

ROBSON RIBEIRO ALVES

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DOS FUNGICIDAS IMAZALIL E
PROCLORAZ APLICADOS EM PÓS-COLHEITA
DE GOIABAS ‘PEDRO SATO’**

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
2017

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

T

A474a
2017
Alves, Robson Ribeiro, 1982-
Avaliação de resíduos dos fungicidas Imazalil e Procloraz
aplicados em pós-colheita de goiabas 'Pedro Sato' / Robson
Ribeiro Alves. – Viçosa, MG, 2017.
xiv, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.79-89.

1. Fungicidas. 2. Goiaba - Efeito de fungicidas.
3. Cromatografia a gás. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em
Agroquímica. II. Título.


CDD 22. ed. 632.952


ROBSON RIBEIRO ALVES


**AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DOS FUNGICIDAS IMAZALIL E
PROCLORAZ APLICADOS EM PÓS-COLHEITA
DE GOIABAS 'PEDRO SATO'**

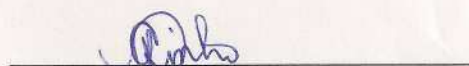
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

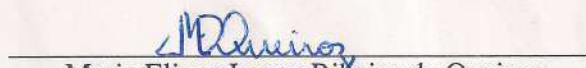
APROVADA: 24 de fevereiro de 2017.


Luiz Carlos Chamfum Salomão
(Coorientador)


Antônio Augusto Neves
(Coorientador)


Dalmo Lopes de Siqueira


Gevany Paulino de Pinho


Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

A Deus.

Aos meus pais José (*in memoriam*) e Neide.

Aos meus irmãos Ricardo, Ronaldo e Andréa.

À Eliana e à minha segunda família, Eliton, Ana Maria e Mariana.

Com amor, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, princípio e fim de todas as coisas, que, com infinita bondade, sempre guia meus passos e Se revela nos pequenos instantes dessa vida passageira.

Aos meus pais José (*in memoriam*) e Neide, pelo amor incondicional que sempre me ofereceram gratuitamente e por incentivarem incessantemente meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do Curso.

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, por sua amizade, pela fundamental participação no processo de aprendizagem e pela orientação, com destacado zelo, paciência e profundo conhecimento científico.

Ao professor Luiz Carlos Chamhum Salomão, pela coorientação, por permitir a execução dos trabalhos no Laboratório de Análise de Frutas, pelo suporte científico e material, pelas sugestões e por compreender as minhas ausências no recinto de trabalho.

Aos professores Antônio Augusto Neves e André Fernando de Oliveira, pela coorientação, aconselhamentos, ensinamentos e dedicação ao longo do doutoramento.

Ao professor Dalmo Lopes de Siqueira, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas sugestões e críticas na qualificação e na participação no aprimoramento da tese.

À professora Gevany Paulino de Pinho, pelos brilhantes conselhos, pela perspicácia em suas observações e por ter aceitado prontamente participar da Banca Examinadora.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pela contribuição nas análises estatísticas.

À Laurence, pela amizade, pelos ensinamentos, pela motivação nos momentos de desânimo e pelo suporte técnico-científico sempre disponível, essencial para a realização do trabalho.

Ao Luiz Manoel, pela amizade, apoio e companheirismo, pelas dicas e ensinamentos no desenvolvimento do trabalho e por estar sempre pronto a ajudar.

Aos amigos do LAQUA, por terem sempre me incentivado a prosseguir: Alessandra, Ana Carolina, Ana Cecília, Anna Isabel, Carlos Eduardo Andrade, Carlos Eduardo Soares, Cristiane, Fernanda Heleno, Gleissy, Jéssika, Liany, Luísa Mazzini, Luiza Fontes, Marcos Raphael, Malu, Mariana Diniz, Nelson, Raquel e Thaís pelo precioso convívio e por terem-me feito digno de conhecê-los.

À Eliana, minha amada esposa, por ser minha base, meu porto seguro. Pela compreensão nos momentos difíceis e pelo incansável apoio, zelo e amor, por sempre acreditar em mim e não permitir que eu desanimasse nunca.

Aos meus amigos da Fraternidade Pequena Via, por compreenderem minha ausência e proporcionarem-me um precioso convívio.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, imprimiram sua marca neste processo constituinte de mais uma etapa de minha vida.

“A vida é um instante entre
duas eternidades”.
Santa Teresinha

BIOGRAFIA

ROBSON RIBEIRO ALVES, filho de José Alves Filho e Neide da Conceição Ribeiro Alves, nasceu em 4 de janeiro de 1982, na cidade de Petrópolis, RJ.

Iniciou o curso de graduação em Química pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em fevereiro de 2000. Em junho de 2004, foi admitido para o cargo de Técnico em Laboratório na UFV, onde, em março de 2007, graduou-se Licenciado em Química.

Em agosto desse mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em nível de Mestrado, da UFV, onde atuou na área de Fruticultura, na linha de pesquisa Fisiologia e Manejo Pós-Colheita de Produtos Agrícolas, defendendo sua dissertação em agosto de 2010.

Em fevereiro de 2012, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de Doutorado, na UFV, onde atuou na área de Química Analítica, na linha de pesquisa Análise de Resíduos de Agroquímicos, submetendo-se à defesa da tese em 21 de fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
1. A goiaba	4
2. Doenças pós-colheita da goiaba	6
3. Uso de fungicidas pós-colheita em goiaba	8
CAPÍTULO 2	13
ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE IMAZALIL E PROCLORAZ EM GOIABAS ‘PEDRO SATO’	13
1. Introdução	13
2. Objetivos	15
3. Material e Métodos	16
3.1. Reagentes	16
3.2. Equipamentos	16
3.3. Material vegetal	16
3.4. Processamento da amostra	17
3.5. Procedimento de extração	18
3.6. Condições cromatográficas	20
3.7. Validação do método analítico	21
3.7.1. Seletividade	21
3.7.2. Linearidade	21
3.7.3. Exatidão	22
3.7.4. Repetitividade	22

3.7.5. Limite de detecção e limite de quantificação.....	22
3.7.6. Avaliação do efeito de matriz	23
4. Resultados e discussão	25
4.1. Análise cromatográfica.....	25
4.2. Validação do método analítico	26
4.2.1. Avaliação do efeito de matriz	26
4.2.2. Qualidade do ajuste do modelo.....	28
4.2.3. Exatidão	28
4.2.4. Repetitividade	29
4.2.5. Limites de detecção e limites de quantificação	30
4.2.6. Avaliação do efeito de matriz	31
5. Conclusões	34
CAPÍTULO 3	35
ESTUDO DA DISSIPAÇÃO DE IMAZALIL E PROCLORAZ EM GOIABAS 'PEDRO SATO'	35
1. Introdução	35
2. Objetivos	36
3. Material e Métodos	37
3.1. Reagentes, equipamentos e material vegetal.....	37
3.2. Montagem do experimento.....	37
3.3. Evolução da cor do epicarpo	40
3.4. Dissipação dos fungicidas	41
4. Resultados e discussão	42
4.1. Evolução da cor do epicarpo	42
4.2. Persistência e dissipação dos fungicidas	43
5. Conclusões	50
CAPÍTULO 4	51
EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE IMAZALIL NA EXTENSÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE GOIABAS 'PEDRO SATO'	51
1. Introdução	51
2. Objetivo.....	53

3. Material e Métodos	54
3.1. Reagentes, equipamentos e material vegetal	54
3.2. Material vegetal	54
3.3. Montagem do experimento	54
3.3. Análises	55
3.3.1. Perda de massa da matéria fresca	55
3.3.2. Incidência de doenças	56
3.3.3. Severidade de doenças	56
3.3.4. Evolução da cor do epicarpo	56
3.3.5. Firmeza do mesocarpo	57
3.3.6. Sólidos solúveis	57
3.3.7. Acidez titulável	57
3.3.8. Análise de resíduos de imazalil	57
3.4. Delineamento experimental e análise estatística	58
4. Resultados e discussão	59
4.1. Perda de massa da matéria fresca	59
4.2. Incidência e severidade de doenças	60
4.3. Evolução da cor do epicarpo	61
4.4. Acidez	63
4.5. Sólidos solúveis	64
4.6. Firmeza do mesocarpo	65
4.7. Resíduos de imazalil	65
5. Conclusões	71
CAPÍTULO 5	72
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE GOIABAS ‘PEDRO SATO’ NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IMAZALIL E PROCLORAZ POR CROMATOLOGRAFIA GASOSA	72
1. Introdução	72
2. Objetivos	73
3. Material e Métodos	73
3.1. Reagentes e equipamentos	73
3.2. Material vegetal	73

3.3. Montagem do experimento.....	73
3.4. Avaliação do efeito de matriz.....	74
3.5. Delineamento experimental e análise estatística	74
4. Resultados e discussão	75
5. Conclusões	77
CONCLUSÕES GERAIS	78
REFERÊNCIAS.....	79

RESUMO

ALVES, Robson Ribeiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Avaliação de resíduos dos fungicidas imazalil e procloraz aplicados em pós-colheita de goiabas ‘Pedro Sato’**. Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Antônio Augusto Neves e Luiz Carlos Chamhum Salomão.

A assistência técnica inadequada, o manejo incorreto da cultura, a ausência de monitoramento de resíduos de agrotóxicos e, por vezes, a falta de consciência do produtor levam ao uso indiscriminado e irresponsável dos produtos químicos, que geram impactos ao meio ambiente e à saúde humana. Em muitas culturas frutícolas, a falta de produtos registrados para a cultura induz o produtor a procurar respostas em produtos não registrados, com eficácia e dosagens desconhecidas para a cultura. Esse é o caso da goiaba, que apesar de ser alvo de pragas e doenças com potencial para comprometer toda a safra, possui poucos produtos registrados para uso em pré-colheita e nenhum produto registrado para uso em pós-colheita. Os fungicidas imazalil e procloraz são frequentemente usados na cultura da goiaba, em pós-colheita. Para avaliar o comportamento desses princípios ativos na goiaba (epicarpo, mesocarpo e placenta) este trabalho se dividiu em três experimentos. O primeiro experimento teve por objetivo estudar a dissipação e ou migração dos agrotóxicos imazalil e procloraz, aplicados na pós-colheita de goiabas ‘Pedro Sato’, do epicarpo para o mesocarpo e deste para a placenta. Para tanto, os frutos foram imersos em caldas fungicidas em diferentes concentrações. Periodicamente, os frutos foram avaliados, quanto à evolução de cor do epicarpo e, quanto à presença de resíduos dos princípios ativos nas frações do fruto. Foi utilizado o método de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT), adaptado e validado para determinação de resíduos destes princípios ativos nas frações do fruto de goiaba por cromatografia gasosa acoplada a um detector por captura de elétrons (CG/DCE). O segundo experimento, teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes doses de imazalil na manutenção da qualidade da goiaba. Neste estudo, os frutos foram imersos em caldas fungicidas em quatro concentrações de imazalil e avaliados quanto à perda de massa da matéria fresca, incidência e severidade de doenças, evolução de cor do epicarpo, firmeza do mesocarpo, teor de sólidos solúveis, acidez titulável e quanto à presença de resíduos dos princípios ativos nas frações do fruto.

Os resultados foram avaliados por estatística descritiva ou por superfície de resposta. O objetivo do terceiro experimento foi avaliar a influência do tempo de armazenamento de goiabas 'Pedro Sato' na determinação de resíduos dos agrotóxicos por cromatografia gasosa. Neste estudo, frutos não tratados foram mantidos por até 13 dias de armazenamento e avaliados quanto à alteração de cor do epicarpo. Posteriormente, os frutos foram processados, separados em frações e estas submetidas ao processo de extração previamente validado. Os extratos foram fortificados em concentrações definidas dos princípios ativos e analisados por CG-DCE. Concomitantemente, foi preparada uma curva analítica dos princípios ativos em acetonitrila, utilizada para comparar com as dos extratos e para o cálculo do efeito de matriz das frações em cada dia de armazenamento. Os resultados foram avaliados por análise de regressão. O método ESL/PBT-CG/DCE validado apresentou seletividade e linearidade satisfatórias, com recuperações de extração na faixa de 94,5 a 108% e limites de quantificação (LQ) entre 12,2 a 19,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No primeiro experimento, verificou-se que há dissipação dos princípios ativos do epicarpo com comportamento ajustável a uma cinética de primeira ordem. Verificou-se também que parte dos princípios ativos são dissipados por translocação para o interior do fruto. Estes também foram detectados na placenta, mas em quantidades abaixo do LQ. No segundo experimento, a aplicação de imazalil, nas doses estudadas, não afetou as características de qualidade dos frutos, embora tenham sido eficazes em retardar a incidência e reduzir a severidade dos danos causados por fungos durante o armazenamento. Independente da dose aplicada nos frutos, o imazalil migra do epicarpo para o mesocarpo, não sendo detectado na placenta. Entretanto a maior concentração deste fungicida permanece no epicarpo. Com relação à persistência do princípio ativo no fruto, as menores doses apresentaram resíduos abaixo do limite de referência tolerado, embora com valores muito próximos deste. No terceiro experimento, os resultados indicam que há diferenças no efeito de matriz ao longo dos dias de armazenamento sendo, portanto, necessário empregar curvas analíticas preparadas no extrato das frações para minimizar o efeito de matriz.

ABSTRACT

ALVES, Robson Ribeiro, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Evaluation of residues of imazalil and prochloraz fungicides applied in post-harvest guava 'Pedro Sato'**. Advisor: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisors: Antônio Augusto Neves and Luiz Carlos Chamhum Salomão.

Inadequate technical assistance, poor crop management, lack of monitoring of pesticide residues and sometimes lack of producer awareness lead to the indiscriminate and irresponsible use of chemicals, which have an impact on the environment and human health. In many fruit crops, the lack of registered products for the crop induces the producer to seek answers in unregistered products, with efficacy and dosages unknown for the crop. This is the case of guava, which despite being a target of pests and diseases with potential to compromise the whole crop, has few products registered for use in pre-harvest and no product registered for post-harvest use. The imazalil and prochloraz fungicides are often used in postharvest guava crops. To evaluate the behavior of these active principles in guava (epicarp, mesocarp and placenta) this work was divided into three experiments. The first experiment aimed to study the dissipation and/or migration of the imazalil and prochloraz pesticides, applied in the postharvest of 'Pedro Sato' guavas, from the epicarp to the mesocarp and from this to the placenta. For this, the fruits were immersed in fungicidal syrup at different concentrations. Periodically, the fruits were evaluated as to the color evolution of the epicarp and, as to the presence of residues of the active principles in the fractions of the fruit. The low-temperature solid-liquid extraction (ESL / PBT) extraction method was used, adapted and validated to determine residues of these active principles in guava fruit fractions by gas chromatography coupled to an electron capture detector (CG / DCE). The second experiment aimed to evaluate the effect of different doses of imazalil on the maintenance of guava quality. In this study, fruits were immersed in fungicidal syrups at four concentrations of imazalil and evaluated for loss of fresh matter mass, disease incidence and severity, epicarp color development, mesocarp firmness, soluble solids content, titratable acidity and as regards the presence of residues of the active principles in the fractions of the fruit. The results were evaluated by descriptive statistics or by response surface. The objective of the third experiment

was to evaluate the influence of 'Pedro Sato' guava storage time on the determination of residues of pesticides by gas chromatography. In this study, untreated fruits were kept for up to 13 days of storage and evaluated for epicarp color change. Subsequently, the fruits were processed, separated into fractions and submitted to the previously validated extraction process. The extracts were fortified at defined concentrations of the active principles and analyzed by GC-DCE. At the same time, an analytical curve of the active ingredients in acetonitrile was used to compare with the extracts and to calculate the matrix effect of the fractions on each day of storage. The results were evaluated by regression analysis. The validated ESL / PBT-CG / DCE method presented satisfactory selectivity and linearity, with extraction recoveries ranging from 94.5 to 108% and limits of quantification (LQ) of 12.2 to 19.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In the first experiment, it was verified that there is dissipation of the active principles of the epicarp with behavior adjustable to a first order kinetics. For the mesocarp, it was verified that part of the active principles are dissipated by translocation into the fruit. These were also detected in the placenta, but in amounts below the LQ. In the second experiment, the application of imazalil at the doses studied did not affect fruit quality characteristics, although they were effective in delaying the incidence and reducing the severity of fungal damage during storage. Regardless of the dose applied to the fruits, imazalil migrates from the epicarp to the mesocarp and is not detected in the placenta. However, the highest concentration of this fungicide remains in the epicarp. Regarding the persistence of the active principle in the fruit, the lowest doses presented residues below the tolerated reference limit, although with very close values. In the third experiment, the results indicate that there are differences in the matrix effect over the storage days, so it is necessary to use prepared analytical curves in the fractions extract to minimize the matrix effect.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

No mundo inteiro são produzidos, anualmente, mais de 800 milhões de toneladas de frutas. No *ranking* dos principais países produtores, o Brasil ocupa a terceira posição, atrás apenas da China e da Índia (TREICHEL *et al*, 2016). Em 2015, o valor da produção nacional das 22 principais frutíferas foi estimado em R\$ 26,5 bilhões (IBGE, 2016) e o setor frutícola empregou 5,6 milhões de pessoas, o equivalente a 27% da mão de obra agrícola do País (TREICHEL *et al*, 2016). Esses fatos mostram com clareza a relevância econômica e social da fruticultura para o Brasil.

Dentre essas frutíferas de importância econômica, encontra-se a goiaba, que tem apresentado gradativa ascensão em sua produção ao longo dos anos. Apenas em 2015, foram produzidas cerca de 425 mil toneladas do fruto, equivalentes a R\$ 476 milhões. Entretanto, apenas uma pequena fração do total produzido – em torno de 0,05% – tem alcançado mercados internacionais (SECEX, 2017). Isto se deve, em grande parte, à alta perecibilidade do produto e a dificuldades relacionadas com a segurança fitossanitária do mesmo. Dessa forma, a goiaba dificilmente atinge o patamar de qualidade exigido por mercados consumidores internacionais.

Uma das barreiras impostas pelo mercado consumidor refere-se aos resíduos gerados pelo uso de agrotóxicos nas culturas agrícolas. Estes são usados no manejo das culturas agrícolas para controlar pragas e doenças e, conseqüentemente, aumentar a produtividade. A falta de assistência técnica, o manejo incorreto da cultura, a ausência de monitoramento de resíduos de agrotóxicos e, por vezes, a falta de consciência do produtor levam ao uso indiscriminado e irresponsável dos produtos químicos, que gera impactos ao meio ambiente e à saúde humana.

Em muitas culturas frutícolas, há ainda um fator agravante que se soma aos demais: a falta de produtos registrados induz o produtor a procurar respostas em produtos não registrados, dos quais se desconhece a eficácia e, ou a dosagem adequada para resolver problemas da cultura. Esse é o caso da goiaba, cultura com menor expressão comercial, quando comparada com culturas como banana, citros,

etc. A goiabeira, apesar de ser alvo de pragas e doenças com potencial para comprometer toda a safra (caso não sejam contidas ou controladas), possui poucos registros para uso em pré-colheita e nenhum produto registrado para uso pós-colheita.

A ausência de registro de fungicidas pós-colheita no país de origem é um dos entraves à comercialização de produtos vegetais a longas distâncias. Organizações como a GlobalGAP, criada em 1997 pelo mercado varejista europeu, impõem regulamentações para a importação de frutas e legumes, exigindo que sua produção seja realizada segundo normas rígidas quanto aos níveis de resíduos de fungicidas, onde toda a cadeia de produção é inspecionada e certificada (GLOBALGAP, 2016). Na área de abrangência da GlobalGAP, só são aceitos produtos que tenham sido tratados com fungicidas registrados tanto no mercado de interesse quanto no país produtor. Dessa forma, a falta de registro de fungicidas para goiabeira no Brasil inviabiliza a exportação de frutas para outros mercados consumidores. A falta de registro de agrotóxicos, em parte, pode ser explicada pelo fato de haver poucos pleitos de registro pelas empresas de agrotóxicos para culturas consideradas de baixo retorno econômico (ANVISA, 2014).

Como agravante ao uso de produtos não registrados, ainda há a problemática do uso inadequado destes por parte do produtor. Ou seja, como não há registro, não há indicação de período de carência nem estudos que orientem o uso consciente do produto no fruto. Assim, há a possibilidade de o agricultor aplicar o produto e vender os frutos sem aguardar o tempo necessário de carência, o que aumenta consideravelmente o risco de ingestão de resíduos por parte do consumidor final, que não possui mecanismos para atestar a qualidade do produto que adquire.

Como a goiaba é um fruto com casca fina e delicada, acredita-se que ocorra a penetração dos princípios ativos em quantidade não negligenciável para o interior do fruto. E como este geralmente é consumido como um todo, há especial preocupação com a distribuição de resíduos não apenas na casca (epicarpo), mas também na polpa (mesocarpo) e no miolo (tecido placentário¹).

¹ Para fins de simplificação dos termos, doravante a expressão 'placenta' será sempre utilizada para indicar o tecido placentário com as sementes, apesar de não ser morfológicamente adequado.

Neste sentido, o monitoramento detalhado dos resíduos de agrotóxicos em goiabas é de fundamental importância, tanto para assegurar a qualidade dos frutos que chegam até o consumidor quanto para avaliar seu grau de contaminação.

No presente trabalho, foi estudada a dissipação dos fungicidas imazalil e procloraz aplicados na pós-colheita de goiabas 'Pedro Sato' e sua translocação entre os tecidos do fruto (epicarpo, mesocarpo e placenta). Verificou-se também a variação do efeito de matriz ao longo do armazenamento e o efeito das doses de imazalil na conservação pós-colheita do fruto.

REVISÃO DE LITERATURA

1. A goiaba

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta tropical ainda pouco conhecida no cenário mundial de frutas. Na União Europeia e nos Estados Unidos, grandes mercados consumidores de produtos hortifrutícolas, a fruta é considerada exótica e é comercializada em pequena escala e a preços elevados. O mercado externo assinala preferência pelos frutos de polpa branca (NETO, 2007), em contraposição ao mercado interno, onde o interesse econômico está focado na produção de frutos de polpa vermelha (AGRIANUAL, 2016).

No Brasil, algumas das principais cultivares de goiabas destinadas ao consumo como fruta fresca surgiram de seleções realizadas por produtores de origem japonesa. Pela seleção realizada em seus pomares, obtiveram plantas cujos frutos apresentavam qualidades adequadas à comercialização, como as cultivares ‘Kumagai’, ‘Ogawa’, ‘Pedro Sato’ e ‘Hitigio’ (CORREA, 2016). A cultivar ‘Pedro Sato’ é uma das mais produzidas na Zona da Mata mineira, em especial, nos municípios de Paula Cândido, Visconde do Rio Branco e Piraúba que, juntos, são responsáveis por 25% da produção mineira de goiaba (SEAPA-MG, 2016).

O Brasil é um dos grandes produtores de goiaba, com produção em torno de 425 mil toneladas/ano e em contínua expansão nos últimos anos (IBGE, 2016). O fruto é procurado tanto para consumo *in natura* quanto para a produção de sucos, geleias e doces, bem como para uso medicinal. Na medicina popular, a goiaba é recomendada no combate ao escorbuto, dor de garganta, vômitos, diarreia, cárie, feridas, inflamações e hipertensão. Flores *et al.* (2013) e Correia (2016) relatam o potencial uso medicinal da goiaba por suas propriedades anti-plasmodiais, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, anticancerígenas e antioxidantes.

Do ponto de vista nutricional, a goiaba é excelente fonte de vitaminas A, C, E e K e do grupo B (tiamina, niacina, B3 e B6), cálcio, ferro, potássio, sódio, zinco, selênio, fibras e substâncias carotenoides, como licopeno. Destaca-se ainda pela presença de flavonoides, triterpenos e outros compostos secundários biologicamente ativos (FLORES *et al.*, 2013; CORREIA, 2016).

Fisiologicamente, a goiaba é classificada como baga, com epicarpo fino (casca), mesocarpo carnoso (tecido róseo e uniforme situado logo abaixo do epicarpo) e tecido placentário que envolve as sementes (Figura 1).



Figura 1: Camadas estruturais da goiaba.

A goiaba é uma fruta de padrão respiratório climatérico e apresenta rápido amadurecimento após a colheita. Isto é decorrente do aumento das taxas respiratórias e da produção de etileno (BELTRAME, 2012) e, que aceleram os processos de perda de firmeza, alteração da cor da casca e incidência de podridões devido ao processo de senescência (SINGH & PAL, 2008). Devido à alta perecibilidade resultante desses fatores, o potencial da cultura no que diz respeito ao armazenamento, comercialização e exportação torna-se extremamente limitado.

2. Doenças pós-colheita da goiaba

Doenças pós-colheita, definidas como doenças cujos sintomas se manifestam após a colheita do produto, caracterizam-se inicialmente por manchas necróticas que afetam a parte externa do fruto e, muitas vezes, também a parte interna. Podem ser ocasionadas por patógenos que infectam o fruto ainda verde, mantendo-se quiescentes até a maturação e/ou por patógenos que infectam o fruto maduro, usualmente devido a danos mecânicos.

Qualquer que seja a época de infecção, os sintomas aparecem após a colheita do produto, podendo colocar a perder toda a produção e os investimentos já realizados com tratamentos culturais, colheita, embalagem, armazenamento e transporte dos frutos. Para evitar as perdas causadas por doenças pós-colheita e manter a integridade do fruto pelo maior período de tempo possível – a chamada vida de prateleira –, o cuidado para prevenir danos mecânicos é fundamental para evitar a aceleração do amadurecimento e a incidência de doenças fúngicas.

As principais doenças pós-colheita que atingem a goiaba são a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* e por *C. acutatum*, a pinta preta, causada por *Guignardia psidii* e a podridão estilar, causada por diferentes patógenos pertencentes à família Botryosphaeriaceae (NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 2016). Além destas, também são comuns danos pós-colheita decorrentes de podridões causadas por *Dothiorella dominicana* e por fungos dos gêneros *Macrophomina*, *Mucor*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phytophthora*, *Rhizopus*, *Sclerotium*, *Thielaviopsis*, *Pestalotiopsis*, *Coanephora* e *Penicillium* (JUNQUEIRA & COSTA, 2002).

Fischer *et al.* (2011), avaliando danos pós-colheita em goiabas ‘Pedro Sato’ na Ceasa (Bauru - SP), observaram a incidência de diferentes doenças pós-colheita, atingindo média total de 3,1%, 38,5%, 80,4% e 92,0% dos frutos aos 1, 3, 6 e 9 dias de armazenamento, respectivamente. Relatam também que a antracnose foi a doença com maior incidência (21,3% aos 3 dias e 46,2% aos 9 dias de armazenamento) entre as podridões detectadas nos frutos, seguida pela pinta preta (12,5% aos 3 dias e 25,5% aos 9 dias de armazenamento). Além destas, outras doenças foram constatadas com menor incidência, como as podridões causadas por *Fusicoccum* spp., *Phoma psidii*, *Mucor hiemalis*, *Aspergillus niger*, *Pestalotiopsis psidii*, *Phomopsis* spp., *Dothiorella* spp. e *Rhizopus stolonifer*.

A respeito da antracnose, também denominada mancha-chocolate, é considerada doença com potencial para danos medianos a severos nas fases de florescimento, maturação e pós-colheita, sobretudo em pomares longevos, muito adensados e/ou malcuidados. Especificamente quando de sua incidência na pós-colheita, a infecção ocorre por pequenas lesões deprimidas, encharcadas, de coloração marrom-clara, que se tornam moles, usualmente recobertas por tufo de conídios sobre as áreas descoloridas. Os frutos atacados, além da depreciação visual, ficam inadequados para o consumo (JUNQUEIRA & COSTA, 2002).

Já os sintomas da pinta preta constituem-se de pontos amarelados deprimidos, os quais evoluem rapidamente na superfície dos frutos de forma concêntrica, tornando-se lesões de coloração preto-esverdeada que podem apresentar na superfície frutificações do fungo. Essas lesões, de aproximadamente 1 a 2,5 cm de diâmetro, ocorrem em qualquer área do fruto, podendo posteriormente coalescer (FISCHER *et al.*, 2012).

Além das doenças relatadas, a elevada incidência de moscas-das-frutas (*Anastrepha* spp. e *Ceratitis capitata*), principal praga da goiabeira, prejudica consideravelmente a produção dos frutos. Para evitar o ataque das moscas, é comum a prática do ensacamento dos frutos. Entretanto, segundo Martins *et al.* (2007), essa técnica promove acréscimo significativo na incidência de doenças quiescentes em goiabas, possivelmente relacionado com microclima favorável ao processo infeccioso. Os autores também encontraram correlação positiva do ensacamento com a suscetibilidade do fruto ao dano mecânico, devido a esses frutos possuírem epicarpo mais fino em relação ao fruto não ensacado.

3. Uso de fungicidas pós-colheita em goiaba

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) implantou, em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com crescente participação dos estados brasileiros e de laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos.

O PARA tem por objetivo verificar se os alimentos comercializados no varejo apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA e publicados em monografia específica para cada agrotóxico. Permite, também, conferir se os agrotóxicos utilizados estão devidamente registrados no país e se foram aplicados somente nas culturas para as quais estão autorizados (ANVISA, 2016).

A escolha dos alimentos monitorados pelo PARA baseia-se nos dados de consumo obtidos nas pesquisas de orçamento familiar, na disponibilidade dos alimentos nos supermercados das diferentes unidades da Federação e no uso de agrotóxicos nas culturas (ANVISA, 2016).

No período de 2013 a 2015, o PARA analisou 406 amostras de goiaba coletadas em diferentes regiões do País. No total, foram detectados 43 agrotóxicos (dentre 69 pesquisados), sendo que 38 são princípios ativos não registrados para a cultura. Destes 38, 20 foram encontrados em concentrações superiores a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Das amostras, 182 apresentaram resíduos de agrotóxicos não registrados para uso em nenhuma modalidade de aplicação, o que equivale a 44,8% da amostragem. Esse dado confirma a situação da goiaba como alimento de suporte fitossanitário insuficiente (ANVISA, 2016).

O uso de fungicidas é um dos tratamentos mais comuns no controle de doenças pós-colheita em frutas. Embora não existam registros de agrotóxicos para uso nessa modalidade em goiaba, o relatório divulgado pela ANVISA (2016) indica que essa prática tem se tornado comum entre os produtores do fruto. Dos 43 princípios ativos encontrados nas amostras, 14 eram fungicidas não registrados (em nenhuma modalidade) para uso em goiaba.

Na União Europeia, os dados também são preocupantes com relação à goiaba, pois 48,3% das amostras analisadas (em 2014) apresentaram resíduos acima dos LMR's pela *European Food Safety Authority* (EFSA^a, 2016).

Até fevereiro de 2016, no Brasil haviam três fungicidas registrados para uso em pós-colheita de frutas: imazalil, tiabendazol e procloraz. Entretanto, o procloraz, até então largamente utilizado, teve sua comercialização e uso proibido pela ANVISA devido à reavaliação toxicológica do produto não mais atender às diretrizes e exigências de segurança adotadas pela Agência (BRASIL, 2016). Classificado como extremamente tóxico – Classe Toxicológica I –, é conhecido por sua ação como disruptor endócrino, causador de diversas toxicidades com múltiplos mecanismos de ação (VINGGAARD *et al*, 2006) e, mais recentemente, por sua capacidade de induzir estresse oxidativo e danos ao DNA de células humanas (LUNDQVIST *et al*, 2016;). O estresse oxidativo (com formação de espécies reativas de oxigênio) é mecanismo comum para vários efeitos deletérios à saúde humana, como teratogenicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade (DEAVALL *et al*, 2012).

Os fungicidas recomendados para tratamento pós-colheita de frutos representam uma pequena fração do número total de fungicidas existentes no mercado. A maioria desses produtos é aplicada em formulações a base de água, utilizada na imersão ou na pulverização dos frutos, podendo ser associados também a ceras. Essa classe de fungicidas, muitas vezes de ação sistêmica – ou mesmo os de ação translaminar – podem penetrar através da cutícula do fruto e migrar aos tecidos internos (REIS & BRESOLIN, 2007), protegendo o fruto contra infecções subsequentes, suprimindo o desenvolvimento de sintomas e inibindo a esporulação de fungos e a disseminação da doença (AMORIM *et al*, 2006).

Dessa forma, os fungicidas podem ter ação protetora, curativa e/ou erradicante. Quando aplicados de forma protetora, a ação é preventiva, inibindo a penetração do fungo nos tecidos do fruto. Quando a ação do fungicida é curativa, o foco é a pós-infecção, ou seja, quando já ocorreu a penetração do agente infeccioso, mas ainda não são verificados sintomas. No caso de a ação ser erradicante, o agrotóxico atua diretamente sobre o patógeno antes da colheita, isto é, inibe o ciclo reprodutivo do fungo e evita novas infecções (REIS & BRESOLIN, 2007).

O procloraz é classificado como fungicida não sistêmico com ação de contato e mobilidade translaminar. Isso significa que o agrotóxico pode translocar a pequenas distâncias, como os tecidos que compõem um fruto. Com efeito protetor e erradicante, age como inibidor da biossíntese do ácido graxo ergosterol, vital para a formação estrutural das membranas celulares dos fungos (FAO, 2009). Apresenta baixa solubilidade em água, degradação lenta em solos (sob condição aeróbica), relativa estabilidade à hidrólise e rápida fotodegradação (PPDB^a, 2017).

O imazalil é um fungicida sistêmico, com ação protetora e curativa. Semelhante ao procloraz, este fungicida age inibindo a síntese do ergosterol. É moderadamente solúvel em água, degrada lentamente em solos (sob condição aeróbica), é estável à hidrólise e fotodegrada moderadamente rápido (PPDB^b, 2017). Também considerado extremamente tóxico – Classe Toxicológica I –, seu uso tem sido associado à disrupção endócrina, neurotoxicidade, teratogenicidade e genotoxicidade (JIN *et al*, 2016).

Já o tiabendazol, fungicida sistêmico, protetor e curativo, possui também possui ação parasiticida e é classificado como medianamente tóxico (classe toxicológica III). A tabela 1 apresenta os fungicidas registrados (à exceção do procloraz, que foi banido) para uso pós-colheita em frutas, as doenças controladas e os intervalos de segurança preconizados.

Tabela 1: Fungicidas registrados* para uso pós-colheita em culturas frutícolas no Brasil e suas características de segurança.

Nome comum	Culturas permitidas	LMR (mg kg ⁻¹)		Indicação de controle	Intervalo de segurança (dias)
		Nacional	Codex		
Imazalil	Banana	1	2	Antracnose Podridão de coroa	3
	Citros	5	5	Bolor verde	3
	Maçã	2	5	Bolor azul Mancha de alternária	3
	Mamão	1	–	Antracnose	3
	Manga	1	–	Antracnose	3
	Melão	1	–	Antracnose Podridão amarga	3
Procloraz* <i>(registro não renovado a partir de 2016)</i>	Mamão	1	1	Antracnose Mancha de alternária Podridão pós-colheita Podridão de rhizopus	Não determinado
	Manga	0,2	2	Antracnose	Não determinado
	Abacate	0,5	15	Antracnose	Não determinado
Thiabendazol	Banana	3	5	Antracnose Podridão de coroa Podridão negra Fusariose Mal do Panamá	Não determinado
	Citros	10	10	Melanose Podridão peduncular Bolor verde Bolor azul Podridão azul dos frutos	Não determinado
	Mamão	6	-	Fusariose Podridão dos frutos Podridão de Lasiodiplodia	Não determinado
	Manga	2	-	Antracnose	Não determinado
	Melão	4	-	Antracnose Podridão amarga	Não determinado

Fonte: AGROFIT, 2017

Dado que as principais perdas pós-colheita de goiaba são provenientes de doenças fúngicas como antracnose, pinta preta e podridões em geral (NOGUEIRA JUNIOR *et al*, 2016), os fungicidas apresentados na tabela 1, tecnicamente, poderiam ser eficientes na manutenção da viabilidade comercial do fruto, caso sua utilização fosse autorizada pelos órgãos competentes.

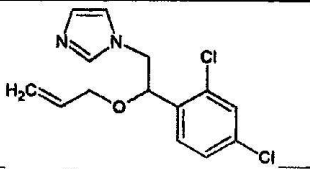
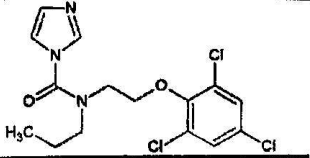
Entretanto, apesar de tratamentos pós-colheita com fungicidas se apresentarem como alternativa razoável, devido à proteção que propiciam durante o armazenamento e/ou transporte prolongado, há um risco elevado – principalmente para frutas de comercialização rápida como a goiaba – de que os frutos tratados apresentem resíduos que possam causar malefícios ao consumidor. Além disso, isso inviabiliza a exportação, dado que a presença de resíduos de agrotóxicos não registrados é parâmetro fundamental, exigido e inspecionado pelo mercado consumidor internacional.

Na tentativa de reduzir as perdas e manter a qualidade da goiaba pelo maior tempo pós-colheita possível, algumas alternativas já foram estudadas como armazenamento sob diferentes concentrações de O₂ e CO₂ (TEIXEIRA *et al*, 2016), uso de fécula de mandioca e óleo essencial de canela (BOTELHO *et al*, 2016), de radiação ultravioleta (VIEIRA *et al*, 2014), de gás ozônio (SIMÕES, 2012), atmosfera controlada (BRACKMANN *et al*, 2012; SINGH *et al*, 2008) e uso de biofilmes, como cera de carnaúba (JACOMINO *et al*, 2003) e fécula de mandioca associada ao fungicida procloraz (SILVA *et al*, 2012).

Neste último, Silva *et al* (2012) verificaram que o tratamento retardou a perda de firmeza, a alteração da cor da casca e a inibição da incidência de podridões causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, durante 12 dias de armazenamento. Além de Silva *et al* (2012), estudos como os de Fisher *et al* (2012), Ojeda (2001) e Basseto *et al* (2002) também verificaram a eficiência do fungicida procloraz no controle de fungos em pós-colheita de goiaba.

Para o presente estudo foram escolhidos o procloraz² e o imazalil, por serem fungicidas amplamente utilizados em pós-colheita de fruteiras e eficientes no controle dos fungos aos quais a goiaba é suscetível (Tabela 1). Sem os devidos estudos sobre o comportamento desses princípios ativos (Tabela 2) na goiaba, o uso destes representa sério risco à saúde humana e ao meio ambiente.

Tabela 2: Nomes comuns, grupo químico, fórmulas e estruturas químicas dos princípios ativos escolhidos para estudo.

Nome comum	Grupo Químico	Fórmula	Fórmula estrutural
Imazalil	Imidazol	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	
Procloraz	Imidazolilcarboxamida	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂	

² Apesar de, atualmente, o procloraz ter seu uso e comercialização proibidos, seu registro era válido quando o procedimento experimental foi executado.

CAPÍTULO 2

ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE RESÍDUOS DE IMAZALIL E PROCLORAZ EM GOIABAS ‘PEDRO SATO’

1. Introdução

No tocante à contaminação ambiental, não apenas o uso indiscriminado dos agrotóxicos é relevante, mas toda e qualquer ação que promova contaminação e desequilíbrio na natureza. Atualmente, é tendência crescente na comunidade científica o desenvolvimento de métodos de extração otimizados, isto é, com maior seletividade e especificidade, mais rápidos, com uso minimizado de solventes e que proporcionem resultados cada vez mais precisos. Esses métodos exigem uma técnica de extração do analito da matriz, limpeza do extrato ou *clean up* para remoção de impurezas e, em alguns casos, pré-concentração dos mesmos para posterior análise instrumental (COLLINS *et al*, 2006).

Diversos autores propuseram métodos para análise de imazalil e procloraz em diferentes matrizes. Dentre os estudos mais recentes, destacam-se determinações simultâneas de imazalil e procloraz em manga (FILHO *et al*, 2010), em água doce e em peixes (BELENGUER *et al*, 2014) e em mel (CHARLTON & JONES, 2007), de imazalil em tangerinas (BESIL *et al*, 2016), em ervilha, lima e suco de maçã (LEHOTAY *et al*, 2010) e em mamão (SOUSA^a *et al*, 2013); e de procloraz em solo (DUROVIC *et al*, 2012). Nestes trabalhos, foram utilizadas adaptações do método QuEChERS, extrações em fase sólida (EFS) ou de microtécnicas, como a microextração em fase sólida (MEFS) e, posteriormente, análises por cromatografia líquida ou gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Dentre os procedimentos listados, o QuEChERS é um dos mais comuns. Sua principal desvantagem está relacionada com a baixa relação amostra/extrato (PRESTES *et al*, 2009). Muitos autores têm utilizado QuEChERS combinado a microtécnicas (ANDRASKIKOVA *et al*, 2013; YOU *et al*, 2013; CUNHA & FERNANDES, 2011) a fim de promover etapa de *clean up* e aumentar o fator de enriquecimento do extrato final.

Dado a necessidade crescente de técnicas para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais no tocante à rapidez, simplicidade e eficiência de extração e purificação das amostras, técnicas como a extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura (ESL-PBT) têm revelado bons resultados na extração de agrotóxicos das amostras.

Com grande potencial de aplicação na determinação de agrotóxicos, as técnicas baseadas em partição à baixa temperatura foram desenvolvidas para simplificar a etapa de *clean up*, utilizando solventes orgânicos menos tóxicos e permitindo a quantificação – em nível de partes por bilhão (ppb) – por cromatografia. Pesquisas têm sido publicadas reportando o uso desta técnica em análises de resíduos em alimentos, como alface (COSTA *et al*, 2015), abacaxi (MORAIS *et al*, 2014), morango (HELENO *et al*, 2014), tomate (PINHO^a *et al*, 2012), batata (DARDENGO *et al*, 2011), manteiga (MARTHE *et al*, 2010), etc.

O princípio da extração consiste em colocar a amostra – líquida ou sólida – em contato com solvente extrator, miscível em água, para que formem uma fase única (é necessário o solvente extrator ser menos denso que a água e com ponto de fusão abaixo de -20 °C). Posteriormente, a mistura é agitada e levada ao freezer até o congelamento da amostra. Com a agitação, ocorre a partição dos analitos para fase orgânica e, com a diminuição da temperatura, a água congela, o que permite a separação das duas fases. O extrato orgânico contendo os analitos é então analisado por cromatografia.

Por ser um processo relativamente simples, de baixo custo e reduzido uso de solventes orgânicos objetivou-se, neste estudo, adaptar e validar a técnica de extração ESL-PBT para determinação dos fungicidas imazalil e procloraz em goiaba por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE).

2. Objetivos

- Determinar condições ideais para análise dos princípios ativos por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE);
- Adaptar e validar a técnica ESL-PBT para determinação dos fungicidas imazalil e procloraz em goiaba por CG-DCE.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes

Padrões analíticos de procloraz (99,1% m/m) e imazalil (99,7% m/m) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os fungicidas comerciais utilizados, Sportak® 450EC (1,2 mol L⁻¹ do princípio ativo procloraz) e Magnate® 500EC (1,7 mol L⁻¹ do princípio ativo imazalil), fabricados por Bayer (Leverkusen, Alemanha) e Adama Agricultural Solutions (Beer–Sheva, Israel), respectivamente. A acetonitrila (ACN) grau HPLC utilizada nas extrações foi adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Soluções estoque dos padrões (1000 mg L⁻¹) dos fungicidas foram preparadas individualmente em acetonitrila. Soluções de trabalho (10 mg L⁻¹) foram preparadas pela diluição das soluções estoque em acetonitrila. Todas as soluções padrão foram armazenadas em freezer, à temperatura de -20 °C.

3.2. Equipamentos

Os resíduos de agrotóxicos foram analisados em um cromatógrafo a gás (modelo GC-2014, Shimadzu), equipado com um detector por captura de elétrons (DCE) e injetor automático Shimadzu AOC-20i. No processo de preparo da amostra, foram utilizados balança analítica (Modelo AUY220, Shimadzu), balança semi-analítica (modelo HL200, Marte Científica, Brasil), homogeneizador de tecidos (Ultra380-I, Ultra Stirrer, Brasil), vortex (modelo AP-56, Phoenix, Brasil).

3.3. Material vegetal

As goiabas (*Psidium guajava* L. cv ‘Pedro Sato’) foram obtidas em plantio comercial no município de Paula Cândido – MG, em plantas sadias com idades de 7 e 17 anos. Quando os frutos atingiam diâmetro de 2 a 3 cm na planta, eram ensacados (controle mecânico) a fim de prevenir o ataque de pragas e a inoculação de agentes infecciosos (Figura 2).



Figura 2: Vista panorâmica de uma das áreas de plantio (A) de goiaba no município de Paula Cândido, MG. Frutos em desenvolvimento (B) e ensacados na planta (C).

Os frutos foram selecionados no *packing house* com descarte daqueles que apresentavam danos, e padronizados quanto ao estágio de maturação. Foi utilizado como referência o estágio 2 (coloração da casca verde-clara, ângulo hue entre 116 e 113) conforme escala de cor definida por Azzolini et al (2004), para colheita de goiabas ‘Pedro Sato’. Após seleção, foram transportados em caixas forradas com plástico bolha ao Laboratório de Análise de Frutas (Departamento de Fitotecnia) da Universidade Federal de Viçosa, MG, onde se realizaram todas as etapas de preparo de amostras.

3.4. Processamento da amostra

Os frutos foram cuidadosamente fracionados em seus tecidos (epicarpo, mesocarpo e placenta). O epicarpo foi retirado com profundidade média de $1,3 \pm 0,2$ mm, com auxílio de lâmina apropriada para descascar frutos.

Para a amostragem do mesocarpo e da placenta, foi utilizado furador de rolha (diâmetro interno de 16 mm) para coletar a região transversal (3 cilindros/fruto) na região equatorial dos frutos (Figura 3). A partir dos cilindros retirados, separaram-se as frações mesocarpo e placenta. As amostras foram trituradas, homogêneas e submetidas aos procedimentos de extração e análise.

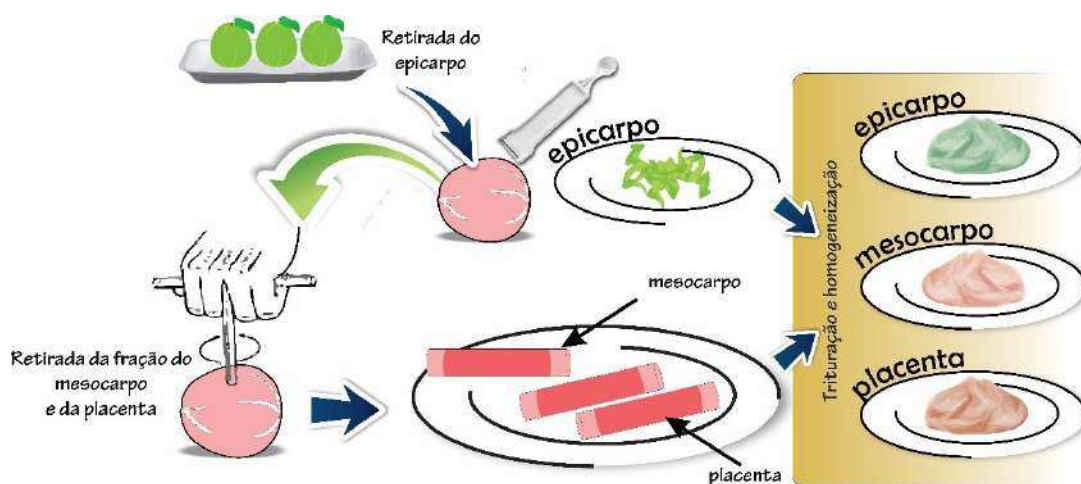


Figura 3: Separação das frações epicarpo, mesocarpo e placenta da goiaba e preparo das amostras para procedimento de extração.

3.5. Procedimento de extração

Para extração dos resíduos de agrotóxicos dos tecidos vegetais homogeneizados, foi empregada a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) desenvolvida por Heleno et al (2014) com modificações para adequar à matriz de interesse.

Neste procedimento, 2,0 g de cada fração homogeneizada de goiaba foram colocados em frascos de vidro transparente com capacidade de 22,0 mL e adicionados 2,0 mL de acetonitrila, com o objetivo de preparar a amostra para a etapa de extração propriamente dita. A mistura foi mantida sob agitação por trinta segundos, em vortex. Após esse período, os frascos foram deixados abertos para evaporação total do solvente.

Aos frascos de vidro transparente contendo amostras das frações homogeneizadas, foi adicionada a mistura extratora, constituída de 2,0 mL de água e 4,0 mL de acetonitrila. Após um minuto de agitação em vortex, a mistura foi resfriada em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 6 horas (Figura 4). A agitação promove a extração propriamente dita e os princípios ativos migram da fase aquosa (material vegetal) para a fase orgânica (acetonitrila).

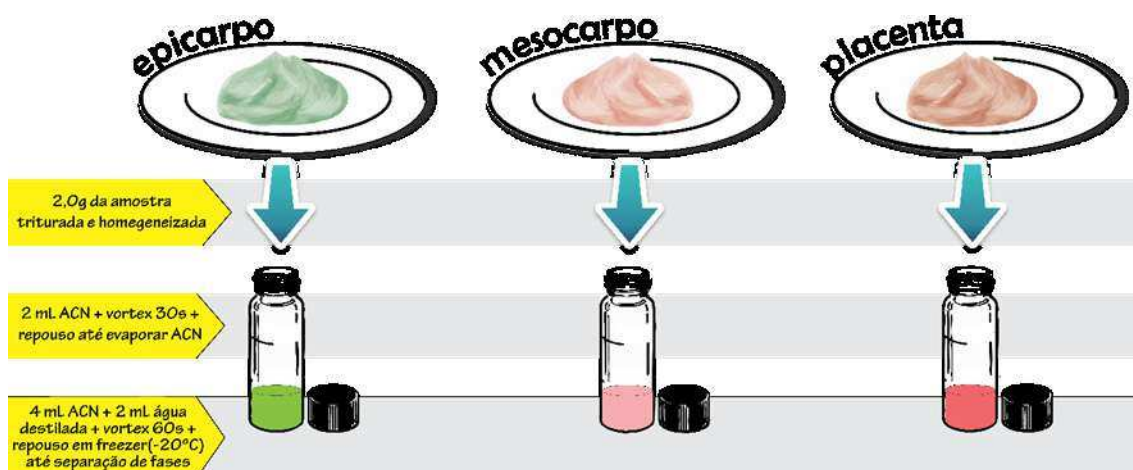


Figura 4: Procedimento de extração sólido-líquido com partição à baixa temperatura (ESL-PBT) efetuado em cada fração da goiaba (epicarpo, mesocarpo e placenta).

Com o congelamento da fase aquosa, a fase orgânica fica livre para ser recolhida (Figura 5). Assim, 2,0 mL da fase orgânica de cada amostra foram transferidos para frascos (vials) de análise com o auxílio de pipeta automática. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa nas condições cromatográficas estabelecidas.

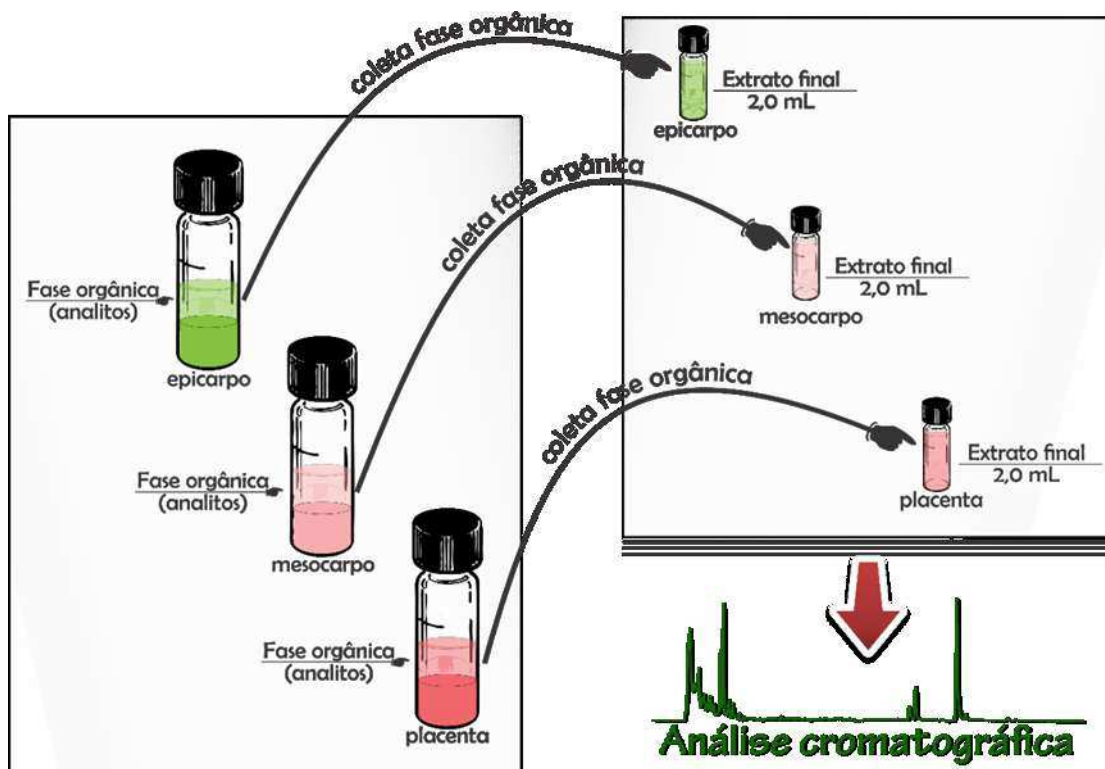


Figura 5: Representação das etapas de extração e análise dos extratos obtidos (ESL-PBT) de cada fração da goiaba.

3.6. Condições cromatográficas

As separações cromatográficas dos analitos foram realizadas em coluna capilar Agilent Technologies DB-5 (fase estacionária composta de 5 % de fenil e 95 % de dimetilsiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 μm de espessura de filme). Nitrogênio foi usado como gás de arraste em uma vazão de 1,2 mL min^{-1} .

A programação da temperatura da coluna (Figura 6) teve início em 150 °C, sendo mantida por um minuto, seguida por gradiente de temperatura (20 °C min^{-1}) até 210 °C e mantida por um minuto, seguida por gradiente de temperatura (5 °C min^{-1}) até 220 °C e mantida a temperatura por um minuto. Após, gradiente de temperatura (10 °C min^{-1}) até 260 °C, mantida por um minuto e seguida por novo gradiente (5 °C min^{-1}) até 270 °C e outro gradiente (20 °C min^{-1}) até 290 °C, com manutenção da temperatura por dois minutos. Tais rampas de temperatura foram necessárias para a separação dos compostos de interesse de interferentes da matriz e para garantir a completa limpeza do sistema cromatográfico. O tempo total de análise foi de 19 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 280 °C e 300 °C, respectivamente. Volumes de 1 μL de amostra foram injetados no cromatógrafo, usando razão split de 1:5.

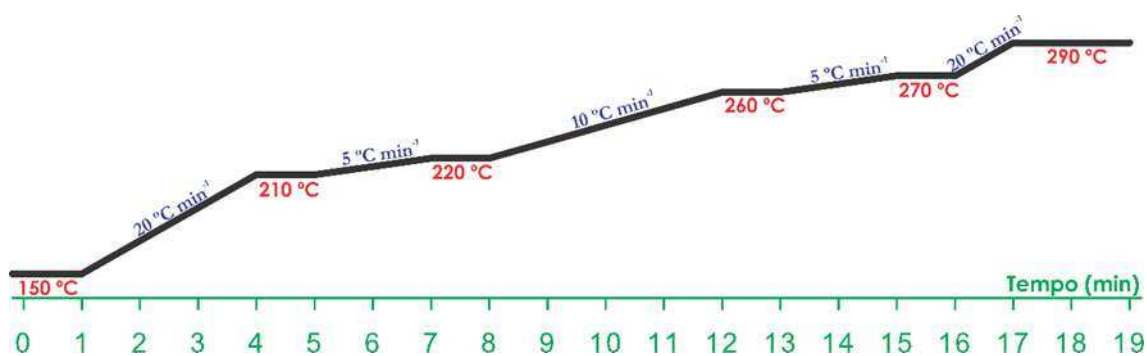


Figura 6: Programação de temperatura da coluna cromatográfica na análise dos extratos obtidos das frações de goiaba (epicarpo, mesocarpo e placenta) por ESL-PBT.

Os fungicidas foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos para os extratos das amostras com os obtidos para soluções dos padrões. A quantificação foi realizada usando o método de superposição de matriz, em que amostras de goiabas, isentas de agrotóxicos, foram fortificadas em 10

concentrações destes, na faixa de 20 a 850 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e submetidas ao método de extração otimizado. As curvas analíticas foram construídas plotando a área dos picos versus concentração dos analitos.

3.7. Validação do método analítico

Os parâmetros de desempenho analítico utilizados para validar o método de análise foram: seletividade, linearidade de resposta do método, exatidão (ensaios de recuperação), repetitividade, limite de detecção e limite de quantificação e efeito de matriz. Os parâmetros foram avaliados para cada princípio ativo em cada fração. Os procedimentos realizados para a validação do método proposto foram baseados em recomendações de ANVISA (2003).

3.7.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos de amostras de goiaba isentas dos agrotóxicos estudados (submetidas ao procedimento de extração proposto) com os cromatogramas desses extratos fortificados com os princípios ativos dos agrotóxicos.

3.7.2. Linearidade

A linearidade de resposta do método foi determinada pela injeção de extratos obtidos de amostras fortificados em 10 concentrações – 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 100,0; 250,0; 400,0; 600,0; 700,0 e 850,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ – dos princípios ativos imazalil e procloraz no epicarpo, mesocarpo e placenta da goiaba, submetidas à técnica de extração empregada.

Após a análise cromatográfica dos extratos foram construídas curvas analíticas para cada princípio ativo em cada fração, onde foram relacionadas as razões das respostas cromatográficas dos analitos com as concentrações

mencionadas. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de determinação obtido pela regressão linear destas curvas.

3.7.3. Exatidão

A exatidão do método foi verificada por meio de ensaios de recuperação. Nesses ensaios, amostras do epicarpo, mesocarpo e placenta de goiaba foram fortificadas com os agrotóxicos – de maneira que a concentração final esperada no extrato recolhido fosse de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ – e submetidas ao método de ESL-PBT. Para cada agrotóxico e cada fração foram obtidos três extratos fortificados.

3.7.4. Repetitividade

A repetitividade, neste estudo, foi avaliada pelo preparo, injeção e análise – no mesmo dia – de seis extratos de cada fração (submetidos à técnica de extração proposta) oriundos de amostras fortificadas com cada princípio ativo na concentração de $300 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para tal avaliação, foram determinados os coeficientes de variação (CV), referente às porcentagens de recuperação de cada agrotóxico em cada fração.

3.7.5. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica dos extratos das frações.

A partir dos extratos isentos dos fungicidas, foram preparadas soluções dos princípios ativos, em 5 diferentes concentrações, e injetadas para construir as curvas analíticas com as áreas dos picos dos fungicidas nos cromatogramas.

Os LD's e os LQ's do método foram determinados para cada fungicida, em cada fração, através do desvio-padrão (s) da resposta cromatográfica dos analitos e da inclinação (S) da curva analítica, de acordo com as equações 1 e 2 (RIBANI et al, 2004), respectivamente:

$$LD = \frac{3,3 \times s}{S} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad \text{Equação 2}$$

onde LD corresponde ao limite de detecção, LQ ao limite de quantificação, s ao desvio-padrão da resposta cromatográfica do analito e S à inclinação da curva analítica.

3.7.6. Avaliação do efeito de matriz

Para este estudo, curvas analíticas contendo os princípios ativos imazalil e procloraz foram preparadas em acetonitrila pura, em extrato do epicarpo, em extrato do mesocarpo e em extrato da placenta. As curvas foram preparadas acrescentando aos extratos e à acetonitrila quantidades adequadas de solução padrão, de modo a se obter concentrações finais de 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 100,0; 250,0; 400,0; 600,0; 700,0 e 850,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os extratos orgânicos do epicarpo, mesocarpo e placenta foram obtidos de amostras de goiabas no estágio 2 de maturação, isentas de agrotóxicos, empregando o método otimizado. Essas soluções foram analisadas por CG-DCE nas condições previamente estabelecidas.

A avaliação do efeito de matriz causada pelos extratos das frações da goiaba foi realizada comparando-se as inclinações das curvas analíticas obtidas pelas curvas no solvente e nos extratos das matrizes. A avaliação da influência dos co-extrativos sobre as respostas cromatográficas dos fungicidas foi realizada utilizando a Equação 3 (GUEDES et al, 2016):

$$EM(\%) = \frac{(X_1 - X_2)}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

em que $EM(\%)$ é o efeito de matriz, X_1 é a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada fungicida em cada extrato e X_2 é a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada fungicida preparada no solvente.

O método validado foi utilizado nos estudos de: dissipação de imazalil e procloraz; influência do efeito de matriz na determinação de imazalil e procloraz e; efeito da concentração de imazalil na extensão da vida de prateleira de goiabas 'Pedro Sato'.

4. Resultados e discussão

4.1. Análise cromatográfica

A análise cromatográfica, nas condições estabelecidas, permitiu separar adequadamente os fungicidas imazalil e procloraz. A identificação dos compostos foi feita por comparação dos tempos de retenção (t_R) referente a cada pico na solução-padrão e nos extratos da matriz. O imazalil apresentou seu pico em 9,58 minutos e o procloraz, em 15,73 minutos (Figura 7).

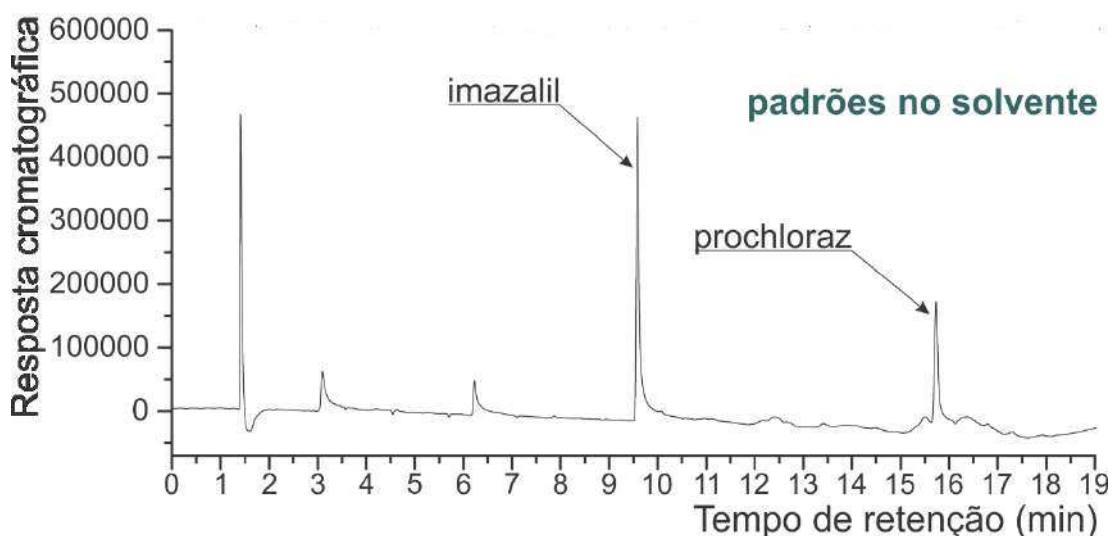


Figura 7: Cromatograma dos padrões dos princípios ativos imazalil ($t_R = 9,58 \text{ min}$) e procloraz ($t_R = 15,73 \text{ min}$) na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila.

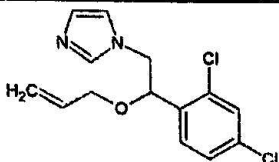
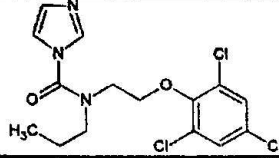
As massas molares dos princípios ativos são fatores determinantes na eluição dos compostos, isto é, analitos com maior massa molar tendem a ficar mais tempo retidos na coluna cromatográfica que os de menores massas.

Além disso, dado que o cromatógrafo utilizado nas análises estava equipado com coluna cromatográfica DB-5, composta de 5% de difenil e 95% de dimetilsiloxano, que proporciona caráter apolar à mesma, a ordem de eluição dos agrotóxicos em estudo foi regida também pela polaridade da molécula, ou seja, a molécula menos apolar tende a chegar ao detector mais rapidamente enquanto a mais apolar tende a ficar mais tempo retida na coluna.

Os valores dos coeficientes de partição octanol/água (K_{ow}) das substâncias (Tabela 3), confirmam essa ordem de eluição. K_{ow} é a medida da lipofilicidade de uma molécula e é definido como a razão da concentração desta em um sistema

octanol e água. Assim, substâncias com maior valor de K_{ow} possuem maior tendência a permanecer na fase orgânica (menor polaridade). Como a coluna cromatográfica possui característica apolar, o procloraz, que possui maior valor de K_{ow} , apresenta maior afinidade pela fase estacionária e fica mais tempo retido que o imazalil.

Tabela 3: Estruturas químicas, massas molares e características físico-químicas dos princípios ativos imazalil e procloraz.

Substância	Fórmula estrutural	Massa Molar (g mol ⁻¹)	K_{ow} (Log P) (pH 7,0; 20 °C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)(20 °C)	Pressão de vapor (mPa) (25 °C)
Imazalil		297,18	2,56	184	0,158
Procloraz		376,67	3,5	26,5	0,150

Fonte: IUPAC, 2016

4.2. Validação do método analítico

A necessidade de atestar a qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação.

4.2.1. Avaliação do efeito de matriz

O cromatograma da solução padrão contendo os fungicidas estudados (Figura 8, D) não apresentou interferência de co-extrativos das matrizes, dado a inexistência de picos nos tempos de retenção dos princípios ativos nos extratos das frações do fruto (Figura 8, A, B e C). O tempo total de análise foi de 19 minutos.

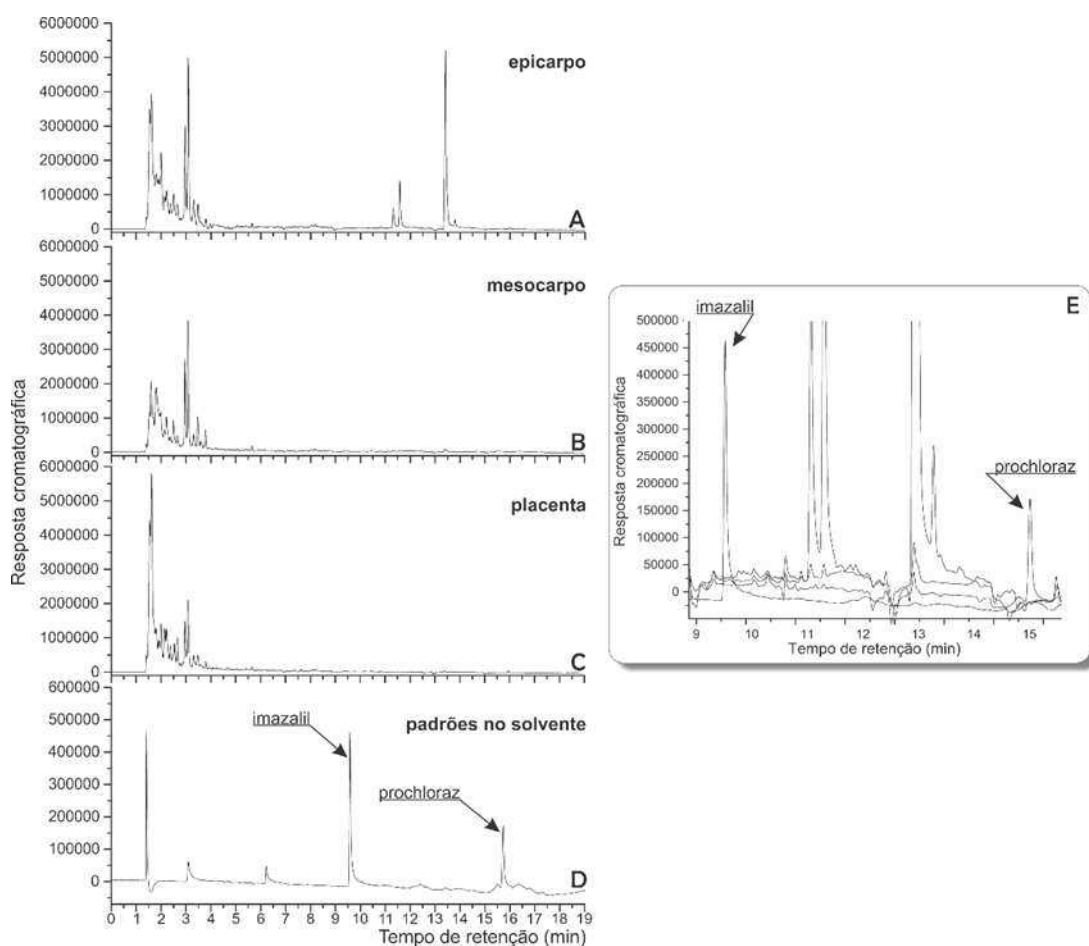


Figura 8: Cromatogramas dos extratos de (A) epicarpo, (B) mesocarpo e (C) placenta da goiaba isentos dos princípios ativos e (D) da solução padrão contendo imazalil ($t_R = 9,58$ minutos) e prochloraz ($t_R = 15,73$), a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Análise comparativa dos cromatogramas (E).

A seletividade, em métodos cromatográficos, é avaliada com objetivo de verificar se o pico de resposta do analito é exclusivamente da substância alvo ou se há outros compostos (interferentes) presentes na amostra e que proporcionariam respostas inadequadas (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A comparação dos cromatogramas dos extratos das frações de goiaba (isentas dos fungicidas) com o cromatograma de uma solução padrão contendo os compostos estudados (Figura 8E), permite afirmar que, considerando as condições cromatográficas empregadas, não foram detectados interferentes eluindo nos mesmos tempos de retenção dos analitos imazalil ($t_R = 9,58$ minutos) e prochloraz ($t_R = 15,73$ minutos). Dessa forma, o procedimento pode ser considerado seletivo, ou seja, é possível identificar e quantificar os compostos de interesse em cada fração da goiaba.

4.2.2. Qualidade do ajuste do modelo

Foram obtidos extratos das frações de goiaba (pelo método proposto) provenientes de amostras fortificadas de modo a se obter as concentrações desejadas para as curvas (20,0 a 850,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Realizadas as análises cromatográficas, foram construídas curvas analíticas para cada composto estudado, em cada fração e avaliadas por análise de regressão linear (Tabela 4).

Tabela 4: Equações de regressão linear e coeficientes de determinação para imazalil e procloraz, nas frações de goiaba. Nas equações, A corresponde à resposta cromatográfica e C à concentração do analito.

Substância	Camada	Equação da reta	R ²
Imazalil	Epicarpo	$A = -16820,0 + 2282,9C$	0,9997
Imazalil	Mesocarpo	$A = -5886,6 + 2307,3C$	0,9998
Imazalil	Placenta	$A = -27722,2 + 2888,2C$	0,9997
Procloraz	Epicarpo	$A = -2636,7 + 1188,5C$	0,9998
Procloraz	Mesocarpo	$A = -5701,2 + 1644,7C$	0,9998
Procloraz	Placenta	$A = -1816,5 + 3480,5C$	0,9996

Segundo ANVISA (2003), linearidade é capacidade de o procedimento analítico obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em determinada faixa de concentração, isto é, produzir curvas analíticas que possam ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta. Quanto mais próximo a 1,00 estiver o coeficiente de correlação da curva analítica, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais.

As curvas analíticas nos extratos apresentaram coeficientes de determinação (R²) satisfatórios (Tabela 4), com todos os valores acima de 0,99 como determina a ANVISA (2003).

4.2.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico diz respeito à proximidade dos resultados obtidos quando comparadas ao valor real esperado, usando o procedimento experimental para uma amostra repetidas vezes (THOMPSON *et al*, 2002).

Define-se como % de recuperação o percentual do analito, presente ou adicionado à amostra, que é extraído e passível de ser quantificado (RIBANI *et al*, 2004).

A exatidão do método, obtida pela extração de imazalil e procloraz, no epicarpo, mesocarpo e placenta da goiaba, apresentou porcentagens de recuperação próximas a 100% (Tabela 5), com todos os coeficientes de variação abaixo de 6%.

Tabela 5: Percentuais de recuperação (R) com desvios-padrão e coeficientes de variação (CV) para amostras fortificadas de imazalil e procloraz nas frações de goiaba, com $n = 3$.

Substância	Camada	R(%)	CV
Imazalil	Epicarpo	108,0 ± 1,7	1,5
Imazalil	Mesocarpo	108,0 ± 2,9	2,7
Imazalil	Placenta	100,1 ± 1,0	1,0
Procloraz	Epicarpo	94,5 ± 3,3	3,5
Procloraz	Mesocarpo	103,5 ± 5,3	5,1
Procloraz	Placenta	104,8 ± 4,1	3,9

São aceitáveis intervalos de recuperação para análise de resíduos valores entre 70 e 120%, com precisão de $\pm 20\%$, embora, para amostras de maior complexidade, sejam aceitos valores entre 50 a 120 %, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al*, 2004).

O coeficiente de variação é uma medida de dispersão relativa, empregada para estimar a precisão de experimentos e representa o desvio-padrão relativo. Sua principal qualidade é a capacidade de comparação de distribuições diferentes.

4.2.4. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e executar as repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al*, 2004).

Os resultados da avaliação (Tabela 6) indicam boa repetitividade do método, dado que todos os coeficientes de variação encontrados ficaram abaixo de 4%, para $n = 6$. Para amostras complexas, são considerados aceitáveis coeficientes de variação de até $\pm 20\%$ (RIBANI *et al*, 2004).

Tabela 6: Coeficientes de variação obtido após seis extrações dos agrotóxicos em amostras de epicarpo, mesocarpo e placenta de goiaba, com $n = 6$.

Substância	Camada	CV
Imazalil	Epicarpo	3,9
Imazalil	Mesocarpo	3,1
Imazalil	Placenta	2,9
Procloraz	Epicarpo	3,8
Procloraz	Mesocarpo	2,6
Procloraz	Placenta	2,5

4.2.5. Limites de detecção e limites de quantificação

Os valores dos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) obtidos para os fungicidas imazalil e procloraz, em cada fração (Tabela 7), variaram de 4,0 a 6,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 12,2 a 19,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Os limites encontrados atendem à exigência de mercados consumidores como União Europeia e Reino Unido que estabelecem, como tolerância, o limite máximo de resíduo (LMR) de 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (EFSA^b, 2016; HSE, 2016) para a presença de imazalil e procloraz em goiaba.

Tabela 7: Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os princípios ativos imazalil e procloraz, no epicarpo, mesocarpo e placenta de goiabas 'Pedro Sato', equações das retas e coeficientes de determinação das curvas analíticas.

Substância	Camada	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Equação da reta	R ²
Imazalil	Epicarpo	5,9	17,9	Y = -18470,1 + 2235,9X	0,9950
Imazalil	Mesocarpo	6,2	18,8	Y = -19241,3 + 2616,9X	0,9945
Imazalil	Placenta	6,4	19,3	Y = -17593,0 + 2680,0X	0,9942
Procloraz	Epicarpo	4,4	13,2	Y = 979,3 + 1083,3X	0,9972
Procloraz	Mesocarpo	4,8	14,7	Y = -8081,6 + 1680,7X	0,9967
Procloraz	Placenta	4,0	12,2	Y = -832,0 + 1739,6X	0,9977

De acordo com PASCHOAL *et al* (2008), o LD é a menor quantidade do analito que detectável na amostra, não necessariamente quantificável, sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ, por sua vez, representa a menor concentração do analito que pode ser expressa com precisão adequada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al*, 2004). Tanto um quanto o outro podem ser determinados por várias maneiras diferentes, tais como pelo método visual, pela injeção de branco, pelo método relação sinal-ruído ou pelo método com base nos parâmetros da curva analítica. Para este estudo, optou-se pelo último.

Os resultados obtidos indicam que o método utilizado é adequado para análise de resíduos de imazalil e procloraz em goiabas, dado que os limites de detecção e quantificação são consideravelmente inferiores à tolerância estabelecida por mercados consumidores internacionais.

4.2.6. Avaliação do efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado pelas curvas analíticas dos princípios ativos nos extratos e em acetonitrila, que foram comparadas para cada fungicida nas frações de goiaba (Figura 9). Verifica-se que todas as curvas preparadas em acetonitrila apresentaram maiores inclinações que as preparadas nos extratos.

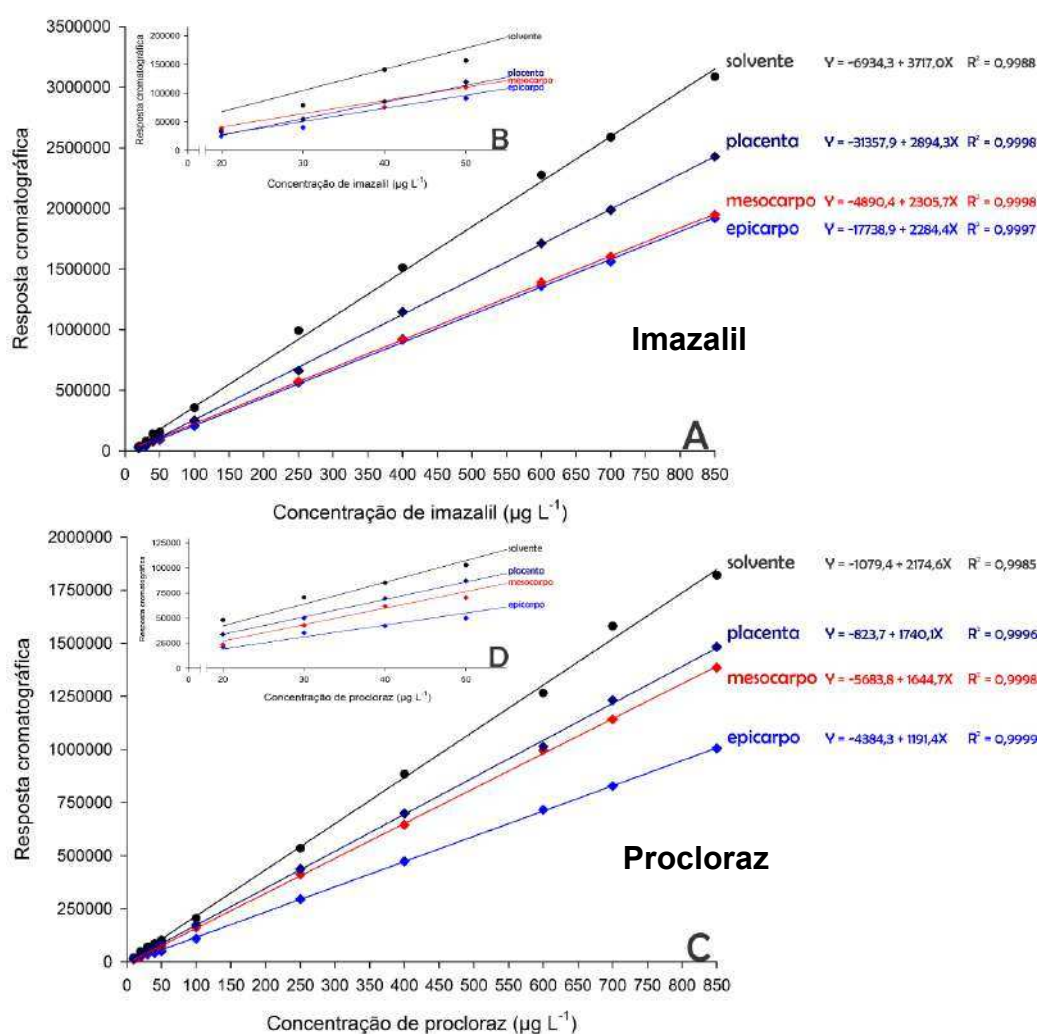


Figura 9: Curvas analíticas de imazalil (A) e procloraz (C) preparadas em acetonitrila (solvente) e nos extratos das frações epicarpo, mesocarpo e placenta, nas concentrações de 20 a 850 $\mu\text{g L}^{-1}$ (A). Em detalhe, as curvas de imazalil (B) e procloraz (D), na faixa de concentração 20 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Nas equações, Y corresponde à resposta cromatográfica e X, à concentração do princípio ativo, em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Verifica-se, pela Tabela 8, que todos os extratos sofreram interferência negativa dos co-extrativos. Isso significa que a concentração do princípio ativo nos extratos das frações de goiaba, caso fossem avaliados pela curva analítica em acetonitrila, seriam subestimados. É possível que tenha ocorrido acúmulo gradual de componentes da matriz não-voláteis no sistema cromatográfico, que ocasiona a formação de novos sítios ativos e que gera um erro na resposta analítica (SOUSA^b *et al*, 2013).

Tabela 8: Percentual de efeito de matriz para os princípios ativos imazalil e procloraz analisados nos extratos de epicarpo, mesocarpo e placenta de goiaba.

Substância	Camada	EM (%)
Imazalil	Epicarpo	-38,6
Imazalil	Mesocarpo	-37,9
Imazalil	Placenta	-22,3
Procloraz	Epicarpo	-45,4
Procloraz	Mesocarpo	-24,4
Procloraz	Placenta	-20,0

O efeito de matriz na análise de resíduos tem sido demonstrado em alimentos, onde o sinal do analito é influenciado pela natureza complexa da amostra e pelas propriedades dos co-extrativos (tamanho da molécula, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.) (GUEDES *et al*, 2016). Isso pode gerar variações na resposta cromatográfica, que conduz a erros na análise (HAJSLOVÁ *et al*, 2003).

Pinho *et al* (2010), definem que há efeito de matriz (EM) quando considerável diferença de resposta é obtida entre padrões preparados no solvente e aqueles preparados no extrato da matriz. Esse efeito, por vezes, justifica resultados com baixa precisão e/ou onde as taxas de recuperação de agrotóxicos excederam 100%, sendo que os EM são mais pronunciados em análises de amostras complexas, tais como frutas, legumes, sucos, vinhos, azeite, tecidos animais e solos (PINHO *et al*, 2009).

Efeitos de matriz podem ocorrer em diferentes partes do sistema cromatográfico, como injetor, coluna ou detector (POOLE, 2007; SCHENCK & LEHOTAY, 2000; PINHO^b *et al*, 2012). Quando a amostra é introduzida no sistema cromatográfico, ocorrem interações entre os analitos e os sítios ativos do *liner*. As alterações na resposta podem ser resultado de competição por estes sítios ativos no

sistema cromatográfico entre analitos e componentes da matriz (HAJSLOVÁ *et al*, 2003). Co-extrativos como lipídeos, clorofila e compostos carotenoides e outros componentes de elevada massa molar podem permanecer solubilizados nos extratos orgânicos. Estes co-extrativos são responsáveis pelo EM durante a análise cromatográfica (PRESTES *et al*, 2009). Assim, quando a alteração na resposta cromatográfica é superior a 10%, considera-se que o EM influencia a análise (LAMBROPOULOU *et al*, 2002).

Os compostos mais afetados pelo EM, geralmente, são termicamente instáveis e degradados no sistema cromatográfico quando preparados em solvente puro. Entretanto, quando os analitos estão presentes no extrato, os componentes da matriz podem agir como protetores e, preferencialmente, ser adsorvido nos sítios ativos do sistema cromatográfico. Esse fenômeno aumenta a resposta cromatográfica dos analitos (PINHO *et al*, 2009). Taxas aparentemente mais elevadas e recuperações com baixa precisão podem ser observadas em análises de agrotóxicos mais polares. O grau de polaridade é classificado de acordo com a solubilidade em água, ou K_{ow} (coeficiente octanol/água) (KLOTZ *et al*, 2001).

Os resultados mostraram que há considerável efeito de matriz para ambos fungicidas, em todas as frações. Assim, para quantificação dos princípios ativos nas amostras, foram utilizadas as curvas analíticas construídas no extrato, a fim de reproduzir com maior fidelidade o comportamento das substâncias na amostra.

5. Conclusões

O método ESL-PBT adaptado e validado para análise de imazalil e procloraz em goiaba apresentou boa linearidade, seletividade e com limites de detecção e quantificação adequados para a análise dos princípios ativos em amostras das frações de goiaba.

O efeito de matriz foi considerado alto para todas as frações da goiaba, de maneira que as análises foram executadas utilizando curvas preparadas nos extratos para realizar a quantificação dos princípios ativos.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA DISSIPAÇÃO DE IMAZALIL E PROCLORAZ EM GOIABAS 'PEDRO SATO'

1. Introdução

A dissipação do princípio ativo refere-se ao padrão de distribuição dessa substância, seus derivados e metabolitos em um organismo, sistema, ou camada da (sub) população de interesse, como resultado de transporte, de particionamento, transformação ou degradação (OECD, 2003). Isso significa, no caso deste trabalho, que a dissipação corresponde a toda variação da concentração inicial do princípio ativo adsorvido na superfície do fruto. Têm-se então algumas possibilidades: o fungicida permanecer na superfície do fruto, ser dissipado para o ambiente, ser dissipado para o interior do fruto (translocação) e/ou ser dissipado por degradação da molécula.

Em estudos de dissipação de imazalil em tangerinas 'Clementina' (BESIL *et al*, 2016) e de procloraz em tangerinas 'Robson' (ZHAO *et al*, 2013), os autores verificaram que as concentrações destes fungicidas durante o armazenamento seguem cinéticas de primeira ordem. O uso de modelos matemáticos tem sido amplamente utilizado para descrever o comportamento de espécies químicas tanto em condições de campo quanto em condições controladas (VAZ *et al*, 2012; ZHAO *et al*, 2013; LI *et al*, 2016).

2. Objetivos

- Estudar a dissipação dos fungicidas imazalil e procloraz aplicados na pós-colheita de goiabas ‘Pedro Sato’;
- Verificar a ocorrência de translocação dos princípios ativos do epicarpo para o mesocarpo e deste para a placenta, durante o armazenamento pós-colheita do fruto.
- Avaliar a persistência do imazalil e procloraz em goiabas ‘Pedro Sato’.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes, equipamentos e material vegetal

Foram utilizadas as soluções de trabalho dos padrões imazalil e procloraz (10 mg L⁻¹) previamente preparadas (Capítulo 2) e os fungicidas comerciais Sportak® 450EC e Magnate® 500EC. Além dos equipamentos já descritos anteriormente, foi utilizado um colorímetro Konica Minolta (modelo CR-10) para avaliação da cor. Os frutos utilizados também possuíam a mesma procedência e as mesmas características já descritas anteriormente.

3.2. Montagem do experimento

Para preparo das caldas fungicidas, foram consideradas as menores doses recomendadas pelos fabricantes dos produtos comerciais para uso em pós-colheita de frutas, bem como o menor tempo de imersão na calda (Tabela 9). A escolha da dose foi realizada considerando a lógica de que, na possibilidade de o produtor ignorar a regulamentação e utilizar estes fungicidas em goiaba, que utilizaria a recomendação para uso pós-colheita para outras fruteiras. Dessa forma, foi utilizada uma calda fungicida com concentração de 0,9 mmol L⁻¹ de procloraz (PCZ) e 3,4 mmol L⁻¹ de imazalil (IMZ) (Dose 1D). Apesar de não ser usual, optou-se por trabalhar com os dois princípios ativos preparados na mesma calda, a fim de reduzir custos operacionais, número de análises e tempo.

Tabela 9: Recomendações de uso (culturas), dosagens e tempo de imersão em calda fungicida dos produtos comerciais Sportak® 450EC e Magnate® 500EC para aplicação em pós-colheita de frutas.

Produto Comercial (PC)	Princípio Ativo (PA)	Cultura	Dose (mL PC/ 100 L água)	Conc. (PA) (mmol L ⁻¹)	Tempo de imersão (min)
Sportak® 450EC	Procloraz	Mamão	75	0,9	2
		Manga	110	1,3	10
Magnate® 500EC	Imazalil	Banana	200	3,4	2
		Citros			
		Maçã			
		Mamão			
		Manga			
Melão					

Fonte: AGROFIT, 2016

Considerando ainda a possibilidade de um segundo cenário, onde o produtor, inadvertidamente, aplicasse um excesso dos produtos, foi também preparada outra

calda contendo o dobro da dose³, isto é, com concentrações de 1,8 mmol L⁻¹ de procloraz e 6,8 mmol L⁻¹ de imazalil (Dose 2D).

Os frutos foram imersos (Figura 10) na calda fungicida⁴ (1D ou 2D; por 2 minutos) e deixados para secar sobre papel absorvente, à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, foram selecionados ao acaso e dispostos em bandejas de poliestireno expandido (três unidades/bandeja). As bandejas com os frutos foram dispostas em caixas numeradas com o dia da análise (0, 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 18 e 25 dias de armazenamento) e armazenadas em câmara fria a 22 ± 2 °C e 75 ± 10 % UR (Figura 11). Paralelamente, foram separados frutos sem tratamento para controle (C) e submetidos ao armazenamento e avaliação, nas mesmas condições dos frutos tratados. No dia programado, as respectivas caixas foram retiradas da câmara fria e os frutos analisados com relação à evolução de cor do epicarpo e com relação aos resíduos de agrotóxicos no epicarpo, mesocarpo e placenta.

³ O dobro da dose recomendada pelo fabricante para uso pós-colheita em fruteiras autorizadas pela ANVISA.

⁴ Os tratamentos diferem apenas na concentração dos fungicidas aplicada nas caldas (1D e 2D). Toda a sequência do procedimento foi realizada de maneira idêntica e isolada para os dois tratamentos.

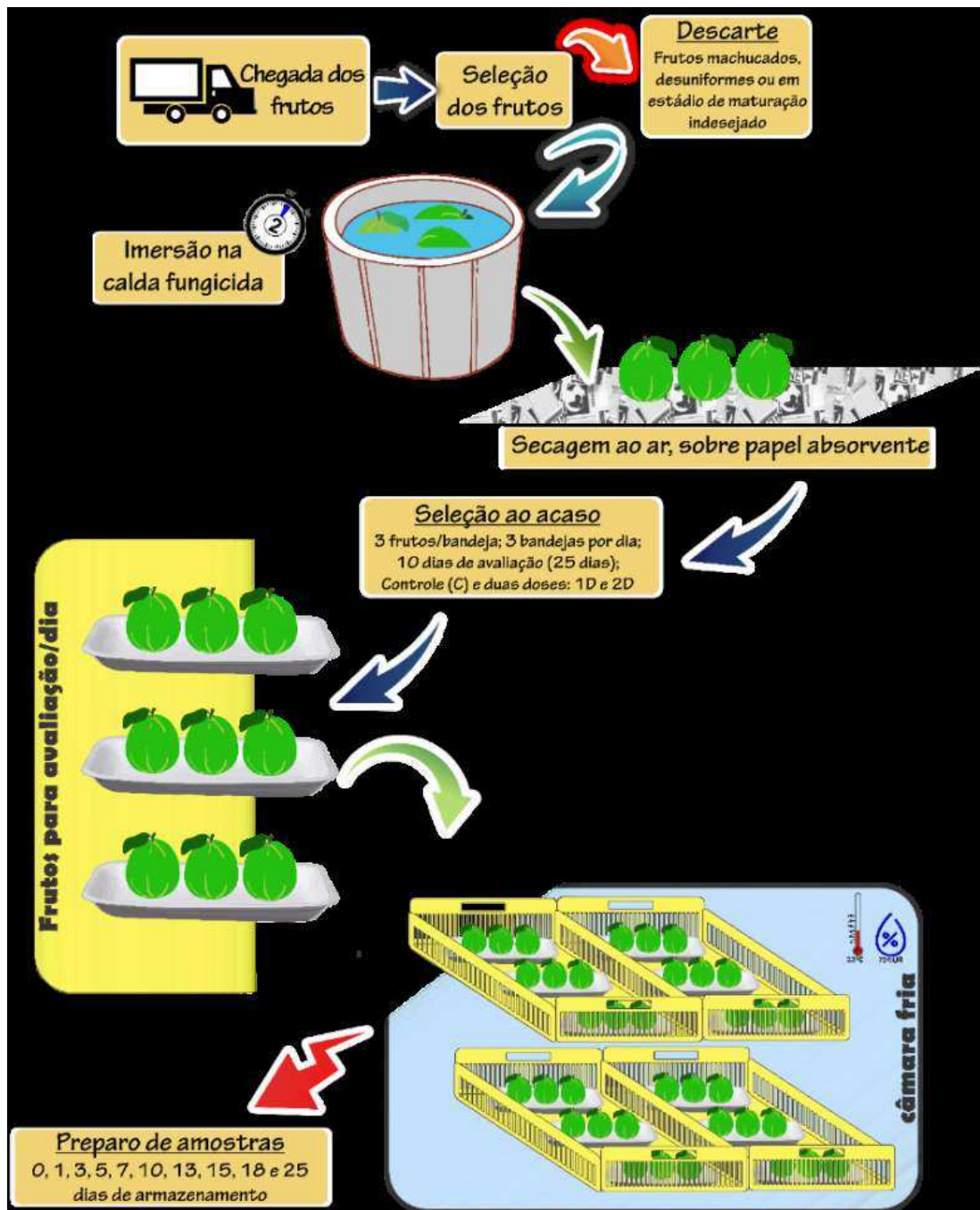


Figura 10: Fluxograma de montagem do experimento, preparação dos tratamentos e acondicionamento em câmara fria (22 ± 2 °C e 75 ± 10 % UR) por até 25 dias.



Figura 11: Caixas com frutos acondicionadas em câmara fria (22 ± 2 °C e 75 ± 10 % UR) por até 25 dias de armazenamento. Cada caixa contém um dia de avaliação de cada tratamento com três bandejas com três frutos.

3.3. Evolução da cor do epicarpo

A avaliação da cor do epicarpo dos frutos foi determinada por reflectometria, mediante a utilização de colorímetro, e os resultados foram expressos pelo valor do ângulo hue. As medidas foram obtidas em dois pontos da goiaba, representativos da

cor global externa e diametralmente opostos na zona equatorial de cada fruto avaliado.

3.4. Dissipação dos fungicidas

As concentrações de imazalil e procloraz no epicarpo, no mesocarpo e na placenta foram determinadas pelas respostas cromatográficas dos analitos e os resultados foram dispostos graficamente em função do tempo. Foi estabelecida a cinética de dissipação para os princípios ativos em goiaba.

4. Resultados e discussão

4.1. Evolução da cor do epicarpo

A coloração do epicarpo das goiabas ‘Pedro Sato’ apresentou variações ao longo do tempo, reduzindo a cor verde em função do período de armazenamento, independente dos frutos terem ou não sido tratados com fungicidas. A figura 12 apresenta as alterações visuais nos frutos ao longo dos dias de armazenamento.

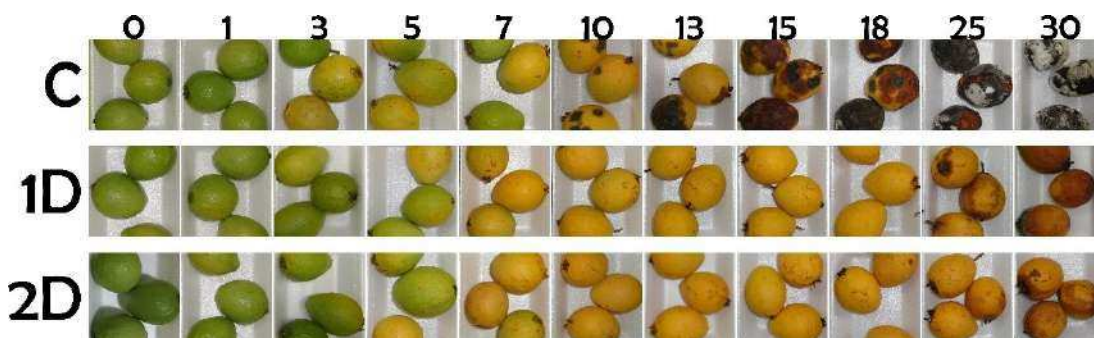


Figura 12: Evolução da cor e incidência de podridões dos frutos controle (C) (sem fungicida) e dos frutos tratados com imazalil e procloraz nas doses 1D e 2D, armazenados em câmara fria (a 22 ± 2 °C e 75 ± 10 % UR) por até 30 dias.

As goiabas foram armazenadas inicialmente (Dia 0) com o epicarpo apresentando ângulo de cor médio de 114,1 °h (Controle), 113,8 °h (dose 1D) e 108,9 °h (dose 2D) e, em torno do quinto dia (Dia 5) de armazenamento, apresentaram coloração com mudança de verde-claro para amarelo, correspondendo ao ângulo médio de 103,6 °h.

Os primeiros sintomas de doenças nos frutos do controle (C) surgiram entre o terceiro (Dia 3) e o quinto dia (Dia 5) e para os frutos dos tratamentos 1D e 2D, a partir do décimo oitavo dia (Dia 18). A figura 12 evidencia que o tratamento com os fungicidas imazalil e procloraz associados, sob as condições de temperatura e umidade a que foram submetidos os frutos, conseguiram retardar a incidência e a severidade da ação dos fungos em goiaba, embora, a partir do 7º dia de armazenamento os frutos já não apresentassem condições para de consumo devido à consistência muito macia e à senescência avançada.

A coloração amarela foi observada quando os frutos atingiram ângulo de cor menor que 100 °h (Figura 13), como também observado por Azzolini *et al* (2004) e de Simões (2012).

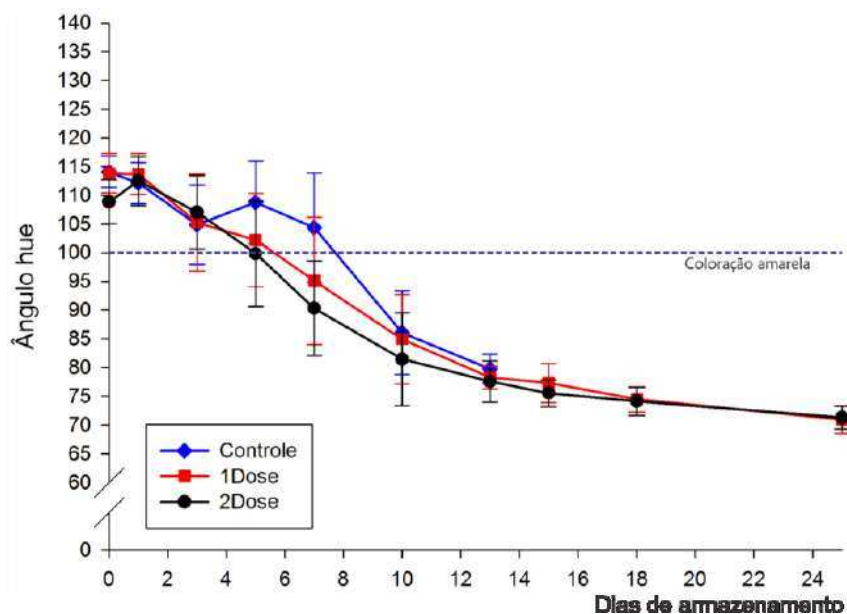


Figura 13: Evolução da cor do epicarpo dos frutos controle (C) (sem fungicida) e dos frutos tratados com imazalil e procloraz nas doses 1D e 2D, armazenados em câmara fria (22 ± 2 °C e 75 ± 10 % UR) por até 25 dias.

A linha tracejada indica o valor de 100 °h, ângulo a partir do qual os frutos apresentaram cor amarela. Os pontos do gráfico e as barras de erros (desvio-padrão) foram calculados pela avaliação de cor das 3 bandejas (total de 9 frutos, 18 leituras) de cada tratamento, em cada dia de avaliação.

A coloração do fruto está intimamente ligada ao seu tempo de prateleira, pois goiabas com coloração amarelada possuem pouca atratividade ao mercado de frutas frescas, pois intuitivamente o consumidor relaciona a cor amarela do fruto com falta de frescor e senescência do fruto. Além disso, a diminuição do ângulo de cor tem correlação direta – com 95% de confiança – com a redução da firmeza do fruto (Azzolini *et al*, 2004). Com menor resistência mecânica, o fruto fica mais propenso a danos mecânicos e, conseqüentemente, mais suscetível à incidência de patógenos.

4.2. Persistência e dissipação dos fungicidas

Os dados de persistência e dissipação dos princípios ativos aplicados em goiabas (1D e 2D) em função do tempo são apresentados na figura 14.

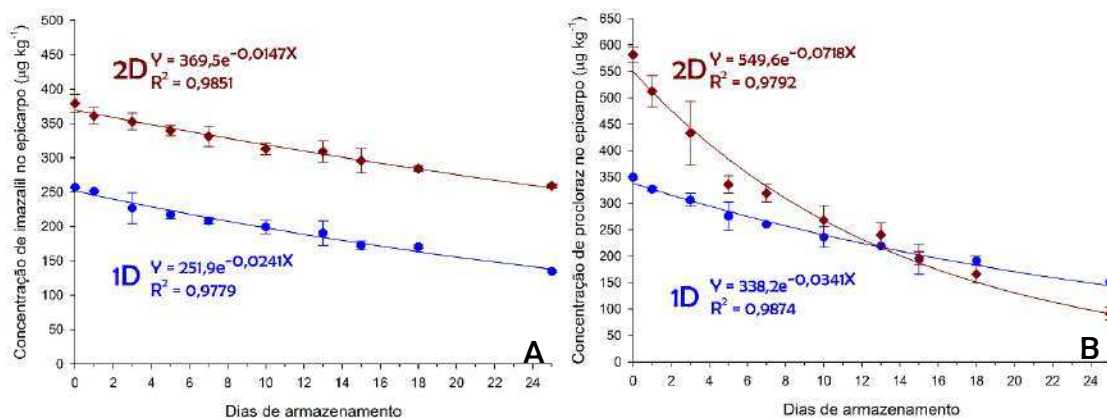


Figura 14: Dissipação dos princípios ativos imazalil (A) e procloraz (B) no epicarpo de goiabas 'Pedro Sato' nas doses 1D e 2D.

Nas equações, Y corresponde à concentração do princípio ativo no epicarpo (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) e X aos dias de armazenamento. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das amostras ($n = 3$).

O decaimento exponencial da concentração dos fungicidas no epicarpo em função do tempo se comportou como uma cinética de primeira ordem (Equação 4):

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad \text{Equação 4}$$

onde C é a concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$ epicarpo), t é o tempo (dias) e k é a taxa de dissipação (dias^{-1}). O decaimento da concentração do fungicida com o tempo (dC/dt) é proporcional à concentração deste nesse tempo (Equação 5) (BEULKE & BROWN, 2001):

$$C_{(t)} = C_0 e^{-kt} \quad \text{Equação 5}$$

onde $C_{(t)}$ é a concentração no tempo t ($\mu\text{g kg}^{-1}$ epicarpo) e C_0 é a concentração no tempo $t = 0$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$ epicarpo).

A concentração dos fungicidas no epicarpo decresceu ao longo dos dias de armazenamento, o que evidencia que existe dissipação dos princípios ativos, seja para o interior do fruto ou para o exterior. Pela figura 14, é possível observar que as concentrações dos fungicidas no epicarpo apresentam decaimento exponencial (cinética de 1ª ordem), embora as taxas de dissipação (k) terem sido mais expressivas para o procloraz, nos dois tratamentos (1D e 2D).

Além disso, é interessante observar que, apesar das doses de procloraz nos

tratamentos terem sido menores (0,9 e 1,8 mmol L⁻¹) que as do imazalil (3,4 e 6,8 mmol L⁻¹), a concentração dos resíduos encontrados no epicarpo (dia 0) foram superiores no procloraz (Figura 14). Isso, provavelmente, está relacionado com o fato do procloraz ser um fungicida cuja ação é por contato. Outra possibilidade é que, dado que foram utilizados fungicidas comerciais, que as substâncias tensoativas (surfactantes) na composição do Sportak[®] (procloraz) sejam mais eficientes que as presentes no Magnate[®] (imazalil). O fabricante do Sportak[®] declara na bula do produto que, além do princípio ativo, contém ‘ingredientes inertes’, sem detalhar a informação. O objetivo do tensoativo é diminuir a tensão superficial e aumentar o contato da calda fungicida com o fruto.

Depois da aplicação dos fungicidas nos frutos, os princípios ativos que ficaram adsorvidos podem permanecer sobre a sua superfície (contato) ou ser absorvidos pela superfície do fruto (cutícula cerosa) e entrar no sistema de transporte do mesmo (sistêmico). A cutícula também pode ser um elemento importante no processo de translocação, permitindo que moléculas com polaridade semelhante a esta atravessem a camada e moléculas com polaridades distintas permaneçam na superfície do fruto. A penetração no fruto é um processo físico-químico comum, que pode ocorrer desde a aplicação do agrotóxico até o fim do armazenamento (KEIKOTLHAILE & SPANOGUE, 2011). Muitos fatores inerentes à molécula podem afetar a penetração, como K_{ow} , massa molar, ação sistêmica provável e a formulação do produto comercial aplicado.

Enquanto ainda sobre o epicarpo da goiaba, o agrotóxico pode sofrer volatilização (mais comum para agrotóxicos não sistêmicos com pressões de vapor elevadas e baixo K_{ow}), fotólise química e/ou degradação por microrganismos (Figura 15) (KEIKOTLHAILE & SPANOGUE, 2011). Caso o princípio ativo (PA) seja translocado para o interior do fruto, ele pode permanecer em sua forma original ou ser degradado em subprodutos.

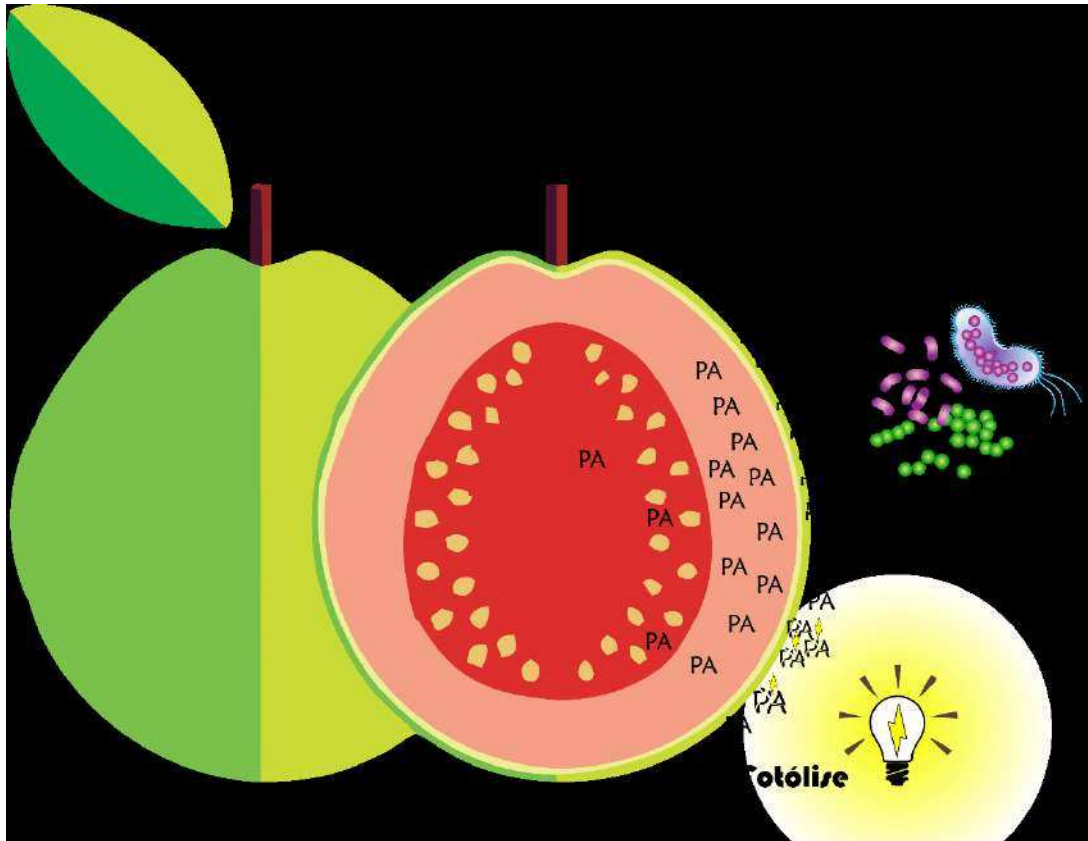


Figura 15: Possibilidades de dissipação (volatilização, degradação microbiana (MO), fotólise e translocação) dos princípios ativos (PA) em goiaba.

Para avaliar se houve dissipação por translocação dos princípios ativos do epicarpo para o mesocarpo, esta fração do fruto foi analisada por CG/DCE e os resultados são apresentados na figura 16.

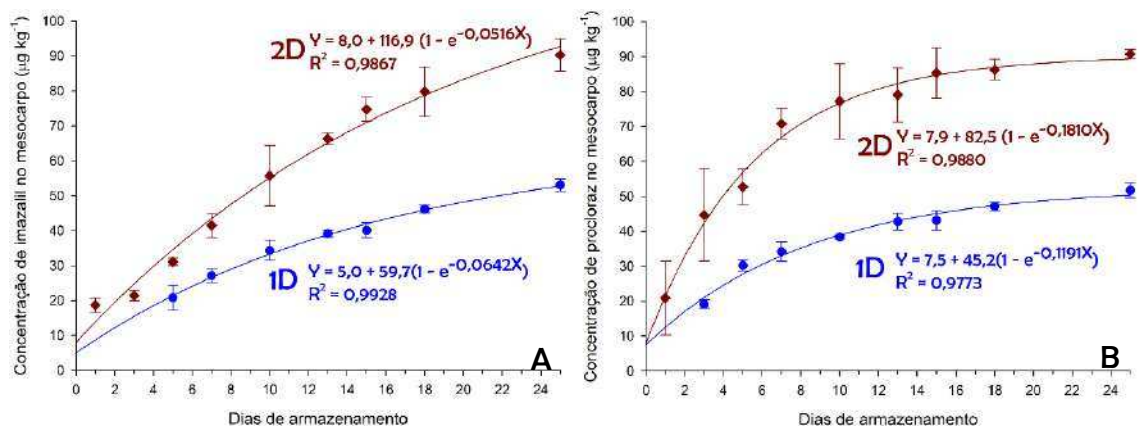


Figura 16: Translocação dos princípios ativos imazalil (A) e procloraz (B) do epicarpo para o mesocarpo de goiabas 'Pedro Sato' nas doses 1D e 2D.

Nas equações, Y corresponde à concentração do princípio ativo no mesocarpo (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) e X aos dias de armazenamento. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das amostras ($n = 3$).

Observa-se que houve aumento da concentração dos princípios ativos no

mesocarpo em função do tempo, confirmando a hipótese de que migraram para o interior dos frutos. A translocação dos princípios ativos do epicarpo para o mesocarpo apresentou comportamento ajustável à equação de crescimento exponencial descrita pela Equação 6, caracterizada por incrementos até estabilização em um máximo:

$$C_{(t)} = C_0 + a(1 - e^{-kt}) \quad \text{Equação 6}$$

em que $C_{(t)}$ é a concentração no tempo t ($\mu\text{g kg}^{-1}$ mesocarpo), C_0 é a concentração no tempo $t = 0$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$ mesocarpo), a é a concentração no equilíbrio, k é a taxa de translocação (dias^{-1}) e t é o tempo (dias).

Observa-se que as taxas de translocação (k) do imazalil apresentam valores bem menores que as do procloraz (Figura 16), o que indica que a translocação ocorre mais lentamente para o primeiro que para o segundo. Entretanto, as concentrações de equilíbrio (a) são menores para o procloraz. Teoricamente, isso significa que se o fruto fosse armazenado até o ponto de equilíbrio do princípio ativo no mesocarpo, este conteria concentrações menores de procloraz do que de imazalil. Na prática, isso é pouco relevante, dado que o fruto, para chegar no equilíbrio, precisaria permanecer armazenado por um período longo de tempo, onde este já não teria condições de consumo.

Os mecanismos pelos quais acontece o transporte de solutos para o interior do fruto ainda é pouco conhecido. Entretanto, acredita-se que a cutícula participe do processo como barreira mecânica, reduzindo a entrada dos princípios ativos. A cutícula é a fração cerosa, presente na superfície de certos frutos cujo principal componente é a cutina, polímero constituído de moléculas de ácido graxo que possui a função de evitar a desidratação e proteger o fruto de infecções. Como a cutícula possui natureza polar, quanto maior afinidade os princípios ativos tiverem com a cutícula, mais facilmente migrarão para o interior do fruto.

Môro *et al*, (2003) observaram a presença de cutícula espessa em goiabas 'Paluma', embora tal característica seja determinada pela exposição ao sol (WITHNER *et al*, 1974) em que a parte vegetal mais exposta tende a exibir uma cutícula mais espessa. No caso deste estudo, espera-se que a cutícula dos frutos seja mais fina, devido ao ensacamento realizado durante o desenvolvimento dos mesmos.

Com a cutícula mais fina, a absorção dos princípios ativos pela epiderme, deve possivelmente, ser favorecida.

Além disso, Mouro *et al* (2003) relataram a presença de estômatos paracíticos salientes, que também podem constituir vias de acesso para a migração dos agrotóxicos para o interior do fruto.

Constatada a presença de resíduos de agrotóxicos no mesocarpo, avaliou-se também a possibilidade de os mesmos migrarem para a placenta. Com relação à placenta, por ser a fração mais profunda da goiaba, existe uma maior dificuldade para os princípios ativos penetrarem em sua estrutura.

Com relação à placenta, a quantidade de agrotóxico que translocou à fração foi relativamente pequena, quando comparada aos resíduos encontrados no epicarpo. No presente estudo, os resíduos de imazalil e procloraz foram detectados ($LD_{IMZ} = 6,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $LD_{PCZ} = 4,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) na placenta, mas não foram quantificados, pois estão abaixo dos limites de quantificação obtidos ($LQ_{IMZ} = 19,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $LQ_{PCZ} = 12,2 \mu\text{g kg}^{-1}$), ou seja, abaixo do limite mínimo ao qual é possível quantificar com confiança os analitos.

A dissipação do fungicida no fruto corresponde à quantidade do princípio ativo dissipada para o interior do fruto, quando acontece, somada com outras formas de dissipação, que serão doravante denominadas genericamente como dissipação indeterminada, D_I . Isso corresponde a dizer que o resíduo total dos agrotóxicos é o resíduo de que foi dissipado de formas não determinadas (por degradação, por volatilização, por fotólise ou outro mecanismo) somado aos resíduos que permanecem no fruto, ou seja, aos resíduos persistentes no epicarpo e aos que foram dissipados por translocação para o interior do fruto (mesocarpo e placenta). Considerando o resíduo em função do tempo de armazenamento, e isolando a D_I tem-se (Equação 7):

$$D_I(\%) = \frac{RT_{(0)} - RE_{(t)} - RM_{(t)} - RP_{(t)}}{RT_{(0)}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

A D_I corresponde ao resíduo total em massa do agrotóxico em um tempo $t=0$ ($RT_{(0)}$) subtraído dos resíduos existentes no epicarpo ($RE_{(t)}$) e do resíduo dissipado para o interior do fruto – mesocarpo ($RM_{(t)}$) e placenta ($RP_{(t)}$) – em um dado instante

de tempo t . Dado que não foram encontrados resíduos na placenta acima do LQ, o mesmo também pode ser considerado como somado à D_I . Considerando que no tempo $t = 0$ todo o princípio ativo permanece adsorvido na superfície do fruto, isto é, ainda não houve dissipação de qualquer forma, o resíduo total do fungicida no tempo zero é igual ao encontrado no epicarpo no tempo 0 ($RT_{(0)} = RE_{(0)}$), então a D_I pode ser definida como (Equação 10):

$$D_I(\%) = \frac{RE_0 - (RE_t + RM_t)}{RE_0} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Em termos percentuais (Tabela 10), a distribuição dos resíduos em massa, na goiaba, ao longo de 25 dias de armazenamento, apresentou comportamentos distintos para os dois fungicidas. A maior parte do imazalil encontrado no epicarpo no dia 0 permanece no fruto (72,9%, 1D; 92,1%, 2D) – seja no epicarpo ou no mesocarpo – mesmo após 25 dias de armazenamento. Já o procloraz dissipa percentuais bem maiores para o D_I , chegando a permanecer no fruto 58,1% (1D) e 31,3% (2D).

Tabela 10: Distribuição, em termos percentuais (m/m), dos resíduos nas frações de goiabas 'Pedro Sato' e aqueles dissipados de forma indeterminada D_I nas duas doses estudadas (1D e 2D), ao longo dos dias de armazenamento em câmara fria ($a 22 \pm 2$ °C e 75 ± 10 % UR).

Dia	Imazalil						Procloraz					
	Epicarpo		Mesocarpo		D_I		Epicarpo		Mesocarpo		D_I	
	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D	1D	2D
0	100,0	100,0	<LQ	<LQ	0,0	0,0	100,0	100,0	<LQ	<LQ	0,0	0,0
1	97,7	95,2	<LQ	3,2	2,3	0,4	93,4	88,1	<LQ	3,6	6,6	8,3
3	88,1	93,0	<LQ	5,6	11,9	1,4	87,7	74,5	5,5	7,7	6,8	17,8
5	84,4	89,5	8,1	8,2	7,5	2,3	78,9	57,7	8,7	9,1	12,4	33,2
7	81,1	87,3	10,5	10,9	8,4	1,7	74,4	54,9	9,8	12,2	15,8	32,9
10	77,5	82,6	13,4	14,7	9,2	2,7	67,5	46,2	11,0	13,3	21,5	40,5
13	74,0	81,5	15,2	17,5	10,8	1,0	62,7	41,4	12,2	13,6	25,1	45,0
15	67,0	78,0	15,6	19,7	17,4	2,3	55,7	33,8	12,3	14,7	32,0	51,5
18	66,3	74,9	18,0	21,0	15,8	4,1	54,8	28,6	13,5	14,8	31,7	56,6
25	52,3	68,3	20,6	23,8	27,0	7,8	43,3	19,8	14,8	15,6	41,9	68,7

5. Conclusões

O estudo confirmou que grande parte dos princípios ativos permanece no epicarpo, parte é dissipada para o ambiente e parte é dissipada por translocação para o interior do fruto. Os fungicidas imazalil e procloraz apresentaram percentuais de dissipação diferentes para cada dose estudada: 47,7 % (1D) e 31,7 % (2D) e para o procloraz 56,7 % (1D) e 80,2 % (2D).

Parte dos princípios ativos dissipados do epicarpo foram translocados, ao longo dos dias de armazenamento, para o mesocarpo (no máximo, 23,8 % para imazalil e 15,6 % para procloraz). As quantidades detectadas para a placenta foram valores abaixo dos limites de quantificação dos analitos na referida fração. Parte dos princípios ativos foi ainda dissipada por formas não determinadas: até 27,0% para o imazalil e até 68,7% para o procloraz.

CAPÍTULO 4

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE IMAZALIL NA EXTENSÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE GOIABAS ‘PEDRO SATO’

1. Introdução

O amadurecimento é um processo onde ocorrem importantes mudanças na cor, textura e sabor, tornando os frutos atrativos e com características agradáveis ao consumidor. Grande número de alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais ocorre durante essa fase, que incluem a degradação de amido e/ou outros polissacarídeos de armazenamento, a produção de açúcares, a síntese de pigmentos e compostos voláteis e a solubilização parcial da parede celular (JAIN *et al*, 2003; ABU-GOUKH & BASHIR, 2003).

Uma das alterações mais facilmente identificáveis é a mudança de coloração dos frutos, importante atributo de qualidade, não apenas por contribuir no aspecto visual, mas também porque a alteração da cor do epicarpo está correlacionada com processos fisiológicos que determinam a qualidade da goiaba, como a firmeza, cor da polpa e acidez (AZZOLINI *et al*, 2004). Intuitivamente, o consumidor relaciona a cor e o aspecto visual do fruto com sua qualidade.

As mudanças de coloração no epicarpo da goiaba são resultantes da degradação da clorofila, que evidencia os compostos carotenoides, que já existem no fruto, mas que são também sintetizados nesta etapa (JAIN *et al*, 2003; ABU-GOUKH & BASHIR, 2003).

A determinação da cor dos frutos geralmente é realizada com auxílio de colorímetro, aparelho que emite um feixe de luz e registra a luz refletida. O equipamento retorna resultados em termos do ângulo hue, conforme o Sistema de Cores CIE (1976), para medida, designação e acerto de cores. Este ângulo assume valores de 0 °h para vermelho, 90 °h para amarelo, 180 °h para verde e 270 °h para o azul (Figura 17) (MCGUIRE, 1992).

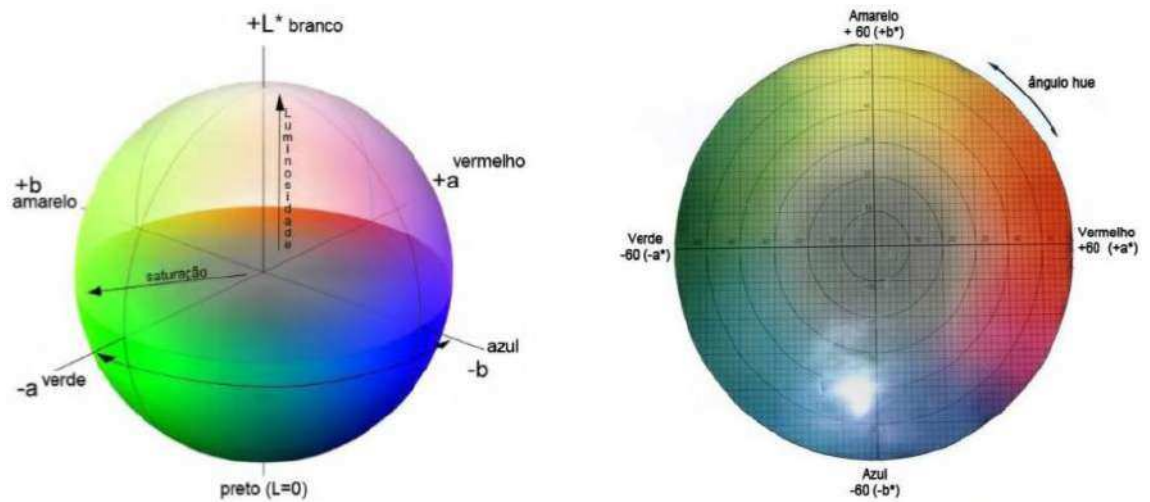


Figura 17: Sistema de cores CIE L^* , a^* e b^* , para medida, designação e acerto de cores em um sólido de cores.

De acordo com estudo de Azzolini *et al* (2004) realizado com goiabas ‘Pedro Sato’, frutos aptos para a colheita (fisiologicamente maduros) podem estar em três estádios diferentes: estágio 1 (cor da casca verde-escura, ângulo de cor entre 120° h e 117° h), estágio 2 (cor da casca verde-clara, ângulo de cor entre 116° h e 113° h e estágio 3 (cor da casca verde-amarela, ângulo de cor entre 112° h e 108° h). Ainda segundo os supracitados autores, frutos colhidos no estágio 2, após 4 dias da colheita, apresentaram coloração totalmente amarela, com ângulo de cor menor que 100° h.

2. Objetivo

- Avaliar o efeito da concentração de imazalil na extensão da vida de prateleira de goiabas 'Pedro Sato';
- Verificar a persistência de imazalil na goiaba, aplicando diferentes doses.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes, equipamentos e material vegetal

Foram utilizadas as soluções de trabalho dos padrões imazalil e procloraz (10 mg L⁻¹) previamente preparadas (Capítulo 2) e os fungicidas comerciais Sportak® 450EC e Magnate® 500EC. Além dos equipamentos já descritos no Capítulo 2, foram utilizados também um refratômetro Atago (modelo N1) para avaliação de sólidos solúveis e um colorímetro Konica Minolta (modelo CR-10) para avaliação da cor.

3.2. Material vegetal

Os frutos utilizados neste estudo foram oriundos do mesmo pomar comercial (descrito no Capítulo 2). Os frutos foram colhidos no estágio 3 (coloração da casca verde-amarela, ângulo hue entre 112 e 108) conforme escala de cor definida por Azzolini *et al* (2004), para colheita de goiabas ‘Pedro Sato’.

3.3. Montagem do experimento

Para a execução do experimento, considerou-se como dose de referência (D_{ref}) do fungicida comercial aquela preconizada (pelo fabricante) para uso em fruteiras⁵ (Tabela 9). Foram preparadas caldas fungicidas em 4 concentrações de imazalil: D_A (equivalente a $0,5D_{ref}$ ou 1,7 mmol L⁻¹), D_B (equivalente a $0,75D_{ref}$ ou 2,6 mmol L⁻¹), D_C (equivalente a D_{ref} ou 3,4 mmol L⁻¹) e D_D (equivalente a $1,5D_{ref}$ ou 5,1 mmol L⁻¹).

Os frutos tratados com as doses acima foram dispostos em bandejas de poliestireno expandido (três unidades por bandeja) e três bandejas por dia de avaliação para cada dose do produto e foram avaliados com 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 dias de armazenamento. Todos as unidades experimentais (contendo 2 frutos) tiveram suas massas determinadas à temperatura ambiente e, em seguida, foram armazenadas em câmara refrigerada a $22,2 \pm 0,3$ °C e $92,2 \pm 7,9\%$ de umidade relativa do ar (Figura 18).

⁵ Uso autorizado apenas em banana, citros, maçã, mamão, manga e melão.

Paralelamente, foram separados frutos isentos do fungicida para controle (C) e submetidos ao armazenamento e avaliação, nas mesmas condições dos frutos tratados (Figura 18). No dia programado, as respectivas bandejas foram retiradas da câmara refrigerada e frutos foram processados, homogeneizados, analisados e submetidos ao procedimento de extração validado.



Figura 18: Disposição dos frutos na câmara de refrigeração ($22,2 \pm 0,3$ °C e $92,2 \pm 7,9\%$), dispostos em bandejas e marcados com a dosagem utilizada e o dia de avaliação.

3.3. Análises

3.3.1. Perda de massa da matéria fresca

Os frutos foram pesados em balança eletrônica de precisão (0,01g). Os resultados foram expressos em porcentagem, considerando-se a diferença entre a pesagem inicial do fruto e aquela obtida nos dias de avaliação.

3.3.2. Incidência de doenças

A incidência representa o percentual de frutos com sintomas de doenças. A determinação foi realizada utilizando-se a Equação 9:

$$I = \frac{NFL}{NTF} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

onde I é a incidência de doenças (%), NFL é o número de frutos com lesões e NTF é o número total de frutos.

3.3.3. Severidade de doenças

Representa o percentual da área superficial dos frutos com sintomas de doenças. As áreas lesionadas de cada fruto foram determinadas pela medição do seu diâmetro (D) – com auxílio de fita métrica flexível para acompanhar a curvatura do fruto – e realizado o cálculo de área (A) utilizando a fórmula: $A = \pi D^2/4$.

O cálculo da severidade foi realizado utilizando a Equação 10:

$$S(\%) = \frac{ATL}{AF} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

onde S(%) corresponde à severidade da doença no fruto, ATL à área total lesionada e AF à área superficial do fruto, calculada pela fórmula $A = 4\pi r_1 r_2 = A = \pi D_1 D_2$.

3.3.4. Evolução da cor do epicarpo

A avaliação da cor do epicarpo dos frutos foi determinada por reflectometria, mediante a utilização de colorímetro, e os resultados foram expressos pelo valor do ângulo hue. As medidas foram obtidas em dois pontos da goiaba, representativos da cor global externa e diametralmente opostos na zona equatorial de cada fruto avaliado.

3.3.5. Firmeza do mesocarpo

A firmeza do mesocarpo foi determinada com auxílio de um penetrômetro digital. Os resultados foram expressos em newtons (N).

3.3.6. Sólidos solúveis

Amostras compostas das frações trituradas e homogeneizadas dos frutos de cada bandeja (dois frutos) foram prensadas com tela fina com objetivo de se obter um suco da fração. O teor de sólidos solúveis foi determinado com o auxílio de um refratômetro digital, e, expressos em °Brix. Foram realizadas duas leituras de cada fração das amostras.

3.3.7. Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por titulação, realizada sob agitação, de 5 gramas das frações processadas. Ao material foram adicionados 100 mL de água destilada, em erlenmeyer, e procedeu-se à titulação com solução de NaOH 0,03 mol L⁻¹, previamente padronizada com biftalato de potássio, usando fenolftaleína 1% (m/v) como indicador. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em g de ácido cítrico por 100 g da fração da goiaba.

3.3.8. Análise de resíduos de imazalil

Foi realizado o procedimento de extração de imazalil (conforme descrito no Capítulo 2, item 3.5) e os extratos analisados por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, nas condições previamente estabelecidas (Capítulo 2, item 3.6). Foram determinadas as concentrações de imazalil nas frações e no fruto como um todo.

3.4. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à estatística descritiva ou à técnica de superfície de resposta, conforme o caso. Os dados foram analisados utilizando o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.1 (SAEG, 2007).

4. Resultados e discussão

4.1. Perda de massa da matéria fresca

Os resultados referentes à perda de massa de matéria fresca (PMF) dos frutos durante o período de armazenamento são apresentados na figura 19.

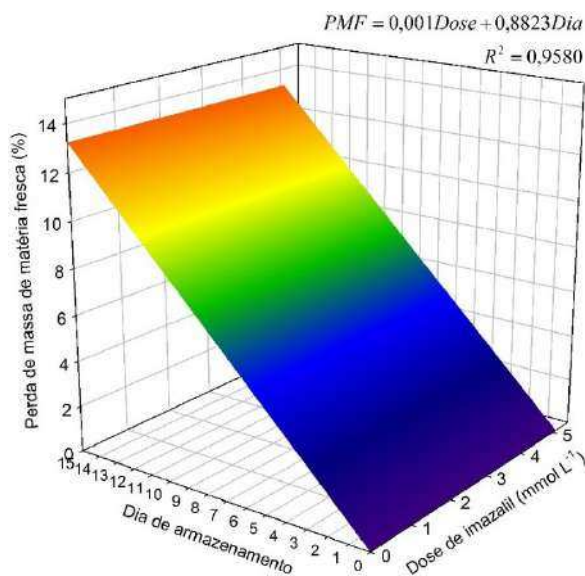


Figura 19: Perda de massa de matéria fresca (PMF) de goiabas 'Pedro Sato' em função das doses de imazalil ($C = 0 \text{ mmol L}^{-1}$, $D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e dos dias de armazenamento (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 dias) a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$.

A superfície de resposta apresentada na figura 19 indica que a perda de massa da matéria fresca das goiabas 'Pedro Sato' aumenta com o tempo de armazenamento e com o aumento da dose, apesar da contribuição desta última ser praticamente negligenciável.

A perda de massa da matéria fresca total dos frutos, após 15 dias de armazenamento, correspondeu, em média, a 14,5% em relação à massa inicial. De acordo com Chitarra & Chitarra (2005), perdas da ordem de 6% para produtos hortícolas podem causar marcante declínio da qualidade. A redução imediata da massa da matéria fresca do fruto é um sintoma inicial de perda de umidade e uma das principais causas da deterioração pós-colheita (FONTES *et al*, 1999). A perda de massa fresca é, basicamente, decorrente dos processos transpiratórios e respiratórios e leva ao amolecimento dos tecidos, diminuindo a aceitabilidade comercial (WOODS, 1990).

4.2. Incidência e severidade de doenças

Foram verificados os primeiros indícios de doença a partir do 5º dia de armazenamento (Figura 20). Com 11 dias de armazenamento, todos os tratamentos apresentavam, no mínimo, 50% de seus frutos infectados. As doses C e D retardaram o aparecimento dos sintomas de doenças nos frutos até o 9º dia de armazenamento.

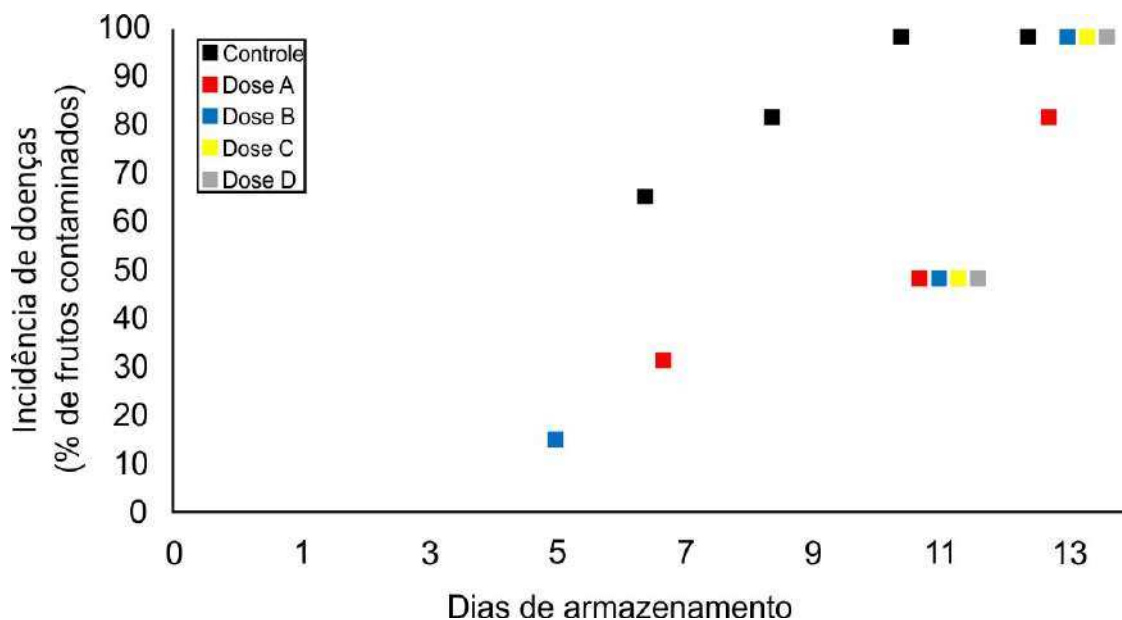


Figura 20: Incidência de contaminação de doenças em goiabas 'Pedro Sato' isentas de imazalil (Controle) e tratadas com diferentes doses desse princípio ativo ($D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$), em função dos dias de armazenamento (a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$).

Os valores correspondem ao percentual de frutos contaminados em função do número total ($n = 6$).

Com relação à severidade da contaminação (Figura 21), os frutos apresentaram danos pontuais até 7 dias de armazenamento, mesmo para o controle, que possuía apenas $5,2 \pm 7,34\%$ de área afetada. As barras de erro na figura 21 correspondem ao desvio padrão da medida ($n = 6$). Observa-se que os desvios são altos, o que indica que, em um mesmo tratamento/dia, ocorreram grandes variações na contaminação.

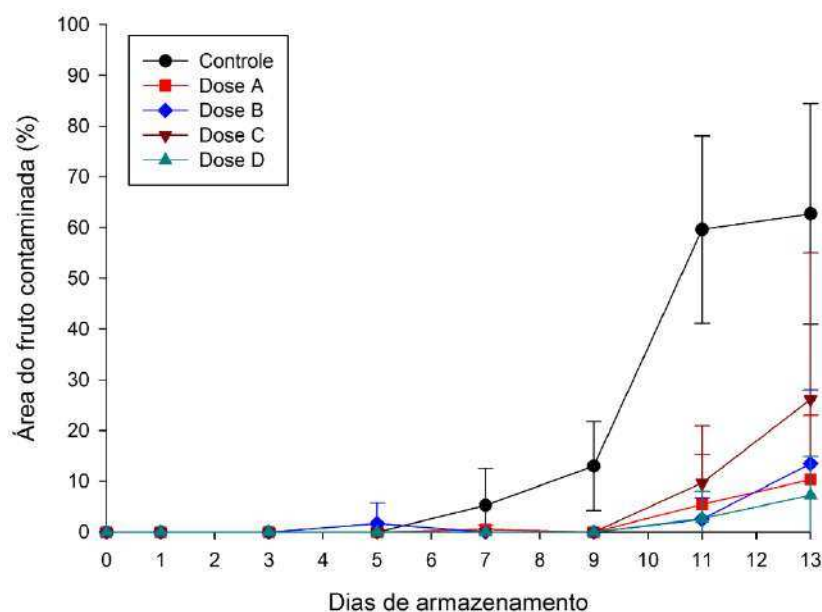


Figura 21: Severidade da contaminação de doenças em goiabas 'Pedro Sato' isentas de imazalil (Controle) e tratadas com diferentes doses desse princípio ativo ($D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$), em função dos dias de armazenamento (a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$).

Os valores correspondem ao percentual da área lesionada em função da área superficial do fruto. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da medida ($n = 6$).

4.3. Evolução da cor do epicarpo

A cor do epicarpo das goiabas 'Pedro Sato', avaliada pelo ângulo hue, apresentou variações ao longo do tempo, reduzindo a coloração verde em função do período de armazenamento e convertendo a cor dos frutos de verde para amarelo (Figura 22).

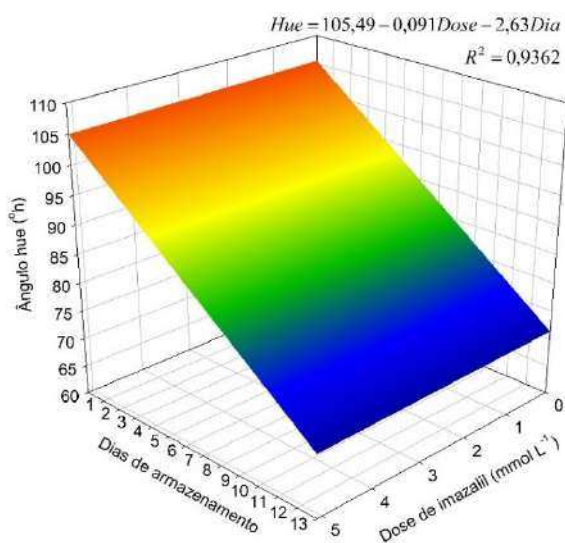


Figura 22: Evolução da cor do epicarpo de goiabas 'Pedro Sato' (Hue) em função das doses de imazalil ($C = 0 \text{ mmol L}^{-1}$, $D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e dos dias de armazenamento (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$.

Como os frutos foram colhidos no estágio 3 (112 a 108 °h), o epicarpo já se encontrava com coloração verde-amarela no dia zero (Figura 23), de forma tal que ao 3º dia de armazenamento, todos os frutos possuíam ângulo de cor abaixo de 100 °h, ângulo que se observa a coloração predominantemente amarela (AZZOLINI *et al*, 2004). A partir do 5º dia, os frutos já não apresentavam brilho e o aspecto visual já se mostrava pouco atrativo.

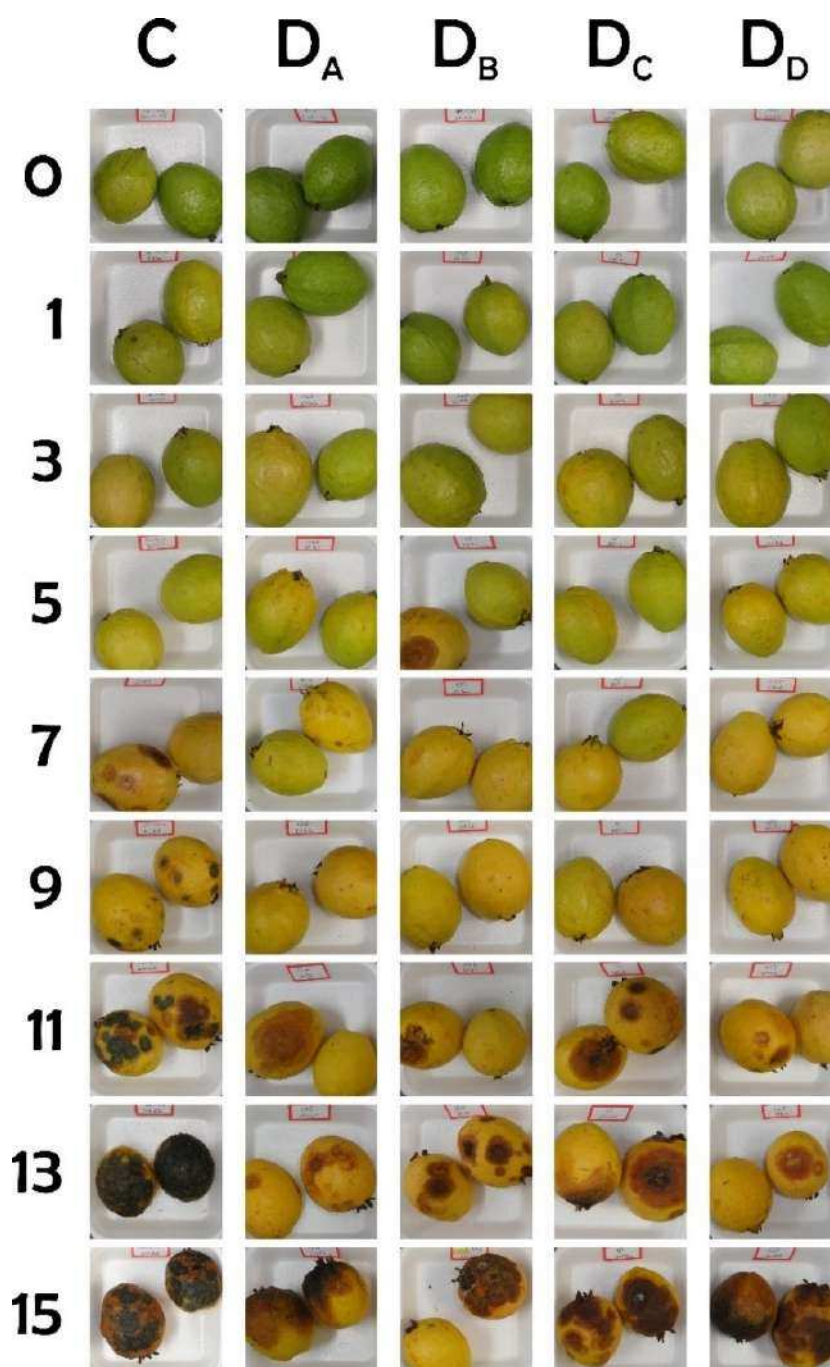


Figura 23: Evolução da cor do epicarpo de goiabas 'Pedro Sato' isentas de imazalil (C) e tratadas com diferentes doses desse princípio ativo ($D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$), em função dos dias de armazenamento (números na vertical) (a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$)

As mudanças de coloração são resultantes principalmente da degradação da clorofila, e da síntese de pigmentos carotenoides. A degradação da clorofila ocorre em função das mudanças de pH, de ácidos, do aumento dos processos oxidativos e da ação das clorofilases (JAIN *et al*, 2003).

4.4. Acidez

A acidez nas frações da goiaba, ao longo dos dias de armazenamento, apresentou comportamento semelhante para todos os tratamentos, no tocante ao efeito das doses na acidez, que possuem participação pequena na alteração da característica ao longo dos dias de armazenamento (Figura 24).

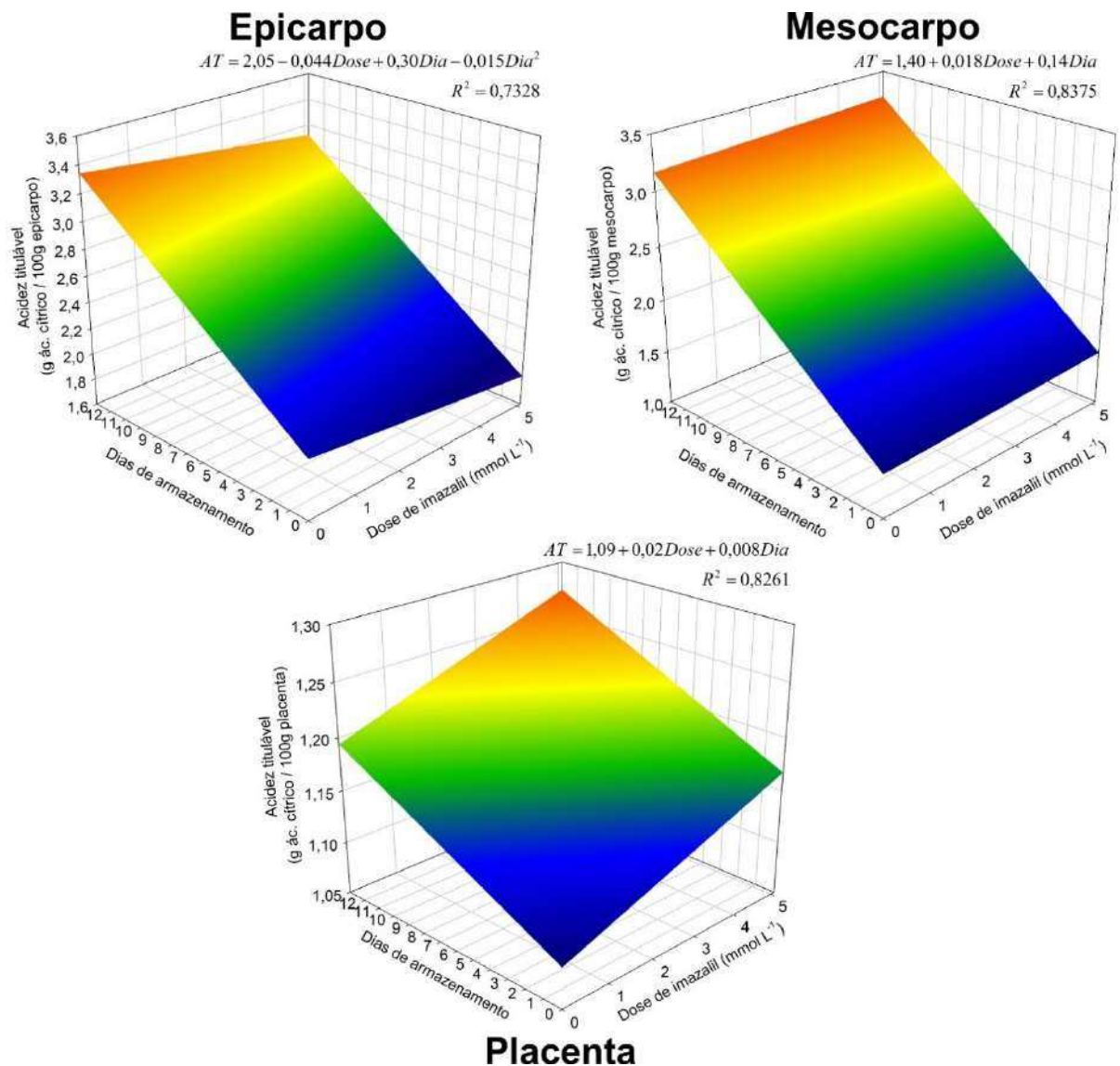


Figura 24: Acidez titulável (AT) de amostras homogêneas do epicarpo, mesocarpo e placenta de goiabas 'Pedro Sato' em função de doses de imazalil ($C = 0 \text{ mmol L}^{-1}$, $D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e dos dias de armazenamento (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\%$ UR.

O incremento na acidez durante o período de armazenamento pode estar relacionado com a provável formação de ácido galacturônico, em consequência da hidrólise da pectina, por ação das enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase (BARRET & GONZALEZ, 1994; SHARAF & EL-SAADANY, 1996), processo este ligado à redução da firmeza do fruto.

4.5. Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis não apresentou variações significativas entre os tratamentos. Entretanto, ao longo dos dias de armazenamento, os frutos apresentaram discretas alterações no teor de sólidos solúveis (Figura 25), em todas as frações, com médias de $10,5 \pm 1,2$ °Brix (epicarpo), $10,2 \pm 1,0$ °Brix (mesocarpo) e $12,9 \pm 0,8$ °Brix (placenta).

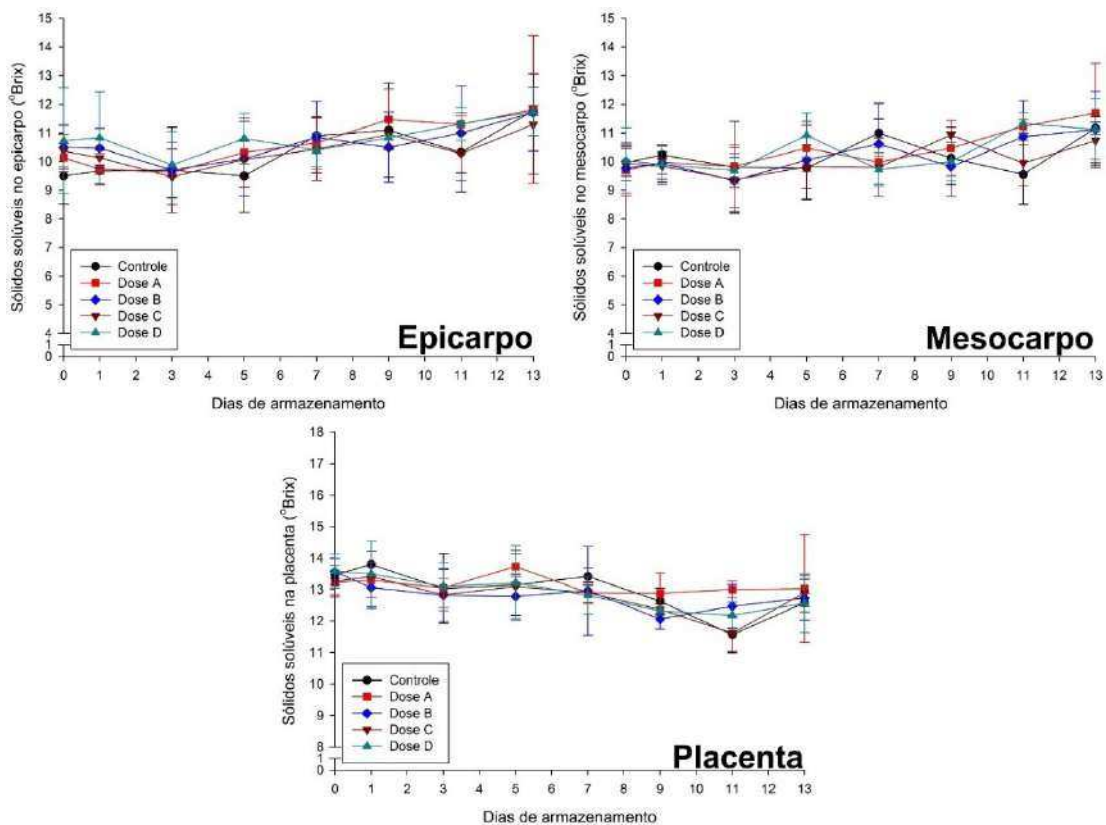


Figura 25: Teor de sólidos solúveis de amostras homogêneas do epicarpo, mesocarpo e placenta de goiabas 'Pedro Sato' isentas de imazalil (Controle) e tratadas com diferentes doses desse princípio ativo ($D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$), em função dos dias de armazenamento (a $22,2 \pm 0,3$ °C e $92,2 \pm 7,9\%$ UR).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão da medida ($n = 6$).

Esses valores podem ser considerados altos quando comparados aos encontrados por Bueno *et al* (2002) (média de $8,7$ °Brix). Entretanto, Abreu *et al*

(2012) relatam que o teor de sólidos solúveis pode alcançar até 15,9 °Brix em frutos maduros.

4.6. Firmeza do mesocarpo

O amaciamento dos tecidos é uma das mudanças mais importantes que ocorrem no processo de maturação. A firmeza do mesocarpo apresentou redução gradativa com o tempo de armazenamento (Figura 26), sendo que nenhum dos tratamentos apresentou comportamento discrepante. Entre os 7 a 13 dias, o tecido praticamente já não ofereceu resistência mecânica, sendo já altamente suscetível a danos mecânicos.

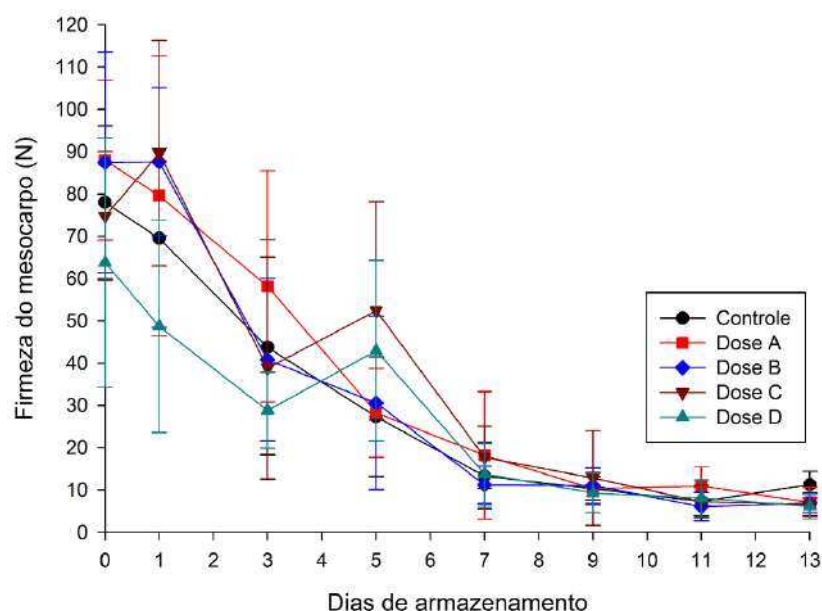


Figura 26: Firmeza do mesocarpo de goiabas 'Pedro Sato' isentas de imazalil (Controle) e tratadas com diferentes doses desse princípio ativo ($D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$), em função dos dias de armazenamento ($a 22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$).

As barras de erro correspondem ao desvio padrão da medida ($n = 9$).

O processo de redução de firmeza é decorrência natural do amadurecimento dos frutos, que ocorre principalmente devido à atividade de grande número de enzimas, como pectinametilesterase, poligalacturonase e celulase, que participam da degradação biológica das substâncias pécticas, classe de polissacarídeos estruturais da parede celular e conseqüente redução de firmeza dos frutos (ABU-GOUKH & BASHIR, 2003).

4.7. Resíduos de imazalil

Avaliou-se periodicamente a presença de resíduos de imazalil nas diferentes

frações de goiabas que receberam as doses desse princípio ativo. Os resultados são apresentados nas figuras 27 e 28.

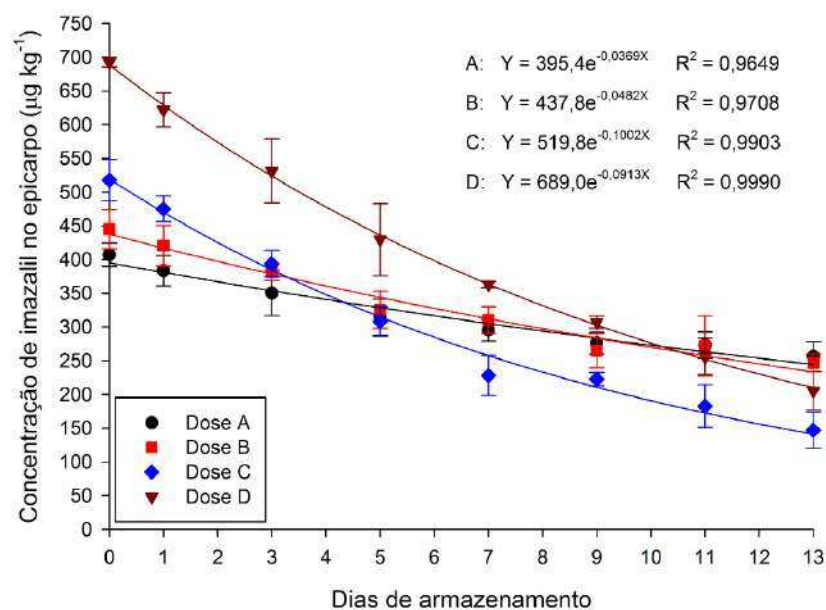


Figura 27: Dissipação do princípio ativo imazalil no epicarpo de goiabas 'Pedro Sato' e tratadas com diferentes doses desse princípio ativo ($D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$), em função dos dias de armazenamento (a $22,2 \pm 0,3 \text{ } ^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$).

Nas equações, Y corresponde à concentração do princípio ativo no epicarpo (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) e X aos dias de armazenamento. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das amostras ($n = 3$).

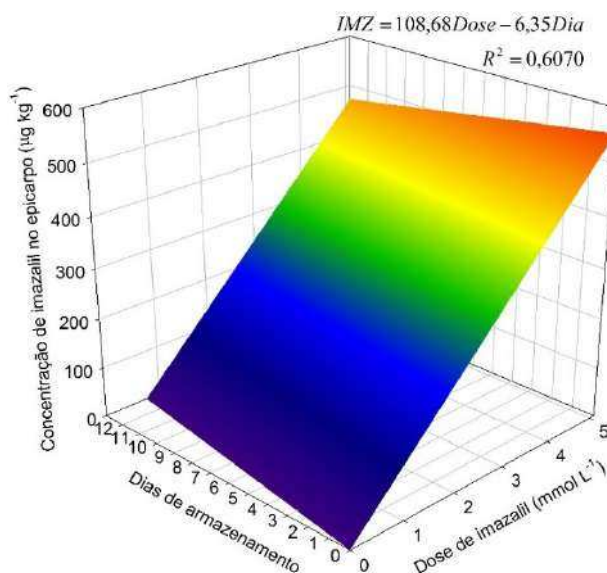


Figura 28: Dissipação do princípio ativo imazalil (IMZ) no epicarpo de goiabas 'Pedro Sato' em função das doses aplicadas e dos dias de armazenamento a $22,2 \pm 0,3 \text{ } ^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$.

Observa-se o comportamento decrescente da concentração de imazalil no epicarpo ao longo dos dias de armazenamento, para todos os tratamentos (Figura 27).

Entretanto, o efeito dos dias de armazenamento é discreto quando comparado ao efeito da dose na concentração de imazalil no epicarpo (Figura 28).

Observa-se também que, ao final de 13 dias, que o tratamento com maior dose (Dose D), apresentou concentração residual semelhante à das menores doses (A e B) (Figura 27). Entretanto, concomitante ao decaimento da concentração no epicarpo há o aumento do princípio ativo no mesocarpo (Figura 29).

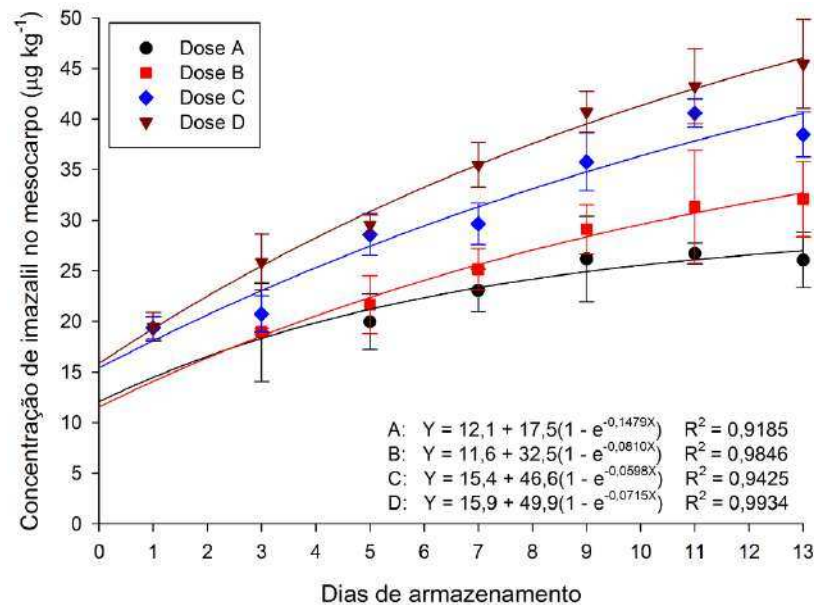


Figura 29: Translocação do princípio ativo imazalil do epicarpo para o mesocarpo de goiabas 'Pedro Sato' tratadas com diferentes doses desse princípio ativo ($D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$), em função dos dias de armazenamento (a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$).

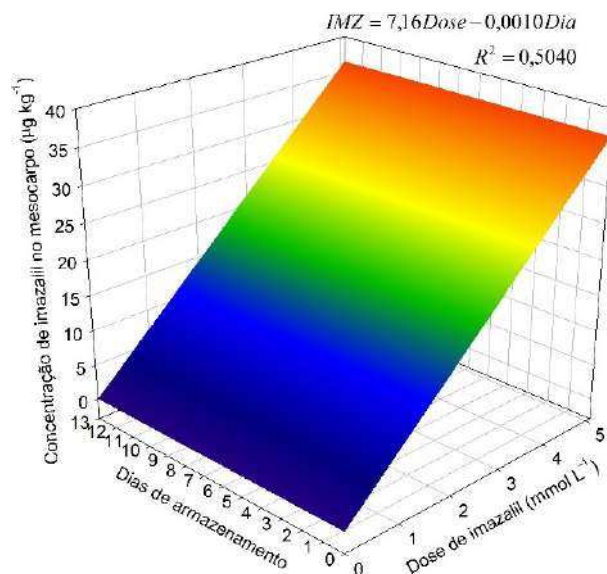


Figura 30: Translocação do princípio ativo imazalil (IMZ) do epicarpo para o mesocarpo de goiabas 'Pedro Sato' em função das doses aplicadas e dos dias de armazenamento a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$.

Observa-se um aumento gradativo da concentração de imazalil no mesocarpo para todas as doses avaliadas, sendo a participação dos dias de armazenamento neste processo pequena, quando comparada à participação da dose aplicada.

Não foi detectada a presença de resíduos de imazalil na placenta para nenhum dos tratamentos avaliados.

De posse dos resultados referentes aos resíduos de imazalil existentes no epicarpo, no mesocarpo e na placenta, procedeu-se um balanço de massa para determinar a concentração de imazalil total no fruto (Figura 31).

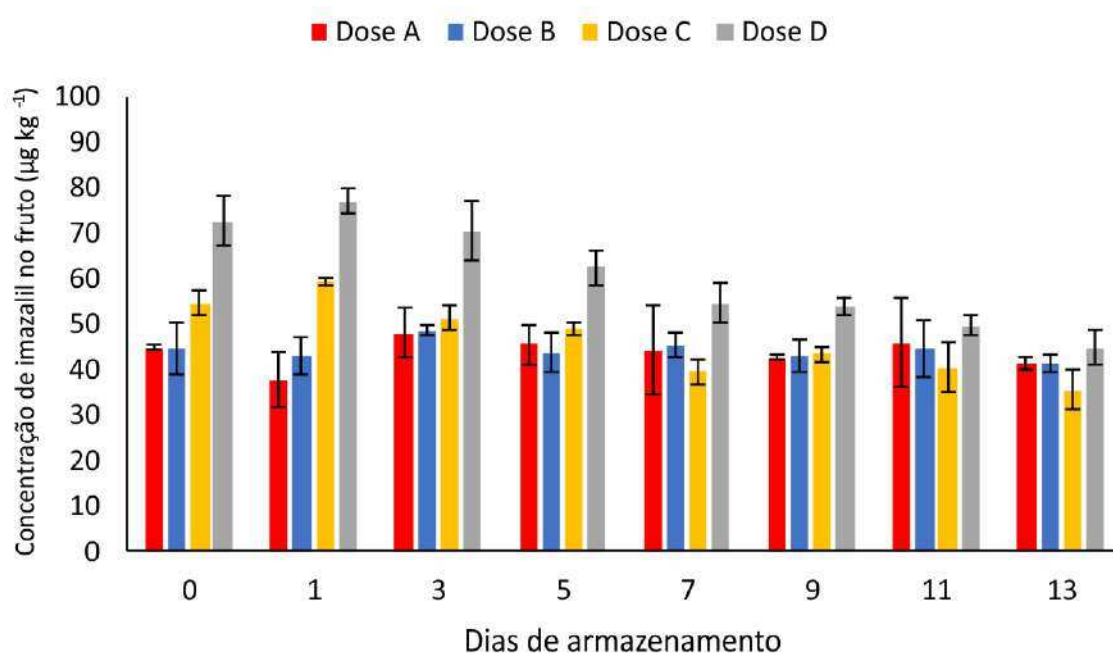


Figura 31: Concentração de imazalil em goiabas 'Pedro Sato' tratadas com diferentes doses desse princípio ativo ($D_A = 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_B = 2,6 \text{ mmol L}^{-1}$; $D_C = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e $D_D = 5,1 \text{ mmol L}^{-1}$), em função dos dias de armazenamento (a $22,2 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e $92,2 \pm 7,9\% \text{ UR}$).

Nas equações, Y corresponde à concentração do princípio ativo no fruto (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) e X aos dias de armazenamento. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das amostras ($n = 3$).

Observa-se pela figura 31 que, com exceção da Dose D, todas as doses apresentaram quantidades de resíduos semelhantes, com pequenas variações.

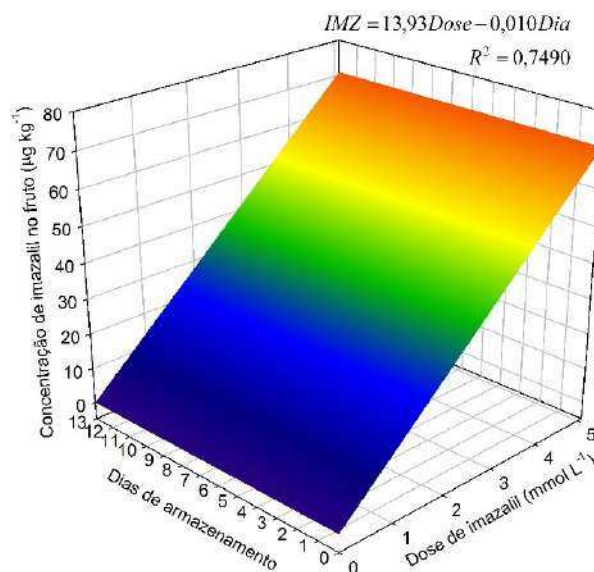


Figura 32: Concentração de imazalil (IMZ) em goiabas 'Pedro Sato' em função das doses aplicadas e dos dias de armazenamento (a $22,2 \pm 0,3$ °C e $92,2 \pm 7,9\%$ UR).

A figura 32 apresenta a relação entre o resíduo de imazalil com os dias de armazenamento e as doses aplicadas. Observa-se que a interrelação entre as variáveis ocorre de maneira linear, com maior dependência das doses e menor dependência dos dias de armazenamento. O modelo da superfície de resposta prevê que, mesmo após passados vários dias de armazenamento, ainda haverá quantidade grande de imazalil no fruto, pois a redução proporcionada pelo fator *Dia* é muito pequena ($0,0010x$) quando comparada com o fator *Dose* ($13,93x$). Isso significa que a dose a ser aplicada nos frutos precisa oferecer segurança alimentar já no dia 0, pois a redução do princípio ativo é pequena ao longo do tempo de armazenamento, quando considerado o fruto como um todo.

O resíduo total de imazalil encontrado nos frutos, nas doses aplicadas, está muito próximo de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ no 13º dia, limite máximo tolerado desse fungicida em goiaba, preconizado pela União Europeia e pelo Reino Unido (EFSA^b, 2016; HSE, 2016).

Apesar das doses A, B e C apresentarem resíduos numericamente abaixo do valor de referência, existe um risco em afirmar, sem uma margem de erro adequada, que as doses A, B e C do fungicida imazalil são adequadas para utilização em pós-colheita de goiabas pois, em condições não controladas (como muitas vezes é o *packing house* do pequeno produtor), a possibilidade de erro decorrente da dosagem

na calda fungicida não pode ser negligenciada. Novos estudos podem ser realizados, utilizando doses menores, a fim de verificar se a eficiência do imazalil não é prejudicada em concentrações menores que $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ (dose A).

5. Conclusões

A aplicação de imazalil, nas doses estudadas, não afetou as características de qualidade dos frutos, embora tenham sido eficazes em retardar a incidência e reduzir a severidade dos danos causados por fungos durante o armazenamento.

Independente da dose aplicada nos frutos, o imazalil migra do epicarpo para o mesocarpo, não sendo detectado na placenta. Entretanto a maior concentração deste fungicida permanece no epicarpo.

Com relação à persistência do princípio ativo no fruto, as doses A, B e C tiveram resíduos abaixo do limite de referência tolerado, embora com valores muito próximos deste. Estima-se que a dose adequada para uso pós-colheita em goiaba deve ser menor do que a menor dose estudada (Dose A), para garantir uma concentração final de resíduos nos frutos adequada.

CAPÍTULO 5

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE GOIABAS ‘PEDRO SATO’ NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE IMAZALIL E PROCLORAZ POR CROMATOGRÁFIA GASOSA

1. Introdução

Durante o amadurecimento da goiaba, uma série de mudanças fisiológicas acontecem no fruto como mudança de coloração do epicarpo, do mesocarpo e da placenta, síntese e degradação de pigmentos, enzimas, substâncias pécticas, polissacarídeos de estrutura da parede celular, etc. (SIMÕES, 2012; ABU-GOUKH *et al*, 2003).

O efeito de matriz tem sido observado em matrizes complexas, como matrizes alimentares, onde o sinal analítico é influenciado pela natureza complexa da amostra e pelas propriedades dos co-extrativos como tamanho da molécula, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc. (GUEDES *et al*, 2016). Dessa forma, os componentes da matriz influenciam diretamente na quantificação dos agrotóxicos.

Entretanto, devido às mudanças naturais que ocorrem no amadurecimento da goiaba, a composição do fruto ao longo do armazenamento se altera, isto é, co-extrativos são degradados e novos co-extrativos são produzidos nos dias sucedem à colheita. Dessa forma, o estudo do efeito de matriz associado à goiaba no dia da colheita pode sofrer alterações ao longo dos dias, culminando em uma avaliação equivocada, se utilizada para frutos mais longevos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de armazenamento de goiabas ‘Pedro Sato’ na determinação de resíduos de imazalil e procloraz por cromatografia gasosa;

2. Objetivos

- Avaliar a influência do tempo de armazenamento de goiabas ‘Pedro Sato’ na determinação de resíduos de imazalil e procloraz por cromatografia gasosa;
- Avaliar a influência do efeito de matriz na determinação de imazalil e procloraz em goiabas ‘Pedro Sato’ submetidas a diferentes tempos de armazenamento;

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes e equipamentos

Foram utilizadas as soluções de trabalho dos padrões imazalil e procloraz (10 mg L⁻¹) previamente preparadas (Capítulo 2). Foram também utilizados os mesmos equipamentos já descritos.

3.2. Material vegetal

Os frutos utilizados neste estudo foram oriundos do mesmo pomar comercial (descrito no Capítulo 2). Os frutos foram colhidos no estágio 3 (coloração da casca verde-amarela, ângulo hue entre 112 e 108) conforme escala de cor definida por Azzolini *et al* (2004), para colheita de goiabas ‘Pedro Sato’.

3.3. Montagem do experimento

Para avaliar a influência do tempo de armazenamento de goiabas na determinação de resíduos dos princípios ativos, amostras deste fruto foram analisadas periodicamente (0, 5, 8, 10 e 13 dias de armazenamento). Neste experimento, frutos isentos dos fungicidas foram dispostos em bandejas de poliestireno expandido (três unidades por bandeja) numeradas para o dia de análise e armazenados em câmara refrigerada a $22,2 \pm 0,3$ °C e $92,2 \pm 7,9\%$ de umidade relativa do ar (UR). No dia programado, as respectivas bandejas foram retiradas da câmara refrigerada e os frutos foram processados, homogeneizados e submetidos ao procedimento de extração validado.

3.4. Avaliação do efeito de matriz

Aos extratos preparados a partir das frações de goiaba, foram adicionados volumes adequados de solução padrão de imazalil e procloraz de maneira que as concentrações nos *vials* fossem de 20, 50, 100, 300, 500, 800 e 1100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada fungicida. Foram também preparadas curvas dos princípios ativos em acetonitrila, nas mesmas concentrações. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Com as amostras preparadas, procedeu-se a análise cromatográfica dos extratos utilizando as condições estabelecidas.

A avaliação do efeito de matriz causada pelos extratos das frações da goiaba foi realizada comparando-se as inclinações das curvas analíticas obtidas pelas curvas no solvente e nos extratos das matrizes. Foi efetuar os cálculos do efeito de matriz, foi utilizada a Equação 3, descrita no Capítulo 2, item 3.7.6.

3.5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado nas análises estatísticas foi o inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de regressão. Os dados foram analisados pelo SAEG, Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.1 (SAEG, 2007).

4. Resultados e discussão

A figura 33 apresenta os resultados obtidos para avaliação do efeito do tempo de armazenamento e, conseqüentemente do estágio de maturação do fruto na resposta cromatográfica de resíduos de imazalil e procloraz no epicarpo, mesocarpo e placenta de goiabas ‘Pedro Sato’.

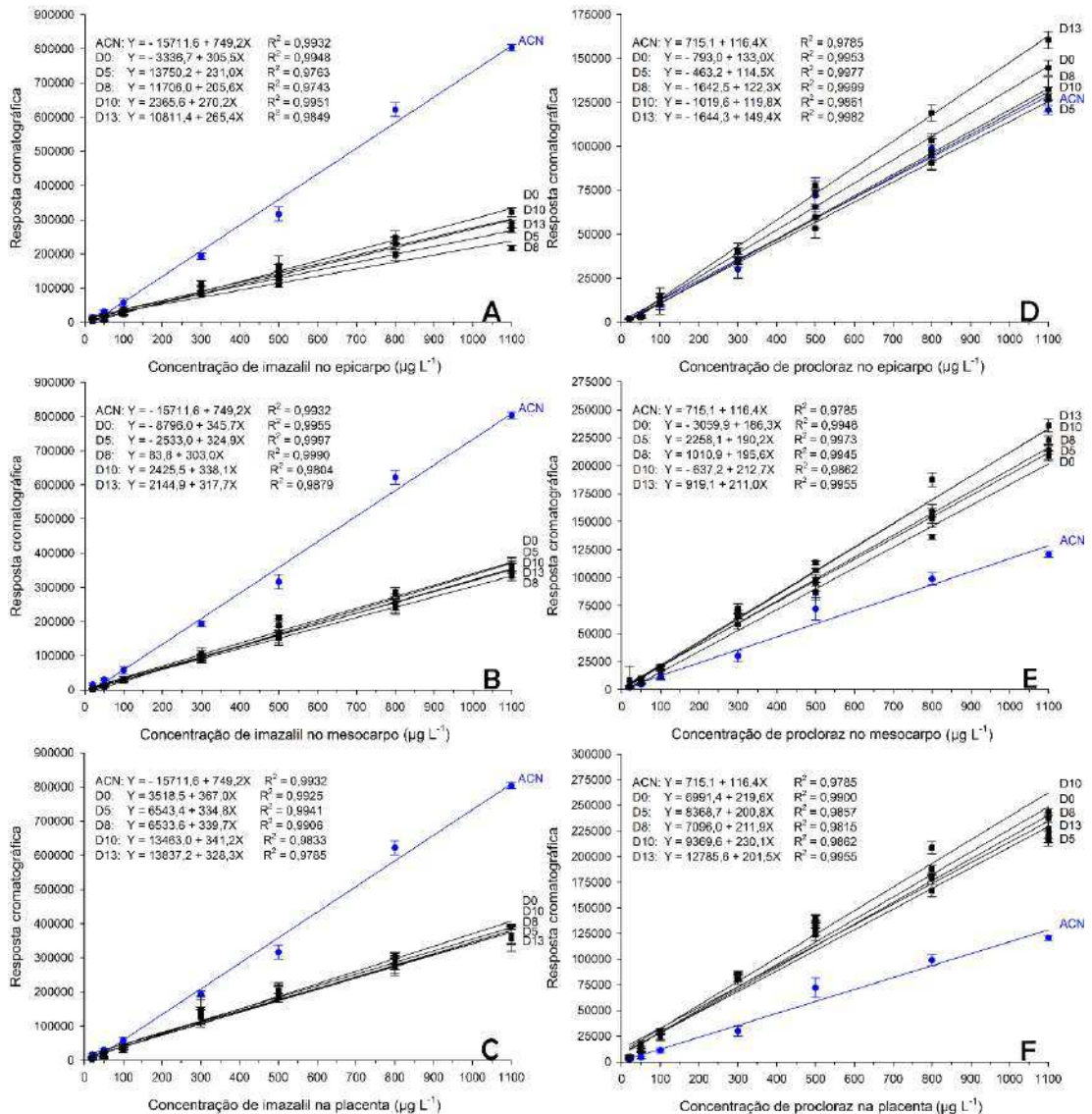


Figura 33: Curvas analíticas do princípio ativo imazalil em acetonitrila (ACN) e nos extratos do epicarpo (A), mesocarpo (B) e placenta (C) em diferentes dias de armazenamento (D0, D5, D8, D10 e D13). Curvas analíticas do princípio ativo procloraz em acetonitrila (ACN) e nos extratos do epicarpo (D), mesocarpo (E) e placenta (F) em diferentes dias de armazenamento (D0, D5, D8, D10 e D13 dias).

Nas equações, Y corresponde à resposta cromatográfica e X, à concentração do princípio ativo na fração. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das amostras (n = 3).

Os resultados apresentados na figura 33 apontam para as diferenças entre os coeficientes angulares das curvas analíticas dos fungicidas nos extratos das frações

de goiaba e em acetonitrila (ACN). Todas as curvas – com exceção das curvas de procloraz no epicarpo – apresentam forte efeito de matriz.

Entretanto, as diferenças entre as curvas analíticas preparadas nos extratos em diferentes dias de armazenamento são pequenas, com coeficientes angulares com pequenas variações. Isso indica que, apesar de haver variações na composição das frações da goiaba, as diferenças no efeito de matriz destas são discretas. A figura 34 apresenta os efeitos de matriz para imazalil e procloraz no epicarpo, mesocarpo e placenta. As barras de erros indicam o desvio padrão do efeito de matriz.

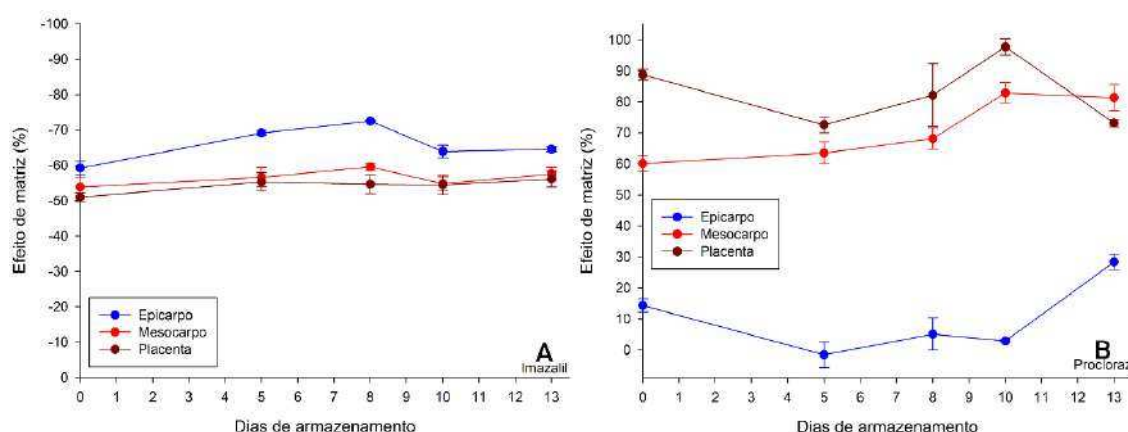


Figura 34: Efeito de matriz do epicarpo, mesocarpo e placenta de goiaba para os princípios ativos imazalil (A) e procloraz (B) ao longo dos dias de armazenamento.

As barras de erro indicam o desvio padrão do efeito de matriz ($n = 3$).

Os efeitos de matriz (EM) observados para os extratos das frações de goiaba ao longo do armazenamento (Tabela 11) foram negativos para o imazalil e positivos para o procloraz.

Tabela 11: Valores médios de efeito de matriz (%) do epicarpo, mesocarpo e placenta de goiaba com relação aos princípios ativos imazalil e procloraz.

		0	5	8	10	13
Imazalil	Epicarpo	-59,2	-69,2	-72,6	-63,9	-64,6
	Mesocarpo	-53,9	-56,6	-59,6	-54,9	-57,6
	Placenta	-51,0	-55,3	-54,7	-54,5	-56,2
Procloraz	Epicarpo	14,3	0,8	8,1	2,9	28,4
	Mesocarpo	60,1	63,5	68,1	82,8	81,4
	Placenta	88,7	72,6	82,2	97,7	73,2

A composição dos co-extrativos é alterada ao longo do tempo de armazenamento, o que afeta o resultado cromatográfico e, conseqüentemente, o efeito de matriz associado à amostra.

5. Conclusões

A variação do efeito de matriz ao longo do armazenamento mostrou que a composição dos co-extrativos é alterada ao longo do tempo de armazenamento, o que afeta o resultado cromatográfico e, conseqüentemente, o efeito de matriz associado à amostra.

CONCLUSÕES GERAIS

O método ESL-PBT adaptado e validado para análise de imazalil e procloraz em goiaba apresentou boa linearidade, seletividade e com limites de detecção e quantificação adequados para a análise dos princípios ativos em amostras das frações de goiaba. O efeito de matriz foi considerado alto para todas as frações da goiaba.

O estudo confirmou que grande parte dos princípios ativos permanece no epicarpo, parte é dissipada para o ambiente e parte é dissipada por translocação para o interior do fruto.

A aplicação de imazalil, nas doses estudadas, não afetou as características de qualidade dos frutos, embora tenham sido eficazes em retardar a incidência e reduzir a severidade dos danos causados por fungos durante o armazenamento. Além disso, verificou-se que independente da dose aplicada nos frutos, o imazalil migra do epicarpo para o mesocarpo, não sendo detectado na placenta. Entretanto a maior concentração deste fungicida permanece no epicarpo.

Com relação à persistência do princípio ativo no fruto, as doses apresentaram resíduos abaixo do limite de referência tolerado, embora com valores muito próximos deste. Estima-se que a dose adequada para uso pós-colheita em goiaba deve ser menor do que a menor dose estudada, para garantir uma concentração final de resíduos nos frutos adequada.

A variação do efeito de matriz ao longo do armazenamento mostrou que a composição dos co-extrativos é alterada ao longo do tempo de armazenamento, o que afeta o resultado cromatográfico e, conseqüentemente, o efeito de matriz associado à amostra.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. R. D.; SANTOS, C. D. D.; ABREU, C. M. P. D.; PINHEIRO, A. C. M.; CORRÊA, A. D. Ripening pattern of guava cv. Pedro Sato. **Food Science and Technology**, Campinas. V. 32, p. 344-350, 2012.

ABU-GOUKH, A.-B. A.; BASHIR, H. A. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. **Food Chemistry**, V. 83, n. 2, p. 213-218, 2003.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. 480p. 2016.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. Disponível em agrofit.agricultura.gov.br. Acesso em 24-04-2016. 2016.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. Disponível em agrofit.agricultura.gov.br. Acesso em 12-01-2017. 2017.

AMORIM, L.; MARTINS, M. C. Controle Químico. In: OLIVEIRA, S. M. A. D.; TERAQ, D. **Patologia pós-colheita - Frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p.229-243. 2006.

ANDRASKIKOVA, M.; HROUZKOVA, S.; CUNHA, S. C. Combination of QuEChERS and DLLME for GC-MS determination of pesticide residues in orange samples. **Food Additives and Contaminants Part A - Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, V. 30, n. 2, p. 286-297, 2013.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. BRASIL. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução, n. 899, 2003.

ANVISA. **Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível

em

http://websphere.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d67107004634368583a5bfec1b28f937/Relatório+PARA+2012+2ª+Etapa+-+17_10_14-Final.pdf?MOD=AJPERES.

Acesso em 05-06-2016. Brasília, DF. 2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA. Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015.** Nov. 2016. <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>.

Acesso em: 09-01-2017. 2016.

AZZOLINI, M.; JACOMINO, A. P.; BRON, I. U. Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V. 39, n. 2. 139-145. Brasília. 2004

BARRET, D. M.; GONZALEZ, C. Activity of softening enzymes during cherry maturation. **Journal of Food Science**, V.59, n.3, p.574-577, 1994.

BASSETTO, E.; SESSO, T. M.; JACOMINO, A. P.; KLUGE, R. A. Efeito de 1-MCP e procloraz na conservação de goiabas 'Pedro Sato'. **Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha**, V. 4, n. 2, p. 122-127, 2002.

BELENGUER, V.; CAPEL, F. M.; MASIÁ, A.; PICÓ, Y. Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain). **Journal of Hazardous Materials**, V. 265, n. 0, p. 271-279, 2014.

BELTRAME, A. E. G. **Fisiologia do amadurecimento de maracujá-amarelo e goiaba 'Pedro Sato' ligados ou não às plantas.** Tese de doutorado. ESALQ. Piracicaba, 2012.

BESIL, N.; PÉREZ-PARADA, A.; CESIO, V.; VARELA, P.; RIVAS, F.; HEINZEN, H. Degradation of imazalil, orthophenylphenol and pyrimethanil in Clementine mandarins under conventional postharvest industrial conditions at 4 °C. **Food Chemistry**, V. 194, p. 1132-1137, 2016.

BEULKE, S.; BROWN, C. D. Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling. **Biology and Fertility of Soils**, V. 33, n. 6, p.

558-564, 2001.

BOTELHO, L. N. S.; ROCHA, D. A.; BRAGA, M. A.; SILVA, A.; DE ABREU, C. M. P. Quality of guava cv. 'Pedro Sato' treated with cassava starch and cinnamon essential oil. **Scientia Horticulturae**, V. 209, p. 214-220, 2016.

BRACKMANN, A.; ANESE, R. D. O.; BOTH, V.; THEWES, F. R.; FRONZA, D. Atmosfera controlada para o armazenamento de goiaba cultivar 'Paluma'. **Revista Ceres**, V. 59, p. 151-156, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução RDC N. 60, de 03 de fevereiro de 2016. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 04 de fevereiro de 2016, Seção 1, pg 48. Disponível em <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=48&data=04/02/2016>. Acesso em 09/01/2017. 2016.

BUENO, S. M.; LOPES, M. R. V.; GRACIANO, R. A. S.; FERNANDES, E. C. B.; GARCIA-CRUZ, C. H. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, V.62, n.2, p.121-126, 2002.

CHARLTON, A. J. A.; JONES, A. Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, V. 1141, n. 1, p. 117-122, 2007.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2 ed. 785p. 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas, SP: Unicamp, 2006. 453p.

CORREIA, M. G. **Efeito dos extratos de cultivares de goiaba em linhagens celulares humanas de câncer de mama**. Dissertação de mestrado. UFRJ. Rio de Janeiro, 130p. 2016.

COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; DE SOUSA, F. A.; ZAMBOLIM, L. Determination of pesticides in lettuce using solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, V. 181, p. 64-71, 2015.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, V. 1218, n. 43, p. 7748-7757, 2011.

DARDENGO, R. P.; GOULART, S. M.; NEVES, A. A.; REIS, C.; ZAMBOLIM, L.; QUEIROZ, M. E. L. R. Pesticide residues analysis in potatoes by gas chromatography. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, V. 3, p. 136-142, 2011.

DEAVALL, D. G.; MARTIN, E. A.; HORNER, J. M.; ROBERTS, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of Toxicology**, V. 2012, n. 645460, 13p. 2012.

DUROVIC, R. D.; DORDEVIC, T. M.; SANTRIC, L. R. Liquid-solid sample preparation followed by headspace solid-phase microextraction determination of multiclass pesticides in soil. **Journal of AOAC International**, V. 95, n. 5, p. 1331-7, 2012.

EFSA^a. European Food Safety Authority. The 2014 European Union report on pesticide residues in food. **EFSA Journal**, V.14, n.10: 4611, 139 pp. 2016.

EFSA^b. Health and Food Safety. **Pesticides EU-MLRs**. European Commission – European Union. Disponível em http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database-redirect/index_en.htm. Acesso em 11-04-16. 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. **FAO Specifications and evaluations for agricultural pesticides - Prochloraz**. 24p. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Prochloraz_2009.pdf. Acesso em: 13-01-2017. 2009.

FILHO, A. M.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, V. 81, n. 1–2, p. 346-354, 2010.

FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. M. D.; ARRUDA, M. C. D.; BERTANI, R. M. D. A.; GARCIA, M. J. D. M.; AMORIM, L. Danos em pós-colheita de goiabas na Região do Centro-Oeste Paulista. **Bragantia**, V. 70, p. 570-576, 2011.

FISCHER, I. H.; SILVA, B. L. O. D.; SOARES, A. R.; ARRUDA, M. C. L. D.; PARISI, M. C. M.; AMORIM, L. Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba. **Semina: Ciências Agrárias**, V. 33, n. 1, p. 2753-2766, 2012.

FLORES, G.; DASTMALCHI, K.; WU, S. B.; WHALEN, K.; DABO, A. J.; REYNERTSON, K. A.; FORONJY, R. F.; D'ARMIENTO, J. M.; KENNELLY, E. J. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chemistry**, V. 141, n. 2, p. 889-895, 2013.

FONTES, V. L.; MOURA, M. A.; VIEIRA, G.; FINGER, F. L. Efeito de filmes plásticos e temperatura de armazenamento na manutenção da cor do pericarpo de lichia (*Litchi chinensis*). **Revista Brasileira de Armazenamento**, V.24, n.1, p. 5659, 1999.

GLOBALGAP. **GlobalGAP Certification**. Disponível em: globalgap.org/uk_en/index.html. Acesso em: 10-04-2016. 2016.

GUEDES, J. A. C.; SILVA, R. D. O.; LIMA, C. G.; MILHOME, M. A. L.; DO NASCIMENTO, R. F. Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, V. 199, p. 380-386, 2016.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, V. 1000, p. 181-197, 2003.

HELENO, F. F.; QUEIROZ, M. E. L. R. D.; NEVES, A. A.; OLIVEIRA, A. F. D. Otimização, validação e aplicação de método para determinação da concentração residual de difenoconazol em morangos após múltiplas aplicações. **Química Nova**, V. 37, n. 1, p. 153-157, 2014.

HSE. Health and Safety Executive. **Maximum Residue Level (MRL) Database**. United Kingdom. Disponível em <https://secure.pesticides.gov.uk/MRLs/main.asp>. Acesso em 11-04-16. 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal: Culturas temporárias e permanentes – 2015**. Rio de Janeiro, RJ. V. 42. 59p. 2016.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, 2010.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. **Pesticides Properties Database**. Disponível em <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>. Acesso em 14-04-16. 2016.

JACOMINO, A. P.; MARTÍNEZ OJEDA, R.; KLUGE, R. A.; SCARPARE FILHO, J. A. Conservação de goiabas tratadas com emulsões de cera de carnaúba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, V. 25, p. 401-405, 2003.

JAIN, N.; DHAWAN, K.; MALHOTRA, S.; SINGH, R. Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): compositional and enzymatic changes. **Plant Foods for Human Nutrition**. V. 58, n. 4, p. 309-15, 2003.

JIN, Y.; ZHU, Z.; WANG, Y.; YANG, E.; FENG, X.; FU, Z. The fungicide imazalil induces developmental abnormalities and alters locomotor activity during early developmental stages in zebrafish. **Chemosphere**, V. 153, p. 455-461, 2016.

JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, H. Controle das doenças da goiabeira. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas frutíferas**. V. 2. Suprema Gráfica e Editora. Viçosa. 2002.

KEIKOTLHAILE, B. M.; SPANOGHE, P. Pesticide Residues in Fruits and Vegetables, Pesticides. In: STOYTCHEVA, M. **Pesticides - Formulations, Effects, Fate**. InTech, 2011

KLOTZ, W. L.; SCHURE, M. R.; FOLEY, J.P. Determination of octanol-water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, V. 930, n. 1-2, p. 145-154. 2001.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 50, n. 12, p. 3359-3365. 2002.

LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2548-2560, 2010.

LI, H.; DU, H.; FANG, L.; DONG, Z.; GUAN, S.; FAN, W.; CHEN, Z. Residues and dissipation kinetics of carbendazim and diethofencarb in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and intake risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 77, p. 200-205, 2016.

LUNDQVIST, J.; HELLMAN, B.; OSKARSSON, A. Fungicide prochloraz induces oxidative stress and DNA damage in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, V. 91, p. 36-41. 2016.

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

MARTINS, M. C.; AMORIM, L.; LOURENÇO, S. A.; GUTIERREZ, A. S. S.; WATANABE, H. S. Incidência de danos pós-colheita em goiabas no mercado atacadista de São Paulo e sua relação com a prática de ensacamento dos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal. V. 29, n. 2, p. 245-248. 2007.

MCGUIRE, R. G. Reporting of Objective Color Measurements. **HortScience**, V. 27, n. 12, p. 1254-1255, 1992.

MORAIS, E. H. D. C. *et al.* Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. **Food Control**, v. 42, n. 0, p. 9-17. 2014.

MÔRO, F. V.; NATALE, W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; PRADO, R. M. Morfologia de frutos de goiabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, V. 25, n. 1, 32-34. 2003.

NETO, L. G. **Produção de goiaba**. Instituto de Desenvolvimento da Fruticultura e Agroindústria – FRUTAL. Fortaleza. 64p. 2007.

NOGUEIRA JÚNIOR, A. F.; FISCHER, I. H.; BRAGANÇA, C. A. D.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; AMORIM, L. Identification of Botryosphaeriaceae species that cause stilar-end rot of guavas and characterisation of the disease monocycle. **European Journal of Plant Pathology**, V. 144, n. 2, p. 271-287, 2016.

OECD. Environment Directorate of Organization for Economic Co-operation and Development - **Descriptions of selected key generic terms used in chemical hazard/risk assessment**, OECD Series on Testing and Assessment, n. 44, OECD Publishing, Paris. 2003.

OJEDA, R. M. **Utilização de ceras, fungicidas e sanitizantes na conservação de goiabas 'Pedro Sato' sob condição ambiente**. Dissertação de mestrado. Departamento de Produção Vegetal da ESALQ-USP, Piracicaba – SP. 57p. 2001.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190- 1198, 2008.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, V. 32, n. 4, p. 987-995. 2009.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, V. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

PINHO^a G. P.; NEVES A. A.; QUEIROZ M. E. L. R.; SILVERIO, F. O.; MARTHE, D.B.; Influence of Tomato Components in the Quantification of Four Pesticides by Gas Chromatography. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, V. 22, n. 2, pp. 294-300, 2012.

PINHO^b, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Evaluation of pesticide adsorption in gas chromatography injector and column. **Química Nova**,

V.35, n. 4, p. 738-742. 2012.

POOLE, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, V.1158, n. 1-2, p. 241-250. 2007.

PPDB^a. Pesticide Properties DataBase. **Prochloraz**. University of Hertfordshire. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/536.htm#none>. Acesso em: 13-01-2017. 2017.

PPDB^b. Pesticide Properties DataBase. **Imazalil**. University of Hertfordshire. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/536.htm#none>. Acesso em: 13-01-2017. 2017.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduo de agrotóxicos em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*. Vol. 32, n.6, 1620-1634, 2009.

REIS, E. M. BRESOLIN, A. C. R. Fungicidas: aspectos gerais. **Revista Plantio Direto**, V. 97, n. 1. Aldeia Norte Editora, Passo Fundo, RS. 2007.

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

SAEG. Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas. Versão 9.1. Viçosa, MG. Fundação Arthur Bernardes, 2007.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatography analysis of pesticide residues in food?. **Journal of Chromatography A**, V.868, n. 1, p. 51-61. 2000.

SEAPA-MG. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Subsecretaria do Agronegócio. **Goiaba**. Belo Horizonte, MG. 2016. Disponível em

agricultura.mg.gov.br/images/documentos/perfil_goiaba_out_2016[1].pdf. Acesso em: 16/01/2017. 2016.

SECEX. Secretaria de Comércio Exterior. Ministério da Indústria, Comercio Exterior e Serviços. Sistema Aliceweb. Acesso em 08/01/2017. Disponível em <http://alicesweb.mdic.gov.br>. 2017.

SHARAF, A.; EL-SAADANY, S. S. Biochemical studies on guava fruits during different maturity stages. **Annals of Agriculture Science**, V.24, n.2, p.975-984, 1996.

SILVA, D. F. P.; SALOMÃO, L. C. C.; ZAMBOLIM, L.; ROCHA, A. Use of biofilm in the postharvest conservation of 'Pedro Sato' guava. **Revista Ceres**, V. 59, p. 305-312, 2012.

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

SINGH, S. P.; PAL, R. K. Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, V. 47, n. 3, p. 296-306, 2008.

SOUSA^a, J. S.; CASTRO, R. C.; ANDRADE, G. A.; LIMA, C. G.; LIMA, L. K.; MILHOME, M. A. L.; NASCIMENTO, R. F. Evaluation of an analytical methodology using QuEChERS and GC-SQ/MS for the investigation of the level of pesticide residues in Brazilian melons. **Food Chemistry**, V. 141, n. 3, p. 2675-2681, 2013.

SOUSA^b, F. A.; COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; TEÓFILO, R. F.; PINHO, G. P. NEVES, A. A. Influence of pH and matrix components in the chromatographic response of pesticides. **Chomatographia**. V. 76, p. 67-73. 2013.

TEIXEIRA, G. H. A.; CUNHA JÚNIOR, L. C.; FERRAUDO, A. S.; DURIGAN, J. F. Quality of guava (*Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato) fruit stored in low-O₂ controlled atmospheres is negatively affected by increasing levels of CO₂. **Postharvest Biology and Technology**, V. 111, p. 62-68, 2016.

THEICHEL, M.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. **Anuário Brasileiro da Fruticultura - 2016**. Santa Cruz do Sul. Ed. Gazeta Santa Cruz. 88p. 2016.

THOMPSON, M.; STEPHEN, L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, V. 74, n. 835, 2002.

VAZ, F. L.; MACIEL NETTO, A.; ANTONINO, A. C. D.; AFONSO, A. C. M.; MARTINS, J. M. F.; GOUVEIA, E. R. Modelagem da cinética de biodegradação de paclobutrazol em dois solos do semiárido do nordeste brasileiro. **Química Nova**, V. 35, p. 77-81, 2012.

VIEIRA, S. M. J.; RAGA, A.; BENEDETTI, B. C.; OLIVEIRA, R. A. D.; MARCO, P. G. D.; SCARPONI, A. P. D. T. Effect of ultraviolet-C radiation on “Kumagai” guavas infested by *Ceratitis capitata* (Diptera—Tephritidae) and on physical parameters of postharvest. **Scientia Horticulturae**, V. 165, p. 295-302, 2014.

VINGGAARD, A. M.; HASS, U.; DALGAARD, M.; ANDERSEN, H. R.; BONEFELD-JØRGENSEN, E.; CHRISTIANSEN, S.; LAIER, P.; POULSEN, M. E. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. **International Journal of Andrology**, V.29. pp. 186–192. 2016.

WITHNER, C.L.; NELSON, P.K.; WEJKSNORA, P.J. The anatomy of orchids. In: **The Orchids: scientific studies**. John Wiley, New York, 267-334,1974.

WOODS, J. L. Moisture loss from fruits and vegetables. **Postharvest News and Information**, V.1, n.3, p.195-199, 1990.

YOU, X. W.; JIANG, W. Q.; LIU, F. M.; LIU, C. Y. QuEChERS in Combination with Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Droplet Method for the Simultaneous Analysis of Six Fungicides in Grape. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 6, p. 1515-1521, 2013.

ZHAO, Y.; KANG, S.; ZHOU, L.; LUO, J. H.; PAN, C. P. Decay and residue dynamics of 25% prochloraz ec in mandarin orange by simulating postharvest treatment at different storage temperatures. **Journal of Food Processing and Preservation**, V. 37, n. 5, p. 496-502, 2013.