contidos na amostra controle (sem tratamento). Para determinar a eficiência das soluções de imersão, foi utilizada ANOVA com teste *post hoc* de Tukey. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Nas figuras 3.3 a 3.5 são apresentadas a porcentagem dos resíduos que ficaram retidas no fruto, na solução de tratamento e a porcentagem considerada de degradação dos analitos.

As concentrações médias dos fungicidas encontradas nos frutos antes da submissão aos diferentes tratamentos foram 119 µg kg⁻¹ de azoxistrobina, 177 µg kg⁻¹ de difenoconazol e 1735 µg kg⁻¹ de clorotalonil.

A eficiência de remoção foi maior para o clorotalonil (29%) do que para a azoxistrobina (23%) que, por sua vez, foi maior que a do difenoconazol (21%). Observou-se que a concentração dos fungicidas nos frutos de pimentão foram reduzidas à medida que se aumentou a concentração das soluções utilizadas. A imersão dos frutos em água proporcionou a remoção dos três agrotóxicos dos frutos de pimentão. Os diversos procedimentos utilizando imersão dos frutos em diferentes soluções podem efetivamente minimizar os resíduos de agrotóxicos, sendo mais eficazes do que a lavagem com água pura, estando assim de acordo com Zhang et al. (2007), Kin et al. (2010) e Liang et al. (2012).

Para a azoxistrobina as soluções de detergente 0,25% e 1%; ácido acético 5%; bicarbonato 5% e água ozonizada e água borbulhada 1 e 3 mg L⁻¹ removeram significativamente mais agrotóxico que a imersão em água pura (variando entre 37 a 67%). Entretanto, o comportamento de diferentes soluções de lavagem e tratamentos com ozônio foram semelhantes em relação a remoção dos resíduos de azoxistrobina nos frutos de pimentões (Figura 3.3).

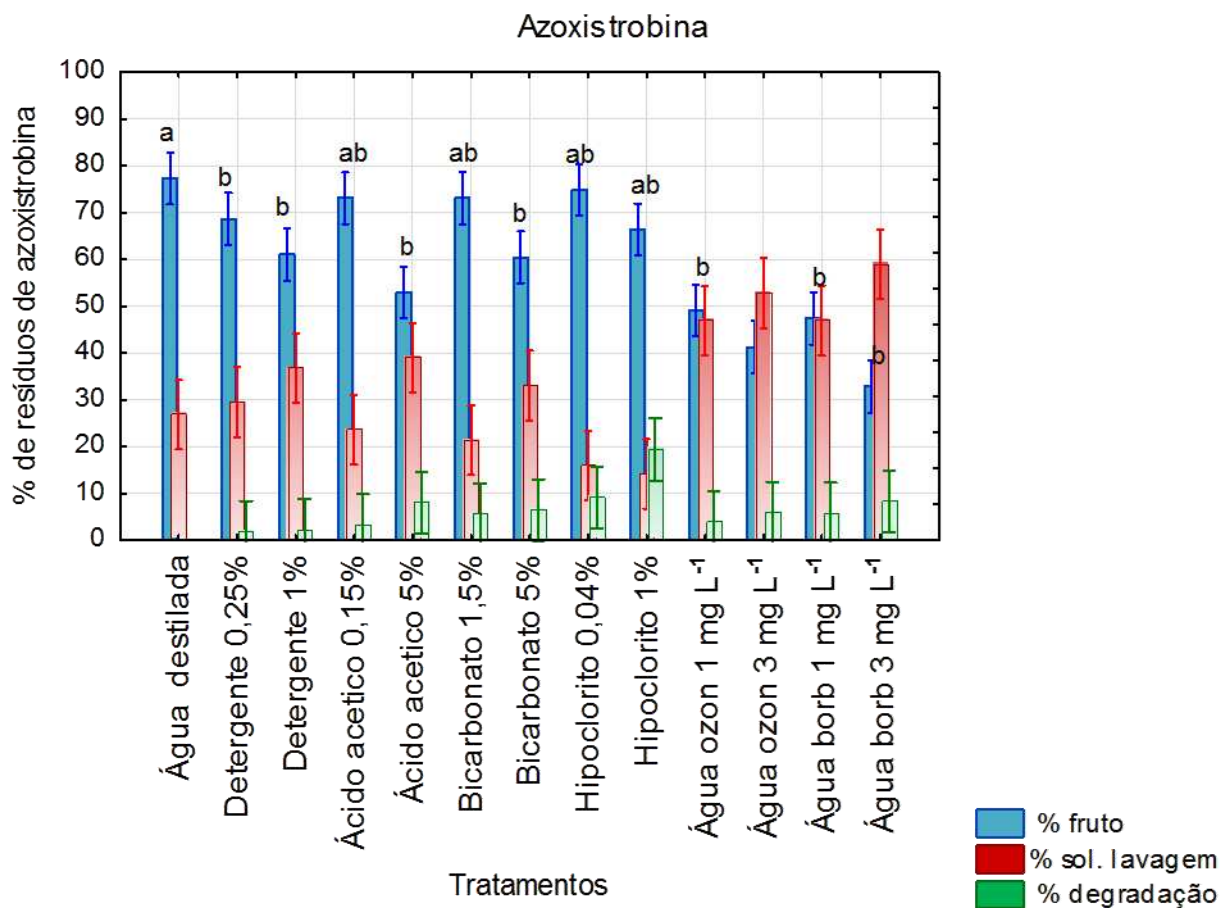


Figura 3.3. Porcentagem de resíduos de azoxistrobina em amostras de pimentão após procedimentos de lavagem. As barras de erro indica erros padrão das medições (n = 3). Letras iguais não diferem entre si com teste de Tukey com post-hoc da ANOVA ($p < 0,05$).

Para o clorotalonil, (Figura 3.4) há diferença significativa positiva em utilizar os diversos procedimentos de imersão dos frutos, do que a simples imersão em água pura. Quando utilizou os níveis de maior concentração de soluções de detergente, ácido acético, hipoclorito de sódio, bicarbonato de sódio, foram removidos 58%; 67%; 80% e

81% dos resíduos, respectivamente. Já o tratamento com água ozonizada e água borbulhada com ozônio nas concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹ reduziram em média (71%; 80%; 75% e 87%) dos resíduos. Dessa forma, as soluções de hipoclorito 1%, bicarbonato 5% e os diferentes tratamentos com ozônio foram mais eficientes na remoção do clorotalonil, e não diferiram entre si de forma significativa de acordo com teste Tukey com post hoc da ANOVA (Figura 3.4).

Clorotalonil e clorpirifós foram removidos eficazmente de tomates cereja quando foram imersos em soluções de detergentes. A adição de ácido acético, ou o aumento da temperatura de lavagem para 40 °C aumentou a porcentagem de remoção de ambos compostos, enquanto NaCl substancialmente reduziu a eficácia de lavagem com detergente (WANG et al., 2013).

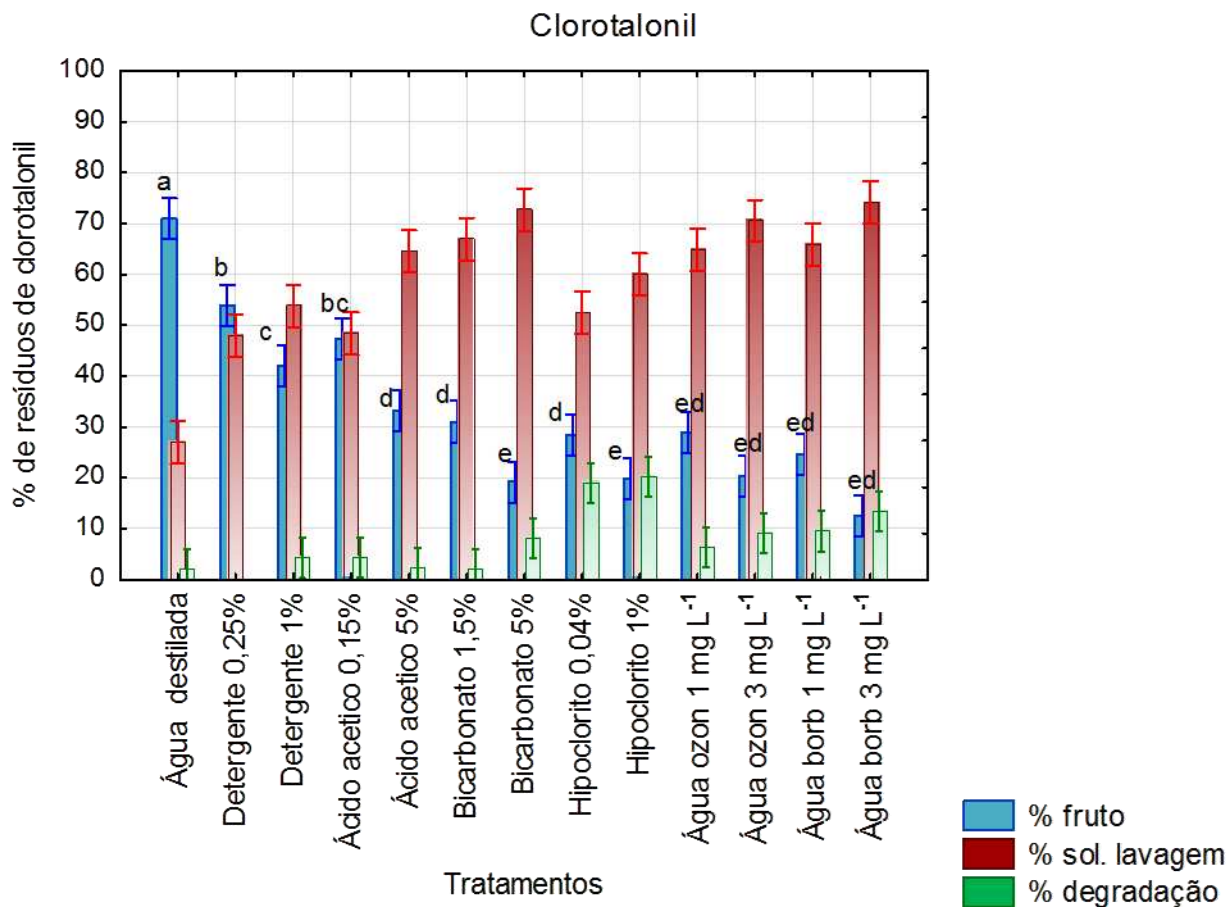


Figura 3.4. Porcentagem de resíduos de clorotalonil em amostras de pimentão após procedimentos de lavagem. As barras de erro indica erros padrão das medições (n = 3). Letras iguais não diferem entre si com teste de Tukey com post-hoc da ANOVA ($p < 0,05$).

Para o difenoconazol, (Figura 3.5) não há diferença significativa entre imersão dos frutos em água e soluções (ácido acético 0,15% e hipoclorito 0,04%) alcançando uma eficiência de remoção média igual a 21%; 25% e 35%. Os tratamentos com solução de bicarbonato de sódio 5%, com água ozonizada (1 e 3 mg L⁻¹) e com água borbulhada com ozônio (1 e 3 mg L⁻¹) não diferiram significativamente, sendo responsáveis pela maior remoção do difenoconazol 66%; 56%; 68%; 63% e 76%, respectivamente.

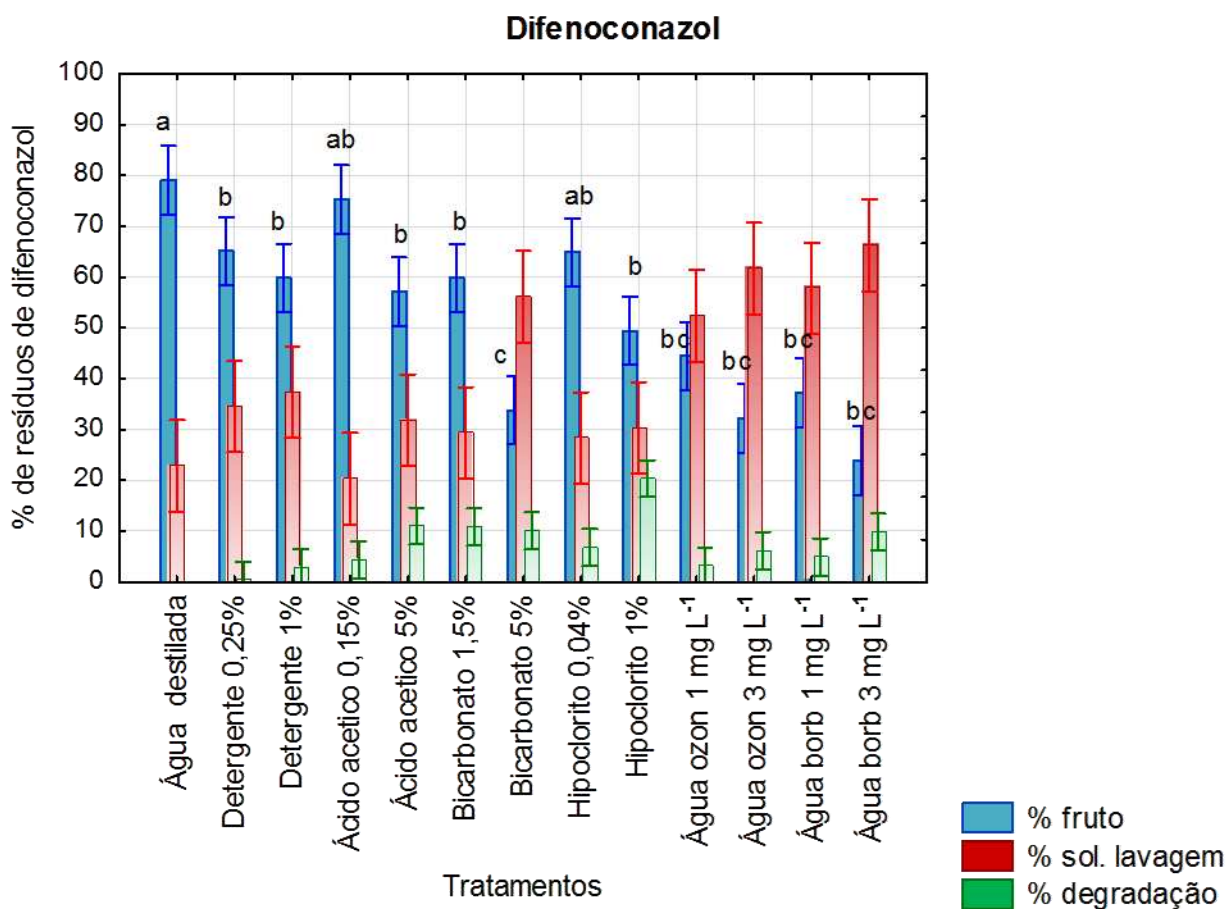


Figura 3.5. Porcentagem de resíduos de difenoconazol em amostras de pimentão após procedimentos de lavagem. As barras de erro indicam erros padrão das medições (n = 3). Letras iguais não diferem entre si com teste de Tukey com post-hoc da ANOVA ($p < 0,05$).

Dentre as soluções utilizadas rotineiramente em ambientes domésticos, o bicarbonato de sódio 5% foi mais eficiente na remoção de difenoconazol (66%) e clorotalonil (81%). Resultados semelhantes foram alcançados por Liang et al. (2012) quando avaliaram a remoção dos agrotóxicos diclorvós, fenitrothion e clorpirifós em pepino.

Os dados mostraram que a lavagem com solução de 5% de bicarbonato por 20 min removeu 98,8%, 67% e 85% dos resíduos dos agrotóxicos, respectivamente.

O hipoclorito de sódio 1% também teve uma boa eficiência na remoção dos resíduos de clorotalonil (80%) nos pimentões. Já a azoxistrobina (47%) foi mais removida pela solução de ácido acético 5%. Quando se utilizou as soluções de detergentes (0,25% e 1%) foi alcançada uma remoção média de 52% dos resíduos de clorotalonil e 38% de azoxistrobina e difenoconazol. Não foi obtido um resultado tão eficiente como esperado (> 60%), pois acreditava-se que a solução de detergente iria proporcionar uma maior solubilização dos compostos, favorecendo assim uma remoção bem mais eficiente do que a simples lavagem com água pura. Dessa forma a adsorção dos compostos na camada cerosa dos frutos, ou seja, a composição química da pele dos frutos deve ter um papel primordial nesse processo de remoção. Resultados semelhantes foram obtidos por Sheikh et al. (2012) em que a lavagem com solução de detergente seguida de lavagem com água da torneira reduziu apenas 36% do Endosulfan e 43% do Profenofós de cebolas descascadas.

Em um estudo realizado por Randhawa et al. (2014), a redução máxima no conteúdo de imidacloprida em pimentões foi observada com a lavagem dos frutos com solução de 9% de ácido cítrico (72,48%), seguido da solução de 9% de ácido acético (68,78%), e menor remoção foi encontrada com a mistura de ácido cítrico e solução de ácido acético (0,75% de cada) (11,64%).

A remoção dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos pelo processo de lavagem depende de uma série de fatores, tais como: as propriedades químicas do agrotóxico, a natureza da membrana (camada cerosa), o tempo de contato do agrotóxico com os alimentos, da localização física e da idade dos resíduos, da solubilidade do agrotóxico em água, da temperatura da água e do tipo de lavagem (HOLLAND et al., 1994).

Dentre todos os tratamentos utilizados neste estudo, a água borbulhada com ozônio no maior nível de concentração (3 mg L⁻¹) proporcionou uma melhor eficiência de remoção dos três agrotóxicos nos pimentões. A azoxistrobina foi removida (67%); o difenoconazol (76%) e o clorotalonil (87%). Já os tratamentos com água ozonizada (1 e 3 mg L⁻¹) removeram em média 55% dos resíduos de azoxistrobina, 62% do difenoconazol e 75% do clorotalonil. A exemplo, Kusvuran et al. (2012) avaliaram a remoção de resíduos de clorotalonil em frutas por ozonização. Nos seus estudos, a

eficiência de remoção de resíduos de clorotalonil com ozônio foi dependente da matriz (limão, laranja e toranja). O mesmo tratamento com ozônio foi removido 92% do resíduo de clorotalonil em limão, 100% em laranja e 44% em toranja.

Assim, a ozonização parece ser uma alternativa segura e eficaz para remoção de resíduos de agrotóxicos. O ozônio apresenta um alto potencial de oxidação mesmo em baixas concentrações, onde reage com quase todos os compostos orgânicos e inorgânicos, não deixando resíduos nos alimentos quando é utilizado de forma adequada, além de ser um forte agente antimicrobiano (KIM et al., 1999).

A taxa de solubilização do ozônio depende do tamanho das bolhas do gás que borbulham na água, pois quanto menores as bolhas formadas, maior a superfície de contato. O tamanho mais adequado deve variar entre 1 e 3 mm de diâmetro. A taxa de fluxo do ozônio e o tempo de contato também afetam a transferência do gás para a água (KHADRE et al., 2001). Esta solubilidade em meio aquoso também é dependente do conteúdo de matéria orgânica, sendo que quanto menor a concentração de matéria orgânica presente no meio maior será o tempo de meia vida do ozônio em água e conseqüentemente maior eficiência do tratamento (GRAHAM, 1997). Um aumento na temperatura de um meio aquoso resulta na diminuição da sua solubilidade e assim redução da eficiência do ozônio. Já uma redução do pH proporciona uma maior eficiência do ozônio em meio aquoso (KUSCU & PAZIR, 2004).

Entre todos os procedimentos empregados para a descontaminação dos frutos de pimentão, o clorotalonil por ser um composto de ação de contato foi removido com maior eficiência nos frutos em relação a azoxistrobina e o difenoconazol que são compostos sistêmicos. Resíduos de agrotóxicos tendem a penetrar na cutícula dos vegetais. A cutícula vegetal é um biopolímero lipofílico extracelular cobrindo superfícies dos vegetais, e pode retardar a entrada destes compostos (SCHREIBER, 2005). Esta penetração depende da mobilidade do soluto na cutícula, da espessura da cutícula, e o coeficiente de partição entre o resíduo depositado na superfície e a cutícula (BAUR et al., 1997).

3.3. Degradação dos agrotóxicos

Para distinguir entre a quantidade de agrotóxicos que foi degradada daquele que permaneceu na solução de imersão, as quantidades adicionadas dos analitos aos frutos (determinados em pimentões sem a etapa de imersão) foram comparadas com as quantidades dos analitos no fruto após a imersão e com as quantidades na solução.

Os agrotóxicos podem ser degradados por fotólise, hidrólise, oxidação e redução, metabolismo (plantas, animais ou micróbios), temperatura e pH (NPIC, 2011). Nesse estudo, uma maior degradação foi alcançada quando os frutos foram imersos nas soluções oxidantes mais concentradas, principalmente água borbulhada com ozônio (3 mg L^{-1}) e solução de hipoclorito de sódio 1% (Figura 3.3 a 3.5).

Dentre as substâncias desinfetantes mais empregadas na indústria de alimentos, o ozônio possui o maior poder de oxidação (2,07 mV), superando inclusive, o peróxido de hidrogênio (1,77 mV), o hipoclorito (1,49 mV) e o cloro (1,36 mV) (KIM et al., 1999).

Apesar da eficiência em alimentos (remoção de agrotóxicos e inativação microbiana), compostos clorados vêm apresentando restrições quanto à sua utilização, devido à formação de subprodutos altamente tóxicos e cancerígenos, como os compostos organoclorados, trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos (CHIATTONE et al., 2008). Em contrapartida, o ozônio é relativamente instável em solução aquosa e apresenta meia-vida que varia de 20 a 30 min em água destilada a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. O único produto do ozônio, quando se decompõe, é o oxigênio, por isso, os produtos alimentares tratados com ozônio são livres dos seus resíduos (KIM et al., 1999).

Entretanto, uma das preocupações com a saúde em relação ao uso de oxidantes para degradar agrotóxicos é a formação de intermediários tóxicos. Agrotóxicos da classe dos organofosforados que contêm ligações $\text{P} = \text{S}$ podem ser oxidado a análogos oxigenados, que são mais tóxicos que o composto original. O inseticida organofosforado parationa, por exemplo, sofre biotransformação quando absorvido, formando metabólito ativo (denominado paraoxona) por meio da oxidação das ligações tiofosfato ($\text{P}=\text{S}$) a ortofosfato ($\text{P}=\text{O}$). Sob essa forma, os organofosforados aumentam e prolongam os efeitos de inibição da enzima acetilcolinesterase do princípio ativo (BRASIL, 2012).

3.4. Efeito dos tratamentos na qualidade dos pimentões

Consumidores cada vez mais conscientes estão exigindo produtos mais seguros e com menor impacto ao meio ambiente e à saúde humana (BEIRÃO-DA-COSTA et al., 2014). Neste contexto, além de avaliar a eficiência de remoção de agrotóxicos nos alimentos, é também necessário avaliar a qualidade dos produtos após os tratamentos.

Amostras de pimentão (controle e tratadas) foram armazenadas em B.O.D. a 23 ± 1 °C por 13 dias e os seguintes atributos físico-químicos foram avaliados: teores de sólidos solúveis, acidez titulável, pH, perda de massa, intensidade da cor (croma) e diferença total de cor (ΔE) e ácido ascórbico. Na Tabela 3.2 está descrita as médias dos quatro tempos (1^0 , 5^0 ; 9^0 e 13^0 dia) de avaliação dos parâmetros de qualidade submetidos à análise de variância (ANOVA), e Teste de Dunnett para comparar os diferentes tratamentos com o controle.

A acidez dos frutos de pimentão foi alterada significativamente em relação a amostra controle quando estes foram imersos nas soluções de ácido acético 0,15% e 5%. Esse resultado mostra o aumento da preservação da qualidade do fruto tratado principalmente com ácido acético 0,15%, pois não foi observada alterações significativas dos outros parâmetros durante o período de armazenamento de 13 dias.

A variação total de cor variou significativamente ($p < 0,05$) entre os frutos de pimentão tratados com solução ozonizada 1 e 3 mg L⁻¹, água borbulhada 3 mg L⁻¹, bicarbonato 5%, hipoclorito 5% e os frutos do controle (Tabela 3.2). Esses resultados indicam que o ozônio afetou este parâmetro de qualidade, pois durante o período de armazenamento, a coloração dos pimentões passou da cor verde escura para verde clara, sendo constatados em alguns frutos coloração avermelhada. Vários estudos têm relatado que os pigmentos de plantas foram branqueados depois do tratamento com ozônio (LIEW & PRANGE, 1994; BADANI et al., 1996).

Outra variável relacionada com a cor é a saturação (croma), que está relacionada com a variação da intensidade da cor durante o armazenamento. Os resultados da saturação de cor mostram que esse parâmetro foi afetado significativamente ($p < 0,05$) quando se utilizou água ozonizada 3 mg L⁻¹ e hipoclorito 0,04% função do tratamento com ozônio pela redução. Os efeitos do ozônio sobre a fisiologia e qualidade de frutas e hortaliças varia de acordo com a composição química

dos alimentos, dose de ozônio utilizada, o tipo e tempo de aplicação (KARACA & VELIOGLU, 2007). Concentrações muito altas do gás podem causar oxidação na superfície de alimentos resultando na descoloração e alteração do sabor e odor.

Em um estudo realizado por Wei et al. (2007), o tratamento com ozônio causou maior escurecimento da alface em relação ao tratamento com cloro. A taxa de escurecimento da alface aumentou significativamente com o aumento da concentração de ozônio e tempo de armazenamento. Para o morango, não houve diferença evidente na mudança de cor entre o tratamento com ozônio e o tratamento com cloro.

Observou-se perda de massa tanto para as amostras de pimentão controle como para todas as amostras tratadas. As alterações observadas nos valores da perda de massa foram significativas ($p < 0,05$) em função dos tratamentos com água ozonizada 1 e 3 mg L⁻¹ e água borbulhada com ozônio 3 mg L⁻¹, bicarbonato de sódio 5% e hipoclorito 1%.

Água ozonizada 3 mg L⁻¹, ácido acético 5% e hipoclorito de sódio 0,04% e 1% afetaram de forma significativa a vitamina C dos frutos de pimentão quando comparadas com o controle pelo teste de Dunnett. Compostos antioxidantes, como flavonóides, polifenóis, vitaminas A e C são componentes importantes dos alimentos. Eles podem servir como substratos naturais para enzimas oxidativas como a polifenoloxidase. Devido à sua forte atividade oxidante, o ozônio pode causar a perda de componentes antioxidantes (BELTRAN et al., 2005).

Tabela 3.2. Valores médios dos parâmetros de qualidade dos pimentões armazenados em B.O.D. a 23 °C ± 1 - acidez titulável (g de ácido cítrico/100 g de polpa), sólido solúveis (°Brix), coroma, % perda de massa (massa inicial – massa tempo), potencial hidrogeniônico (pH), variação da cor e Vitamina C (mL de ácido ascórbico /100 g de polpa).

Tratamentos	Análises de qualidade						
	Acidez	Brix	Croma	Perda de massa	pH	Varição da cor	Vitamina C
Controle	0,13 ± 0,21	6,01 ± 0,81	20,64 ± 0,38	5,57 ± 0,53	6,37 ± 0,04	13,21 ± 0,49	96,19 ± 0,14
Sol. detergente (0,25%)	0,14 ± 0,15	6,09 ± 0,16	19,52 ± 0,38	8,74 ± 0,45	6,49 ± 0,04	13,60 ± 0,51	99,06 ± 0,17
Sol. detergente (1%)	0,13 ± 0,25	6,07 ± 0,18	19,25 ± 0,43	8,62 ± 0,50	6,58 ± 0,04	13,98 ± 0,48	83,55 ± 0,30
Água ozonizada (1 mg L ⁻¹)	0,14 ± 0,15	5,94 ± 0,11	18,69 ± 0,42	11,99 ± 0,30*	6,55 ± 0,02	19,07 ± 0,43*	84,75 ± 0,20
Água ozonizada (3 mg L ⁻¹)	0,14 ± 0,21	5,63 ± 0,19	15,45 ± 0,42*	18,18 ± 0,58*	6,44 ± 0,02	19,74 ± 0,43*	62,61 ± 0,30*
Água borbulhada (1 mg L ⁻¹)	0,12 ± 0,22	5,82 ± 0,23	18,48 ± 0,38	9,79 ± 0,72	6,44 ± 0,03	13,84 ± 0,52	99,06 ± 0,13
Água borbulhada (3 mg L ⁻¹)	0,14 ± 0,19	6,14 ± 0,23	16,87 ± 0,50	12,11 ± 0,66*	6,37 ± 0,05	22,30 ± 0,46*	90,99 ± 0,25
Controle	0,11 ± 0,16	4,24 ± 0,17	18,7 ± 0,22	10,24 ± 0,53	5,76 ± 0,03	6,03 ± 0,39	103,58 ± 0,15
Água destilada	0,12 ± 0,28	4,47 ± 0,21	16,96 ± 0,29	9,65 ± 0,82	5,97 ± 0,08	7,08 ± 0,49	99,8 ± 0,16
Ácido acético (0,15%)	0,14 ± 0,19*	4,08 ± 0,18	20,03 ± 0,22	13,77 ± 0,52	5,59 ± 0,06	7,17 ± 0,43	96,4 ± 0,29
Ácido acético (5%)	0,14 ± 0,27*	3,98 ± 0,14	19,69 ± 0,21	15,83 ± 0,46*	5,11 ± 0,01*	8,04 ± 0,37	74,6 ± 0,32*
Bicarbonato de sódio (1,5%)	0,12 ± 0,13	4,52 ± 0,21	17,48 ± 0,22	11,68 ± 0,63	5,70 ± 0,07	6,83 ± 0,58	94,84 ± 0,21
Bicarbonato de sódio (5%)	0,12 ± 0,13	4,63 ± 0,30	17,74 ± 0,32	12,72 ± 0,73	5,74 ± 0,05	9,77 ± 0,69*	110,7 ± 0,19
Hipoclorito de sódio (0,04%)	0,12 ± 0,17	4,00 ± 0,17	22,25 ± 0,21*	12,84 ± 0,50	5,87 ± 0,06	7,77 ± 0,71	60,00 ± 0,22*
Hipoclorito de sódio (1%)	0,11 ± 0,19	4,30 ± 0,18	20,69 ± 0,25	13,26 ± 0,53	5,97 ± 0,05	9,45 ± 0,66*	63,96 ± 0,32*

*Valores destacados em uma mesma coluna diferem significativamente do controle pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$). Valores médios (n=3) das características qualitativas dos pimentões ao longo do armazenamento (1^o, 5^o; 9^o e 13^o dia) ± coeficiente de variação.

4.0.CONCLUSÃO

De forma geral, o tratamento dos vegetais com soluções neutras, ácidas, alcalinas e oxidantes pode efetivamente minimizar os resíduos de agrotóxicos, sendo mais eficazes do que a lavagem com água pura.

Dentre todos os tratamentos utilizados neste estudo, a água borbulhada no maior nível de concentração (3 mg L^{-1}) proporcionou uma melhor eficiência de remoção dos três agrotóxicos nos pimentões. Porém, o tratamento com água borbulhada com ozônio (1 mg L^{-1}), parece ser o tratamento mais adequado, pois além de ter reduzido os níveis de agrotóxicos com eficiência (cerca de 70%), não afetou nenhum parâmetro de qualidade dos pimentões. Os efeitos do ozônio sobre a fisiologia e qualidade de frutas e hortaliças varia de acordo com a composição química dos alimentos, dose de ozônio utilizada, o tipo e tempo de aplicação.

Dentre as soluções utilizadas rotineiramente em ambientes domésticos, o bicarbonato de sódio 5% foi mais eficiente na remoção de difenoconazol (66,2%) e clorotalonil (80,8%). O hipoclorito de sódio 1% também teve uma boa eficiência na remoção dos resíduos de clorotalonil (80,1%) nos pimentões.

Os parâmetros físico-químicos mais afetados nos frutos de pimentão foram a perda de massa, cor e vitamina C. A maior variação da cor e murchamento dos frutos foi decorrente do uso de água ozonizada 1 e 3 mg L^{-1} e água borbulhada com ozônio 3 mg L^{-1} . Já a vitamina C foi mais afetada pelo hipoclorito de sódio, ácido acético 5% e água ozonizada 3 mg L^{-1} .

5.0.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução, n. 899. 2003, p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório de atividades. 2011 e 2012, 19 p.

APHA; AWWA; WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington: American Public Health Association, 937 p., 2005.

BADANI, M.; FUHRER, J.; PAOLACCI, A. R.; GIOVANNOZZI, S. G. Deriving critical levels for ozone effects on peach trees (*Prunus persica*(L.) Batsch) grown in open-top chambers in central Italy. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 5, n. 9, p. 594-603, 1996.

BAJWA, U.; SANDHU, K. S. Effect of handling and processing on pesticide residues in food-a review. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 2, p. 201-220, 2014.

BAUR, P.; MARZOUK, H.; SCHONHERR, J.; GRAYSON, B.T. Partition coefficients of active ingredients between plant cuticle and adjuvants as related to rates of foliar uptake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3659-3665, 1997.

BEIRÃO-DA-COSTA, S.; MOURA-GUEDES M. C.; FERREIRA-PINTO M. M, EMPIS, J.; MOLDÃO-MARTINS, M. Alternative sanitizing methods to ensure safety and quality of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.38, p.1-10, 2014.

BELTRAN, D.; SELMA, M.V.; MARIN, A.; GIL, M. I. Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5654-5663, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consulta pública n. 8, de 19 de janeiro de 2012. **Proposta de regulamento técnico para o ingrediente ativo parationa metílica em decorrência da reavaliação toxicológica**. Brasília, 2012.

CHEN, C.; QIAN, Y.; CHEN, Q.; TAO, C.; LI, C.; LI, Y. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. **Food Control**, v. 22, n.7, p. 1114-1120, 2011.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. Aplicação de ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição (Brazilian Journal of Food and Nutrition)**, v. 19, n. 3, p. 341-350, 2008.

DOSSIÊ ABRASCO (Associação Brasileira de Saúde Coletiva). Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Disponível em: <<http://www4.planalto.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2015.

GEISMAN, J. R. "Reduction of pesticide residues in food crops by processing." In *Residue reviews*, pp. 43-54. Springer New York, 1975.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. D.; ASSIS, T. C. D.; QUEIROZ, M. E. L. R. D. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1-2, p. 41-47, 2010.

GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. *Food Technology*, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.

HELENO, F. F. **Ozonização: uma estratégia para remoção de resíduos de agrotóxicos em alimentos**. 2013. 86f. Tese (Doutorado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

HENZ, G. P.; COSTA, C. S. R.; CARVALHO, S.; BANCI, C. A. **Como cultivar pimentão: alta produtividade. Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 7, n. 42, 2007.

HOLLAND, P. T.; HAMILTON, D.; OHLIN, B.; SKIDMORE, M. W. Pesticides report 31: Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products, **Pure Appl. Chem.**, 66, 335-356, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1020 p.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology**. Q(2)R1, November 2005. International Conference on Harmonisation. Geneva. 2005.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. D. A.; QUEIROZ, S. C. D. N. D. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v.32, p.996-1012, 2009.

JARDIM, A. N., & CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010, **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

KARACA, H.; VELIOGLU, Y. S. Ozone applications in fruit and vegetable processing. **Food Reviews International**, v. 23, n. 1, p. 91-106, 2007.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, Malden, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.

KEIKOTLHAILE, B.M.; SPANOGHE, P.; STEURBAU, P.W. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 1-6, 2010.

- KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; DAVE, S. Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review. **Journal of Food Protection**, 1999, 62 (9), 1071–1087.
- KIN, C. M., & HUAT, T. G. (2010). Headspace solid-phase microextraction for the evaluation of pesticide residue contents in cucumber and strawberry after washing treatment. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 760-764, 2010.
- KUSCU, A., PAZIR, F. Ozone applications in food industry. **Gida**, v. 29, n. 2, p. 123-129, 2004.
- KUSVURAN, E., YILDIRIM, D., MAVRUK, F., CEYHAN, M. Removal of chloropyrifos ethyl, tetradifon and chlorothalonil pesticide residues from citrus by using ozone. **Journal of hazardous materials**, v. 241, p. 287-300, 2012.
- LIANG, Y., WANG, W., SHEN, Y., LIU, Y., & LIU, X. J. Effects of home preparation on organophosphorus pesticide residues in raw cucumber. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 636-640, 2012.
- LIBARDI, V.M., HELENO, F. F., QUEIROZ, M.E.L.R., NEVES, A.A., DE OLIVEIRA, A. F., RODRIGUES, A. A. Z. (artigo produzido no laboratório de Química Analítica (LAQUA) da UFV. Pronto para submissão.
- LIEW, C. L., PRANGE, R. K. Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 119, n. 3, p. 563-567, 1994.
- MACDOUGALL, D. B. Color in food: improving quality .Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2002. 388 p.
- MEIR, S.; PHILOSOPH-HADAS, S.; GLOTER, P.; AHARONI, N. Nondestructive assessment of chlorophyll content in watercress leaves by atristimulus reflectance colorimeter. **Postharvest Biology and Technology**, v.2, n. 2, p. 117-124, 1992.
- MOURA, AP, GUIMARAES, J., & LIMA, M. (2016). Guia Prático Para o Reconhecimento e monitoramento das principais Pragas na Produção Integrada do Pimentão. *Embrapa Hortaliças-Documentos (INFOTECA-E)*.
- MOSTAFALOU, S., ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157-177, 2013.
- NPIC (National pesticide information Center, 2011. <http://npic.orst.edu/envir/efate.html>, acessada 23 de fevereiro de 2015.

RANDHAWA, M. A., ANJUM, M. N., SADIQ BUTT, M, YASIN, M., IMRAN, M. Minimization of Imidacloprid Residues in Cucumber and Bell Pepper Through Washing with Citric Acid and Acetic Acid Solutions and Their Dietary Intake Assessment. **International Journal of Food Properties**, 17:5, 978-986, 2014.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. *Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

SANCO : Procedures Method validation and quality control for Pesticide residue analysis in food and Food , Document No. SANCO / 10684/2009 . Legal Deposit : AL - 1133-2009.

SCHREIBER, L. Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. **Annals of Botany**, v. 95, n. 7, p. 1069-1073, 2005.

SHEIKH, S. A., SHAHNAWAZ, M., NIZAMANI, S. M., LAGHARI, M., PANWAR, A., ABBAS, S. IMPACT OF TRADITIONAL PROCESSING ON PESTICIDE RESIDUES IN ONION. **Inter. J. Modern Agril**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2012.

WANG, Z., HUANG, J., CHEN, J., & LI, F. Effectiveness of dishwashing liquids in removing chlorothalonil and chlorpyrifos residues from cherry tomatoes. **Chemosphere**, v. 92, n. 8, p. 1022-1028, 2013.

WEI, K., ZHOU, H., ZHOU, T., GONG, J. Comparison of aqueous ozone and chlorine as sanitizers in the food processing industry: impact on fresh agricultural produce quality. **Ozone: Science and Engineering**, v. 29, n. 2, p. 113-120, 2007.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; VALE, F. X. R. Controle de doenças em pós-colheita de frutas tropicais. In: ZAMBOLIM, L (Ed.). Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. p. 443-512

ZHANG, Z.Y.; LIU, X.J.; HONG, X.Y. Effects of home preparation on pesticide residues in cabbage. **Food Control**, v. 18, n. 12, p. 1484-1487, 2007.

CONCLUSÕES FINAIS

Ainda que procedimentos corretos para evitar a contaminação de agrotóxicos em alimentos sejam bem definidos e gradualmente certificados, utilizando as boas práticas agrícolas, eles nem sempre são seguidos e assim há grande risco de frutas e hortaliças disponíveis no mercado estarem contaminadas, comprometendo assim a saúde do consumidor.

Com o intuito de avaliar a eficiência de algumas técnicas de remoção de resíduos de agrotóxicos nos vegetais consumidos *in natura*, amostras de tomate e pimentão foram pulverizados com soluções de agrotóxicos e submetidas a vários tratamentos. Os resultados dos frutos de tomate e pimentão de certa forma apresentaram-se similares tanto na incorporação dos resíduos de agrotóxicos nos vegetais como na eficácia do processo de remoção. Dessa forma, foi observado que o emprego de soluções ácidas, alcalinas e oxidantes nos frutos pode reduzir os níveis de resíduos, principalmente de resíduos de agrotóxicos não sistêmicos e que a eficiência de remoção nem sempre está correlacionada com a solubilidade dos mesmos em água.

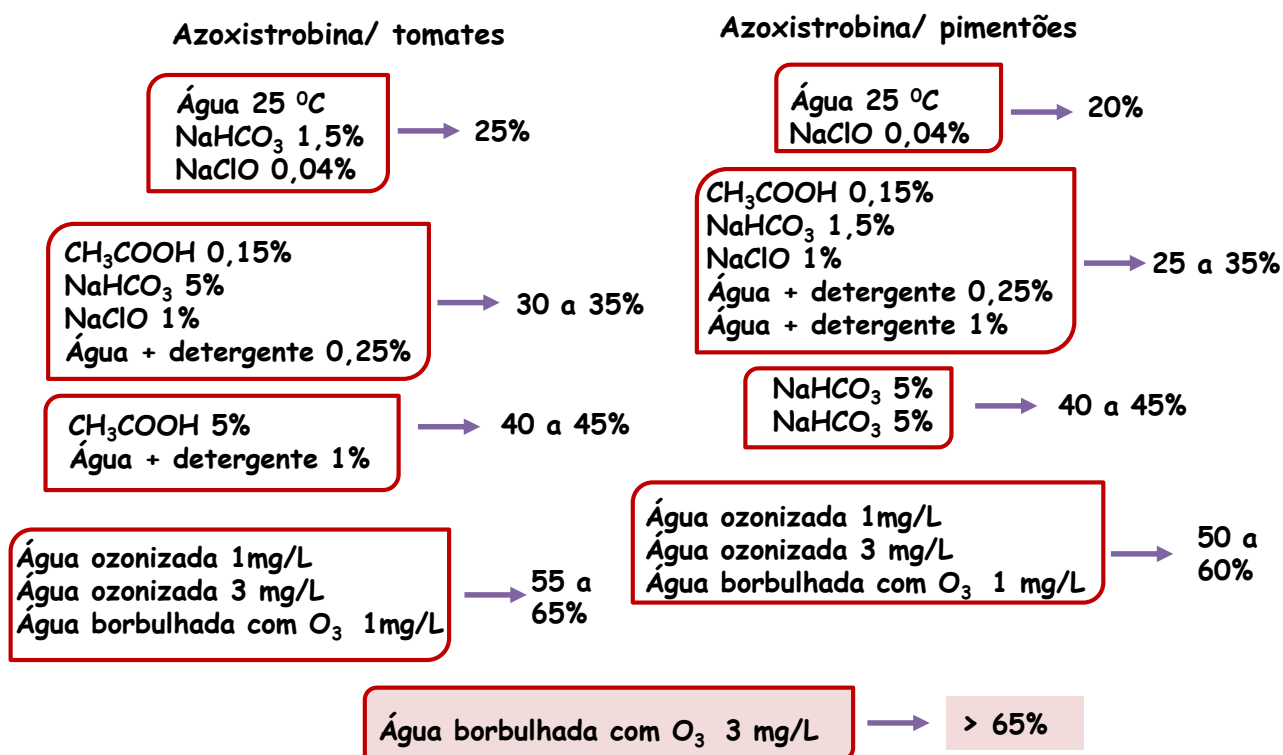
O processo de descascamento se mostrou efetivo na remoção dos resíduos de clorotalonil (88%), difenoconazol (79%) e azoxistrobina (68%) em amostras de tomates, pois a maior parte da contaminação foi encontrada na pele dos frutos. Apesar do apelo positivo para o consumo desta fração dos frutos, por representar uma importante fonte de fibra alimentar na dieta, este consumo deve ser questionado quando ingerido “*in natura*”, sem qualquer método de descontaminação.

Os tratamentos com ozônio demonstraram ser uma alternativa promissora na remoção de resíduos de agrotóxicos, pois independente da forma e da concentração estudada proporcionaram maior eficiência que os métodos tradicionais. Aliado a isso, o ozônio tem a vantagem de ser um forte agente antimicrobiano e oxidante sem deixar resíduos prejudiciais à saúde quando é utilizado de forma adequada.

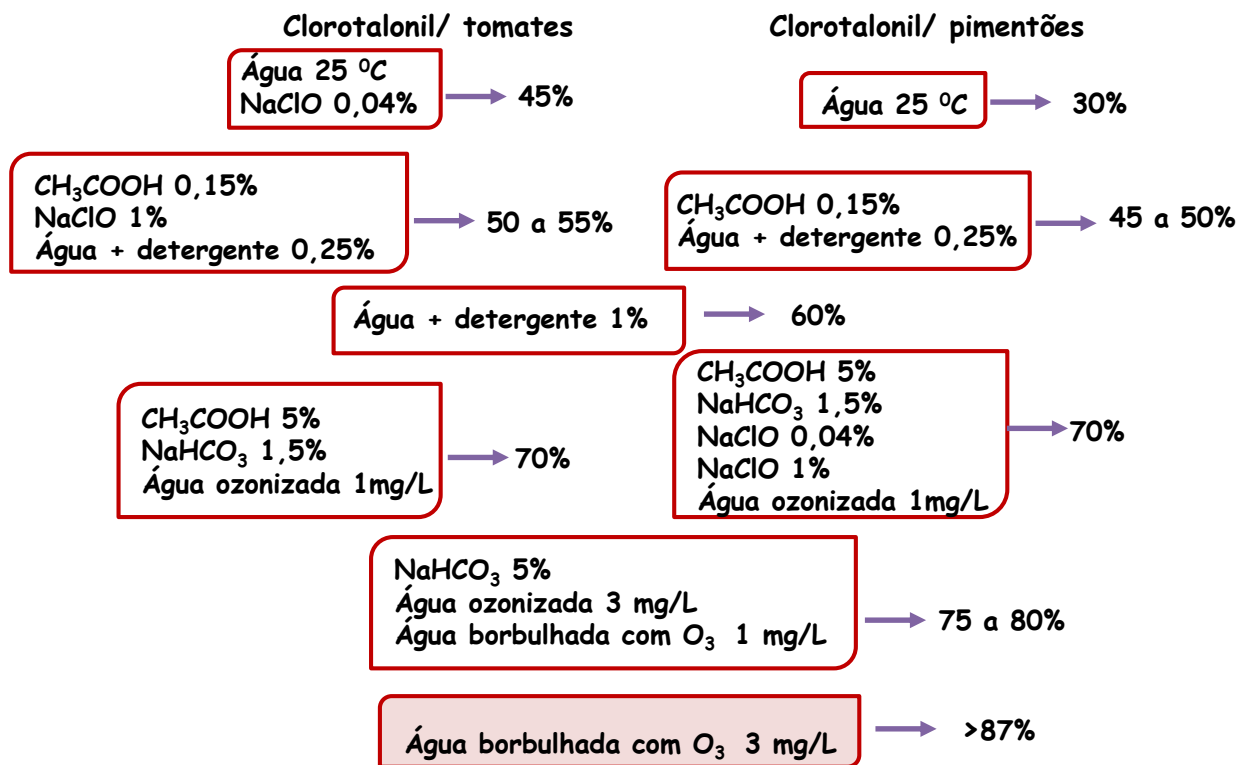
Além da minimização da contaminação de agrotóxicos, visando a segurança alimentar, é necessário que as características físico-químicas dos frutos não sejam prejudicadas. Os parâmetros de qualidade mais afetados foram a perda de massa, acidez e cor. Os maiores danos nos frutos foram causados pelas soluções de maior nível de concentração.

APÊNDICE

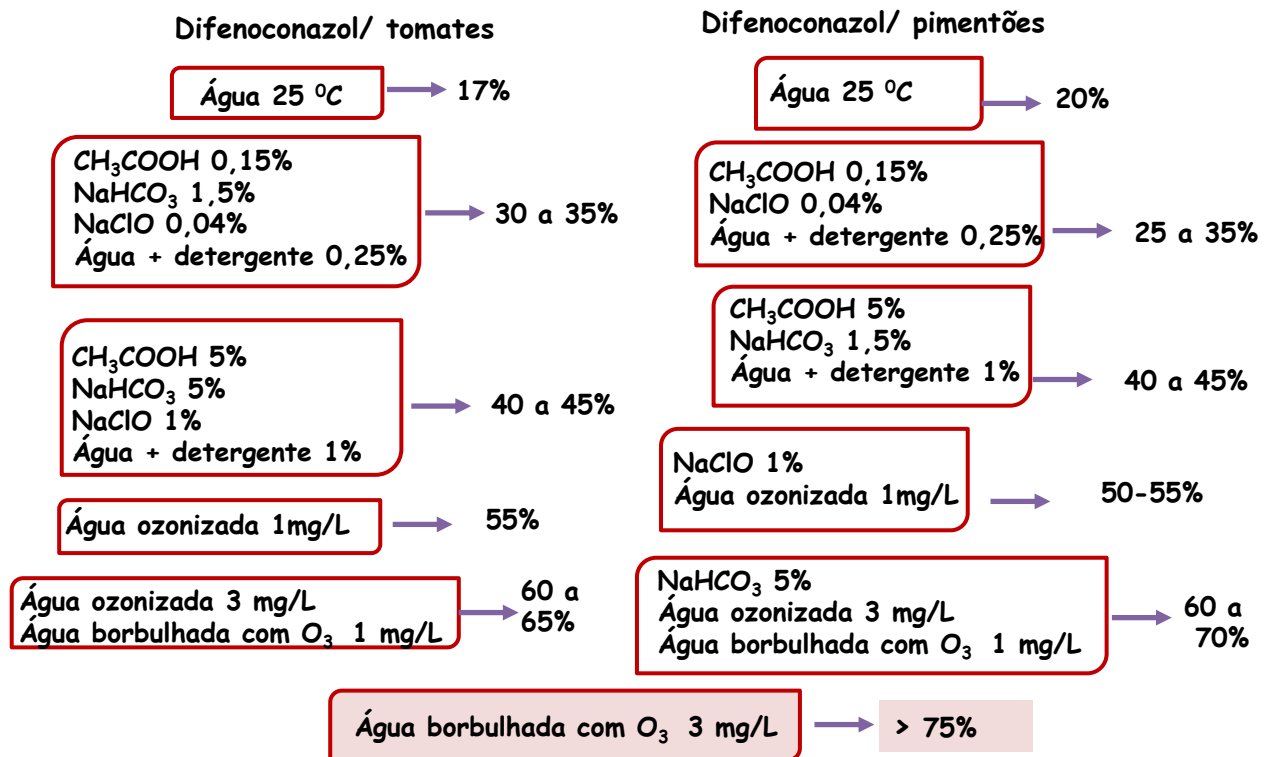
APÊNDICE A- Porcentagem média dos resíduos de azoxistrobina (sistêmico) removidos dos frutos de tomate e pimentão após serem submetidos aos diferentes tratamentos



APÊNDICE B - Porcentagem média dos resíduos de clorotalonil (contato) removidos dos frutos de tomate e pimentão após serem submetidos aos diferentes tratamentos.



APÊNDICE C - Porcentagem média dos resíduos de difenoconazol (sistêmico) removidos dos frutos de tomate e pimentão após serem submetidos aos diferentes tratamentos



APÊNDICE D - Gráficos de resíduos do ajuste linear para os agrotóxicos azoxistrobina, clorotalonil e difenoconazol para a matriz água, tomate e pimentão.

