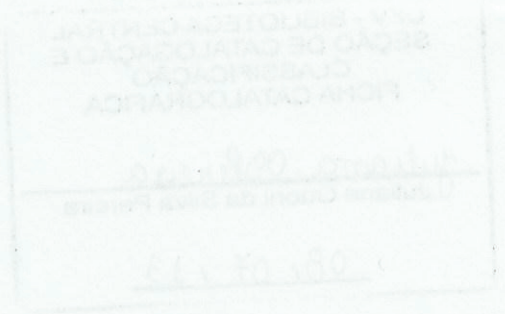


FERNANDA FERNANDES HELENO

**OZONIZAÇÃO: UMA ESTRATÉGIA PARA REMOÇÃO DE
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS**

**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
2013**



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

H474o
2013

Heleno, Fernanda Fernandes, 1980-

Ozonização: uma estratégia para remoção de resíduos de agrotóxicos em alimentos / Fernanda Fernandes Heleno. – Viçosa, MG, 2013.

xii, 86 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 76-86.

1. Fungicidas. 2. Frutas. 3. Ozônio. 4. Extração (Química). 5. Cromatografia a gás. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 632.952

FERNANDA FERNANDES HELENO

OZONIZAÇÃO: UMA ESTRATÉGIA PARA REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS

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: 09 de abril de 2013.

Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

Leda Rita D'Antonino Faroni
(Coorientadora)

Robson José de Cássia Franco Afonso

José Humberto de Queiroz

Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

*Dedico este trabalho a
minha mãe, Ireny.
Que saudade...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar comigo em todos os momentos. Sem Ele não seria possível completar esta importante etapa.

Ao meu pai Dé e meus irmãos Dedeu, Ninha e Naldo pelo amor, compreensão e força.

Ao Rodrigo, pelo apoio, paciência e pelo amor que tem me dedicado.

Às minhas grandes amigas e companheiras Flaviane e Anna Isabel, sempre dispostas a ajudar em todos os aspectos.

À minha orientadora, Maria Eliana, pela confiança, pelas oportunidades e por toda sua dedicação. A sua competência profissional, sua generosidade pessoal e, sobretudo, seu afeto, carinho e amizade tornaram essa jornada extremamente agradável.

Ao professor Antônio Augusto por estar sempre disposto a contribuir com sua experiência e por ter ajudado enormemente nos momentos mais difíceis.

À professora Lêda e ao professor André Fernando pela grande contribuição neste trabalho.

Ao técnico Ricardo pela disponibilidade e boa vontade em ajudar.

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Química, pela recepção e pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, pelo enriquecimento e pela avaliação na tese.

Ao Vitor, Luiz Philip, Guilherme, Sofia, Paula, Lívia França, Bruno, Rafaela, Ana Maria e ao Vinícius pela valiosa contribuição neste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório: Romenique, Carlos, Gustavo, Simone, Renata, Elenice, Alessandra, Elisa, Lívia Carvalho, Bárbara Diniz, Carol, Cláudia, Luiz Manoel, Adley, Isadora, Nívia, Cyntia e Bethânia que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Fernanda Fernandes Heleno, filha de José Moreira Heleno e Ireny Fernandes Heleno, nasceu em 22 de agosto de 1980 em Senador Firmino - MG.

Em 2006, graduou-se no curso Bacharel em Química - Habilitação Química Industrial na Universidade Federal de Ouro Preto. Em novembro de 2011 obteve o título de Licenciada em Química pela Universidade Católica de Brasília.

Em março de 2006, iniciou o Mestrado em Engenharia Ambiental na área de concentração em Saneamento Ambiental na Universidade Federal de Ouro Preto. Defendeu sua dissertação em fevereiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o doutorado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em abril de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Ozônio	4
2. Geração do ozônio	6
2.1. Método fotoquímico	7
2.2. Processo corona	7
2.3. Método eletroquímico	8
3. Quantificação do ozônio	8
4. Efeito do ozônio na remoção de resíduos de agrotóxicos de alimentos.....	10
5. Qualidade dos alimentos tratados com ozônio.....	16
6. Aspectos toxicológicos	17
CAPÍTULO 2. OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO RESIDUAL DE DIFENOCONAZOL EM MORANGO APÓS MÚLTIPLAS APLICAÇÕES	19
1. Introdução	19
2. Material e métodos	20
2.1. Reagentes e soluções.....	20
2.2. Preparo de amostras fortificadas.....	20
2.3. Condições cromatográficas	21
2.4. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT).....	22
<i>Planejamento fatorial completo</i>	22
<i>Planejamento composto central</i>	23

2.5.	Figuras de mérito do procedimento analítico.....	25
2.6.	Avaliação da dissipação de difenoconazol em morango após múltiplas aplicações.....	25
3.	Resultados e discussão	26
3.1.	Otimização dos parâmetros de extração	26
3.2.	Validação do procedimento analítico.....	28
3.3.	Avaliação da dissipação de difenoconazol em morango após múltiplas aplicações.....	30
4.	Conclusões.....	32
CAPÍTULO 3. REMOÇÃO DO DIFENOCONAZOL EM MORANGOS PELA EXPOSIÇÃO AO OZÔNIO.....		34
1.	Introdução	34
2.	Material e métodos.....	35
2.1.	Obtenção do ozônio	35
2.2.	Método para determinação da concentração de ozônio.....	36
2.3.	Câmara de fumigação	38
2.4.	Saturação da câmara	38
2.5.	Fortificação dos morangos com difenoconazol	39
2.6.	Avaliação da remoção do fungicida difenoconazol em morangos.....	39
2.7.	Efeito da aplicação do ozônio na qualidade do morango	39
2.7.1.	Avaliação da cor.....	40
2.7.2.	Perda de massa	40
2.7.3.	Acidez total titulável (AT).....	40
2.7.4.	Medida do pH.....	41
2.7.5.	Sólidos solúveis (SS)	41
2.7.6.	Ácido ascórbico (vitamina C).....	41
3.	Resultados e discussão	42
3.1.	Saturação da câmara	42

3.2.	Remoção do fungicida difenoconazol em morangos	45
3.3.	Efeito do ozônio na qualidade dos frutos de morango	47
3.3.1.	Avaliação da cor	47
3.3.2.	Perda de massa	49
3.3.3.	Acidez titulável (AT)	50
3.3.4.	pH.....	52
3.3.5.	Sólidos solúveis (SS)	53
3.3.6.	Ácido ascórbico (vitamina C).....	54
4.	Conclusões.....	57
CAPÍTULO 4. USO DE OZÔNIO PARA REMOÇÃO DE CLOROTALONIL EM UVAS.....		58
1.	Introdução	58
2.	Material e métodos	59
2.1.	Reagentes e soluções	59
2.2.	Análise de clorotalonil nas amostras de uva	60
2.3.	Validação do método de extração e análise.....	61
2.4.	Obtenção e quantificação do ozônio	62
2.5.	Tratamento das uvas com o fungicida clorotalonil.....	62
2.6.	Remoção do clorotalonil nas uvas contaminadas	62
2.7.	Qualidade da uva após tratamento	63
3.	Resultados e discussão	64
3.1.	Validação do método de análise	64
3.2.	Remoção do fungicida clorotalonil em uvas	66
3.2.1.	Efeito da concentração inicial do fungicida sobre a eficiência dos tratamentos com ozônio.....	66
3.2.2.	Efeito dos tratamentos com ozônio sobre a concentração do fungicida na polpa e na casca dos frutos	67
3.3.	Efeito do ozônio na qualidade das uvas.....	70

4. Conclusão	74
CONCLUSÕES GERAIS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

RESUMO

HELENO, Fernanda Fernandes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Ozonização: uma estratégia para remoção de resíduos de agrotóxicos em alimentos.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Antônio Augusto Neves e Lêda Rita D'Antonino Faroni.

O uso indiscriminado de agrotóxicos e a não observância dos períodos de carência faz com que alguns ingredientes ativos sejam detectados em concentrações acima do limite máximo de resíduo (LMR) em diversos alimentos. Neste contexto, há uma necessidade de se estudar a dissipação de resíduos de agrotóxicos em alimentos em função da aplicação do produto comercial, bem como desenvolver estratégias para remoção ou redução de resíduos de agrotóxicos que permanecem nos alimentos, após a colheita. Os tratamentos utilizando ozônio vêm sendo estudados como alternativa para descontaminação de alimentos, nos últimos anos, por apresentar uma série de vantagens como, por exemplo, o alto potencial de oxidação do ozônio mesmo em baixas concentrações. O presente trabalho consta de três partes. Na primeira parte a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) foi otimizada e validada para a determinação de difenoconazol em amostras de morango por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE). O método apresentou valores de recuperação $\geq 98\%$, repetitividade com coeficientes de variação $\leq 15\%$ e limite de detecção de $9,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. O método foi aplicado para a determinação da dissipação de resíduos difenoconazol em morango após múltiplas aplicações do produto comercial. Os resultados mostraram que ocorre uma dissipação rápida do fungicida, mas que a concentração residual aumenta após múltiplas aplicações. Na segunda parte deste trabalho, o efeito da aplicação de ozônio na redução de resíduos de difenoconazol em morango e a qualidade dos morangos ozonizados foram avaliados. Morangos contaminados com o produto comercial contendo difenoconazol foram expostos ao gás ozônio, nas concentrações de 0,3, 0,6 e 0,8 mg L^{-1} , durante 1 h. Os tratamentos com ozônio reduziram até 95% dos resíduos de difenoconazol nos morangos.

Algumas características desses frutos foram monitoradas durante o armazenamento a 4 °C por 10 dias. Alguns parâmetros como pH, perda de massa e diferença total de cor não foram significativamente ($p > 0,05$) alterados. A fumigação com ozônio afetou significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros sólidos solúveis, acidez titulável e ácido ascórbico (vitamina C), impedindo a queda acentuada dessas características durante o armazenamento. No terceiro capítulo avaliou-se a remoção de clorotalonil de amostras de uva pela imersão das frutas em água destilada borbulhada com ozônio. Essa estratégia permitiu a remoção de 60% do clorotalonil da casca e da polpa das uvas, independente da concentração de ozônio borbulhada. Entretanto, a qualidade dos frutos armazenados a 1 °C por oito semanas foi alterada em função do tratamento. O tratamento das uvas com ozônio na concentração de 3 mg L⁻¹ alterou a maioria dos parâmetros de qualidade avaliados. Já o tratamento das uvas com ozônio a 2 mg L⁻¹ manteve a qualidade dos frutos por um período maior que as uvas controle (sem tratamento com ozônio).

ABSTRACT

HELENO, Fernanda Fernandes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, april 2013. **Ozonation: a strategy for removal of pesticide residues in food.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisers: Antônio Augusto Neves and Lêda Rita D'Antonino Faroni.

The indiscriminate use of pesticides and non-observance of shortage periods causes some active ingredients to be detected at concentrations above the maximum residue limits (MRLs) in various foods. In this context, there is a need of studying the pesticide residues dissipation in food because of the commercial product application, as well as developing strategies for pesticide residues removal, or reduction that remain in food after the harvest. The treatments using ozone have been studied as an alternative for food decontamination in recent years, for presenting a number of advantages, as for example, the ozone high oxidation potential even at low concentrations. The present work consists of three parts. In the first part the solid-liquid extraction with low temperature partition (SLE/LTP) was optimized and validated for the determination of difenoconazole in strawberry samples by gas chromatography with an electron capture detector (GC/ECD). The method showed recovery values $\geq 98\%$, repeatability with variation coefficients $\leq 15\%$ and a detection limit of $9.0 \mu\text{g kg}^{-1}$. The method was applied to determine the difenoconazole residues dissipation in strawberry after repeated applications of the commercial product. The results have shown that there is rapid fungicide dissipation; however the residual concentration increases after multiple applications. In the second part of this work, the ozone application effect on the difenoconazole residues reduction in strawberry, and the quality of ozonated strawberries were evaluated. Strawberries infected with the commercial product containing difenoconazole were exposed to ozone gas at concentrations of 0.3, 0.6 and 0.8 mg L^{-1} for 1 h. The treatments with ozone reduced until 95% of difenoconazole residues in strawberries. Some characteristics of these fruits were monitored during storage at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 days. Some parameters such as pH, mass loss and total color difference were not significantly ($p > 0.05$) changed. The ozone treatment affected significantly ($p < 0.05$) the soluble solids parameters, titratable acidity and ascorbic acid (vitamin C), preventing the sharp decline of these

characteristics during storage. In the third section it was evaluated the chlorothalonil removal of grape samples by the fruits immersion in distilled water bubbled with ozone. This strategy allowed the removal of 60% of chlorothalonil from grapes peel and pulp, regardless the ozone bubbled concentration. However, the quality of the fruit stored at 1 °C for eight weeks was altered because of the treatment. The grapes treatment with ozone at a concentration of 3 mg L⁻¹ changed most of the quality parameters evaluated. The grapes treatment with ozone at 2 mg L⁻¹ maintained the fruit quality for a longer period than the control grapes (the ones with no ozone treatment).

INTRODUÇÃO GERAL

A demanda por alimentos de qualidade tem crescido nos últimos anos, sendo observado, em função disso, um aumento das áreas usadas na agricultura, bem como um aumento do uso de insumos agrícolas para controle de pragas e aumento da quantidade e qualidade dos alimentos. O uso indiscriminado desses insumos (fertilizantes, agrotóxicos e promotores de crescimento) e a não observância dos períodos de carência destes têm ocasionado a contaminação dos alimentos e conseqüentemente, a ingestão de resíduos dessas substâncias pela população.

A maioria dos países possui legislação e órgãos que regulamentam a quantidade máxima de resíduos permitidos em alimentos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pelo estabelecimento desses limites máximos em alimentos comercializados. Para monitorar a qualidade de alguns alimentos, foi criado pela ANVISA, em 2001, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Esse programa publica desde então relatórios informativos sobre a qualidade de alimentos (frutas, hortaliças e grãos) consumidos no país.

Segundo os relatórios publicados pelo PARA, alguns alimentos têm mostrado níveis de contaminação com agrotóxicos acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira. Isso ocorre porque a dissipação do agrotóxico no campo não foi suficiente. Além disso, tem sido detectada a presença de resíduos de princípios ativos não autorizados para determinadas culturas. Dentre estes alimentos, o morango e a uva apresentaram alto índice de irregularidade.

Esses fatos, que também são do conhecimento do público não científico, tem gerado preocupação aos consumidores, que por sua vez criam “receitas” milagrosas com o objetivo de diminuir ou eliminar a contaminação dos alimentos. Mesmo no meio científico estudos realizados com as receitas populares mostram dados contraditórios e difíceis de serem avaliados com segurança, pois dependem do agrotóxico e da matriz. Recomendações como lavar as frutas e hortaliças com água corrente ou por imersão em água e/ou

soluções aquosas contendo diferentes substâncias são encontradas na literatura. Dessas recomendações pode-se afirmar que alguns tratamentos a que os alimentos são submetidos diminuem os níveis de contaminação. Tratamentos como descascamento, cozimento, secagem, moagem, fermentação, lavagem, etc., podem diminuir a contaminação, mas é necessário um estudo mais cuidadoso dos processos para estabelecer a eficiência dos mesmos.

Outro tipo de tratamento que pode contribuir significativamente para a redução dos níveis de contaminação dos alimentos é o tratamento com o ozônio. O ozônio é um gás fortemente oxidante e conhecido pelo seu alto poder de desinfecção. Além disso, tem sido utilizado na indústria alimentícia para aumento do tempo de armazenamento de frutas e hortaliças. A grande vantagem do ozônio é que ao reagir ou degradar não deixa resíduos no alimento, uma vez que o seu produto de degradação é o oxigênio.

O efeito da aplicação de ozônio para descontaminação de alimentos deve ser avaliado pela presença de resíduos de agrotóxicos, de seus produtos de degradação e pela manutenção das características físico-químicas dos alimentos. Nesse sentido, técnicas de extração e análise de resíduos devem ser adaptadas e/ou desenvolvidas e a qualidade do alimento monitorada durante o período de armazenamento.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a dissipação de agrotóxicos e a eficiência de tratamentos com o ozônio (ozônio gasoso e borbulhamento de ozônio em água) para remoção de resíduos de agrotóxicos de frutas como morango e uva.

Como se trata de um produto oxidante foi necessário também avaliar as características físico-químicas dos frutos submetidos ao processo de descontaminação pela aplicação do ozônio. Algumas características que foram avaliadas são: mudança de cor, perda de massa, pH, acidez total titulável, sólidos solúveis (°Brix) e teor de ácido ascórbico (vitamina C), etc., a fim de verificar se o processo de ozonização altera a qualidade destes produtos.

Para um controle rigoroso do processo também foi necessário dispor de métodos analíticos confiáveis para quantificar os níveis de contaminação dos frutos antes e após o tratamento com ozônio. O método para extração de agrotóxicos de uva foi desenvolvido por Soares *et al.* (2010). Nesse trabalho

pretendeu-se otimizar e validar o método de extração de agrotóxico em morango. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE).

CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Ozônio

O ozônio é um gás com o odor característico e pungente. É incolor quando em baixas concentrações e de coloração azulada quando em altas concentrações. Na Tabela 1.1 encontram-se as principais propriedades físico-químicas desse gás.

Tabela 1.1. Propriedades físico-químicas do ozônio.

Propriedades físico-químicas	
Massa molecular	48,00 g mol ⁻¹
Ponto de ebulição (1 atm)	-111,9 °C
Ponto de fusão (1 atm)	-192,5 °C
Temperatura crítica	-12,1 °C
Pressão crítica	5460 kPa
Densidade crítica	540 kg m ⁻³
Calor latente no ponto de ebulição e 1 atm	297 kJ kg ⁻¹
Calor específico a 0 °C e 1 atm	0,767 kJ kg ⁻¹

Fonte: Compressed Gas Association, Inc. Publication CGA P-34, 2001 apud Rakness (2005).

O ozônio (O₃) foi descoberto em 1785, ano em que van Marum observou sua formação através de uma faísca de descarga elétrica em oxigênio (O₂) (Chiattonne *et al.*, 2008). Em 1839, o ozônio foi reconhecido como uma nova substância por Schönbein que estudava a decomposição eletrolítica da água (Tiwari e Rice, 2012). Em seguida, em 1848, Hunt concluiu que o ozônio era a forma alotrópica do oxigênio (Russel *et al.*, 1999; Vidal, 2003). A composição química do ozônio, caracterizada pela forma triatômica do oxigênio, foi estabelecida uma década depois (Silva *et al.*, 2011).

A molécula de ozônio possui uma geometria triangular, onde o átomo de oxigênio central utiliza orbitais sp² para formar ligações σ com os demais oxigênios. Os orbitais p_z dos três oxigênios são utilizados para formar uma ligação π deslocalizada, sendo que as duas ligações desta molécula são equivalentes, com comprimentos iguais e ordem de ligação igual a 1,5 (Lee,

1999). Devido a este arranjo, o ozônio se comporta com um dipolo elétrico e, portanto, pode reagir como um agente eletrofílico ou nucleofílico. De modo geral, nas reações de degradação de compostos orgânicos, o ozônio tende a reagir preferencialmente com compostos insaturados (alquenos, alquinos, anéis aromáticos, etc) quebrando as ligações duplas carbono-carbono (Gottschalk *et al.*, 2009).

O ozônio destaca-se pelo seu elevado potencial de oxidação (2,07 mV) quando comparado a outros agentes oxidantes, sendo o segundo mais poderoso agente oxidante, com potencial inferior apenas ao flúor (3,06 mV) (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2011). Na Tabela 1.2 são apresentados os valores de potenciais de oxidação de diferentes agentes oxidantes.

Tabela 1.2. Agentes oxidantes e os seus respectivos potenciais de oxidação.

Agente oxidante	Potencial de oxidação (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: Manley *et al.* (1967) apud Guzel-Seydim, Greene *et al.* (2004).

O uso do ozônio como oxidante tem suas limitações pela baixa solubilidade em água (Tabela 1.3). A solubilidade do ozônio em água é descrita pelo equilíbrio gás-líquido, e portanto, pela constante de Henry ($K_H = 2,027 \text{ mol atm}^{-1}$, a 25 °C). O fluxo de ozônio e o tempo de contato afetam a taxa de transferência do gás para água, assim como o tamanho das bolhas, pois quanto menores as bolhas formadas, maiores as superfícies de contato (Khadre *et al.*, 2001).

Nos processos de oxidação com ozônio em meio aquoso podem ocorrer dois processos, 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.

Nessa reação indireta, o ânion hidroxila é o principal responsável pela decomposição do ozônio e a reação entre as duas espécies desencadeia uma série de reações radicalares formando radicais hidroxila (Vidal, 2003).

O tipo de reação que irá ocorrer entre o ozônio e os compostos orgânicos depende principalmente da concentração de ozônio e de radicais hidroxilas. Em meio ácido (pH < 4) predomina mecanismos de reação direta, ou seja, via ozônio molecular. À medida que o valor do pH aumenta, maior quantidade de radicais hidroxila são formados. Para valores de pH acima de 10 a decomposição do ozônio em radicais hidroxila é instantânea e o mecanismo de reação indireta predomina. Contudo, em pH em torno de 7 podem ocorrer as duas reações, tanto direta quanto indireta.

Tabela 1.3. Relação da temperatura e da solubilidade do ozônio em água.

Temperatura (°C)	Solubilidade (L de O ₃ /L de H ₂ O)
0,0	0,641
11,8	0,500
15,0	0,456
19,0	0,381
27,0	0,270
32,0	0,195
40,0	0,112
55,0	0,031
60,0	0,000

Fonte: Roth e Sullivan (1981).

2. Geração do ozônio

A reação global para geração do ozônio a partir do oxigênio pode ser descrita como:



$$\Delta H = + 284,5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Esta reação é altamente endotérmica e não é espontânea ($\Delta G = + 161,3$ kJ mol⁻¹). O ozônio não pode ser gerado pela ativação térmica do oxigênio, uma vez que se decompõe rapidamente quando aquecido (Vidal, 2003).

Devido à grande instabilidade do ozônio é necessário gerá-lo no local onde será usado, pois quando exposto ao ar, o gás se decompõe rapidamente (Russel *et al.*, 1999). O ozônio pode ser produzido, principalmente pelos métodos fotoquímico, de descarga elétrica (processo corona) e eletroquímico.

2.1. Método fotoquímico

A geração fotoquímica do ozônio ocorre mediante a reação do oxigênio do ar sob luz ultravioleta em comprimento de onda de 140 a 190 nm. Este método de geração ocorre naturalmente na estratosfera e pode ser reproduzido em laboratório através da radiação emitida por lâmpadas do tipo ultravioleta. Esse procedimento não é utilizado industrialmente devido ao baixo rendimento e ao elevado consumo energético (Langlais, 1991; Vidal, 2003).

2.2. Processo corona

O processo corona, desenvolvido por Von Siemens (1857) é baseado na produção de O₃ a partir da passagem de O₂ gasoso através de uma descarga elétrica. Este método é o mais utilizado, pois gera uma quantidade maior de ozônio com menor custo (Almeida *et al.*, 2004). A Figura 1.1 mostra um esquema do princípio de funcionamento dos geradores de ozônio do tipo corona.

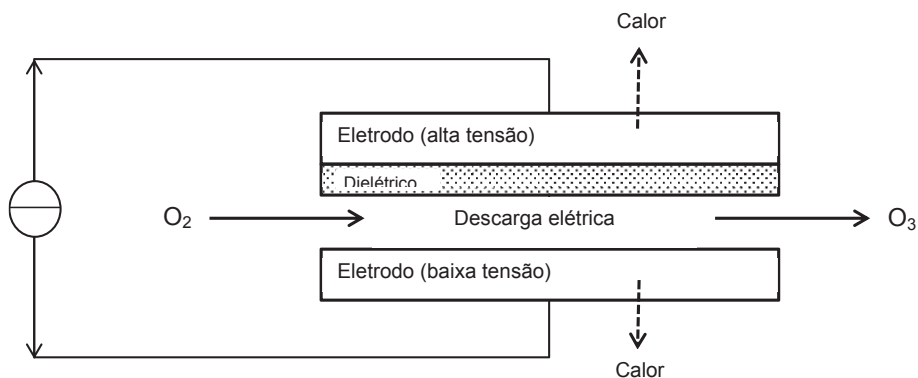


Figura 1.1. Esquema do princípio de funcionamento de ozonizadores do tipo corona adaptado de Rice *et al.* (1981).

Um gerador de ozônio que utiliza o processo corona é constituído por dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000 V). O ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos. Quando os elétrons possuem energia suficiente para dissociar a molécula de oxigênio, começam a ocorrer colisões, que causam a dissociação do oxigênio e a conseqüente formação do ozônio (USEPA, 1999).

Neste método, a eficiência da reação de formação de ozônio é resultante da competição entre os processos de formação e de decomposição ocorrido dentro da corona. A eficiência de formação do ozônio é controlada pela temperatura do gás de entrada, pureza do oxigênio, potência elétrica da corona e pelo fluxo do gás de alimentação (Rice e Netzer, 1984).

2.3. Método eletroquímico

O emprego das tecnologias fotoquímica e corona de produção de ozônio não permitem a obtenção de uma concentração elevada de ozônio na fase gasosa. Isso se deve ao fato das fontes de energia empregadas para promover a dissociação da molécula de oxigênio (radiação UV e arco elétrico) também acarretarem a degradação da molécula de O₃ recém formada, já que a reação ocorre em fase homogênea. A produção eletroquímica de ozônio, ao contrário, possibilita a geração de radicais O^{*} (precursores da molécula de O₃) em uma interface sólido/líquido. Sendo assim, uma vez formadas as moléculas de O₃ na interface, estas podem inicialmente se deslocar para o seio da fase líquida, evitando que a fonte de energia responsável pela sua formação propicie a sua decomposição em moléculas de O₂ (Curti, 2011).

Neste método, a água é convertida em hidrogênio e átomos de oxigênio através de eletrólise. As moléculas de hidrogênio são separadas do gás e da água e os átomos de oxigênio se combinam para formar ozônio e oxigênio diatômico (Kim *et al.*, 2000).

3. Quantificação do ozônio

Os métodos disponíveis para quantificação de ozônio gasoso e dissolvido baseiam-se nas suas propriedades físicas ou na sua considerável reatividade química. Dentre eles, os mais utilizados são os métodos iodométrico, radiação ultravioleta e o colorimétrico do índigo.

O método iodométrico é utilizado para determinar a concentração de ozônio residual tanto gasoso quanto dissolvido. Neste método, os íons iodeto são oxidados a iodo pelo ozônio em uma solução de iodeto de potássio. Então o iodo liberado é titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio. Como o iodeto reage rapidamente, a decomposição do ozônio torna-se um fator que influencia na determinação. Por este motivo, antes da titulação do iodo/tiosulfato, é necessário acidificar o meio para que qualquer íon iodato volte a iodo (Gordon, 1995). Todas as outras espécies oxidantes, além do ozônio, agem como interferentes ao método (USEPA, 1999).

A radiação ultravioleta também pode ser utilizada para determinar a quantidade residual de ozônio gasoso ou dissolvido nos comprimentos de onda de 258-260 nm ou 253,7 nm, que pode ser obtido pelo uso de lâmpadas de mercúrio de baixa pressão e filtros espectrais (Langlais, 1991). Uma desvantagem deste método se deve à incerteza quanto à absorvidade molar do ozônio em águas naturais e ao fato dessas águas poderem conter compostos que absorvem na região do ultravioleta.

O método colorimétrico do índigo, desenvolvido por Bader e Hoigné em 1981 (Cesarino *et al.*, 2011), é o método padrão para medida da concentração do ozônio dissolvido em água. Aceito mundialmente pela EPA (*Environmental Protection Agency*), este método que está no *Standards methods for the examination of water and wastewater* se baseia na oxidação do corante índigo pela molécula do ozônio, causando redução na intensidade da cor azul de uma solução preparada usando ácido fosfórico e índigo trissulfonato de potássio. A medida da absorvância em espectrofotômetro a 600 ± 5 nm e cálculos adequados fornecem a quantidade de ozônio residual dissolvido (Langlais, 1991). Sensível, preciso e rápido, o método do índigo é mais seletivo para o ozônio que os outros métodos utilizados para determinação do ozônio residual em meio aquoso. Manganês, cloro e peróxido de hidrogênio apresentam menos interferência no procedimento com índigo, do que nos outros métodos.

Porém, a presença de cloro acima de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ pode mascarar o ozônio tornando o método inadequado (APHA *et al.*, 2005).

4. Efeito do ozônio na remoção de resíduos de agrotóxicos de alimentos

A maioria dos países possui legislação e órgãos que regulamentam a quantidade máxima de resíduos permitidos em alimentos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pelo estabelecimento desses limites máximos em alimentos comercializados. Para monitorar a qualidade de alguns alimentos, foi criado pela ANVISA, em 2001, o Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Esse programa publica desde então, relatórios informativos sobre a qualidade de alimentos (frutas, hortaliças e grãos) consumidos no país.

Segundo os relatórios publicados pelo PARA, alguns alimentos têm mostrado níveis de contaminação com agrotóxicos acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira. Isso ocorre devido ao uso indiscriminado de agrotóxicos e a não observância dos períodos de carência.

Vários tipos de tratamento têm sido propostos, para remover os resíduos de agrotóxicos dos alimentos e minimizar o risco à saúde. Durante o processamento de alimentos parte dos resíduos de agrotóxicos presentes podem ser parcialmente removidos. Nos processamentos, o uso do calor, vapor, luz e condições ácidas ou básicas podem contribuir para a remoção dos agrotóxicos. Outros processamentos podem também remover fisicamente os contaminantes dos alimentos como o descascamento, limpeza ou aparamento dos alimentos.

A oxidação química é, aparentemente, uma tecnologia importante para resolver os problemas dos agrotóxicos nos alimentos. Deve-se levar em conta que esses processos que fazem uso de substâncias oxidantes podem deixar resíduos nos alimentos. O ideal é fazer uso de oxidantes cujos produtos de sua redução sejam inofensivos à saúde.

Neste contexto os processos de oxidação envolvendo ozônio tem a grande vantagem de não deixar resíduos de sua redução, pois o oxigênio é

inerte e gasoso. Com isso, as variações da técnica de remoção de contaminantes pelo uso do ozônio vêm se tornando alvo de pesquisas intensas. Algumas dessas pesquisas empregam o ozônio para remoção de microrganismos que contribuem para a deterioração do alimento. Como não deixa resíduo e pode eliminar esses microrganismos, essa técnica aumenta a vida de prateleira dos alimentos.

Numa outra linha de pesquisa relacionada com o uso do ozônio como oxidante está a utilização do ozônio gasoso ou dissolvido em água com a finalidade de remoção de resíduos de agrotóxicos nos alimentos (Tabelas 1.4 e 1.5). Nessas pesquisas são avaliadas diferentes formas de aplicação do ozônio e o resultado na remoção dos contaminantes.

Tabela 1.4. Tratamentos com ozônio gasoso para remoção de agrotóxicos em alimentos.

Alimento	Tratamento	Resultado	Ref.
Uva	Fumigação de uvas com 10000 $\mu\text{L L}^{-1}$ (196,3 mg L^{-1}) de ozônio por 1 h.	Resíduos de fenexamida, ciprodinil, pirimetanil e piraclostrobina foram reduzidos em 68,5, 75,4, 83,7 e 100,0%, respectivamente. Resíduos de iprodiona e boscalida não foram reduzidos significativamente.	Gabler <i>et al.</i> (2010)
Uva	Fumigação de uvas com ozônio por 2 h na concentração de 900 ± 12 ppmv ($1,77 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$).	A diminuição de resíduos foi observada apenas para os agrotóxicos fenexamida (~ 64%), ciprodinil (~ 38%) e o pirimetanil (~ 35%).	Walse e Karaca (2011)
Uva	Armazenamento de uvas em atmosfera de ozônio a 0,3 $\mu\text{L L}^{-1}$ (0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$) ou de ar ambiente a 2 °C e 95% UR por 36 dias.	O armazenamento em atmosfera de ozônio acelerou a degradação de resíduos de fenexamida, ciprodinil e pirimetanil, mas não dos resíduos de boscalide ou iprodiona. Ao final de armazenamento, a degradação de fenexamida, ciprodinil, pirimetanil foi 1,6; 2,8 ou 3,6 vezes superior, respectivamente, em atmosfera do ozônio em comparação a do ar.	Karaca <i>et al.</i> (2012)
Lichia	Exposição dos frutos de lichia ao ozônio, nas concentrações de 80, 160, 200, 240 mg L^{-1} por 10, 20, 30 e 60 min, respectivamente.	O tratamento por fumigação com ozônio reduziu os resíduos de clorpirifós nos frutos em 45%.	Whangchai <i>et al.</i> (2011)

Tabela 1.5. Tratamentos com água ozonizada para remoção de agrotóxicos em alimentos.

Alimento	Tratamento	Resultado	Ref.
Maçã	Lavagem das maçãs com água ozonizada a 0,25 mg L ⁻¹ por 15 min.	Os níveis de resíduos de azinfós metílico, captana e cloridrato de formetanato nos frutos foram reduzidos em cerca de 75%, 72% e 46%, respectivamente.	Ong <i>et al.</i> (1996)
Maçã	Imersão de maçãs em água ozonizada contendo O ₃ nas concentrações de 1 e 3 ppm por 30 min.	Os resíduos de mancozebe diminuíram 56-97% com o tratamento com ozônio.	Hwang <i>et al.</i> (2001)
Maçã	Lavagem de maçãs com água ozonizada a 3 ppm por 15 min.	Não foram detectados resíduos de mancozebe nos frutos após o tratamento com ozônio.	Hwang <i>et al.</i> (2002)
Couve pak choi	Imersão das hortaliças em água ozonizada (1,4 e 2,0 mg L ⁻¹) por 15 e 30 min e em duas temperaturas diferentes (14 e 24 °C).	A lavagem com 1,4 mg L ⁻¹ de água ozonizada por 15 min removeu os resíduos dos agrotóxicos em 27-34%. A lavagem com maior concentração de ozônio dissolvido (2,0 mg L ⁻¹), aumentou a eficácia da remoção dos agrotóxicos para 30-54%. O aumento do tempo de lavagem para 30 min aumentou a remoção para 45-61%.	Wu <i>et al.</i> (2007) e Wu <i>et al.</i> (2007)
Alface, Tomate cereja	Imersão dos frutos e hortaliças em água ozonizada (2,0 ppm) mantida por microbolhas	A remoção de resíduos de fenitrotiona aumentou com o aumento do tempo de tratamento e da concentração	Ikeura <i>et al.</i> (2011b)

e morango	de ozônio através de um borbulhamento contínuo. O tempo de imersão variou em 0, 5, ou 10 min e temperatura foi mantida a 20 °C durante todo tratamento.	de ozônio dissolvido. Houve uma redução de 55% dos resíduos em 5 min e 58% após 10 min. Nos tomates cereja e nos morangos, após 10 min de tratamento os resíduos foram reduzidos em 35% e 25%, respectivamente.	
Alface, tomate cereja e morango	Imersão em água ozonizada (2,0 ppm) mantida por microbolhas de ozônio geradas por descompressão ou circulação gás-água. O tempo de imersão variou em 0, 5, ou 10 min e temperatura foi mantida a 20 °C durante todo tratamento.	A remoção de fenitrotona pelos tratamentos com microbolhas geradas por descompressão e circulação gás-água em alface foi de 56% e 45% em 5 min, e 67% e 55% após 10 min, respectivamente. Nos tomates cereja, após 5 min foram removidos 11% e 3% e após 10 min a remoção foi de 16% e 5%, respectivamente. Nos morangos, a remoção foi de 22% e 3% em 5 min e 38% e 13% em 10 min.	Ikeura <i>et al.</i> (2011a)
Lichia	Imersão dos frutos em água ozonizada, nas concentrações de 2,2; 2,4; 3,4 e 3,2 mg. L ⁻¹ por 10, 20, 30 e 60 min, respectivamente.	O tratamento com água ozonizada reduziu a concentração de clorpirifós nos frutos em 10,3%.	Whangchai <i>et al.</i> (2011)
Repolho branco chinês e Acelga	Imersão das hortaliças em água borbulhada com duas concentrações de ozônio (250 ou 500 mg h ⁻¹) por 15 min.	Quando se borbulhou ozônio a 250 mg h ⁻¹ por 15 min a remoção dos resíduos de clorfluazuron, clorotalonil e permetrina teve aumento de 10% em relação à	Chen <i>et al.</i> (2013)

chinesa (bok choy)			lavagem sem ozônio. Quando a concentração de ozônio borbulhado foi aumentada para 500 mg h ⁻¹ , as remoções foram melhoradas em 20%.	
Alface e tomate cereja	Imersão de alface e tomate em água ozonizada mantida a 2,0 ppm por microbolhas de ozônio (2,0 L min ⁻¹). A temperatura da água (15, 20, 25 e 30 °C) e o tempo de imersão (0, 5, 10, 15 e 20 min) também foram avaliados.		A remoção dos resíduos de fenitrotona em alface e tomates cereja foi maior utilizando-se temperaturas mais elevadas da água ozonizada.	Ikeura <i>et al.</i> 2013

5. Qualidade dos alimentos tratados com ozônio

Como mencionado anteriormente várias publicações sobre a remoção de contaminantes com ozônio são encontradas na literatura. As formas de uso do ozônio são normalmente a fumigação do gás nos alimentos ou a imersão dos alimentos em água saturada com o gás.

Além de ser efetivo na remoção de contaminantes é desejável que o alimento mantenha suas propriedades físico-químicas após o tratamento com ozônio.

O efeito do tratamento com ozônio na qualidade pós-colheita de morango foi avaliado por Pérez e colaboradores (1999). Os morangos foram armazenados a 2 °C em uma atmosfera contendo ozônio (0,35 ppm). Após 3 dias a 2 °C, os frutos foram transferidos para 20 °C para simular as condições de varejo (vida de prateleira). As alterações em vários parâmetros de qualidade, tais como cor, açúcares, ácidos e aroma foram avaliados durante a vida de prateleira dos morangos. O tratamento com ozônio causou diferenças significativas nos açúcares e ácido ascórbico. No fim do armazenamento a frio, o teor de vitamina C nos morangos ozonizados foi 3 vezes maior do que nos frutos do controle. Foi observado um efeito prejudicial do tratamento com ozônio no aroma dos morangos, com uma redução de 40% na emissão de ésteres voláteis.

Segundo Salvador e colaboradores (2006) a exposição de caqui ao gás ozônio (0,15 ppm v/v) manteve a firmeza nos limites comerciais, mesmo após 30 dias. Os frutos tratados com ozônio apresentaram maiores valores de perda de massa e condutividade elétrica. O ozônio não afetou a cor, teor de etanol, sólidos solúveis totais e pH. Foram observadas pequenas diferenças entre o acetaldeído dos frutos submetidos ao tratamento com ozônio e frutos controle. Durante o armazenamento de kiwi por 4-6 meses em câmaras frigoríficas industriais a 0 °C ou câmaras de ozônio industriais, a massa, a firmeza e a acidez diminuíram, enquanto que o °Brix e o pH aumentaram. As concentrações dos principais açúcares solúveis presentes no kiwi aumentaram durante os dois armazenamentos. Durante o armazenamento na câmara de

ozônio, as concentrações de ácidos orgânicos não voláteis diminuíram acentuadamente após 25 semanas (Barboni *et al.*, 2010).

Tzortzakis e colaboradores (2007) avaliaram a qualidade de tomates durante e após o tratamento com ozônio em concentrações que variam entre 0,005 (controles) e 1,0 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ a 13 °C e 95% de umidade relativa. O ozônio manteve a firmeza dos frutos em comparação com os armazenados em ar. O tratamento com ozônio não afetou a perda de massa dos frutos, os níveis de antioxidantes, a troca $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, a produção de etileno, ácidos orgânicos, vitamina C e conteúdo fenólico total.

Também em tomates, Rodoni e colaboradores (2010), avaliaram o efeito de tratamento com ozônio gasoso (10 $\mu\text{L L}^{-1}$) por 10 min. Os tratamentos não modificaram a cor dos tomates, o teor de açúcar, a acidez ou a capacidade antioxidante, mas reduziram a perda de massa e induziram o acúmulo de compostos fenólicos. Além disso, o amolecimento dos frutos foi atrasado pelo tratamento com ozônio.

6. Aspectos toxicológicos

Os níveis elevados de ozônio são danosos e podem ser prejudiciais à saúde humana. Sendo assim, é importante monitorar as pessoas que tem contato com o ozônio na indústria. Nos seres humanos o ozônio afeta principalmente o trato respiratório.

Uma concentração de ozônio da ordem de 0,1 mg L^{-1} pode causar irritação ao nariz, garganta e olhos. Pesquisadores alegam que concentrações de ozônio de 0,02 a 0,04 mg L^{-1} podem ser detectadas pelo ser humano e que a exposição prolongada a concentrações iguais ou superiores a 1,0 mg L^{-1} pode causar a morte. Uma exposição de uma hora a concentrações de 2, 4, 15 e 95 mg L^{-1} pode causar efeitos sintomáticos, irritantes, tóxicos e letais, respectivamente (Kim *et al.*, 2000).

Devido à sua alta instabilidade, o ozônio não deixa resíduos nos alimentos. No entanto, muitos problemas são encontrados para a efetiva degradação dos agrotóxicos, sendo que, muitas vezes a completa

mineralização destes não é conseguida, implicando na geração de subprodutos muitas vezes mais tóxicos do que o próprio agrotóxico.

Hwang e colaboradores (2002) relataram que, na degradação de alguns agrotóxicos organofosforados, os subprodutos podem ter uma toxicidade maior do que os próprios agrotóxicos originais. Além disso, os produtos formulados dos agrotóxicos também contêm diferentes ingredientes, chamados de "ingredientes inertes", tais como solventes, surfactantes, transportadores e intensificadores de ingredientes ativos. Como resultado, a amostra ozonizada tende a conter variedades de subprodutos originados do agrotóxico e de outros componentes da fórmula (Ikehata e Gamal El-Din, 2005). Neste caso, não se pode dizer que o risco do uso de agrotóxicos na dieta pode ser completamente removido pela ozonização, a menos que os subprodutos da degradação sejam comprovadamente seguros.

CAPÍTULO 2 OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO RESIDUAL DE DIFENOCONAZOL EM MORANGO APÓS MÚLTIPLAS APLICAÇÕES

1. Introdução

O difenoconazol (*cis-trans*-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il]fenil 4-clorofenil eter) (Figura 2.1) é um fungicida sistêmico empregado no controle da mancha-de-mycosphaerella ou mancha-foliar causada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae* (Barbosa, 2010). Esse princípio ativo é indicado para aplicação foliar em diferentes culturas, como maçã, uva, pimentão, tomate e morango.

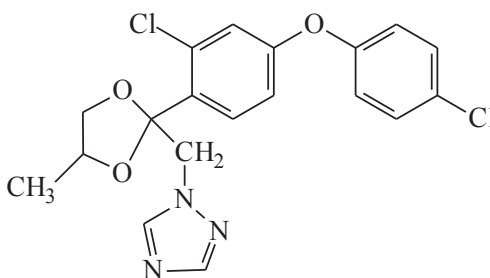


Figura 2.1. Estrutura química do difenoconazol.

O uso indiscriminado de agrotóxicos e a não observância dos períodos de carência faz com que estes sejam detectados em concentrações acima do limite máximo de resíduo (LMR) em diversos alimentos (Jardim e Caldas, 2012). Nos alimentos consumidos *in natura* como o morango esse problema torna-se um pouco mais sério uma vez que a população é exposta diretamente ao agrotóxico. O LMR de difenoconazol estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para essa cultura é de 500 µg de princípio ativo por kg de morango (ANVISA, 2012).

O morango, cada vez mais, vem se destacando por estar presente na lista dos alimentos mais contaminados por resíduos de agrotóxicos no Brasil, por vários anos consecutivos (Oshita e Jardim, 2012).

A extração do difenoconazol em matrizes vegetais tem sido realizada em duas etapas, uma extração com solventes orgânicos e uma etapa de *clean-up*

em cartuchos de extração em fase sólida (Schermerhorn *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; El Mouden *et al.*, 2009). Uma outra técnica que vem sendo empregada para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT), que possui a vantagem de realizar os processos de extração do analito e *clean-up* do extrato simultaneamente, além de baixo consumo de amostra e reagentes (Vieira *et al.*, 2007; Marthe *et al.*, 2010; Pinho *et al.*, 2010).

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar o método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura e análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (ESL/PBT-CG/DCE) para monitorar a concentração residual de difenoconazol em morangos que receberam múltiplas aplicações foliares desse princípio ativo.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram acetato de etila (99,5% v/v) e acetonitrila (99,5% v/v) adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), e cloreto de sódio (99,0% m/m) e ácido acético (99,7% v/v) adquiridos da Isofar (Duque de Caxias, Brasil).

Solução padrão estoque de difenoconazol, na concentração de 1000,0 mg L⁻¹, foi preparada pela solubilização do padrão de difenoconazol (97,0% m/m) adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) em acetonitrila. A solução de trabalho contendo o agrotóxico difenoconazol na concentração de 50,0 mg L⁻¹, foi preparada a partir da diluição da solução padrão estoque, com o mesmo solvente. Estas soluções foram armazenadas em *freezer* à temperatura de aproximadamente -20 °C.

2.2. Preparo de amostras fortificadas

Para a otimização e validação da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) e análise por CG/DCE foram utilizados morangos isentos de agrotóxicos. Os morangos foram picados e triturados em *mixer* (Walita, São Paulo, Brasil) até total homogeneização. Em seguida, 4,0000 g (Sartorius, Göttingen, Alemanha) de polpa foram colocados em frascos de vidro transparente com capacidade de 22,0 mL, e fortificados com 80 µL da solução de trabalho (50,0 mg L⁻¹). Essas amostras de morango fortificadas foram deixadas em repouso por 3 h em recipiente aberto e posteriormente, submetidas ao método de ESL/PBT.

2.3. Condições cromatográficas

Para determinação do analito de interesse foi empregado um cromatógrafo a gás (modelo GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector por captura de elétrons (CG/DCE), equipado com auto injetor AOC-20i. A temperatura do detector foi mantida em 300 °C, o nitrogênio (Air Products, São Paulo, Brasil, 99,999% de pureza) foi empregado como gás de arraste e as injeções foram feitas com divisão de fluxo (*split*) de 1:5. As separações foram realizadas em uma coluna capilar DB-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), com fase estacionária (5%-fenil)-metilpolissiloxano, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de espessura de filme.

Para determinação de difenoconazol após extração por ESL/PBT foi empregada a seguinte programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 200 °C com rampa de aquecimento de 20 °C min⁻¹ até 290 °C, sendo esta temperatura mantida por 4,5 min. A temperatura do injetor foi mantida em 280 °C e o fluxo do gás de arraste empregado foi de 1,2 mL min⁻¹. O volume injetado foi de 1,0 µL e o tempo total de análise foi de 9 min. As corridas foram gerenciadas pelo *software* GCsolution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

O difenoconazol foi identificado por comparação do tempo de retenção do pico presente nos extratos das amostras com o tempo de retenção do padrão. A quantificação foi feita empregando o método de superposição de matriz (Ribani *et al.*, 2004).

2.4. Otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT)

A otimização da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) para análise de difenoconazol em amostras de morango foi adaptada das técnicas para extração em leite (Goulart *et al.*, 2008) e tomate (Pinho *et al.*, 2010).

Nesta técnica 4,0000 g de polpa de morangos foram colocados em contato com a solução extratora. Após agitação e centrifugação, a mistura foi deixada em *freezer* a -20 °C para separação das fases pelo congelamento da polpa. O extrato orgânico foi analisado por CG/DCE.

A técnica foi otimizada multivariadamente avaliando os seguintes parâmetros: tipo de solução extratora, razão massa de amostra:volume de solução extratora e tempos de agitação, centrifugação e refrigeração. Um planejamento fatorial completo e um planejamento composto central foram utilizados para a otimização desses parâmetros.

Planejamento fatorial completo

Foi empregado um planejamento fatorial completo, 2², para avaliação do comportamento simultâneo dos fatores em dois níveis: tipo de solução extratora e razão massa de amostra:volume de solução extratora. As análises foram realizadas em duplicata e os dados do planejamento são mostrados na Tabela 2.1.

As melhores condições dos planejamentos foram avaliadas em função das respostas cromatográficas (áreas) obtidas em cada ensaio. Esses dados foram analisados empregando o *software* Statistica (versão 8, StatSoft Corp., Tulsa, EUA).

Tabela 2.1. Planejamento fatorial 2², em duplicata, realizado para estabelecer as melhores condições para extração de difenoconazol de amostras de morango.

Ensaio	Fatores		Fatores	
	(Valores Codificados)		(Valores Reais)	
	SE	A/SE	SE	A/SE
1	-	-	ACN	4 g/4 mL
2	+	-	ACN/ACE	4 g/4 mL
3	-	+	ACN	4 g/8 mL
4	+	+	ACN/ACE	4 g/8 mL
5	-	-	ACN	4 g/4 mL
6	+	-	ACN/ACE	4 g/4 mL
7	-	+	ACN	4 g/8 mL
8	+	+	ACN/ACE	4 g/8 mL

A = amostra; SE = solução extratora; ACN = acetonitrila; ACE = acetato de etila; ACN/ACE = mistura dos dois solventes na proporção 81,25/18,75 v/v.

Planejamento composto central

Na otimização do processo de extração, os tempos de agitação em mesa agitadora (Tecnal - modelo TE 420, Piracicaba, Brasil) a 200 rpm, de centrifugação (Centrífuga Excelsa II, modelo 206MP, FANEM, São Paulo, Brasil) a 560 g e o tempo de partição a baixa temperatura no *freezer* (Consul, modelo 280, São Paulo, Brasil) a - 20 °C, foram avaliados por um planejamento composto central. O planejamento empregado foi o fatorial 2³ com cinco pontos centrais e extensão axial, totalizando 19 ensaios (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Planejamento composto central realizado para estabelecer as melhores condições para extração de difenoconazol de amostras de morango.

Ensaio	Fatores (Valores Codificados)			Fatores (Valores Reais)		
	A	C	R	A (min)	C (min)	R (h)
1	-	-	-	10,00	3,00	5,00
2	-	-	+	10,00	3,00	12,00
3	-	+	-	10,00	5,00	5,00
4	-	+	+	10,00	5,00	12,00
5	+	-	-	20,00	3,00	5,00
6	+	-	+	20,00	3,00	12,00
7	+	+	-	20,00	5,00	5,00
8	+	+	+	20,00	5,00	12,00
9	- α	0	0	6,59	4,00	8,50
10	α	0	0	23,41	4,00	8,50
11	0	- α	0	15,00	2,32	8,50
12	0	α	0	15,00	5,68	8,50
13	0	0	- α	15,00	4,00	2,61
14	0	0	α	15,00	4,00	14,39
15 C	0	0	0	15,00	4,00	8,50
16 C	0	0	0	15,00	4,00	8,50
17 C	0	0	0	15,00	4,00	8,50
18 C	0	0	0	15,00	4,00	8,50
19 C	0	0	0	15,00	4,00	8,50

A = tempo de agitação; C = tempo de centrifugação; R = tempo de refrigeração.

2.5. Figuras de mérito do procedimento analítico

A linearidade foi avaliada pela curva analítica obtida pela análise dos extratos de amostras fortificadas com concentrações de difenoconazol que variaram de 250 - 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($n = 42$, sete pontos em triplicata e uma reinjeção). A relação matemática entre o sinal (resposta) e a concentração do analito de interesse foi expressa pela equação da curva analítica e o seu coeficiente de correlação (r). Os parâmetros de desempenho para o método foram avaliados: seletividade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão/recuperação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do analito.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pela relação entre a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva analítica. O valor resultante foi multiplicado por 3,3 para obter o LD e por 10 para obter o LQ (Ribani *et al.*, 2004).

A precisão foi expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária. Para determinar a repetitividade, as amostras foram fortificadas em seis replicatas e em três concentrações (250, 500 e 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Para determinar a precisão intermediária, as amostras foram fortificadas em seis replicatas, em três concentrações (250, 500 e 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e em três dias consecutivos. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação.

A exatidão foi determinada a partir de ensaios de recuperação em que quantidades conhecidas de analito foram adicionadas à amostra em seis replicatas de três concentrações diferentes (250, 500 e 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação.

2.6. Avaliação da dissipação de difenoconazol em morango após múltiplas aplicações

O experimento foi conduzido em casa de vegetação empregando 40 vasos (3,0 L de capacidade) contendo quatro plantas de morango por vaso. A irrigação foi feita diretamente no solo, duas vezes por semana. O produto

comercial do fungicida difenoconazol (250 g L^{-1}) foi pulverizado nas folhas, na dosagem recomendada para o produto utilizado (40 mL ha^{-1}) três dias antes da primeira colheita dos frutos. Esse produto comercial pode ser aplicado até seis vezes na cultura do morango, com intervalos de 14 dias entre as aplicações (Barbosa, 2010). Em função disso, foram feitas seis aplicações com o produto comercial, respeitando o intervalo de 14 dias entre cada tratamento. As amostras de morango foram coletadas no 3° e 7° dia depois de cada aplicação, totalizando 77 dias de monitoramento. Depois de colhidos, os frutos foram transportados para o laboratório, onde foram triturados em *mixer* e armazenados em *freezer*. Essas amostras foram submetidas ao método de extração ESL/PBT e os extratos foram analisados por CG/DCE.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização dos parâmetros de extração

A eficiência da extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) pode sofrer a influência de alguns fatores como a escolha da solução extratora, tempos de agitação, de centrifugação e de refrigeração e da razão massa de amostra/volume de solução extratora. A escolha correta do melhor conjunto de parâmetros de trabalho leva a maior frequência analítica (menor tempo de extração), boa sensibilidade e precisão. Para avaliar a melhor solução extratora (acetonitrila ou uma mistura de acetonitrila:acetato de etila - 81,25/18,75 v/v) e a redução do seu volume no preparo de amostra um planejamento fatorial completo, 2^2 , foi empregado. Na Figura 2.2 é apresentado o gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores solução extratora e razão massa de amostra/volume de solução extratora sobre a extração do difenoconazol.

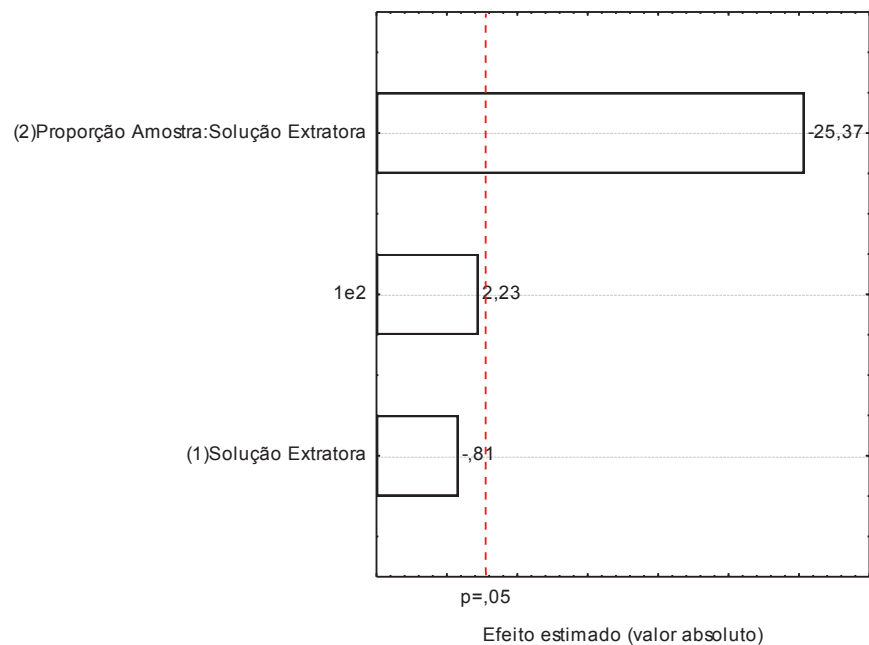


Figura 2.2. Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores solução extratora e razão amostra/solução extratora sobre a extração do difenoconazol de amostras de morango.

Pela análise dos efeitos dos fatores sobre a resposta cromatográfica do difenoconazol verificou-se que o fator solução extratora não apresentou efeito principal significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Isto é, diminuir a polaridade com a adição de acetato de etila à solução extratora não interferiu significativamente no método. Já a proporção massa de amostra/volume de solução extratora no nível mais baixo (4 g/4 mL) apresentou efeito significativo, melhorando a resposta cromatográfica do difenoconazol. Deste modo, optou-se pelo uso de 4 mL acetonitrila como solvente extrator e 4 g de amostra.

A otimização dos tempos de agitação, centrifugação e refrigeração, tendo como resposta a área cromatográfica, foi realizada de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 com cinco repetições no ponto central e extensão axial (composto central). Na Figura 2.3 é apresentado o gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores tempos de agitação, centrifugação e refrigeração sobre a extração do difenoconazol.

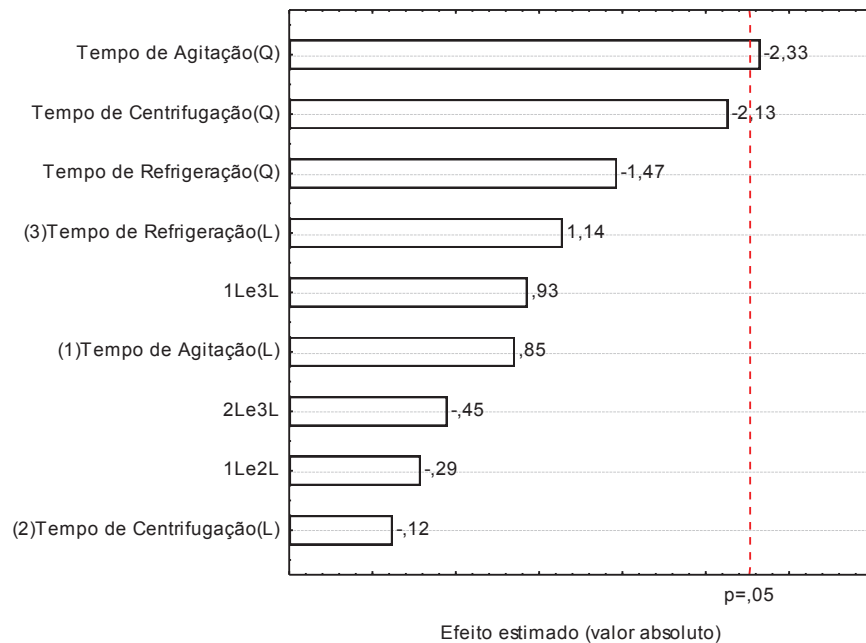


Figura 2.3. Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores tempos de agitação, centrifugação e refrigeração sobre a extração do difenoconazol de amostras de morango.

Pela análise dos efeitos dos fatores sobre os agrotóxicos verificou-se que apenas o fator tempo de agitação foi significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Pelos valores críticos, as melhores condições experimentais foram: 17 min de agitação (200 rpm), 4 min de centrifugação (560 g) e 10 h de refrigeração ($\sim -20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Levando-se em consideração os resultados da otimização e aspectos práticos da técnica, o método de ESL/PBT consiste em adicionar a 4,0000 g de amostra de morango 4,0 mL de acetonitrila. Essa mistura é agitada por 17 min em mesa agitadora, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 200 rpm e posteriormente centrifugada por 4 min a 560 g e deixada resfriar em *freezer* a aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 h. Do extrato sobrenadante retira-se 1,8 mL para análise cromatográfica.

A técnica ESL/PBT otimizada apresenta baixo consumo de amostra e solvente extrator, não sendo necessário implementar etapas de evaporação e troca de solvente, o que reduz os riscos de contaminação e perdas de amostras.

3.2. Validação do procedimento analítico

Para avaliar a seletividade, o método otimizado foi aplicado em frutos de morango isentos de agrotóxicos. Posteriormente, essas amostras foram fortificadas com difenoconazol e submetidas novamente ao método de extração e análise. Os cromatogramas referentes a essas amostras foram comparados, não sendo observado nenhum interferente com resposta no tempo de retenção do analito de interesse (Figura 2.4). O pico duplo observado no cromatograma corresponde aos isômeros estruturais do difenoconazol.

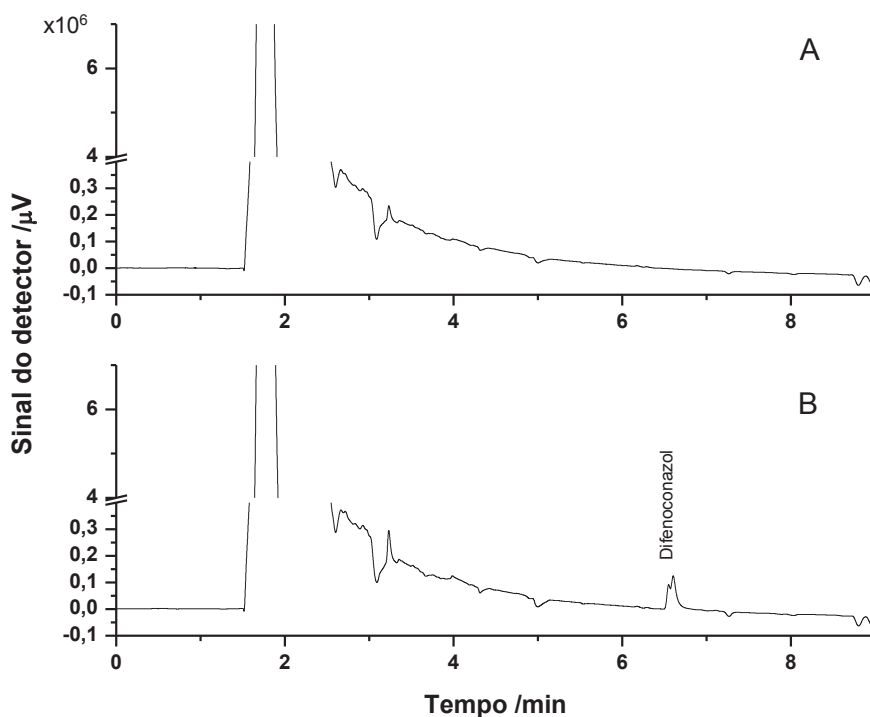


Figura 2.4. Cromatogramas de extratos obtidos de uma amostra de morango (A) isenta de difenoconazol; (B) contendo difenoconazol a $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ com $t_R = 6,6 \text{ min}$.

Para avaliar a linearidade do método, foi obtida a equação da curva analítica por meio de regressão linear ($y = 697660x + 10180$) no intervalo entre $250\text{-}1000 \text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ na matriz. Foram empregados sete níveis e coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,995. Esse valor indica a boa linearidade de resposta do método para o difenoconazol em concentrações próximas ao LMR (INMETRO, 2010). Para verificar se o ajuste linear foi adequado à curva analítica, plotou-se o gráfico de resíduos e aplicou-se o teste de Cochran dos

dados. Os valores de Cochran calculados foram inferiores ao valor de Cochran tabelado, mostrando variâncias homogêneas conforme o aumento da concentração. A variância dos erros foi constante para as concentrações estudadas, sendo os resíduos distribuídos aleatoriamente em torno do zero. Este resultado indica que ao longo da faixa de concentração estudada o modelo tem um comportamento homocedástico.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método estimados pelos parâmetros da curva analítica foram 9 e 31 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. O LQ obtido está bem abaixo dos LMRs estabelecidos pela Agência de Vigilância Sanitária Brasileira (ANVISA, 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e pela União Europeia (EU, 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

A repetitividade foi avaliada em três níveis de concentração (250, 500 e 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$) sendo os valores obtidos de coeficiente de variação (CV) iguais a 11,69; 5,89; 6,99%, respectivamente. A precisão intermediária também foi avaliada pelo valor do CV, obtido depois de análises executadas em três dias consecutivos. Em cada ensaio seis amostras de cada nível de concentração (250, 500 e 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$) foram analisadas por um mesmo analista, no mesmo laboratório, sob as mesmas condições de trabalho. Os valores de CV obtidos foram de 15,49; 9,57 e 8,21%, respectivamente.

As recuperações foram $98 \pm 12\%$ (250 $\mu\text{g kg}^{-1}$), $109 \pm 6\%$ (500 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e $103 \pm 7\%$ (750 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Para a análise de resíduos de agrotóxicos o procedimento analítico deve ser capaz de recuperar, em cada nível de fortificação, de 70 a 120% em média, com uma precisão de $\text{CV} \leq 20\%$ (Brasil, 2011). Uma vez que os valores obtidos estão dentro deste intervalo, pode-se concluir que a recuperação e o coeficiente de variação para difenoconazol são adequados.

3.3. Avaliação da dissipação de difenoconazol em morango após múltiplas aplicações

A ESL/PBT vem sendo utilizada para extração de diversos agrotóxicos em diferentes matrizes com resultados satisfatórios (Marthe *et al.*, 2010; Pinho *et al.*, 2010). Além de promover uma extração eficiente dos analitos, a técnica

tem a vantagem de realizar simultaneamente os processos de extração e *clean-up*.

Alguns autores descrevem a dissipação de agrotóxicos em diferentes matrizes, entretanto não mostram o efeito de aplicações sucessivas sobre a dissipação dos mesmos (Geng *et al.*, 2012; Malhat e Mahmoud, 2012; Sun *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Abd-Alrahman e Ahmed, 2013; You *et al.*, 2013).

A ESL/PBT foi aplicada para avaliar a dissipação do fungicida sistêmico difenoconazol em morangos durante seis aplicações sucessivas do produto comercial. As concentrações residuais de difenoconazol determinadas, em triplicata, durante os seis tratamentos nos diferentes dias são apresentadas na Figura 2.5.

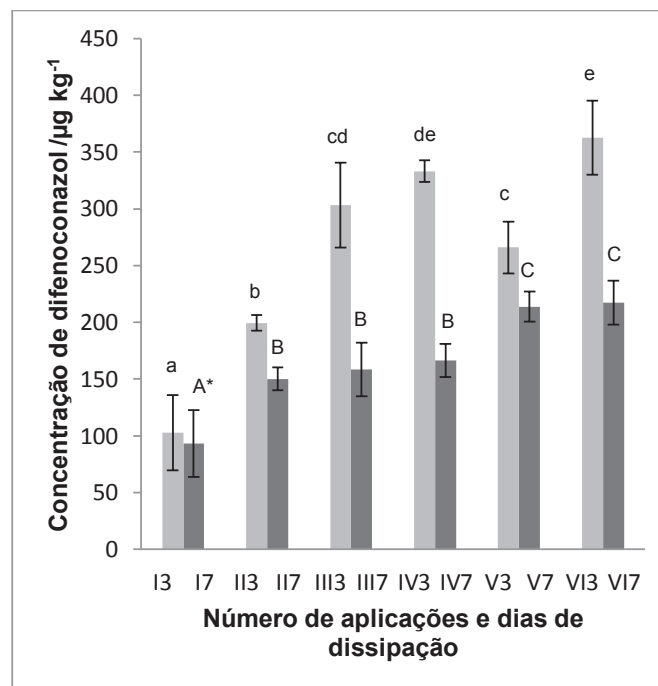


Figura 2.5. Concentrações residuais de difenoconazol em morangos depois de múltiplas aplicações. Algarismos romanos (I a VI) representam as seis aplicações e algarismos arábicos (3 e 7) os números de dias após a aplicação. Letras iguais não diferem entre si no teste ANOVA com post-hoc teste de Tukey ($p < 0,05$); *: diferença não significativa entre as duas colheitas de uma mesma aplicação.

As aplicações sucessivas do produto comercial contendo o difenoconazol levaram a um aumento das concentrações residuais desse princípio ativo nos morangos, avaliadas no terceiro dia depois de cada aplicação (3). Comportamento semelhante é observado nos resultados obtidos no sétimo dia depois de cada aplicação (7). Entretanto, esses resultados são significativamente menores do que os obtidos para o terceiro dia (3) a partir da segunda aplicação (II), mostrando que ocorre a dissipação do produto nesse período.

Wang *et al.* (2008) monitoraram a dissipação do difenoconazol em couve chinesa e mostraram que este se dissipa rapidamente com meia-vida de 6,6-7,8 dias. Mukhopadhyay *et al.* (2011) mostraram que a meia-vida de difenoconazol em pimentões é ainda menor, cerca de 2,15-2,32 dias. Sendo assim, não se esperava encontrar nos morangos, resíduos de difenoconazol remanescente de uma aplicação para outra, já que o intervalo entre as aplicações foi de 14 dias. No entanto, depois das seis aplicações sucessivas do difenoconazol, observou-se um aumento nos níveis de agrotóxico no fruto. Os resíduos de difenoconazol observados nos frutos colhidos no terceiro dia (3) e no sétimo dia (7) depois da primeira aplicação (I); (I3 = 102,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e I7 = 93,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) são significativamente inferiores aos observados nas colheitas seguintes. Depois da sexta aplicação (VI), foi encontrado para o terceiro dia (3) uma concentração residual (VI3 = 362,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 3,5 vezes maior que a encontrada na primeira aplicação (I). Mesmo ocorrendo dissipação do fungicida, no sétimo dia (7) depois da sexta aplicação (VI) a concentração residual foi 2,3 vezes maior que a da primeira aplicação (I); (VI7 = 217,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

4. Conclusões

O método de ESL/PBT e análise por cromatografia gasosa, otimizado e validado é simples e eficiente, consumindo uma pequena quantidade de amostra e de solvente extrator, com porcentagens de recuperação elevadas e boa repetitividade.

Os resultados mostraram que ocorre uma dissipação rápida do fungicida, mas que com múltiplas aplicações, a concentração residual aumenta devido à persistência do produto.

CAPÍTULO 3 REMOÇÃO DO DIFENOCONAZOL EM MORANGOS PELA EXPOSIÇÃO AO OZÔNIO

1. Introdução

A cultura do morango demanda o uso de diversos produtos químicos para o controle de insetos, ácaros e doenças. Estima-se que são gastos entre 30 e 40 aplicações de fungicidas, perfazendo um total de 35-45 kg por ha, durante o ciclo da cultura, nas mais diferentes regiões produtoras do País. Em decorrência disto, os frutos podem apresentar altos índices de resíduos destes produtos, acarretando riscos à saúde dos consumidores (Carvalho, 2006). Há uma necessidade de se desenvolver métodos para remoção ou redução dos agrotóxicos nos morangos, após a colheita. Tais métodos podem diminuir as preocupações com os riscos causados por estes produtos aos seres humanos e ao ambiente.

Entre os procedimentos empregados para descontaminação de alimentos, a utilização do ozônio (O_3) tem sido investigada como uma alternativa promissora. O ozônio pode ser gerado pela transformação do O_2 , por meio de descarga elétrica. Por ser uma molécula muito reativa e instável, degrada-se rapidamente em O_2 , liberando um radical livre de oxigênio, o qual pode se ligar a outro oxigênio livre formando uma nova molécula de O_2 ou reagir com outras substâncias químicas, oxidando-as (Güzel-Seydim *et al.*, 2004). Esta auto decomposição do ozônio em oxigênio molecular torna o processo de descontaminação vantajoso por não deixar resíduos nos alimentos.

O ozônio vem sendo historicamente empregado no tratamento de água com finalidades múltiplas como desinfecção, remoção de gosto, odor e degradação de contaminantes orgânicos (Hwang, E. S. *et al.*, 2001). A indústria alimentícia tem utilizado ozônio gasoso para aumentar a vida de prateleira dos alimentos e ozônio dissolvido na água para a desinfecção da superfície de frutas e hortaliças (Karaca e Velioglu, 2007). A aplicação do ozônio para a degradação de resíduos de agrotóxicos também tem sido investigada. Entretanto, a maioria dos trabalhos utiliza o ozônio dissolvido em água e não

avaliam a qualidade do produto após o tratamento (Ong *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2002; Wu, J. *et al.*, 2007; Wu, J. G. *et al.*, 2007).

Além da eficiência do ozônio na remoção de resíduos de agrotóxicos em alimentos deve-se também avaliar a qualidade do alimento após o tratamento. Critérios de qualidade, como cor, forma, peso, aroma e frescor são requisitos observados pelo consumidor ao adquirir hortaliças e frutas como o morango (Lunati, 2006). O sabor do morango é um dos mais importantes aspectos qualitativos exigidos pelo consumidor. Essa característica é condicionada, em parte, pelo balanço entre o teor de açúcar e a acidez do fruto (Shaw, 1990). Os principais ácidos presentes no morango são o cítrico e o málico, sendo encontrado também ácido ascórbico (vitamina C) (Carvalho, 2006). No morango maduro a glicose, a sacarose e a frutose compõem mais de 99% do total de açúcares presentes (Makinen e Soderling, 1980). Já a cor atrativa do morango se deve à presença de antocianinas (Montero *et al.*, 1996). O pH celular pode influenciar tanto no sabor, quanto no aparecimento desses pigmentos na fruta.

A adequação da tecnologia de tratamento de frutos de morango com o gás ozônio torna-se relevante em função do uso elevado de agrotóxicos para o controle de pragas nesta cultura. Devem ser consideradas as perspectivas de remoção desses resíduos e a manutenção das características de qualidade como cor, brilho e sabor, que o tornam um produto atraente ao consumidor.

O fungicida difenoconazol, que está entre os dois triazóis mais encontrados pelos programas de fiscalização brasileiros (Jardim e Caldas, 2012), é pulverizado várias vezes durante a safra do morango.

Neste trabalho avaliou-se a remoção do difenoconazol em morangos fortificados expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e as alterações físico-químicas desses frutos durante o período de armazenamento.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção do ozônio

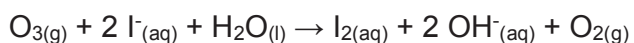
O ozônio foi obtido de um gerador de ozônio (Figura 3.1) desenvolvido pela empresa Ozone & Life (São José dos Campos, Brasil). Para a geração do ozônio utilizou-se como insumo o gás oxigênio (Linde Gases, Canoas, Brasil, 99,5% de pureza), que recebe uma descarga por barreira dielétrica (DBD). Na camada ar/oxigênio são formados elétrons com energia suficiente para quebrar as moléculas de oxigênio, formando átomos de oxigênio, que ao se juntarem com moléculas de oxigênio formam as moléculas de ozônio (Urruchi, 2009).



Figura 3.1. Gerador de ozônio.

2.2. Método para determinação da concentração de ozônio

Para se quantificar a concentração do gás introduzido na câmara ou o que sai da câmara, uma válvula é acionada manualmente e o fluxo é dirigido para o interior de uma proveta de 100,0 mL contendo 50,0 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 20 g L⁻¹, por 30 s. O gás borbulhado nesta solução que é acidificada com 2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 mol L⁻¹ reage com a solução de KI formando iodo (I₂). A quantidade de I₂ formado, que é proporcional ao ozônio borbulhado, é titulado com solução padronizada de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 5,00 x 10⁻³ mol L⁻¹ (Equações 3.1 e 3.2), usando uma suspensão de amido (5 g L⁻¹) como indicador, até o desaparecimento da coloração azul.



Equação 3.1



A massa de ozônio (m_0) que é introduzida na câmara pode ser calculada pela quantidade de tiosulfato consumido na titulação (Equação 3.3) da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

$$m_0 = \frac{C_{\text{tio}} f V W}{2} \quad \text{Equação 3.3}$$

onde, m_0 = massa de ozônio (mg); C_{tio} = concentração de tiosulfato (mol L^{-1}); f = fator de correção do tiosulfato; V = volume gasto de tiosulfato (mL); e W = massa molar do ozônio (g mol^{-1}).

A concentração do ozônio (mg L^{-1}) no volume de gás introduzido na câmara pode ser calculada a partir do resultado da Equação 3.3 considerando o fluxo do gás e o tempo de borbulhamento (Equação 3.4)

$$C_0 (\text{mg L}^{-1}) = \frac{m_0}{\phi t} \quad \text{Equação 3.4}$$

onde, C_0 = concentração de ozônio (mg L^{-1}); m_0 = massa de ozônio (mg); ϕ = fluxo de ozônio (L s^{-1}); e t = tempo de borbulhamento (s).

A pressão é calculada através da Equação 3.5 e é usada para determinação da concentração de ozônio em ppmv (Equação 3.6).

$$\rho = RTC_0 \quad \text{Equação 3.5}$$

onde, ρ = pressão do ozônio (atm); T = temperatura (K); R = constante dos gases perfeito ($0,082 \text{ atm L mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e C_0 = concentração de ozônio (mg L^{-1}).

$$C_0 (\text{ppmv}) = \frac{\rho}{\rho_{\text{atm}}} 10^6 \quad \text{Equação 3.6}$$

onde, C_0 = concentração de ozônio (ppmv); p = pressão do ozônio (atm); e p_{atm} = pressão atmosférica local (0,935 atm).

2.3. Câmara de fumigação

Acoplada ao gerador de ozônio foi instalada uma câmara de acrílico com dimensões 0,32 m x 0,53 m x 0,44 m (0,075 m³) desenvolvida por Simões, (2012). A câmara possui em seu interior prateleiras para acomodação das amostras e é dotada de conexões para entrada e saída do gás, com válvulas para fechamento (Figura 3.2). A concentração do ozônio que foi injetado e a que saiu da câmara foi quantificada usando o método iodométrico indireto (APHA *et al.*, 2005).

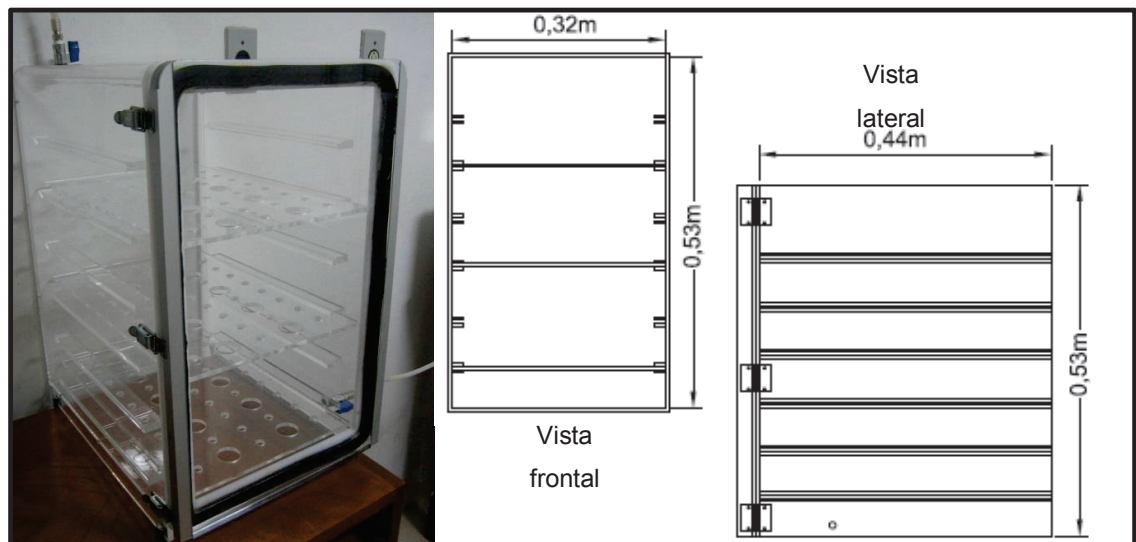


Figura 3.2. Câmara de fumigação e suas dimensões.

2.4. Saturação da câmara

A câmara de fumigação foi saturada, introduzindo-se o ozônio nas concentrações de 0,3; 0,6 e 0,8 mg L⁻¹ em fluxo constante de 2,00 L min⁻¹. A concentração do ozônio no interior da câmara foi monitorada a cada 10 min durante 60 min para estabelecer o tempo necessário para saturação e a concentração de ozônio na câmara saturada.

O mesmo procedimento foi repetido para avaliar a saturação da câmara contendo 600 g de morango.

Os dados de saturação da câmara (com e sem frutos de morango) com ozônio, foram submetidos à análise de regressão *Linear Response Plateau* em função do tempo, utilizando o *software* SAEG (UFV, Viçosa, Brasil).

2.5. Fortificação dos morangos com difenoconazol

Amostras de morango isentas de resíduos de agrotóxicos (600 g) recém-colhidos (cultivares Albion, Camino Real, Dover e Oso Grande) foram imersas, por 1 min, em 1,0 L de solução aquosa contendo 400 µL do produto comercial (250 g L⁻¹ de difenoconazol). As amostras foram deixadas secar em ambiente ventilado por 1 h, e depois tratadas com ozônio.

2.6. Avaliação da remoção do fungicida difenoconazol em morangos

Os frutos de morango contaminados com o fungicida foram submetidos ao tratamento com ozônio no interior da câmara de fumigação. Os frutos foram acondicionados nas prateleiras da câmara e expostos ao ozônio nas concentrações de 0,3, 0,6 e 0,8 mg L⁻¹ durante 1 h. O gás foi aplicado em fluxo contínuo de 2,00 L min⁻¹.

O difenoconazol foi quantificado nas amostras de morango utilizando o método de extração e análise otimizado e validado no Capítulo 1.

A influência da concentração do ozônio sobre a degradação do difenoconazol nos frutos de morango foi analisada por meio do modelo descrito utilizando o *software* Origin 8.0 (Origin Lab, Northampton, EUA).

2.7. Efeito da aplicação do ozônio na qualidade do morango

Amostras tratadas com ozônio e as amostras controle foram armazenadas a 4 °C e as características qualitativas dos frutos avaliadas periodicamente (3°, 7° e 10° dia).

2.7.1. Avaliação da cor

A avaliação da cor dos frutos de morango foi realizada com o auxílio de um colorímetro Minolta (Ramsey, EUA) 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*" (relativa de verde a vermelho) e "b*" (relativa de amarela a azul). Com os valores das coordenadas L*, a* e b* foi possível gerar parâmetros relacionados à saturação da cor (Croma) (Equação 3.7) (Macdougall, 2002) e à diferença de cor ΔE (Equação 3.8) (Meir *et al.*, 1992; Macdougall, 2002).

$$\text{Croma} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad \text{Equação 3.7}$$

$$\Delta E = \sqrt{((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)} \quad \text{Equação 3.8}$$

2.7.2. Perda de massa

Durante o período de armazenamento, a perda de massa dos frutos foi acompanhada, utilizando-se uma balança analítica com precisão de 1×10^{-4} g, sendo a variação expressa em percentual de perda em relação ao massa inicial.

2.7.3. Acidez total titulável (AT)

A acidez foi determinada por titulação do suco da polpa, com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ padronizado e 3 gotas de indicador fenolftaleína. Para essa análise, 5,00 g de polpa foram retiradas da região mediana dos frutos e as amostras foram homogeneizadas em 50,0 mL de água destilada (Instituto Adolfo Lutz, 2005). As análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico por 100 g de amostra (Equação 3.9).

$$\text{g de ácido cítrico/100 g} = 0,6404 \frac{\text{V}}{\text{m}} \quad \text{Equação 3.9}$$

onde:

V = volume da solução de NaOH (mL); e

m = massa da amostra (g).

2.7.4. Medida do pH

A medida de pH foi feita por imersão direta do eletrodo na amostra de morango preparada para determinação da acidez total titulável (2.7.3). A determinação do pH da polpa foi efetuada utilizando-se pHmetro de bancada digital Homis, mod. MPA 210.

2.7.5. Sólidos solúveis (SS)

O teor de sólidos solúveis da polpa dos morangos foi determinado utilizando-se um refratômetro manual mod.107 - 0 a 90% BRIX – Biobrix. O morango foi partido ao meio, depositando-se três gotas de suco sobre a superfície de leitura do refratômetro. Os resultados foram expressos em °Brix.

2.7.6. Ácido ascórbico (vitamina C)

O teor de ácido ascórbico (vitamina C) dos frutos foi determinado segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005). Este método baseia-se na oxidação do ácido ascórbico pelo iodato de potássio. Para essa análise, 10 g de polpa foram retiradas da região mediana dos frutos 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. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido ascórbico por 100 g de amostra (Equação 3.10).

$$\text{mg de ácido ascórbico/100 g} = \frac{100 \times V \times f}{m} \quad \text{Equação 3.10}$$

onde:

f = fator estequiométrico = 8,806;

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

m = massa da amostra (g).

Os dados de todos os testes de qualidade dos frutos de morango foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o *software* Statística (versão 8.0, StatSoft Corp., Tulsa, EUA). Um $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados e discussão

3.1. Saturação da câmara

O gás ozônio além de reagir com a superfície da câmara e dos frutos tem meia vida curta. Assim, a concentração de ozônio no interior da câmara é sempre menor que a concentração inicial injetada, mesmo após alcançar a saturação. Um estudo do comportamento do ozônio no interior da câmara, em função da concentração inicial de ozônio, foi feito. Esse estudo permitiu verificar o tempo necessário para que ocorresse a saturação da câmara e determinar a concentração do ozônio na câmara após saturação. Assim foi possível conhecer o tempo em que os frutos ficaram expostos a uma câmara saturada em cada tratamento.

Na câmara de fumigação vazia foi introduzido o gás ozônio em fluxo constante de $2,00 \text{ L min}^{-1}$, em todos os experimentos. Como a molécula de ozônio é instável, parte do mesmo sofre degradação ao entrar em contato com as paredes da câmara. No início do processo a concentração do gás ozônio é nula na saída da câmara. Com a entrada constante do gás no interior da câmara, a concentração do gás vai aumentando e o mesmo acontece na saída. Como a taxa de entrada do gás na câmara é constante e maior que a taxa de degradação, o interior da câmara vai saturando. Esse fato foi confirmado pelos dados de concentração do ozônio determinados na saída da câmara. Depois de um determinado tempo, que é dependente da concentração de ozônio que é introduzido na câmara, a mesma fica saturada e a concentração do ozônio no gás de saída é constante.

A introdução das amostras de morango na câmara alterou as condições internas e conseqüentemente novos valores foram obtidos. No ensaio de saturação da câmara contendo morangos os dados foram obtidos em condições semelhantes, ou seja, um fluxo de 2,00 L min⁻¹ e nas concentrações de 0,3, 0,6 e 0,8 mg L⁻¹.

Usando o aplicativo SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genética) foram feitas as análises de regressão e obtidos as principais equações (Tabelas 3.1 e 3.2) e dados do processo (Tabelas 3.3 e 3.4). Esses dados são o tempo de saturação, que é o tempo necessário para que a concentração do gás de saída torne-se constante, e a concentração de saturação, que corresponde à concentração do ozônio no interior da câmara saturada.

Na Figura 3.3 estão apresentados os dados da concentração de ozônio, na saída da câmara, em função do tempo para a câmara vazia e para a câmara contendo morangos. Observa-se que a maior parte do ozônio foi degradado no interior da câmara. O aumento da concentração do ozônio que é introduzido aumenta a concentração de saturação e diminui o tempo de saturação. De maneira geral, a presença de morangos no interior da câmara aumenta o tempo de saturação e diminui a concentração de saturação para todas as concentrações de ozônio injetadas.

Tabela 3.1. Equações de regressão linear simples *Linear Response Plateau* para saturação da câmara vazia.

[O ₃] Injetado (mg L ⁻¹)	Intervalo	Equação	Coefficiente de Determinação (r ²)
0,3	$\chi_i < 28,13$	$\hat{y} = 0,007 + 0,002\chi_i$	0,914
	$28,13 \leq \chi_i \leq 60,00$	$\hat{y} = 0,070$	
0,6	$\chi_i < 23,52$	$\hat{y} = 0,005 + 0,004\chi_i$	0,975
	$23,52 \leq \chi_i \leq 60,00$	$\hat{y} = 0,103$	
0,8	$\chi_i < 6,51$	$\hat{y} = 0,000 + 0,019\chi_i$	0,991
	$6,51 \leq \chi_i \leq 60,00$	$\hat{y} = 0,126$	

χ_i = tempo de exposição (min) e \hat{y} = concentração de ozônio (mg L⁻¹).

Tabela 3.2. Equações de regressão linear simples Linear Response Plateau para saturação da câmara contendo morangos.

[O ₃] Injetado (mg L ⁻¹)	Intervalo	Equação	Coefficiente de Determinação (r ²)
0,3	$\chi_i < 49,82$	$\hat{y} = 0,004 + 0,001\chi_i$	0,842
	$49,82 \leq \chi_i \leq 60,00$	$\hat{y} = 0,04$	
0,6	$\chi_i < 38,39$	$\hat{y} = 0,006 + 0,001\chi_i$	0,882
	$38,39 \leq \chi_i \leq 60,00$	$\hat{y} = 0,06$	
0,8	$\chi_i < 23,95$	$\hat{y} = 0,003 + 0,004\chi_i$	0,977
	$23,95 \leq \chi_i \leq 60,00$	$\hat{y} = 0,09$	

χ_i = tempo de exposição (min) e \hat{y} = concentração de ozônio (mg L⁻¹).

Tabela 3.3. Tempo de saturação, concentração de saturação e % de degradação do ozônio na câmara vazia.

[O ₃] Injetado (mg L ⁻¹)	Tempo de Saturação (min)	Concentração de Saturação (mg L ⁻¹)	% de Degradação
0,3	28,13	0,07	77
0,6	23,51	0,10	83
0,8	6,51	0,13	84

Tabela 3.4. Tempo de saturação, concentração de saturação e % de degradação do ozônio na câmara contendo morango.

[O ₃] Injetado (mg L ⁻¹)	Tempo de Saturação (min)	Concentração de Saturação (mg L ⁻¹)	% de Degradação
0,3	49,82	0,04	87
0,6	38,39	0,06	90
0,8	23,95	0,09	89

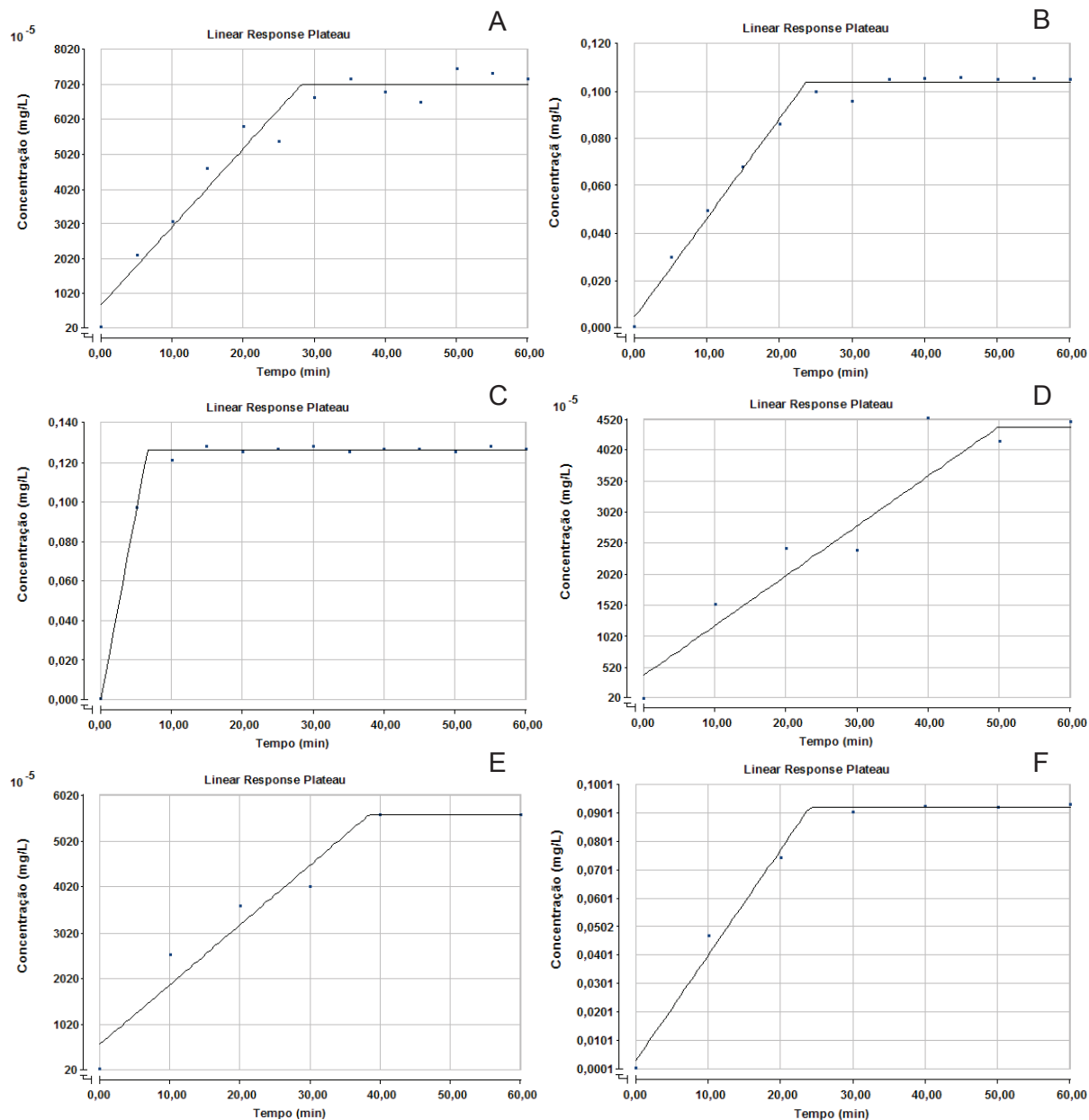


Figura 3.3. Concentração residual do ozônio em função do período de exposição para o processo de saturação da câmara vazia: A) 0,3 mg L⁻¹, B) 0,6 mg L⁻¹ e C) 0,8 mg L⁻¹; e da câmara contendo morangos: D) 0,3 mg L⁻¹, E) 0,6 mg L⁻¹ e F) 0,8 mg L⁻¹.

3.2. Remoção do fungicida difenoconazol em morangos

Os morangos foram imersos em solução de difenoconazol e deixados secar. Com o propósito de avaliar a eficiência do ozônio na remoção do fungicida difenoconazol, parte dos morangos foi exposta ao ozônio e

submetida à ESL/PBT e os extratos analisados por CG/DCE. A concentração média do fungicida encontrada nos frutos antes da submissão ao processo de ozonização foi de $4,96 \text{ mg kg}^{-1}$.

Observou-se que a concentração do fungicida nos frutos de morango reduziu drasticamente à medida que se aumentou a concentração do ozônio, injetada na câmara. Após 1 h de exposição ao ozônio na concentração de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, verificou-se que a concentração residual do difenoconazol encontrava-se um pouco acima dos LMRs estabelecidos pela ANVISA e pela EU, porém, já apresentava redução de 82% em relação a concentração do fungicida antes da ozonização dos frutos. Com o aumento da concentração do ozônio observa-se uma queda mais acentuada nos níveis de contaminação do morango, obtendo-se remoção máxima de 95% da contaminação quando submetidos a maior concentração do gás. Esse comportamento foi adequadamente descrito por um modelo que descreve a influência da concentração de ozônio sobre a degradação do difenoconazol (Figura 3.4).

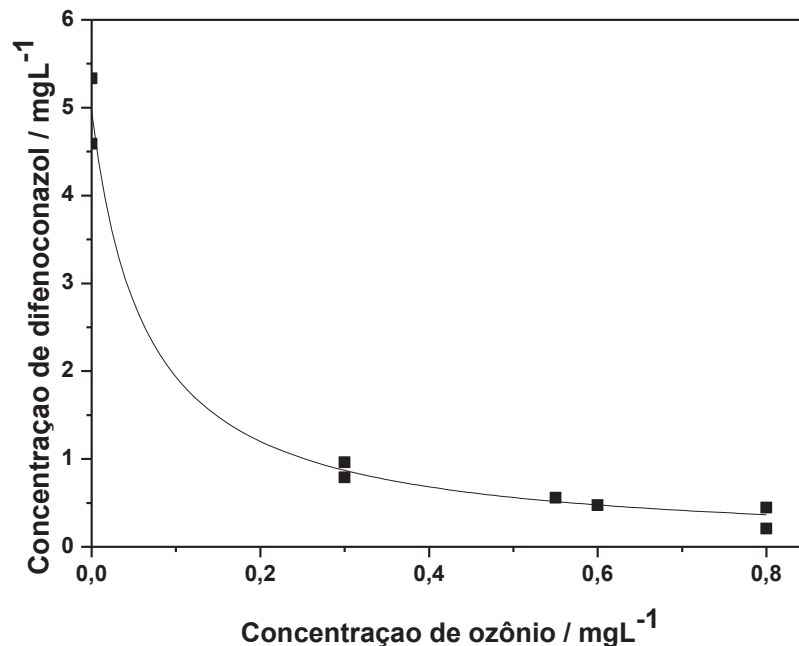


Figura 3.4. Resíduo do fungicida difenoconazol nas amostras de morango, após 1 h de exposição ao gás ozônio em diferentes concentrações.

Foi ajustado o modelo não linear apresentado na Equação 3.11:

$$\frac{1}{(0,215 + 3,16c(O_3))} = c(D), (r^2_{aj} = 0,987; x^2 = 0,054) \quad \text{Equação 3.11}$$

onde $c(D)$ é a concentração do agrotóxico após ozonização e $c(O_3)$ a concentração de ozônio, que foi mantida constante durante cada experimento.

Esse modelo foi racionalizado considerando-se a reação de pseudo-segunda ordem para a oxidação do agrotóxico, enquanto que a constante de pseudo-segunda ordem é função linear da concentração de ozônio (Equação 3.12).

$$\frac{1}{(\frac{1}{C_0} + (k\Delta t)c(O_3))} = c(D) \quad \text{Equação 3.12}$$

onde C_0 , é a concentração inicial do agrotóxico; k , a constante de segunda ordem; Δt , o tempo de ozonização e $c(O_3)$, a concentração do ozônio.

3.3. Efeito do ozônio na qualidade dos frutos de morango

3.3.1. Avaliação da cor

Observou-se uma variação de cor ao longo do período de armazenamento tanto para as amostras controle como para as amostras de morango fumigadas com ozônio. Essa variação de cor foi maior ao final do armazenamento. A Figura 3.5 mostra a superfície de resposta que melhor se ajustou aos dados (modelo quadrático) e as análises de resíduos dos modelos linear e quadrático em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento.

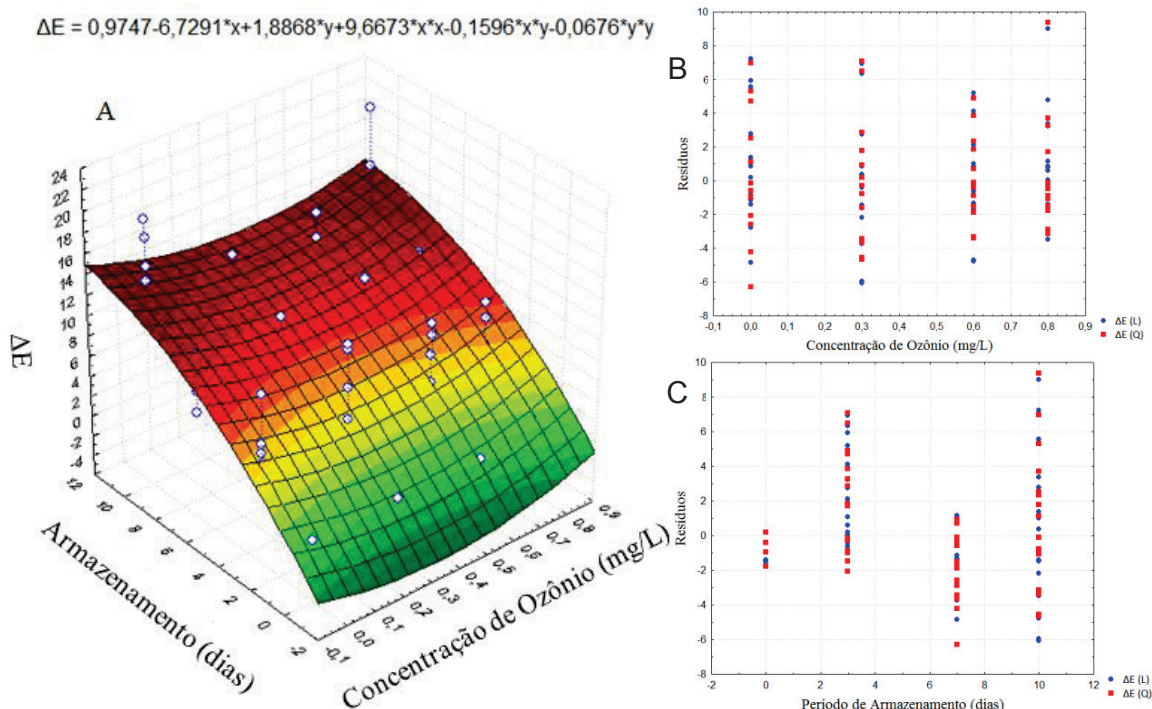


Figura 3.5. A) Superfície de resposta da variação total da cor (ΔE) dos morangos ozonizados e armazenados na temperatura de 4 °C. B) e C) Análise de resíduos em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento respectivamente.

A análise dos resíduos do modelo quadrático apresentou dados aleatórios e com menor dispersão ($dp = 3,08$) do que o modelo linear ($dp = 3,24$).

A variação total de cor não variou significativamente ($p > 0,05$) entre os frutos de morango fumigados e os frutos do controle (Figura 3.5A). Esses resultados indicam que o ozônio não afetou este parâmetro de qualidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Nadas, Olmo, e García (2003) e Holtz (2006).

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 ($p < 0,05$) em função do tratamento com ozônio pela redução da cor vermelha (Figura 3.6). A redução possivelmente ocorre pela oxidação de pigmentos que conferem cor vermelha, tais como as antocianinas (Pérez *et al.*, 1999).

$$\text{Croma} = 50,2442 - 43,1689 \cdot x - 0,1343 \cdot y + 46,3657 \cdot x^2 + 0,0177 \cdot x \cdot y - 0,0846 \cdot y^2$$

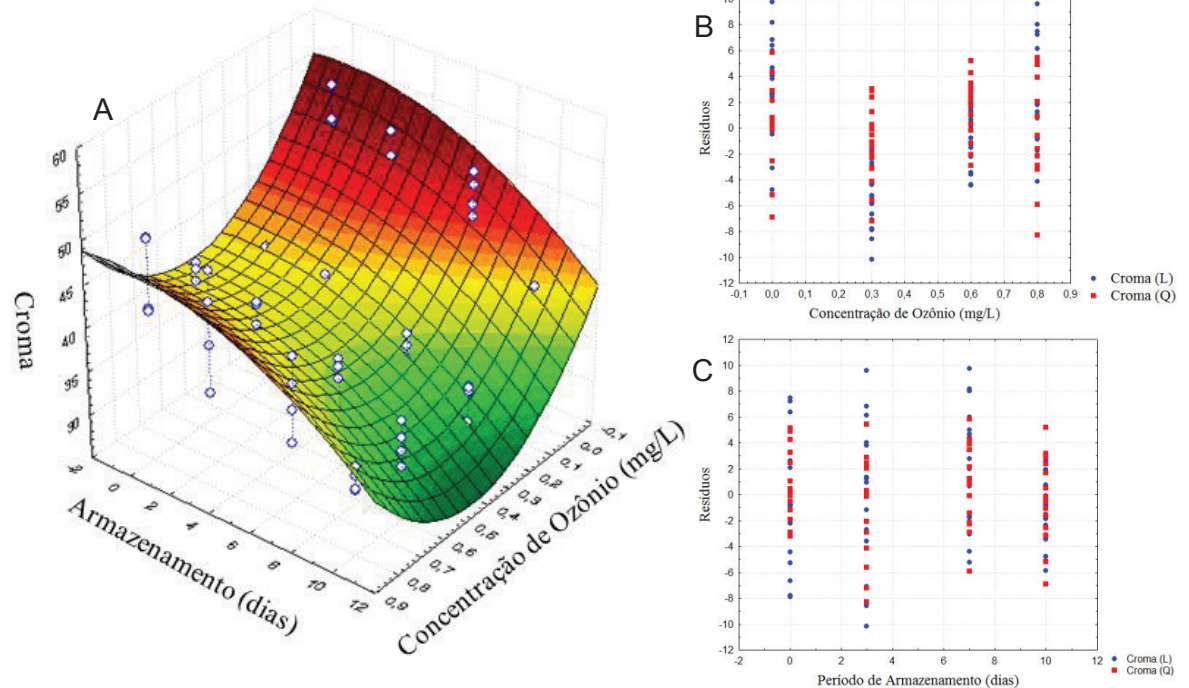


Figura 3.6. A) Superfície de resposta da saturação da cor (Croma) dos morangos ozonizados e armazenados na temperatura de 4 °C. B) e C) Análise de resíduos em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento respectivamente.

Observa-se, que similarmente à variação total de cor, o modelo quadrático apresentou dados aleatórios e com menor dispersão ($dp = 3,36$) do que o modelo linear ($dp = 4,74$). A análise estatística (análise de variância, ANOVA) dos efeitos dos fatores (concentração de ozônio e tempo de armazenamento) sobre a variação e a saturação da cor está apresentada na Tabela 3.5.

3.3.2. Perda de massa

Observou-se perda de massa tanto para as amostras de morango controle como as ozonizadas. As alterações observadas nos valores da perda de massa foram significativas ($p < 0,05$) apenas em função do período de armazenamento. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 3.5. Na Figura 3.7 está representada a superfície de resposta para o modelo quadrático da perda de massa e as análises de resíduos dos modelos linear e quadrático

em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento. Pela análise dos resíduos, o modelo quadrático apresentou dados aleatórios e com menor dispersão ($dp = 1,42$) do que o modelo linear ($dp = 1,48$). Pelos resultados obtidos o tratamento dos frutos com ozônio não afetou a perda de massa dos morangos. Nadas *et al.* (2003) observaram uma redução da perda de massa induzida pelo ozônio em morangos, relacionada com uma melhor manutenção da firmeza dos frutos, o que não foi observado nesse estudo.

$$\text{Perda de Massa} = 0,682 + 1,782 * x + 0,5677 * y - 3,2039 * x * x + 0,0736 * x * y + 0,0321 * y * y$$

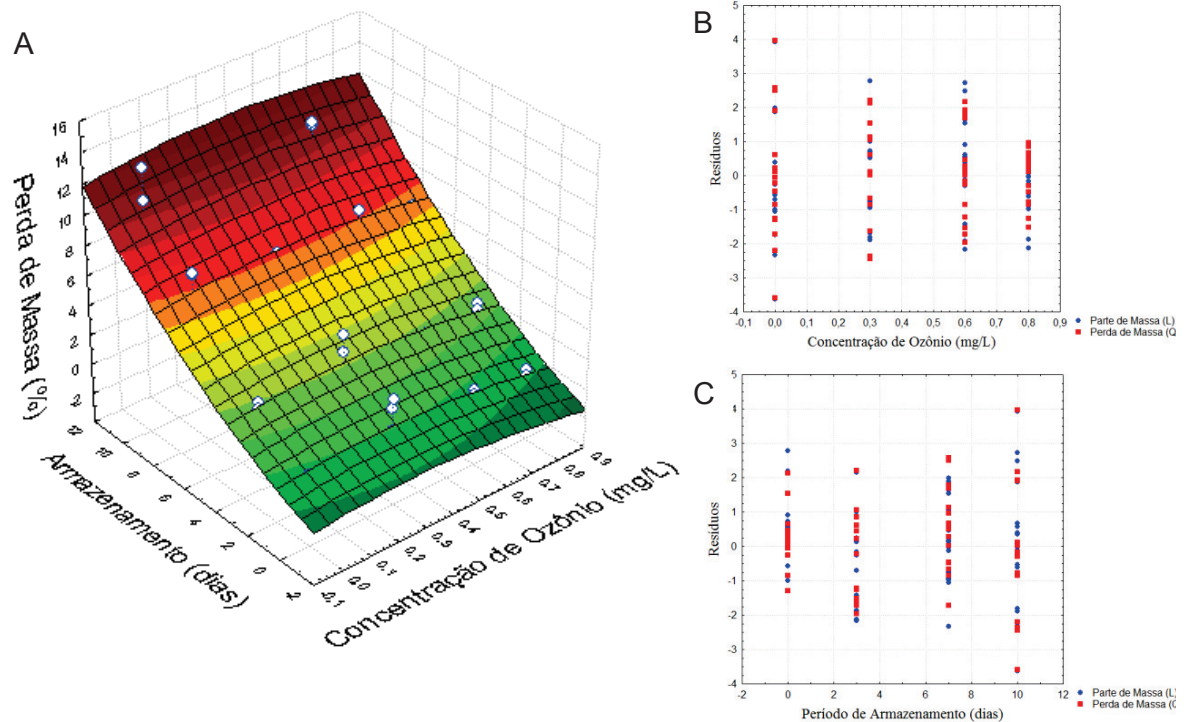


Figura 3.7. A) Superfície de resposta da perda de massa dos morangos ozonizados e armazenados na temperatura de 4 °C. B) e C) Análise de resíduos em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento respectivamente.

3.3.3. Acidez titulável (AT)

A acidez total das amostras de morango diminuiu durante o período de armazenamento tanto para as amostras controle quanto para as amostras ozonizadas. A redução no teor de AT, durante o armazenamento, foi mais acentuada em morangos não ozonizados. Essas alterações foram significativas ($p < 0,05$) em função do tratamento com ozônio e do período de

armazenamento. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 3.5. A superfície de resposta ajustada no modelo quadrático, em função da análise de resíduos linear (dp = 0,07) e quadrático (dp = 0,06) é mostrada na Figura 3.8.

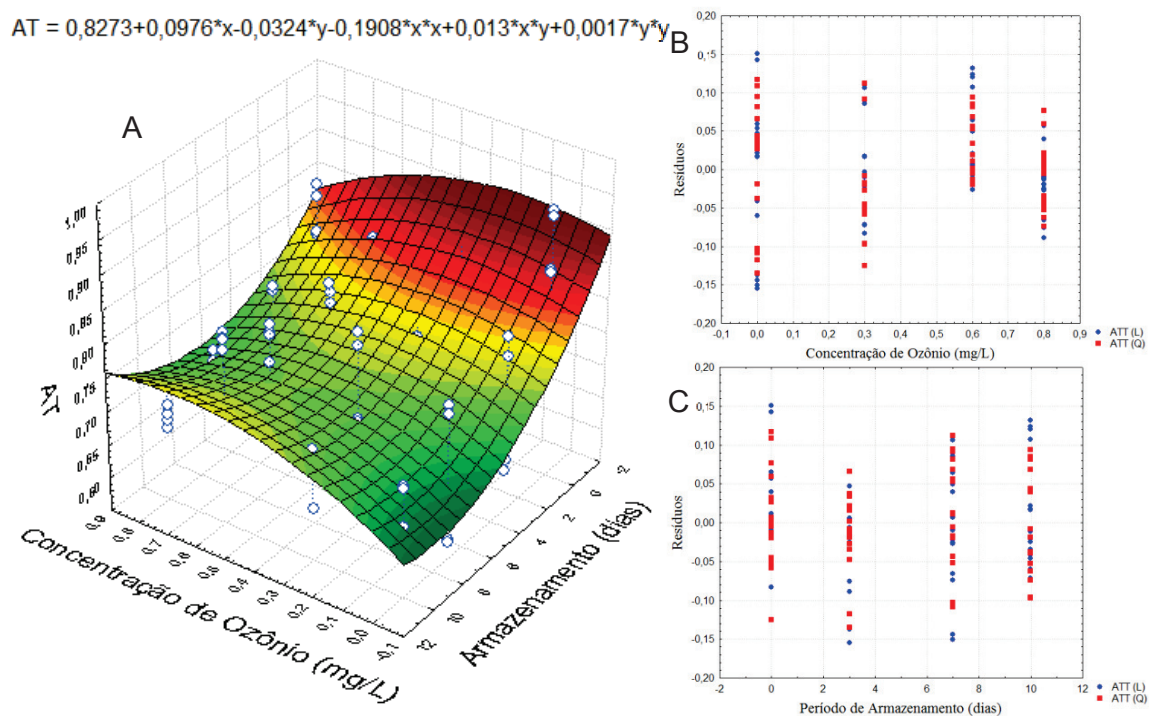


Figura 3.8. A) Superfície de resposta do teor de acidez titulável dos morangos ozonizados e armazenados na temperatura de 4 °C. B) e C) Análise de resíduos em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento respectivamente.

A redução no teor de AT pode ser atribuída à tendência de diminuição dos ácidos orgânicos em virtude da sua utilização, como substrato para a síntese de açúcares (Toledo *et al.*, 2011). Toledo *et al.* (2011) também observaram reduções significativas na AT em relação ao tratamento com ozônio e tempo de armazenamento.

O tratamento com ozônio permitiu manter por mais tempo a qualidade original do fruto com relação a essa característica.

3.3.4. pH

A Figura 3.9 apresenta a superfície de resposta do modelo quadrático para as alterações dos valores de pH. Este modelo obteve um melhor ajuste e menor dispersão ($dp = 0,099$) quando comparado ao modelo linear ($dp = 0,103$).

As amostras de morango controle e ozonizadas apresentaram pH inicial em torno de 3,3, chegando ao valor médio de 3,6 ao final do armazenamento. As alterações observadas nos valores de pH foram significativas ($p < 0,05$) apenas em função do período de armazenamento. Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura (Holtz, 2006; Françoso *et al.*, 2008).

A ozonização das amostras de morango com diferentes concentrações de ozônio não alterou significativamente ($p > 0,05$) o pH das amostras. Logo, não afeta este parâmetro de qualidade. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 3.5.

$$\text{pH} = 3,376 - 0,2721 * x + 0,0236 * y + 0,4156 * x * x - 0,0009 * x * y - 0,0003 * y * y$$

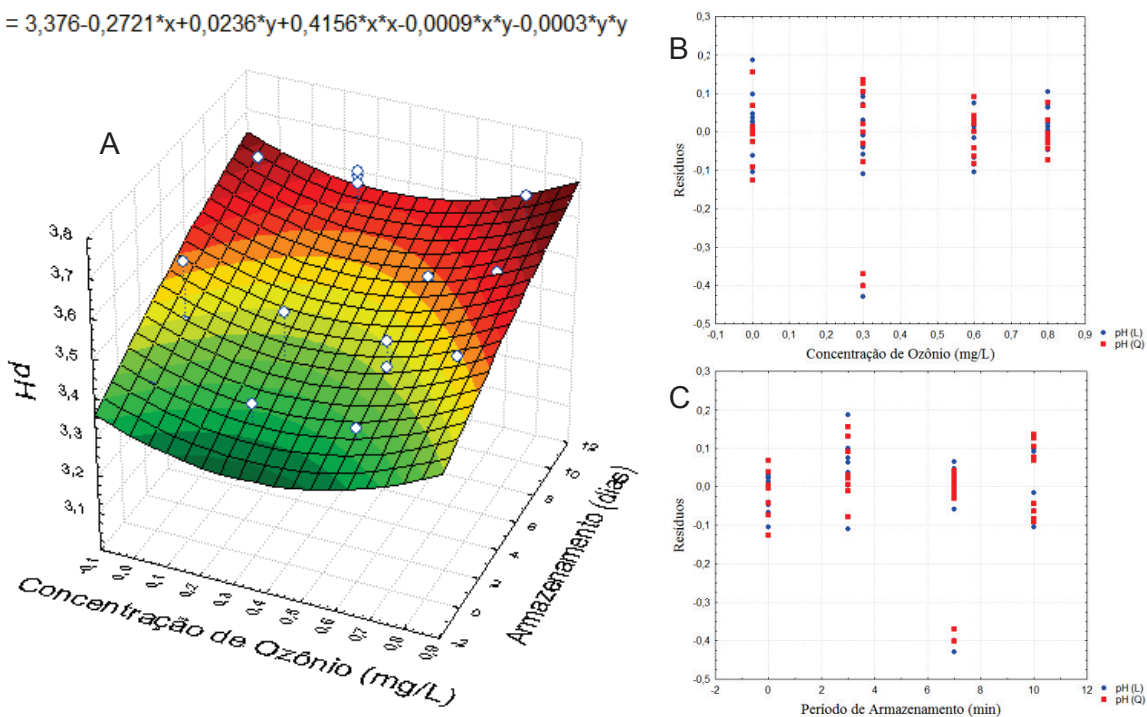


Figura 3.9. A) Superfície de resposta do pH dos morangos ozonizados e armazenados na temperatura de 4 °C. B) e C) Análise de resíduos em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento respectivamente.

3.3.5. Sólidos solúveis (SS)

Foram observadas alterações significativas ($p < 0,05$) nos valores de SS em função do tratamento com ozônio e do período de armazenamento. Os resultados desta análise são mostrados na Tabela 3.5. A redução no teor de SS, durante o armazenamento a 4 °C foi mais acentuada nas amostras controle do que nas amostras ozonizadas. Pela Figura 3.10, as análises de resíduos dos modelos linear e quadrático em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento mostraram que a superfície de resposta do modelo quadrático foi a que melhor representou os resultados obtidos, com menor dispersão ($dp = 0,62$) do que o modelo linear ($dp = 2,25$).

Resultados sobre teores de sólidos solúveis registrados na literatura são variáveis, mas deve ser considerado que a concentração de ozônio, tempo de exposição e as condições de armazenamento também variam o que dificulta a comparação entre os resultados. Nadas *et al.* (2003) não observaram diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de sólidos solúveis de morangos tratados ou não com ozônio e mantidos a 2 °C. Entretanto, Pérez *et al.* (1999) observaram que os teores de açúcares de morangos mantidos em atmosfera controlada com ozônio a 2 °C decresceram significativamente ($p < 0,05$).

$$SS = 9,1761 + 7,4903 * x - 0,3117 * y - 8,9034 * x * x + 0,031 * x * y + 0,0028 * y * y$$

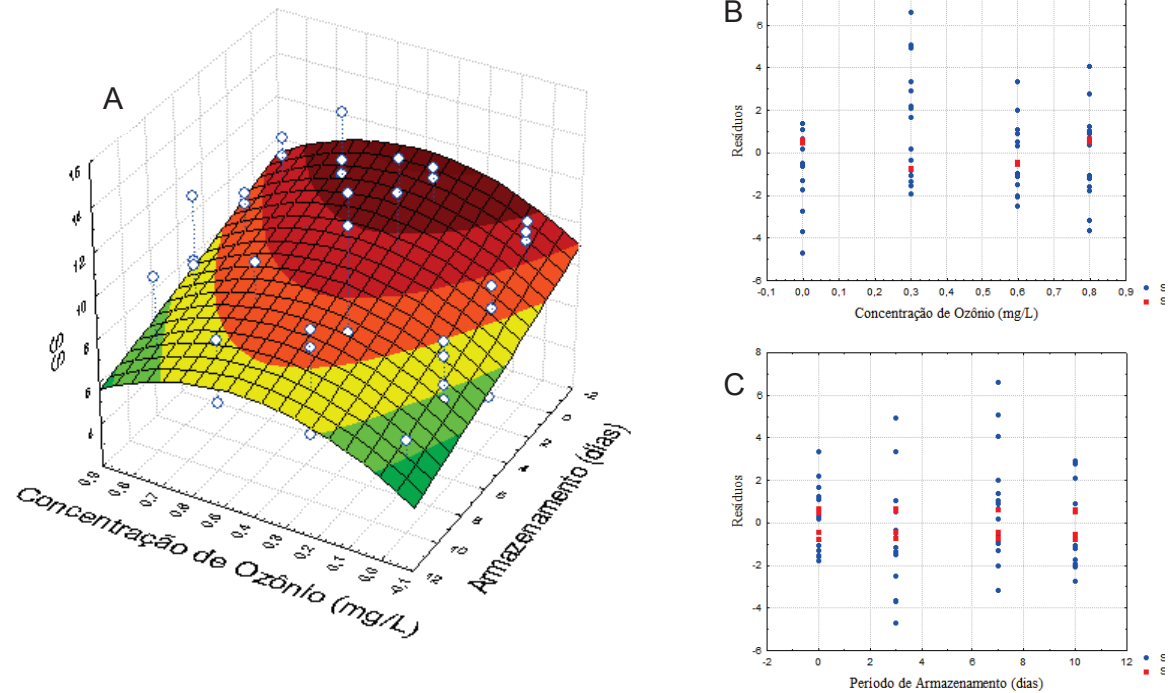


Figura 3.10. A) Superfície de resposta do teor de sólidos solúveis dos morangos ozonizados e armazenados na temperatura de 4 °C. B) e C) Análise de resíduos em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento respectivamente.

3.3.6. Ácido ascórbico (vitamina C)

Os teores de ácido ascórbico (vitamina C) diminuíram ao longo do armazenamento. Essa diminuição foi mais acentuada para as amostras controle que para as amostras submetidas ao ozônio em diferentes concentrações. A superfície de resposta dos teores de ácido ascórbico (vitamina C) em função do armazenamento e da concentração de ozônio é mostrada na Figura 3.11. A análise dos resíduos do modelo quadrático apresentou dados aleatórios e com menor dispersão ($dp = 7,72$) do que o modelo linear ($dp = 10,00$). A análise de variância, dos efeitos dos fatores (concentração de ozônio e tempo de armazenamento) sobre o ácido ascórbico é apresentada na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Análise da variância dos fatores ΔE , cor, AT, SS e vitamina C em morangos armazenados a 4 °C.

		Graus de Liberdade	Valor F	Valor p
ΔE				
	Concentração de Ozônio	3	1,1644	0,331324
	Período de armazenamento	3	56,8677	0,000000*
	Erro	57		
Croma				
	Concentração de Ozônio	3	36,13	0,000000*
	Período de armazenamento	3	36,31	0,000000*
	Erro	48		
AT				
	Concentração de Ozônio	3	3,480	0,021598*
	Período de armazenamento	3	9,944	0,000023*
	Erro	57		
SS				
	Concentração de Ozônio	3	4,652	0,005615*
	Período de armazenamento	3	7,389	0,000289*
	Erro	57		
Vitamina C				
	Concentração de Ozônio	3	6,6137	0,000652*
	Período de armazenamento	3	10,1781	0,000018*
	Erro	57		

* = significativo $p < 0,05$; ΔE = variação total de cor; AT = acidez titulável; SS = sólidos solúveis.

Segundo Pérez *et al.* (1999) a menor redução das concentrações de ácido ascórbico nos morangos ozonizados possivelmente ocorre como resposta ao estresse oxidativo provocado pelo ozônio. Concentrações elevadas de vitamina C em regiões de alta atividade metabólica no tecido vegetal pode

ser resultado de um sistema antioxidativo que promove a biossíntese de vitamina C a partir de reservas de carboidratos dos morangos. Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang *et al.* (2011), que mostraram também em seus estudos com morangos que o tratamento com ozônio pode inibir a redução de ácido ascórbico.

Pérez *et al.* (1999) também observaram que morangos mantidos em atmosfera modificada com ozônio a 2 °C por três dias e depois a 20 °C por quatro dias, apresentaram, teor de vitamina C significativamente ($p < 0,05$) maior que o controle.

$$\text{Vitamina C} = 29,5728 + 36,2279 * x - 6,0369 * y - 53,8978 * x * x + 2,4386 * x * y + 0,3986 * y * y$$

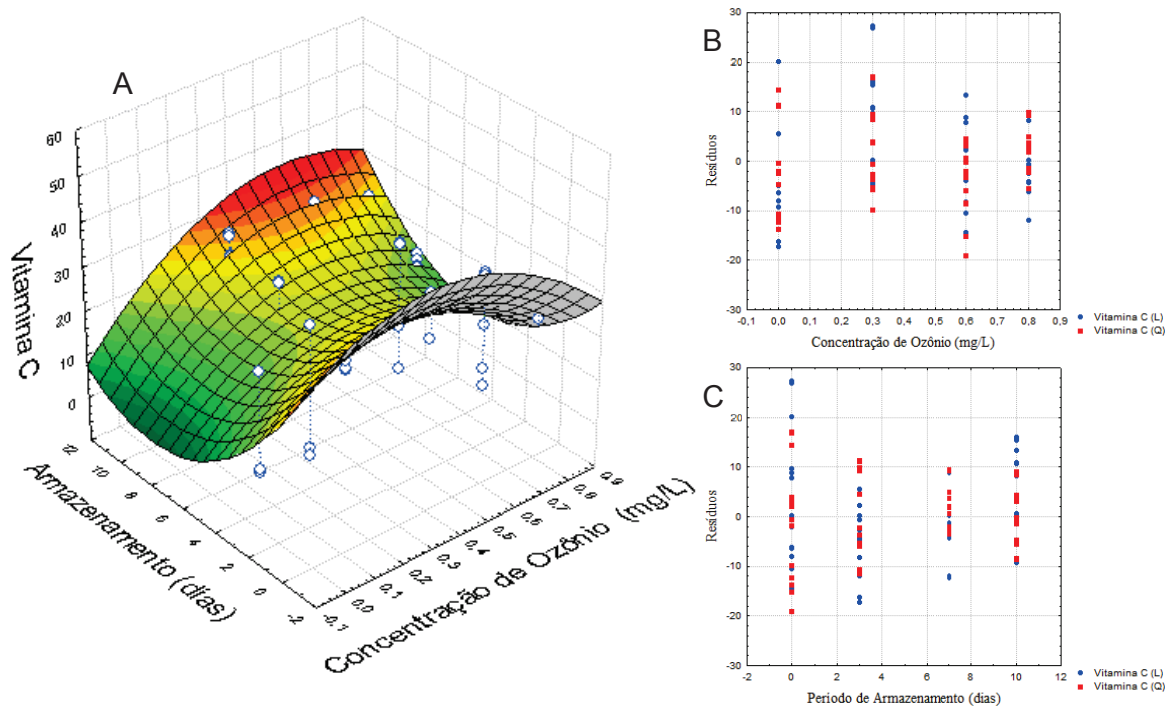


Figura 3.11. A) Superfície de resposta do teor de ácido ascórbico (vitamina C) dos morangos ozonizados e armazenados na temperatura de 4 °C. B) e C) Análise de resíduos em função da concentração de ozônio e do período de armazenamento respectivamente.

Com esses resultados pode-se inferir que o tratamento com ozônio preserva por mais tempo a qualidade original do fruto com relação a essa característica.

4. Conclusões

A exposição de morangos ao ozônio reduziu os resíduos de difenoconazol para concentrações próximas às dos limites máximos de resíduo (LMRs) estabelecidos pela ANVISA ($0,5 \text{ mg kg}^{-1}$) e pela EU ($0,4 \text{ mg kg}^{-1}$). A degradação do difenoconazol aumentou com o aumento da concentração de ozônio. Os tratamentos por fumigação de ozônio não alteraram significativamente ($p > 0,05$) algumas características da amostra como pH, perda de massa e diferença total de cor. Entretanto, afetaram significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros sólidos solúveis (SS), acidez titulável (TA) e ácido ascórbico (vitamina C) impedindo a queda acentuada desses parâmetros durante o armazenamento. O único parâmetro de qualidade afetado negativamente pela ozonização foi a saturação de cor (croma), pela redução da intensidade da cor vermelha. Isso pode ser compensado pela diferença total de cor que não foi alterada pelo ozônio durante o armazenamento. Pode-se concluir, em função disso, que o ozônio pode ser aplicado para a remoção de resíduos de agrotóxicos de frutos de morango sem prejudicar a qualidade destes frutos.

CAPÍTULO 4 USO DE OZÔNIO PARA REMOÇÃO DE CLOROTALONIL EM UVAS

1. Introdução

Vários fungicidas, tais como o clorotalonil (2,4,5,6-tetracloro-1,3-benzenodicarbonitrilo, Figura 4.1), são amplamente utilizados para o controle de doenças das videiras. Embora o uso correto desses fungicidas não cause impacto ao meio ambiente, quando as doses de aplicação e os intervalos de segurança não são respeitados, os resíduos desses agrotóxicos podem permanecer nas uvas pós-colheita. Sendo assim, as uvas podem apresentar alto índice de contaminação destes produtos, acarretando riscos à saúde dos consumidores. Torna-se necessário, portanto, o desenvolvimento de métodos para remoção dos resíduos de agrotóxicos pós-colheita das uvas, diminuindo assim os riscos à saúde humana e ao meio ambiente.

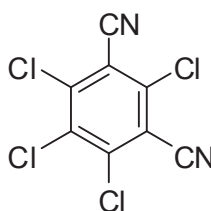


Figura 4.1. Estrutura química do clorotalonil.

Entre os procedimentos empregados para descontaminação de alimentos, a utilização do ozônio (O₃) tem sido investigada como uma alternativa promissora (Ong *et al.*, 1996; Hwang, E.-S. *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2002; Wu, J. *et al.*, 2007; Wu, J. G. *et al.*, 2007; Gabler *et al.*, 2010; Ikeura *et al.*, 2011a; b; Walse e Karaca, 2011; Whangchai *et al.*, 2011; Karaca *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Ikeura *et al.*, 2013). O ozônio (O₃) é gerado quando uma molécula de O₂ gasoso recebe uma descarga elétrica. Por ser uma molécula muito reativa e instável, degrada-se rapidamente em O₂, liberando um radical livre de oxigênio, o qual pode se ligar a outro oxigênio livre formando uma nova molécula de O₂, ou reagir com outras substâncias químicas, oxidando-as (Güzel-Seydim *et al.*, 2004). Esta auto decomposição do ozônio

em oxigênio molecular torna o processo de descontaminação vantajoso por não deixar resíduos nos alimentos. Apesar da eficácia do ozônio na remoção de resíduos de agrotóxicos, a qualidade dos alimentos com relação à cor, pH, acidez, sólidos solúveis, perda de massa, etc. após o tratamento deve ser avaliada (Bevan *et al.*, 2009; Barboni *et al.*, 2010; Kechinski *et al.*, 2012).

Em uvas, a adequação da tecnologia de tratamento com borbulhamento de ozônio em água torna-se relevante em função da presença de resíduos de agrotóxicos pós-colheita e da fragilidade do fruto.

A uva é um fruto não-climatérico, com atividade respiratória relativamente baixa e que não amadurece após a colheita. Devem ser consideradas as perspectivas de remoção desses resíduos e a manutenção das características de qualidade como cor, brilho e sabor, que o tornam o produto atraente ao consumidor.

Os padrões comerciais de qualidade das uvas são baseados em dimensões físicas, coloração, teor de ácidos orgânicos, pH, sólidos solúveis e pela relação entre sólidos solúveis/acidez titulável (Chitarra e Chitarra, 1990).

Neste trabalho avaliou-se a remoção de resíduos de clorotalonil em uvas tratadas com ozônio em água. As alterações físico-químicas dos frutos (teores de sólidos solúveis (°Brix), acidez titulável, pH, perda de massa e mudanças na cor) foram avaliadas durante o armazenamento, por um período de oito semanas.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes e soluções

Foram utilizados para a extração do agrotóxico os solventes acetato de etila (99,5% v/v) e acetonitrila (99,5% v/v) adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Solução padrão estoque do agrotóxico clorotalonil, na concentração de 1000,0 mg L⁻¹, foi preparada pela solubilização do padrão de clorotalonil (99,3% m/m), adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) em acetonitrila. A solução de trabalho, para validação do método, contendo o

agrotóxico clorotalonil na concentração de 100,0 mg L⁻¹, foi preparada a partir da diluição da solução padrão estoque, com o mesmo solvente. Estas soluções foram armazenadas em freezer à temperatura de aproximadamente -20 °C.

Para os demais experimentos foram utilizados os seguintes reagentes: ácido sulfúrico (96,0% m/v, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); iodeto de potássio (99,0% m/m, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); tiosulfato de sódio (99,0% m/m, Carlo Erba, Milão, Itália); amido solúvel (99,6% m/m, Êxodo Científica, Hortolândia, Brasil); hidróxido de sódio (99,0% m/m, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e fenolftaleína (>99%, Merck, Darmstadt, Alemanha).

2.2. Análise de clorotalonil nas amostras de uva

Os resíduos de clorotalonil foram extraídos das amostras de uva pelo método descrito por Soares (2010), eliminando a etapa de filtração do extrato. Neste método 3,0000 g de amostras de uva foram submetidas à extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) com 6,5 mL de acetonitrila, 1,0 mL de água e 1,5 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada por 15 min em mesa agitadora Tecnal TE 420 (São Paulo, Brasil), a 25 °C e 200 rpm e deixada em freezer (Consul, modelo 280, São Paulo, Brasil) a aproximadamente -20 °C por 3 h para separação das fases. Após esse período, o sobrenadante foi analisado por CG/DCE. Para a extração de clorotalonil das amostras de cascas e das polpas de uva foi utilizado o mesmo método, porém com adição de mais 1,0 mL de água no caso das cascas.

Os resíduos de clorotalonil foram detectados e quantificados utilizando um cromatógrafo a gás (modelo GC-2014, Shimadzu, Kyoto, 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, Palo Alto, 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, São Paulo, Brasil, 99,999% de pureza) como gás de arraste na vazão de 1,2 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor *split/splitless* e do detector foram de 280 e 300 °C, respectivamente.

Para determinação de clorotalonil após extração por ESL/PBT foi empregada a seguinte programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 200 °C, com rampa de aquecimento de 20 °C min⁻¹ até 290 °C, 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 min.

O clorotalonil foi identificado por comparação do tempo de retenção do pico presente nos extratos das amostras com o tempo de retenção do padrão e quantificado pelo método de superposição de matriz.

As corridas cromatográficas foram gerenciadas pelo *software* Shimadzu GCsolution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

2.3. Validação do método de extração e análise

Na validação do método de extração foi levado em consideração o limite máximo de resíduo (LMR) de clorotalonil em uvas estabelecido pela legislação brasileira (5,00 mg kg⁻¹), no intuito de garantir que o método seja adequado para a determinação de resíduos nesta faixa de concentração. A linearidade do método foi avaliada pela regressão dos dados das análises de extratos obtidos de amostras de uvas fortificadas com quantidades crescente do padrão entre 2,50 e 10,00 mg kg⁻¹ (0,5 x LMR a 2,0 x LMR; n = 42, sete pontos em triplicata e uma reinjeção). A relação matemática entre o sinal (resposta) e a concentração do analito de interesse foi expressa pela equação da curva analítica e o seu coeficiente de correlação (r). Outros parâmetros de desempenho para o método também foram avaliados: seletividade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão/recuperação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados pela relação entre a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva analítica. O valor resultante foi multiplicado por 3,3 para obter o LD e por 10 para obter o LQ (ICH, 2005). A precisão foi expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi avaliada pelo coeficiente de variação das análises de seis replicatas de amostras fortificadas

em três concentrações (2,5, 5,0 e 7,5 mg kg⁻¹). Para determinar a precisão intermediária, as amostras foram analisadas em três dias consecutivos. A exatidão foi determinada a partir de ensaios de recuperação em que quantidades conhecidas de analito foram adicionadas à amostra em seis replicatas de três concentrações diferentes (2,5, 5,0 e 7,5 mg kg⁻¹). Os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação.

2.4. Obtenção e quantificação do ozônio

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 H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹) de KI 20 g L⁻¹. A quantidade de iodo formado é titulada com solução padronizada de Na₂S₂O₃ a 5,00 10⁻³ mol L⁻¹, usando suspensão de amido (5 g L⁻¹) como indicador.

2.5. Tratamento das uvas com o fungicida clorotalonil

Amostras de uvas (cultivar Itália) isentas de resíduos de agrotóxicos (1,0 kg) recém-colhidas foram imersas, por 3 min, em 1,0 L de solução aquosa contendo 0,27 ou 1,5 g do produto comercial (850 g kg⁻¹ de clorotalonil). Em seguida as uvas foram deixadas em ambiente ventilado para secar por 12 h. Parte dessas amostras foi submetida, em triplicata, à ESL/PBT e os extratos analisados por CG/DCE para determinação da concentração de clorotalonil nas uvas antes do tratamento com ozônio (controle).

2.6. Remoção do clorotalonil nas uvas contaminadas

As amostras de uva contaminadas com o fungicida (1 kg) foram mergulhadas em 5,0 L de água destilada, mantida a 15 °C em um recipiente de PVC (20 cm de diâmetro por 65 cm de altura, Figura 4.2).

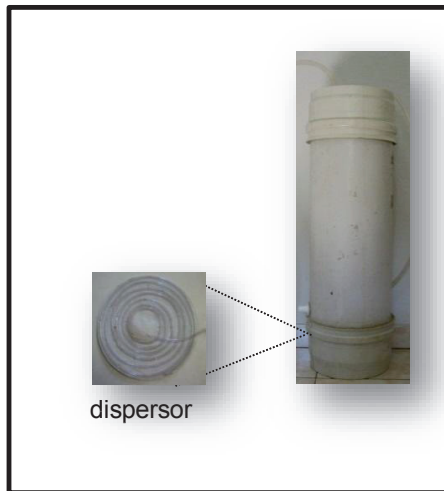


Figura 4.2. Câmara de ozonização.

O ozônio foi borbulhado na água, nas concentrações de 2 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 60 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. As bolhas percorriam toda a extensão do recipiente até a superfície da água.

Parte das amostras tratadas foi submetida, em triplicata, à ESL/PBT e os extratos analisados por CG/DCE para determinar a concentração de clorotalonil nas uvas após o tratamento com ozônio. Parte foi descascada para avaliar a remoção do agrotóxico na polpa e na casca da uva separadamente. O restante das amostras foi armazenado para avaliar a qualidade dos frutos.

2.7. Qualidade da uva após tratamento

Amostras controle (contaminadas com clorotalonil e sem tratamento com ozônio) e as amostras tratadas com ozônio foram armazenadas em geladeira

(1 °C). Periodicamente, no 1°, 7°, 14°, 21°, 28°, 35°, 42° e 49° dia, foram avaliados os parâmetros de qualidade: teores de sólidos solúveis - °Brix (SS), acidez titulável (AT), pH, perda de massa, intensidade da cor (croma) e diferença total de cor (ΔE). Os teores de SS, AT, pH e perda de massa foram determinados de acordo com os métodos do Instituto Adolfo Lutz (2005). A acidez foi determinada por titulação do suco da polpa, com solução padronizada de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e a medida de pH foi feita por imersão direta do eletrodo na amostra de uva preparada para determinação da acidez. O teor de sólidos solúveis das uvas foi determinado por um refratômetro manual mod.107 - 0 a 90% BRX – Biobrix (São Paulo, Brasil). A avaliação da cor dos frutos de uva 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 4.1) e à diferença total de cor, ΔE (Equação 4.2) (Meir *et al.*, 1992; Macdougall, 2002).

$$\text{Croma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Equação 4.1}$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação 4.2}$$

Os dados dos testes de qualidade dos frutos de uva e da remoção de clorotalonil foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste *post-hoc* de Tukey usando o *software* Statistica 8.0 (StatSoft Corp., Tulsa, EUA). Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo.

3. Resultados e discussão

3.1. Validação do método de análise

Para avaliar a seletividade, o método foi aplicado em frutos de uva isentos de agrotóxicos. Posteriormente, essas amostras foram fortificadas com

clorotalonil e submetidas novamente ao método de extração e análise. Os cromatogramas referentes a essas amostras foram comparados, não sendo observado nenhum interferente com resposta no tempo de retenção do analito de interesse (Figura 4.3).

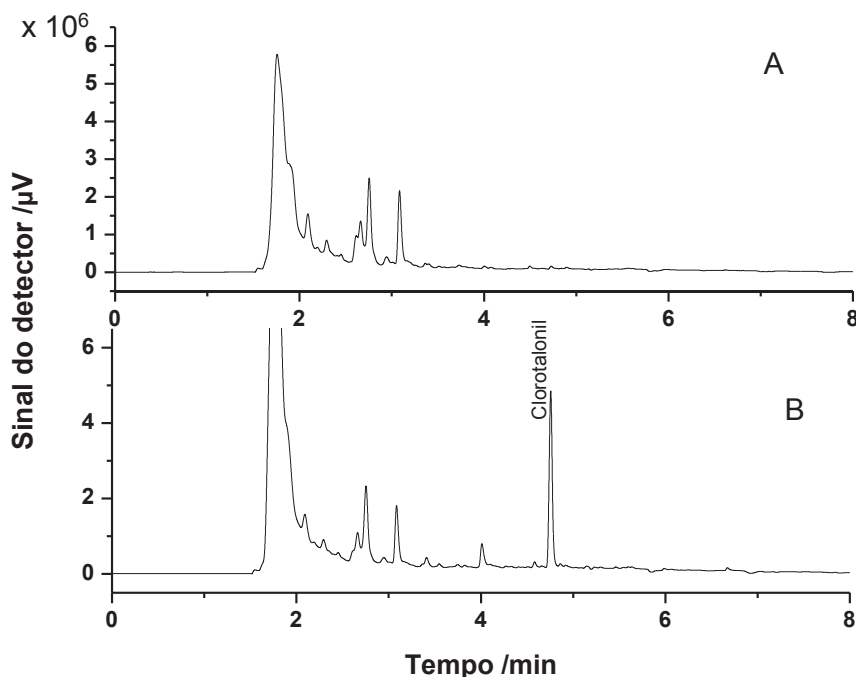


Figura 4.3. Cromatogramas de extratos obtido de uma amostra de uva (A) isenta de clorotalonil; (B) contendo clorotalonil a 5 mg kg^{-1} com $t_R = 4,7 \text{ min}$.

Para avaliar a linearidade de resposta do método otimizado, foi obtida a regressão linear ($y = 1,12 \cdot 10^6 x + 4,26 \cdot 10^6$) da curva analítica no intervalo de 2,50 a $10,00 \text{ mg kg}^{-1}$. Foram empregados sete níveis de concentração e o coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,990. Esse valor indica a boa linearidade de resposta do método para o clorotalonil (INMETRO, 2010). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método, estimados pelos parâmetros da curva analítica foram $0,71$ e $2,1 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. O LQ obtido está abaixo do LMR estabelecidos pela Agência de Vigilância Sanitária Brasileira (ANVISA, $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$), pelo *Codex Alimentarius* ($3,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e pela União Europeia (EU, $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$).

A repetitividade foi avaliada em três níveis de concentração ($2,50$, $5,00$ e $7,50 \text{ mg kg}^{-1}$) sendo os valores obtidos de coeficiente de variação (CV) iguais a

5,5; 3,7; 2,7%, respectivamente. A precisão intermediária foi obtido após análises executadas em três dias consecutivos. Em cada ensaio, seis amostras de cada nível de concentração (2,5, 5,0 e 7,5 mg kg⁻¹) foram analisadas por um mesmo analista, no mesmo laboratório, nas mesmas condições de trabalho. Os valores de CV obtidos foram de 9,2, 4,1 e 4,1%, respectivamente. As porcentagens de recuperação foram 84 ± 5% (2,5 mg kg⁻¹), 109 ± 4% (5,0 mg kg⁻¹) e 102 ± 3% (7,5 mg kg⁻¹). Para a análise de resíduos de agrotóxicos o procedimento analítico deve ser capaz de recuperar, em cada nível de fortificação, de 70 a 120% em média, com uma precisão de CV ≤ 20% (Brasil, 2011). Uma vez que os valores obtidos estão dentro deste intervalo, pode-se concluir que a recuperação e a precisão para clorotalonil foram adequados.

3.2. Remoção do fungicida clorotalonil em uvas

3.2.1. Efeito da concentração inicial do fungicida sobre a eficiência dos tratamentos com ozônio

Os resíduos de clorotalonil quantificados nas amostras de uva antes dos tratamentos com ozônio em água foram proporcionais à concentração da solução de contaminação. Devido às características das amostras de uva, a contaminação destas não foi uniforme. Isto é, os resíduos que permaneceram nos frutos variaram de 38,1 a 82,7 mg kg⁻¹ para as amostras de uva mergulhadas em solução a 1,28 g L⁻¹ de clorotalonil (Tabela 4.1) e de 3,5 a 8,0 mg kg⁻¹ para as amostras de uva mergulhadas em solução a 0,23 g L⁻¹ (Tabela 4.2).

Tabela 4.1. Tratamento de uvas, contaminadas em solução 1,28 g L⁻¹ de clorotalonil, com ozônio.

Tratamento	Concentração de clorotalonil (mg kg ⁻¹)		Remoção (%)
	Antes do tratamento	Após o tratamento	
O ₃ (2,0 mg L ⁻¹)	54,7 ± 1,04	38,3 ± 1,07	29,9
	55,9 ± 0,97	38,3 ± 0,17	31,5
	76,9 ± 3,59	29,3 ± 1,89	61,9
O ₃ (3,0 mg L ⁻¹)	38,1 ± 0,08	28,3 ± 2,04	25,6
	45,6 ± 2,86	29,2 ± 1,55	36,0
	82,7 ± 2,86	26,9 ± 0,63	67,4

Tabela 4.2. Tratamento de uvas, contaminadas em solução 0,23 g L⁻¹ de clorotalonil, com ozônio.

Tratamento	Concentração de clorotalonil (mg kg ⁻¹)		Remoção (%)
	Antes do tratamento	Após o tratamento	
O ₃ (2,0 mg L ⁻¹)	5,2 ± 0,19	3,4 ± 0,26	35,5
	5,6 ± 0,30	3,6 ± 0,19	36,8
	8,0 ± 0,02	4,3 ± 0,12	45,8
O ₃ (3,0 mg L ⁻¹)	3,5 ± 0,12	2,6 ± 0,15	24,9
	4,0 ± 0,10	2,9 ± 0,17	26,3
	4,6 ± 0,01	1,7 ± 0,08	62,6

Pela análise de variância dos resultados (ANOVA), a remoção dos resíduos de clorotalonil foi afetada significativamente ($p < 0,05$) pela concentração inicial do fungicida. A degradação foi maior onde a concentração inicial do agrotóxico era maior, independente da concentração de ozônio borbulhada.

3.2.2. Efeito dos tratamentos com ozônio sobre a concentração do fungicida na polpa e na casca dos frutos

A fim de verificar a distribuição do fungicida no fruto e a capacidade do ozônio de degradar os resíduos, a remoção na polpa e na casca das uvas foi avaliada separadamente (Tabela 4.3).

Como esperado a contaminação dos frutos foi predominantemente na casca (entre 9,0 e 13,7 mg kg⁻¹). No entanto observou-se que o fungicida penetra no fruto contaminando também a polpa. Essa contaminação variou de 13 a 18% da quantidade presente na casca.

Pela análise de variância dos resultados (ANOVA), a remoção dos resíduos de clorotalonil durante os tratamentos com 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de ozônio foram estatisticamente iguais, sendo removidos em média 60% do clorotalonil presente na polpa e na casca das uvas.

Tabela 4.3. Distribuição da contaminação e da remoção do fungicida em uvas mergulhadas em solução 0,23 g L⁻¹ de clorotalonil e tratadas com ozônio.

Tratamento O ₃	Concentração de clorotalonil (mg kg ⁻¹)						Remoção na casca (%)	Remoção na polpa (%)
	Antes do tratamento		Após o tratamento		Polpa	Casca		
	Polpa	Casca	Polpa	Casca				
(2,0 mg L ⁻¹)	1,17 ± 0,03	8,97 ± 0,35	0,67 ± 0,01	4,24 ± 0,20			43,34	52,70
	1,35 ± 0,06	10,00 ± 0,95	0,51 ± 0,03	4,69 ± 0,07			61,96	53,16
	1,75 ± 0,07	13,65 ± 2,00	0,60 ± 0,10	5,28 ± 0,80			65,69	61,31
(3,0 mg L ⁻¹)	1,97 ± 0,06	10,87 ± 0,02	0,42 ± 0,02	3,38 ± 0,24			78,86	68,91
	1,49 ± 0,04	11,83 ± 0,74	0,53 ± 0,04	3,61 ± 0,24			64,76	69,52
	1,34 ± 0,03	7,82 ± 0,82	0,71 ± 0,04	3,40 ± 0,27			47,39	56,50

3.3. Efeito do ozônio na qualidade das uvas

Os parâmetros de qualidade das amostras controle e das amostras tratadas com ozônio nas concentrações de 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ foram comparados com auxílio de testes ANOVA (Tabelas 4.4 e 4.5).

Dos parâmetros avaliados pela ANOVA, apenas a acidez (Figura 4.4) e conseqüentemente o pH dos frutos apresentaram diferença significativa entre as amostras controle (sem tratamento) e as tratadas com 2,0 mg L⁻¹ de ozônio durante o armazenamento. Um teste *post-hoc* de Tukey mostrou uma diferença significativa para os valores de acidez após a 6^a semana nas uvas controle, com um aumento linear, enquanto que não foi observada alteração desse parâmetro nas uvas tratadas com ozônio. Esse resultado mostra o aumento da preservação da qualidade do fruto tratado com ozônio na concentração de 2 mg L⁻¹, pois além de não ter sido observada alterações significativas dos outros parâmetros, a acidez se manteve constante por um período maior do que aquelas frutas sem tratamento.

Tabela 4.4. Análise de variância do efeito do tratamento com ozônio 2 mg L⁻¹ sobre a qualidade das uvas.

		Graus de Liberdade	Estatística F	p-valor
ΔE				
	Tratamento com ozônio	1	1,2036	0,275897
	Período de armazenamento	7	3,0761	0,006385*
	Erro	80		
Croma				
	Tratamento com ozônio	1	0,002	0,967162
	Período de armazenamento	7	2,038	0,060246
	Erro	80		
SS				
	Tratamento com ozônio	1	2,811	0,097505
	Período de armazenamento	7	13,571	0,000000*
	Erro	80		
AT				
	Tratamento com ozônio	1	40,329	0,000000*
	Período de armazenamento	7	39,625	0,000000*
	Erro	80		
pH				
	Tratamento com ozônio	1	29,3	0,000001*
	Período de armazenamento	7	30,8	0,000000*
	Erro	80		
Perda de massa				
	Tratamento com ozônio	1	0,438	0,510125
	Período de armazenamento	7	162,989	0,000000*
	Erro	80		

* = significativo $p < 0,05$; ΔE = variação total de cor; AT = acidez titulável; SS = sólidos solúveis.

Tabela 4.5. Análise de variância do efeito do tratamento com ozônio 3 mg L⁻¹ sobre a qualidade das uvas.

		Graus de Liberdade	Estatística F	p-valor
ΔE	Tratamento com ozônio	1	0,55409	0,458833
	Período de armazenamento	7	2,88348	0,009736*
	Erro	80		
Croma	Tratamento com ozônio	1	107,654	0,000000*
	Período de armazenamento	7	0,767	0,616652
	Erro	80		
SS	Tratamento com ozônio	1	94,87	0,000000*
	Período de armazenamento	7	31,24	0,000000*
	Erro	80		
AT	Tratamento com ozônio	1	68,803	0,000000*
	Período de armazenamento	7	52,075	0,000000*
	Erro	80		
pH	Tratamento com ozônio	1	203,479	0,000000*
	Período de armazenamento	7	53,145	0,000000*
	Erro	80		
Perda de massa	Tratamento com ozônio	1	29,073	0,000001*
	Período de armazenamento	7	223,860	0,000000*
	Erro	80		

* = significativo $p < 0,05$; ΔE = variação total de cor; AT = acidez titulável; SS = sólidos solúveis.

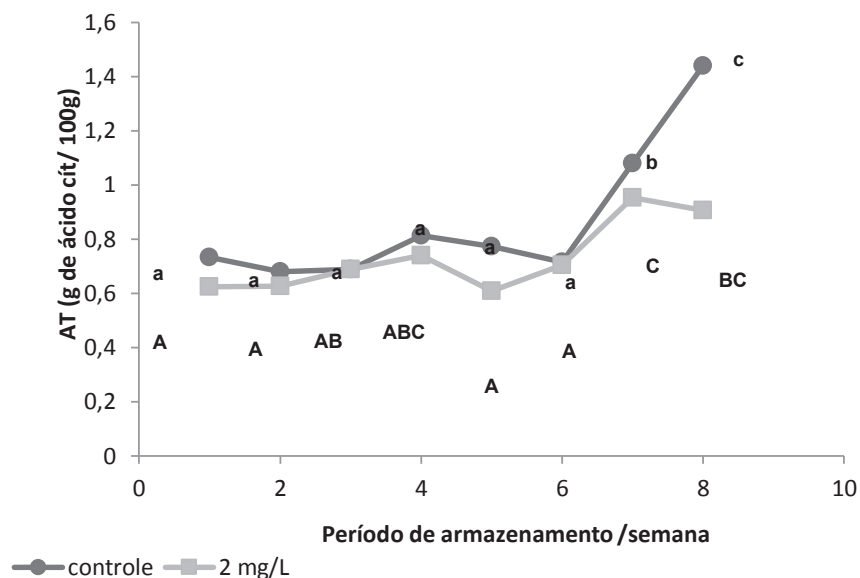


Figura 4.4. Efeito dos tratamentos com ozônio sobre a acidez total titulável (AT) de uvas durante 8 semanas de armazenamento. Letras iguais não diferem entre si teste ANOVA com post-hoc teste de Tukey ($p < 0,05$).

No entanto, o tratamento com ozônio na concentração de 3 mg L⁻¹ alterou significativamente ($p < 0,05$) a maioria dos parâmetros avaliados. O único parâmetro que não foi afetado foi a diferença total de cor (Figura 4.5).

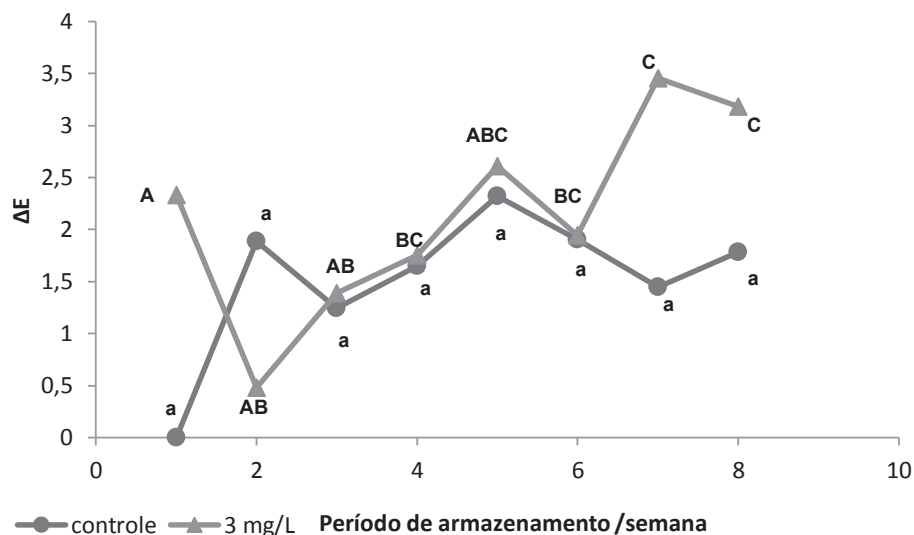


Figura 4.5. Efeito dos tratamentos com ozônio sobre a variação total de cor (ΔE) de uvas durante 8 semanas de armazenamento. Letras iguais não diferem entre si teste ANOVA com post-hoc teste de Tukey ($p < 0,05$).

Vários estudos realizados apresentam aspectos favoráveis à exposição de uvas ao ozônio. Sarig *et al.* (1996) avaliaram a exposição de uvas ao ozônio gasoso e demonstraram que além do seu efeito de esterilização, o ozônio também induz a resistência pós-colheita dos frutos.

Palou *et al.*, (2002) mostraram em seus estudos que o mofo cinzento pode ser completamente inibido de uvas armazenadas por 7 semanas a 5 °C, se estas forem submetidas a um tratamento contínuo com 0,3 µL L⁻¹ de ozônio. A resposta fisiológica do fruto ao tratamento com esta baixa concentração de ozônio foi avaliada pela perda de massa, que não foi estatisticamente diferente do controle.

Gabler *et al.*, (2010) fumigaram uvas com ozônio a 5000 µL L⁻¹ durante 60 min. Esses autores observaram uma redução de aproximadamente 65% da incidência do mofo cinzento nas uvas armazenadas durante 6 semanas a 0,5 °C após a fumigação. Porém, os autores não avaliaram a qualidade dos frutos.

4. Conclusão

A remoção de clorotalonil das uvas é dependente da quantidade de agrotóxico adsorvido pelo fruto. Quanto maior a quantidade de agrotóxico no fruto maior a remoção pelo ozônio borbulhado. Essa estratégia permitiu a remoção de 60% do clorotalonil da casca e da polpa das uvas. Essa remoção foi estatisticamente igual para as concentrações de 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de ozônio.

Entretanto, a qualidade dos frutos foi alterada em função do tratamento com ozônio. O tratamento com ozônio na concentração de 3 mg L⁻¹ alterou significativamente ($p < 0,05$) a maioria dos parâmetros avaliados. Já o tratamento das uvas com ozônio a 2 mg L⁻¹ não alterou significativamente, em relação ao grupo controle, os parâmetros de qualidade sólidos solúveis, perda de massa, intensidade da cor e diferença total de cor. Entretanto, este tratamento afetou significativamente ($p < 0,05$) a acidez titulável e conseqüentemente o pH das uvas. O tratamento com 2 mg L⁻¹ de ozônio impediu o aumento da acidez durante o período de armazenamento, mantendo a qualidade do fruto por mais tempo.

CONCLUSÕES GERAIS

A presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos vem sendo constatada há vários anos pela ANVISA, através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA). A grande preocupação com a presença desses compostos em alimentos levou os pesquisadores a investigarem sobre o comportamento desses nos produtos agrícolas pré e pós-colheita. Esses estudos abrangem monitoramento, dissipação e estratégias de remoção.

Neste trabalho foi investigada a dissipação do difenoconazol em morangos após múltiplas aplicações e a remoção de agrotóxicos de frutas (morango e uva) empregando o ozônio como estratégia de remoção.

Foi observado que, embora haja a dissipação do difenoconazol após múltiplas aplicações do produto comercial nas amostras de morango, ocorre também um aumento gradativo da concentração residual desse princípio ativo.

Duas estratégias para remoção de fungicidas em frutas foram avaliadas. Uma, envolvendo o tratamento de frutas por fumigação com ozônio em diferentes concentrações e outra, por imersão dos frutos em água ozonizada.

A fumigação de morangos com diferentes concentrações de ozônio levou a alta remoção do fungicida difenoconazol, mantendo a qualidade dos frutos por mais tempo.

A imersão das uvas em água borbulhada com ozônio levou à remoção significativa de clorotalonil da casca e da polpa das uvas. Observou-se que a concentração mais baixa de ozônio manteve por mais tempo a qualidade de uvas armazenadas.

Novos estudos estão sendo desenvolvidos para avaliar a estabilidade do ozônio em diferentes valores de pH e temperatura, visando aumentar a meia vida desse em água e, conseqüentemente, sua eficiência na remoção de resíduos de agrotóxicos e tempo de aplicação. Está sendo avaliado também o uso de água ozonizada, para remoção de outros agrotóxicos em batata e alface.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALRAHMAN, S.; AHMED, N. Dissipation of penconazole in peach, plum, apricot, and mango by HPLC–DAD. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 260-263, 2013.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A.; DURÁN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, p. 818-824, 2004.

ANVISA. Sistema de informações sobre agrotóxicos. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: fevereiro 2012.

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

BARBONI, T.; CANNAC, M.; CHIARAMONTI, N. Effect of cold storage and ozone treatment on physicochemical parameters, soluble sugars and organic acids in *Actinidia deliciosa*. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 946-951, 2010.

BARBOSA, C. A. **Compêndio de defensivos agrícolas**. Viçosa: AgroJuris, 2010. 767 p.

BEVAN, S. L.; NORTH, P. R. J.; GREY, W. M. F.; LOS, S. O.; PLUMMER, S. E. Impact of atmospheric aerosol from biomass burning on Amazon dry-season drought. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v. 114, p. D09204, 2009.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227 p.

CARVALHO, S. P. **Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 2006. 160 p.

CESARINO, I.; MORAES, F. C.; MACHADO, S. A. S.; PASSARETTIFILHO, J.; CARDOSO, A. A. A new indirect electrochemical method for determination of ozone in water using multiwalled carbon nanotubes. **Electroanalysis**, v. 23, n. 6, p. 1512-1517, 2011.

CHEN, J. Y.; LIN, Y. J.; KUO, W. C. Pesticide residue removal from vegetables by ozonation. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 404-411, 2013.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 341-349, 2008.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. D. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320 p.

CURTI, K. C. F. **Estudo comparativo da degradação do inseticida endossulfan através de: ozônio, fotólise e ozonização fotolítica**. 2011. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG. 135 p.

EL MOUDEN, O. I.; ZOUGAGH, M.; LEMERHYERATTE, A.; SALGHI, R.; BAZZI, L.; HORMATALLAH, A.; CHAKIR, A.; RIOSI, A. In-house pesticide residue monitoring of tomatoes from souss-massa (morocco) and pesticide residue levels in tomatoes grown in a greenhouse after multiple applications of dicofol and difenoconazole. **Italian Journal of Food Science**, v. 21, n. 4, p. 517-528, 2009.

FRANÇOSO, I. L. T.; COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Alterações físico-químicas em morangos (*Fragaria anassa* Duch.) irradiados e armazenados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 614-619, 2008.

GABLER, F. M.; SMILANICK, J. L.; MANSOUR, M. F.; KARACA, H. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, n. 2, p. 85-90, 2010.

GENG, Y.; JIA, R.; LI, C.; MA, X.; LIN, Y. Dissipation and residue determination of fluoroglycofen-ethyl in soybean and soil by UPLC-MS-MS. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 669-673, 2012.

GORDON, G. The chemistry and reactions of ozone in our environment. **Progress in Nuclear Energy**, v. 29, Supplement, p. 89-96, 1995.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, J. A.; SAUPE, A. **Ozonation of water and waste water: a practical guide to understanding ozone and its applications**. 2 ed. Weinheim: Wiley, 2009. 378 p.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320-1323, 2008.

GÜZEL-SEYDIM, Z.; BEVER, P. I.; GREENE, A. K. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 475-479, 2004.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

HOLTZ, S. G. **Aplicação de ozônio e de revestimentos comestíveis em morangos (Fragaria ananassa Duch.) minimamente processados**. 2006. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 81 p.

HWANG, E. S.; CASH, J. N.; ZABIK, M. J. Postharvest treatments for the reduction of mancozeb in fresh apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3127-3132, 2001.

_____. 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.

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

IKEHATA, K.; GAMAL EL-DIN, M. Aqueous pesticide degradation by ozonation and ozone-based advanced oxidation processes: a review (Part I). **Ozone: Science & Engineering**, v. 27, n. 2, p. 83-114, 2005.

IKEURA, H.; KOBAYASHI, F.; TAMAKI, M. Removal of residual pesticide, fenitrothion, in vegetables by using ozone microbubbles generated by different methods. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 3, p. 345-349, 2011a.

_____. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 956-959, 2011b.

_____. Ozone microbubble treatment at various water temperatures for the removal of residual pesticides with negligible effects on the physical properties of lettuce and cherry tomatoes. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 2, p. T350-T355, 2013.

INMETRO. **INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010.

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

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.

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

KARACA, H.; WALSE, S. S.; SMILANICK, J. L. Effect of continuous 0.3 µL/L gaseous ozone exposure on fungicide residues on table grape berries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 64, n. 1, p. 154-159, 2012.

KECHINSKI, C. P.; MONTERO, C. R. S.; NOREÑA, C. P. Z.; TESSARO, I. C.; MARCZAK, L. D. F.; BENDER, R. J. Effects of ozone in combination with hydrothermal treatment and wax on physical and chemical properties of papayas. **Ozone: Science & Engineering**, v. 34, n. 1, p. 57-63, 2012.

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

KIM, T. J.; SILVA, J. L.; CHAMUL, R. S.; CHEN, T. C. Influence of ozone, hydrogen peroxide, or salt on microbial profile, TBARS and color of channel catfish filets. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1210-1213, 2000.

LANGLAIS, B. **Ozone in water treatment: application and engineering: cooperative research report**. 1 ed. Chelsea: CRC Press, 1991. 592 p.

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999. 527 p.

LUNATI, F. Le fragole italiane in cerca di un posto al solo. **Rivista di Frutticoltura**, v. 68, n. 4, p. 9-10, 2006.

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

MAKINEN, K. K.; SODERLING, E. A quantitative study of mannitol, sorbitol, xylitol, and xylose in wild berries and commercial fruits. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 2, p. 367-371, 1980.

MALHAT, F. M.; MAHMOUD, H. A. Dissipation and residues of mandipropamid in grape using QuEChERS methodology and HPLC-DAD. **ISRN Anal. Chem.**, v. 2012, p. 5, 2012.

MARTHE, D. B.; BITTENCOURT, L. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Quim. Nova**, v. 33, p. 1389-1393, 2010.

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.

MONTERO, T. M.; MOLLÁ, E. M.; ESTEBAN, R. M.; LÓPEZ-ANDRÉU, F. J. Quality attributes of strawberry during ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 65, n. 4, p. 239-250, 1996.

MUKHOPADHYAY, S.; DAS, S.; BHATTACHARYYA, A.; PAL, S. Dissipation study of difenoconazole in/on chili fruit and soil in India. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 1, p. 54-57, 2011.

NADAS, A.; OLMO, M.; GARCÍA, J. M. Growth of Botrytis cinerea and strawberry quality in ozone-enriched atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, p. 1798-1802, 2003.

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.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 52-76, 2012.

PALOU, L. S.; CRISOSTO, C. H.; SMILANICK, J. L.; ADASKAVEG, J. E.; ZOFFOLI, J. P. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay

development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 24, n. 1, p. 39-48, 2002.

PÉREZ, A. G.; SANZ, C.; RÍOS, J. J.; OLÍAS, R.; OLÍAS, J. M. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 1652-1656, 1999.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; 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 Chem.**, v. 121, n. 1, p. 251-256, 2010.

RAKNESS, K. L. **Ozone in drinking water treatment - process design, operation, and optimization**. 1 ed. Denver: American Water Works Association, 2005. 302 p.

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

RICE, R. G.; NETZER, A. **Handbook of ozone technology and applications**. Boston: Ann Arbor Science, 1984. 392 p.

RICE, R. G.; ROBSON, C. M.; MILLER, G. W.; HILL, A. G. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal (American Water Works Association)**, v. 73, n. 1, p. 44-57, 1981.

RODONI, L.; CASADEI, N.; CONCELLÓN, A. A.; CHAVES ALICIA, A. R.; VICENTE, A. R. Effect of short-term ozone treatments on tomato (*solanum lycopersicum* L.) fruit quality and cell wall degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 594-599, 2010.

ROTH, J. A.; SULLLVAN, D. E. Solubility of ozone in water. **Ind. Eng. Chem. Fundam.**, v. 20, n. 2, p. 137-140, 1981.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization.** Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

SALVADOR, A.; ABAD, I.; ARNAL, L.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M. Effect of ozone on postharvest quality of persimmon. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, p. S443-S446, 2006.

SARIG, P.; ZAHAVI, T.; ZUTKHI, Y.; YANNAI, S.; LISKER, N.; BEN-ARIE, R. Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 48, n. 6, p. 403-415, 1996.

SCHERMERHORN, P. G.; GOLDEN, P. E.; KRYNITSKY, A. J.; LEIMKUEHLER, W. M. Determination of 22 triazole compounds including parent fungicides and metabolites in apples, peaches, flour, and water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Aoac International**, v. 88, n. 5, p. 1491-1502, 2005.

SHAW, D. V. Response to selection and associated changes in genetic variance for soluble solids and titratable acids contents in strawberries **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 5, p. 839-843, 1990.

SILVA, S. B. D.; LUVIELMO, M. D. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

SIMÕES, R. O. **Processo de ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de goiabas 'Pedro Sato'**. 2012. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 145p.

SOARES, C. E. S.; SANTOS, L. C.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. **Efeito do pH na extração de agrotóxicos em uva por ESL-PBT e análise**

por cromatografia gasosa. XXIV Encontro Regional da SBQ-MG. Viçosa - MG 2010.

SUN, D.; LI, L.; LIANG, H.; LI, W.; JI, R.; WU, Y.; LIU, C. The dissipation of ethofenprox in cabbage and soil under open conditions. **Environ. Monit. Assess.**, v. 184, n. 9, p. 5743-5747, 2012.

TIWARI, B. K.; RICE, R. G. Regulatory and legislative issues. In: (Ed.). **Ozone in food processing**: Wiley-Blackwell, 2012. p.7-17.

TOLEDO, C. T.; AGUIAR, A. R. D.; AMARAL, M. O.; OLIVEIRA, B. D. Á.; SILVA, D. F.; SILVA, L. M. D.; PINTO, N. A. V. D.; FRANCO, D. V. **Aplicação do ozônio visando à conservação de morangos produzidos na região do alto Jequitinhonha**. XXV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. Lavras 2011.

TZORTZAKIS, N.; BORLAND, A.; SINGLETON, I.; BARNES, J. Impact of atmospheric ozone-enrichment on quality-related attributes of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 317-325, 2007.

URRUCHI, W. I. **Estado da arte da Tecnologia de Geração de Ozônio e Suas Aplicações**. I Simpósio Latinoamericano de Tecnologias e Aplicações de Ozônio. São José dos Campos: Anais do I Simpósio Latinoamericano de Tecnologias de Ozônio, 2009.

USEPA. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. 1999. Disponível em: http://www.epa.gov/ogwdw000/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf. Acesso em: janeiro de 2013.

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

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-

PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Quim. Nova**, v. 30, p. 535-540, 2007.

WALSE, S. S.; KARACA, H. Remediation of fungicide residues on fresh produce by use of gaseous ozone. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 16, p. 6961-6969, 2011.

WANG, Z. H.; YANG, T.; QIN, D. M.; GONG, Y.; JI, Y. Determination and dynamics of difenoconazole residues in Chinese cabbage and soil. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, n. 8, p. 969-972, 2008.

WHANGCHAI, K.; UTHAIBUTRA, J.; PHIYANALINMAT, S.; PENGPHOL, S.; NOMURA, N. Effect of ozone treatment on the reduction of chlorpyrifos residues in fresh lychee fruits. **Ozone: Science & Engineering**, v. 33, p. 232-235, 2011.

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.

WU, J. G.; LUAN, T. G.; LAN, C. Y.; LO, W. H.; CHAN, G. Y. S. Efficacy evaluation of low-concentration of ozonated water in removal of residual diazinon, parathion, methyl-parathion and cypermethrin on vegetable. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 3, p. 803-809, 2007.

WU, Y.; LIU, X.; DONG, F.; XU, J.; ZHENG, Y. Dissipation and residues of rimsulfuron in potato and soil under field conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 6, p. 1264-1267, 2012.

YOU, X.; JIANG, N.; LIU, F.; LIU, C.; WANG, S. Dissipation and residue of bifenthrin in wheat under field conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 238-241, 2013.

ZHANG, X.; ZHANG, Z.; WANG, L.; ZHANG, Z.; LI, J.; ZHAO, C. Impact of ozone on quality of strawberry during cold storage. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 5, n. 3, p. 356-360, 2011.