

ROMENIQUE DA SILVA DE FREITAS

**OZÔNIO NA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS
EM GRÃOS DE MILHO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2013

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

T

F866o
2013

Freitas, Romenique da Silva de, 1982-

Ozônio na degradação de resíduos de inseticidas em grãos de milho / Romenique da Silva de Freitas. – Viçosa, MG, 2013. ix, 79f. : il. ; 29cm.

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Taroni
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Grãos - Armazenamento. 2. Política alimentar.
3. Alimentos - Manuseio- Medidas de segurança. 4. Bifentrina.
5. Pirimifós-metílico. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 633.10468

ROMENIQUE DA SILVA DE FREITAS

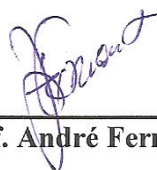
**OZÔNIO NA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE INSETICIDAS
EM GRÃOS DE MILHO**

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

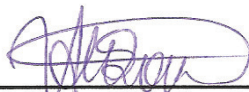
APROVADA: 26 de março de 2013.



**Prof.ª Maria Eliana Lopes Ribeiro de
Queiroz**
(Coorientadora)



Prof. André Fernando de Oliveira



Prof. Adalberto Hipólito de Sousa



Prof. Ernandes Rodrigues de Alencar



Prof.ª Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)

*À minha avó Odete Maria,
à minha mãe Maria Francisca,
aos meus irmãos e à minha sobrinha,
meus grandes incentivadores.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria, por me fazer forte e perseverante.

À minha mãe Maria Francisca, irmãos Rubeniguem, Romildo, Flávia, Rubenildo, Rubenilson, Fabiene, Robson e Rafaela, e sobrinha Bárbara por todo o amor, respeito, incentivo e confiança.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Lêda Rita D'Antonino Faroni pela orientação, confiança, ensinamentos e oportunidades concedidas.

À Professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e à Fernanda Fernandes Heleno pelas valiosas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Adalberto Hipólito de Sousa pelo apoio, incentivo, dedicação e, principalmente, pelos ensinamentos.

Aos amigos Gutierrez Nelson Silva, Lucas Martins Lopes, Marcela Silva Carvalho, Mariane Borges Rodrigues de Ávila, Raquel Rodrigues dos Santos e Vanessa Vaz Moura pela ajuda na execução dos experimentos e grandes momentos compartilhados.

As amigas Juliana Lobo Paes, Marta Cristina Silva Carvalho, Patrícia Helena Ribeiro, Rita Cristina Pereira de Freitas, Silvana Aparecida Silva Souza e Svetlana Fialho Soria Galvarro pelos grandes momentos compartilhados.

Aos amigos André Rodrigues da Costa, Alisson Santos Lopes, Daniel Francis Ribeiro, Ernandes Rodrigues de Alencar, Juliane Laureano, Luane Isadora Souza, Luis

Osvaldo Viteri Jumbo, Luz Paola Velasquez, Marcus Vinícius Assis Silva e Paula Garcia Viol pelo apoio, incentivo e momentos de descontração.

Aos estagiários, pós-graduandos, técnico e professores do Laboratório de Química Analítica (LAQUA) da UFV pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários do Setor de Armazenamento do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV pelo apoio, incentivo e disponibilidade em ajudar.

A todos que de um modo geral, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

Romenique da Silva de Freitas, filho de Francisco de Assis de Freitas e Maria Francisca da Silva, nasceu em Itaiçaba, Ceará, em 14 de setembro de 1982.

Em fevereiro de 2002 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal Rural do Semi-Árido e graduou-se Engenheiro Agrônomo em janeiro de 2007. Em fevereiro do mesmo ano ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, sob orientação do Professor Patrício Borges Maracajá, submetendo-se a defesa de dissertação em fevereiro de 2009. Em março de 2009 iniciou o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, na Área de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação da Professora Lêda Rita D'Antonino Faroni, submetendo-se à defesa de tese em abril de 2013.

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Introdução Geral	10
Referências Bibliográficas	16
Capítulo 1.....	21
Resumo	21
Abstract	22
1. Introdução	24
2. Material e Métodos	26
2.1. Reagentes e soluções	26
2.2. Análise cromatográfica	27
2.3. Preparo das amostras de milho	29
2.4. Otimização da técnica ESL-PBT	29
2.5. Validação da técnica ESL-PBT	31
2.6. Aplicação da ESL-PBT para análise da degradação dos inseticidas em grãos de milho expostos ao ozônio	34
2.7. Análises estatísticas	36
3. Resultados	36
3.1. Análise cromatográfica	36
3.2. Otimização da técnica ESL-PBT	38
3.3. Validação da técnica ESL-PBT	41
3.4. Aplicação da ESL-PBT para análise da degradação dos inseticidas em grãos de milho expostos ao ozônio.....	47
4. Conclusões	50

5. Referências Bibliográficas	51
Capítulo 2	57
Resumo	57
Abstract	58
1. Introdução	59
2. Material e Métodos	60
2.1. Aplicação dos inseticidas na massa de grãos de milho	61
2.2. Ozonização dos grãos de milho	62
2.3. Determinação dos resíduos dos inseticidas nos grãos de milho	63
2.4. Cinética de degradação dos inseticidas	64
2.5. Avaliação da qualidade dos grãos de milho	65
2.6. Delineamento experimental e análises estatísticas	66
3. Resultados	66
3.1. Cinética de degradação dos inseticidas	66
3.2. Avaliação da qualidade dos grãos de milho	71
4. Conclusões	73
5. Referências Bibliográficas	74
Considerações Finais	79

RESUMO

FREITAS, Romenique da Silva de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Ozônio na degradação de resíduos de inseticidas em grãos de milho.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-orientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Paulo Roberto Cecon.

Os resíduos de agrotóxicos representam sérios riscos à saúde da população. Em decorrência disto, é necessária a adoção de estratégias para a degradação dos resíduos dos inseticidas presentes nos grãos e subprodutos, antes do consumo. Uma estratégia potencial consiste no uso do ozônio, o qual vem sendo empregado para a remoção de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes. Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do ozônio na degradação de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho. O estudo foi dividido em duas etapas, onde na primeira foi realizada a otimização e validação da técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para determinação de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho; e na segunda etapa estudou-se a cinética de degradação destes inseticidas em função do período de exposição ao ozônio. Aliado a isto, avaliou-se o efeito da ozonização sobre a qualidade dos grãos de milho. Os resultados indicaram que a técnica ESL-PBT atende aos critérios estabelecidos pela ANVISA e INMETRO, podendo ser utilizada para a determinação de bifentrina e pirimifós-metílico em amostras de milho. Observou-se que o ozônio foi eficiente na degradação dos inseticidas, sendo o aumento na eficiência diretamente proporcional ao aumento no período de exposição ao gás. Este processo ajustou-se a um modelo cinético de primeira ordem com tempos de meia vida para bifentrina e pirimifós-metílico iguais a 4,1 e 0,2 h, respectivamente. Verificou-se ainda que o processo de aplicação do ozônio não alterou as características qualitativas avaliadas. Desta forma, torna-se evidente o uso do ozônio como estratégia potencial para a remoção de resíduos de agrotóxicos em grãos e subprodutos armazenados.

ABSTRACT

FREITAS, Romenique da Silva de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2013. **Insecticides degradation in maize grains by ozone**. Adviser: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-advisers: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Paulo Roberto Cecon.

The insecticide residues in foods is a serious health risks to the population. It's necessary to adopt strategies for the degradation of pesticides residues in the grains and by-products before consumption. A potential strategy is the use of ozone, wich has been used for the removal of pesticide residues in different matrices. This study aimed to evaluate the ozone effectiveness in the bifenthrin and pirimiphos-methyl degradation in maize grains. The study was divided into two phases. In the first phase was optimized and validated the technique of solid-liquid extraction with low temperature partitioning (SLE-LTP) for bifenthrin and pirimiphos-methyl in maize grains. In the second phase was studied the kinetics of the degradation of insecticide residues according to the ozone exposure. Associated to this, was evaluated the ozonation effect on the maize quality. The results indicated that the developed ESL-PBT according to the guidelines established by ANVISA and INMETRO and can be used for the bifenthrin and pirimiphos-methyl determination in maize samples. It was observed that ozone was effective in the bifenthrin and pirimiphos-methyl degradation. The increase of insecticide degradation was directly proportional to the increase in the ozone exposure. This process was adjusted to a first order kinetic model with half-lives for bifenthrin and the pirimiphos-methyl equal to 4.1 and 0.2 h, respectively. It was found that the process of ozone application did not alter qualitative characteristics evaluated. Thus, it becomes evident the use of ozone as a potential strategy for the removal of pesticide residues in stored grains and by-products.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de grãos tem expressiva importância na economia global e contribui significativamente para o desenvolvimento socioeconômico mundial. Dentre as culturas graníferas cultivadas, o milho tem se destacado como o segundo cereal mais produzido no mundo. A importância econômica desta “commodity” se caracteriza por seu uso diversificado, o que compreende o emprego na alimentação humana e animal e na indústria de alta tecnologia. Como alimento, o milho, destina-se ao consumo tanto no estado leitoso (milho verde) como na forma de subprodutos do milho seco (farinhas, fubá, quirera, farelo, óleos, xaropes, amido e rações). Outras formas de uso se caracterizam pela extração de compostos empregados na fabricação de cervejas (maltose), papéis (amidos industriais) e tecidos (dextrinas); no beneficiamento de minérios (dextrinas) e fundição de peças metálicas (pré-gelatinizados); e como matéria prima para a produção de etanol (EMBRAPA, 2011).

No Brasil, a cultura do milho tem apresentado expressivo aumento de produtividade ao longo das últimas décadas, destacando o país como o terceiro maior produtor mundial deste cereal. A produção brasileira de milho na safra 2011/2012 foi de cerca de 72,98 milhões de toneladas, o que representa um aumento de 27% em relação ao produzido na safra anterior (57,41 milhões de toneladas) (CONAB, 2012). No entanto, o armazenamento dos grãos no país, ainda, é realizado em condições inadequadas, ocorrendo redução dos valores nutritivo e comercial do milho, ocasionados principalmente pelo ataque de insetos-praga (Anderson et al., 1990; Rees, 1996; Loeck, 2002). Os principais danos provocados por estes insetos são a redução da massa e/ou volume (Resende et al., 2008); a redução na qualidade fisiológica e na capacidade de germinação (Caneppele et al., 2003); e o aumento da temperatura e do teor de água (Faroni & Silva, 2008) dos grãos.

A principal forma de controle de insetos-praga, no setor de armazenamento, consiste no uso de inseticidas protetores com ação residual, os quais vêm sendo empregado desde a década de 1960 em programas de manejo destes organismos, em todo o mundo (Arthur, 1996). Estes inseticidas além de promoverem a morte dos insetos por ocasião da aplicação evitam reinfestações, uma vez que podem persistir nos grãos por longos períodos em concentrações letais para os insetos (Arthur, 1996; Hagstrum & Subramanyam, 2006). Os inseticidas protetores mais utilizados pertencem aos grupos químicos piretróides e organofosforados, os quais são muito tóxicos para os insetos e pouco persistentes no ambiente quando comparados aos organoclorados, inseticidas sintéticos largamente utilizados até 1985 (Oviedo et al., 2003; Santos et al., 2007).

Os piretróides são derivados sintéticos das piretrinas, compostos tóxicos isolados das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Santos et al., 2007). Inseticidas deste grupo possuem estrutura molecular contendo um grupo vinil, um anel com três átomos de carbono e um grupo carboxílico com função éster (Figura 1). Tais características conferem aos piretróides baixa volatilidade, alta lipofilicidade e fotoestabilidade (Manna et al., 2004; Santos et al., 2007). Os organofosforados são derivados do ácido fosfórico e seus análogos. Apresentam em sua estrutura molecular ésteres do ácido fosfórico e álcoois, os quais se combinam com átomos de oxigênio, carbono, enxofre e nitrogênio dando origem a organofosforados com diferentes identidades (Figura 1). O grupo éster fosfórico torna os organofosforados resistentes a ação da água, do solo e do ar, permitindo que atinjam o alvo sem serem alterados quimicamente e se tornem aptos a acumular nos tecidos e provocar danos aos seres vivos (Domingos et al., 2003).

No setor de armazenamento são indicados para o tratamento de grãos os inseticidas piretróides deltametrina, permetrina e bifentrina e os organofosforados fenitrotiom e pirimifós-metílico. No entanto, o uso contínuo e indiscriminado destes inseticidas resultou no desenvolvimento de resistência a estes compostos pelos insetos-

praga de grãos armazenados (Champ & Dyte, 1976; Guedes et al., 1994; 1995; Subramanyam & Hagstrum, 1996). Em decorrência disto, é comum o emprego de doses de inseticida cada vez mais elevadas para controlar as infestações por insetos. Tal fato expõe os consumidores aos riscos oferecidos pelos elevados níveis de resíduos de inseticidas presentes nos grãos e seus subprodutos.

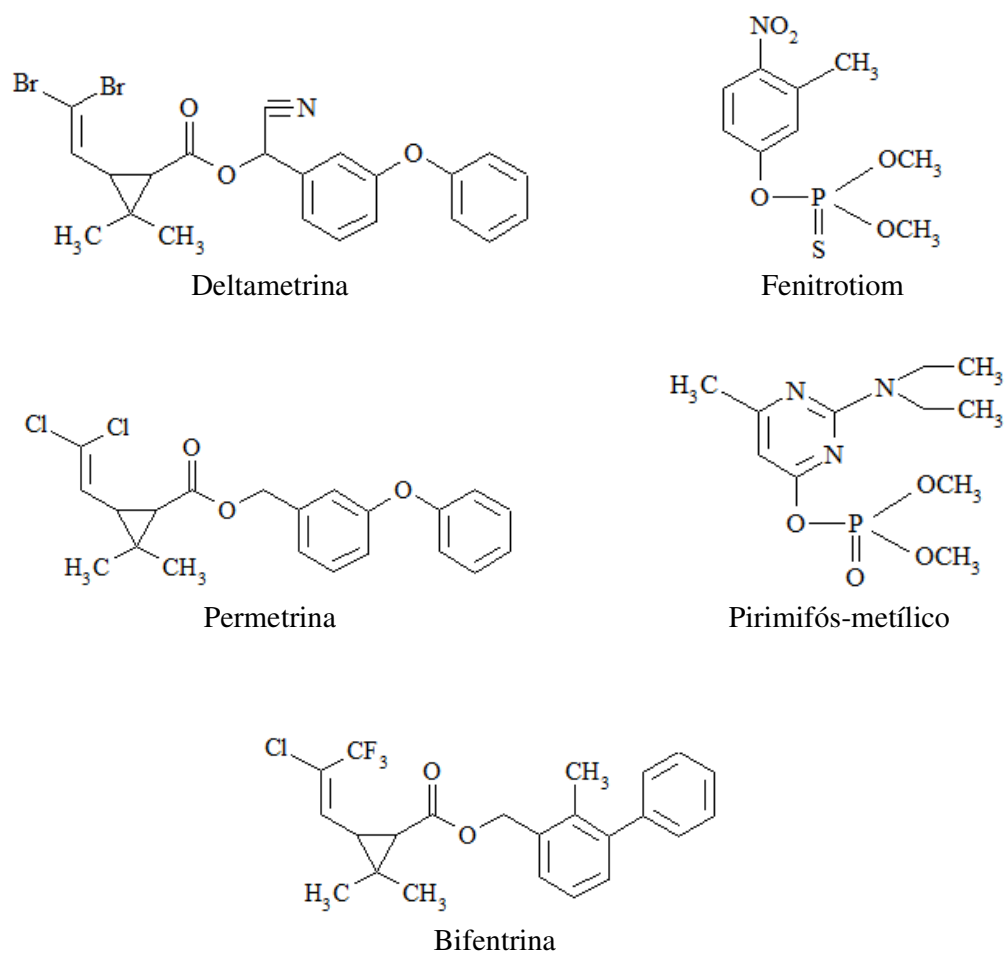


Figura 1. Estrutura química de inseticidas piretróides (deltametrina, permetrina e bifentrina) e organofosforados (fenitrotiom e pirimifós-metílico).

O consumo de alimentos com resíduos de inseticidas, mesmo em quantidades sub-letais, pelo homem e pelos animais, representa risco potencial à saúde destes. Os inseticidas piretróides quando ingeridos podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal e metabolizados no fígado por meio de reações de oxidação e hidrólise de ésteres. A

primeira ação destes inseticidas no sistema nervoso é a indução de atividades repetitivas e duradouras como tremores, salivação, hipersensibilidade e convulsões (Miyamoto et al., 1995). Os inseticidas organofosforados agem no sistema nervoso central, inibindo a ação da enzima colinesterase, com conseqüente acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos e gerando uma série de efeitos no organismo como convulsões, paradas respiratórias, coma e morte (Coutinho et al., 2005).

Além dos riscos oferecidos à saúde de humanos e animais, os resíduos de inseticidas também oferecem risco ao meio ambiente podendo contaminar o solo e atingir os mananciais de água. A presença de resíduos de inseticidas nos alimentos acima dos limites permitidos pela legislação vigente pode, inclusive, representar barreira comercial para estes produtos, tanto no mercado interno como no externo (Oviedo et al., 2003). Em decorrência destes problemas, torna-se evidente a necessidade da adoção de estratégias capazes de degradar os resíduos de inseticidas em grãos armazenados antes do consumo e/ou processamento. Uma estratégia moderna e eficiente que vem sendo sugerida, para este fim, é a utilização do ozônio (O_3).

O ozônio (O_3) é um gás resultante do rearranjo de átomos de oxigênio e pode ser gerado pela incidência de descargas elétricas ou radiação de luz ultravioleta no ar ou no oxigênio puro. É uma molécula instável que decai rapidamente a gás oxigênio, liberando um átomo de oxigênio altamente reativo (Khadre et al., 2001). Por essa característica, o ozônio possui o segundo maior potencial de oxidação dentre os agentes químicos, sendo superado apenas pelo flúor (F_2) (Hill & Rice, 1982). O potencial oxidativo do ozônio (potencial de oxidação: $E^\circ = 2,07 \text{ V}$) é superior ao de outros agentes reconhecidamente oxidantes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 : $E^\circ = 1,77 \text{ V}$) e o cloro (Cl_2 : $E^\circ = 1,36 \text{ V}$) (Kunz et al., 1999; Robinson et al., 2001). Essa

característica possibilita sua utilização na eliminação de substâncias indesejadas ou prejudiciais.

O ozônio apresenta numerosas aplicações na indústria alimentícia e na medicina, sendo considerado um agente antimicrobiano de amplo espectro. Foi classificado pela U.S. Food and Drug Administration em 2001, nos Estados Unidos, como sanitizante seguro para aplicação em alimentos, já que o seu produto de degradação é o oxigênio e não deixa resíduos (Gabler et al., 2010). O ozônio é utilizado para a descontaminação da superfície de frutas e legumes, auxiliando na preservação destes durante o armazenamento (Kim et al., 1999). No setor de armazenamento, a utilização deste gás vem sendo apontada com uma estratégia potencial para o combate a insetos-praga (Erdman, 1980; Kells et al., 2001; Pereira et al., 2008; Sousa et al., 2008; 2012), controle de fungos e degradação de micotoxinas (Alencar et al., 2012) em grãos armazenados. A este respeito foi constatado que o ozônio além de ser eficaz no controle das pragas não modifica a qualidade dos grãos tratados e seus subprodutos (Pereira et al., 2007; Alencar et al., 2011).

A oxidação de compostos orgânicos por este gás pode ocorrer por meio de duas reações específicas: reação da molécula do O_3 com as moléculas dos compostos orgânicos, e reação dos radicais livres ($O\bullet$) formados pela decomposição do O_3 com os compostos orgânicos. Em solução aquosa pode ocorrer, também, a oxidação dos compostos orgânicos por meio da ação de radicais hidroxila ($\bullet OH$), formados a partir dos átomos de oxigênio provenientes da degradação do O_3 com átomos de hidrogênio livres no meio (Chiron et al., 2000, von Gunten, 2003). Por estas características o ozônio vem sendo amplamente utilizado em todo o mundo para o tratamento de poluentes em água, principalmente resíduos de pesticidas (Chiron et al., 2000; von Gunten, 2003; Chelme-Ayala et al., 2010; Qiang et al., 2010), e é considerado um potencial agente para a degradação de resíduos de inseticidas em produtos armazenados.

O ozônio é capaz de reagir com pesticidas organofosforados, organoclorados e organonitrogenados, sendo efetivo na degradação destes, sobretudo quando a reação é conduzida em meio alcalino (Almeida et al., 2004). Em decorrência disto, vem sendo amplamente utilizado em todo o mundo para o tratamento de água potável e águas residuárias para fins de saneamento, bem como para a oxidação de poluentes comuns, incluindo os pesticidas (Chiron et al., 2000; von Gunten, 2003, Chelme-Ayala et al., 2010; Qiang et al., 2010). Em estudo realizado por Wu et al. (2009) consta que o inseticida diazinon, presente em amostras de água com diferentes valores de pH, foi completamente degradado quando submetido ao tratamento com o ozônio por 30 min. Já Chelme-Ayala et al. (2010) relatam a degradação de resíduos dos pesticidas bromoxinil e trifluralina, resultante da oxidação pelo ozônio, em amostras de água. Neste estudo os autores verificaram que houve 98% de degradação do bromoxinil e 50% de degradação da trifluralina após dois e cinco minutos, respectivamente, de exposição dos pesticidas ao gás O₃.

Embora se conheça o potencial do ozônio como agente de degradação de resíduos de pesticidas e compostos orgânicos não há relatos sobre o uso deste gás para a degradação de resíduos de pesticidas em produtos armazenados. Deste modo a presente pesquisa foi desenvolvida com o intuito de avaliar a eficiência do ozônio como agente de degradação dos inseticidas bifentrina (piretróide) e pirimifós-metílico (organofosforado) em grãos de milho. O estudo foi executado em duas etapas, onde a primeira teve como objetivo otimizar e validar a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para uso na determinação de resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho; e a segunda etapa teve como objetivo estudar a cinética de degradação dos resíduos dos inseticidas bifentrina e pirimifós-metílico nos grãos de milho, em função do período de exposição ao gás ozônio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alencar, E.R.; Faroni, L.R.A.; Soares, N.F.F.; Carvalho, M.C.S.; Pereira, K.F. Effect of the ozonation process on the quality of peanuts and crude oil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.2, p.154-160, 2011.
- Alencar, E.R.; Faroni, L.R.A.; Soares, N.F.F.; Silva, W.A.; Carvalho, M.C.S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, n.4, p.899-905, 2012.
- Almeida, E.; Assalin, M.R.; Rosa, M.A.; Durán, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v.27, n.5, p.818-824, 2004.
- Anderson, K.; Schurle, B.; Reed, C.; Pedersen, J. An economic analysis of producers decision regarding insect control in stored grain. **North Central Journal of Agricultural Economics**, v.12, n.1, p.23-29, 1990.
- Arthur, F.H. Grain protectants: current status and prospects for the future. **Journal of Stored Products Research**, v.32, n.4, p.293-302, 1996.
- Caneppele, M.A.B.; Caneppele, C.; Lázari, F.A.; Lázari, S.M.N. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) and the quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, n.4, p.625-630, 2003.
- Champ, B.R.; Dyte, C.E. **Informe de la prospección mundial de la FAO sobre susceptibilidad a los insecticidas de las plagas de granos almacenados**, Roma: FAO, 1976. 356p.
- Chelme-Ayala, P.; Gamal El-Din, M.; Smith, D.W. Kinetics and mechanism of the degradation of two pesticides in aqueous solutions by ozonation. **Chemosphere**, v.78, n.5, p.557-562, 2010.

- Chiron, S.; Fernandez-Alba, A.; Rodriguez, A.; Garcia-Calvo, E. Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art. **Water Research**, v.34, n.2, p.366-377, 2000.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: 12º Levantamento.** Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_09_18_33_boletim_graos_-_setembro_2012.pdf. Acesso em: 27 de dezembro de 2012.
- Coutinho, C.F.B.; Tanimoto, S.T.; Galli, A.; Garbellini, G.S.; Takayama, M.; Amaral, R.B.; Mazo, L.H.; Avaca, L.A.; Machado, S.A.S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.15, n.1, p.65-72, 2005.
- Domingos, J.B.; Longhinotti, E.; Machado, V.G.; Nome, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v.26, n.6, p.745-753, 2003.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do Milho: Sistema de Produção 1.** Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br>. Acesso em: 26 de dezembro de 2012.
- Erdman, H.E. Ozone toxicity during ontogeny of two species of flour beetles, *Tribolium confusum* and *T. castaneum*. **Environmental Entomology**, v.9, n.1, p.16-17, 1980.
- Faroni, L.R.A.; Silva, J.S. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. In: Silva, J.S. (Ed.). **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2008. p.371-406.
- Gabler, F.M.; Smilanick, J.L.; Mansour, M.F.; Karaca, H. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.55, n.2, p.85-90, 2010.
- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Santos, J.P.; Cruz, C.D. Inheritance of deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil *Sitophilus zeamais* Mots. **International Journal of Pest Management**, v.40, n.1, p.103-106, 1994.

- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Santos, J.P.; Cruz, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Product Research**, v.31, n.2, p.145-150, 1995.
- Hagstrum, D.W.; Subramanyam, B. **Fundamentals of stored-product entomology**. St. Paul, Minnesota: AACC International, 2006. 323p.
- Hill, A.G.; Rice, R.G. **Handbook of ozone technology and applications**. Michigan: Ann Arbor Science, 1982. 386p.
- Kells, S.A.; Mason, L.J.; Maier, D.E.; Wolososhuk, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n.4, p.371-383, 2001.
- Khadre, M.A.; Yousef, A.E.; Kim, J.G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.
- Kim, J.G.; Yousef, A.E.; Chism, Q.W. Use of ozone to inactivate microorganisms in lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, n.1, p.17-34, 1999.
- Kunz, A.; Freire, R.S.; Rohwedder, J.J.R.; Durán, N.; Mansilla, H.; Rodriguez, J. Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório. **Química Nova**, v.22, p.425-428, 1999.
- Loeck, A.E. Principais pragas que atacam produtos armazenados. In: Loeck, A.E. (Org.). **Pragas de produtos armazenados**. Pelotas: EGUFPEL, 2002, p.35-59.
- Manna, S.; Bhattacharyya, D.; Mandal, T.K.; Dey, S. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. **Journal of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.133-136, 2004.
- Miyamoto, J.; Kaneko, H.; Tsuji, R.; Okumo, Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks should be assessed to human health. **Toxicology Letters**, v.82-83, n.1, p.933-940, 1995.

- Oviedo, M.T.P.; Toledo, M.C.F.; Vicente, E. Resíduos de agrotóxicos piretróides em hortaliças. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, n.1, p.9-18, 2003.
- Pereira, A.M.; Faroni, L.R.A.; Silva Júnior, A.G.; Sousa, A.H.; Paes, J.L. Viabilidade econômica do gás ozônio como fumigante em grãos de milho armazenados. **Engenharia na Agricultura**, v.16, n.2, p.144-154, 2008.
- Pereira, A.M.; Faroni, L.R.A.; Sousa, A.H.; Urruchi, W.I.; Roma, R.C.C. Efeito imediato e latente da fumigação com ozônio na qualidade dos grãos de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.32, n.2, p.100-110, 2007.
- Qiang, Z.; Liu, C.; Dong, B.; Zhang, Y. Degradation mechanism of alachlor during direct ozonation and O₃/H₂O₂ advanced oxidation process. **Chemosphere**, v.78, n.5, p.517-526, 2010.
- Rees, D.P. Coleoptera. In: Subramanyam, B.; Hagstrum, D.W. (eds.). **Integrated management of insects in stored products**. New York: Marcel Dekker, 1996, p.1-39.
- Resende, O.; Corrêa, P.C.; Faroni, L.R.A.; Cecon, P.R. Avaliação da qualidade tecnológica do feijão durante o armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.2, p.517-524, 2008.
- Robinson, T.; McMullan, G.; Marchant, R.; Nigam, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposal alternative. **Bioresource Technology**, v.77, n.3, p.247-255, 2001.
- Santos, M.A.T.; Areas, M.A.; Reyes, F.G. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.3, p.339-349, 2007.
- Shimadzu Scientific Instruments. **GCSolution Software**, Versão 2.3. Columbia: Shimadzu Scientific Instruments, 2004.

- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.A.; Guedes, R.N.C.; Tótola, M.R.; Urruchi, W.I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.44, n.4, p.379-385, 2008.
- Sousa, A.H.; Faroni, L.R.A.; Silva, G.N.; Guedes, R.N.C. Ozone toxicity and walking response of populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, n.105, v.6, p.2187-2195, 2012.
- Subramanyam, B.; Hagstrum, D.W. Resistance Measurement and Management. In: Subramanyam, B.; Hagstrum, D.W. **Integrated Management of Insects in Stored Products**, New York: Marcel Dekker, 1996, p.331-397.
- Von Gunten, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v.37, n.7, p.1443-1467, 2003.
- Wu, J.; Lan, C.; Chan, G.Y.S. Organophosphorus pesticide ozonation and formation of oxon intermediates. **Chemosphere**, v.76, n.9, p.1308-1314, 2009.

Capítulo 1

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO – EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA – PARA DETERMINAÇÃO DE INSETICIDAS EM GRÃOS DE MILHO OZONIZADOS

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo otimizar e validar a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para uso na determinação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho; e utilizar a técnica ESL-PBT para avaliar a taxa de degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho expostos ao ozônio em diferentes concentrações. Na realização dos ensaios utilizaram-se grãos de milho isentos de resíduos de agrotóxicos. As variáveis analisadas foram solvente extrator (acetonitrila e acetonitrila: acetato de etila), modo de agitação (mesa agitadora, ultrassom e vórtex), tempo de agitação (1, 2 e 3 min) e tempo de congelamento (3, 6 e 12 h). A técnica otimizada foi validada com base nos parâmetros de seletividade, linearidade, detectabilidade, exatidão e precisão do método. A aplicabilidade do método foi testada medindo-se a eficiência do ozônio como agente de degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós metílico em grãos de milho. Os grãos foram tratados com bifentrina (Prostore 25 CE[®]), na dose recomendada pelo fabricante e pirimifós-metílico (Actellic 500 CE[®]) na dose de 1,5 vezes a dose recomendada pelo fabricante, as quais fornecem as concentrações de 0,4 e 12,0 mg kg⁻¹, respectivamente. Os grãos tratados com bifentrina foram fumigados com o ozônio nas concentrações de 0,0; 1,1; 2,1; 3,2 e 4,3 mg L⁻¹. Os grãos contendo pirimifós-metílico foram ozonizados nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,9 mg L⁻¹. Para análise dos resíduos, os grãos foram triturados e submetidos ao método de extração desenvolvido. O método otimizado consiste em acrescentar a uma amostra de 2,0 g de milho triturado, 4,0 mL de

água e 8,0 mL de acetonitrila. Em seguida, as amostras são agitadas em vórtex por 1 min e mantidas sob congelamento (-20 °C) por 3 h. Os extratos obtidos são analisados por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-DCE). A técnica proposta é seletiva para ambos os inseticidas; apresenta limites de detecção e quantificação iguais a 0,09 e 0,29 mg kg⁻¹ para bifentrina e 1,05 e 3,19 mg kg⁻¹ para pirimifós-metílico; possui linearidade (r – bifentrina e pirimifós-metílico = 0,99), exatidão (recuperação – bifentrina = 100,3% e pirimifós-metílico = 102,1%) e precisão (CV – bifentrina = 8,9% e pirimifós-metílico = 2,8%) dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA e INMETRO. Aplicando-se o método desenvolvido para analisar os resíduos dos inseticidas nos grãos ozonizados, observou-se que os níveis de bifentrina e pirimifós-metílico reduziram pela aplicação do ozônio. A redução nos níveis dos inseticidas foi proporcional ao aumento na concentração do ozônio. Concluiu-se que o método ESL-PBT/CG-DCE desenvolvido é adequado à determinação de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho.

Palavras-chave: Bifentrina, pirimifós-metílico, resíduos, grãos

**ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT - SOLID-LIQUID EXTRACTION
WITH LOW TEMPERATURE PARTITIONING - FOR INSECTICIDES
DETERMINATION IN MAIZE GRAIN OZONIZED**

ABSTRACT

This study aimed to optimize and validate the solid-liquid extraction with low temperature partitioning (SLE-LTP) technique to determination of bifenthrin and pirimiphos-methyl residues in maize grains. It was applied the ESL-PBT to evaluate the degradation rate of waste bifenthrin and pirimiphos-methyl in maize grains exposed to

ozone at different concentrations. It was used maize grains free of pesticide residues. The analyzed variables were extractor solvent (acetonitrile and acetonitrile: ethyl acetate), homogenization (shaker, ultra-sonic bath and vortex), agitation time (1, 2 and 3 min) and partition time (3, 6 and 12 h). The optimized technique was validated based on the parameters of the method selectivity, linearity, detectability, accuracy and precision. The method applicability was tested by measuring the ozone efficiency as a bifenthrin and pirimiphos methyl residue degradation agent in maize grains. The grains were treated with bifenthrin (Prostore 25 EC[®]) in the manufacturer recommended dose and pirimiphos-methyl (Actellic 500 EC[®]) in a 1.5-times manufacturer recommended dose, which provide concentrations of 0.4 and 12.0 mg kg⁻¹, respectively. The grains treated with bifenthrin were ozone fumigated at concentrations of 0.0, 1.1, 2.1, 3.2 and 4.3 mg L⁻¹. The grains treated with pirimiphos-methyl were ozonized at concentrations of 0.0, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.9 mg L⁻¹. For residue analysis, the grains were milled and subjected to the developed extraction method. The optimized method consists of adding 4.0 mL water and 8.0 mL of acetonitrile to a sample of 2.0 g of milled maize. Then the samples were put on vortex for 1.0 min and maintained under freezing (-20 ° C) for 3.0 h. The obtained extract is analyzed by gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD). The proposed technique is selective to both insecticides; presents detection and quantification limits equal to 0.09 and 0.29 mg kg⁻¹ for bifenthrin and 1.05 and 3.19 mg kg⁻¹ for pirimiphos-methyl; possesses linearity (r – bifenthrin and pirimiphos-methyl = 0.99), accuracy (recovery – bifenthrin = 100.3% and pirimiphos-methyl = 102.1%) and precision (CV – bifenthrin = 8.9 and pirimiphos methyl = 2.8%) within the limits established by ANVISA and INMETRO. Applying the developed method for the insecticides analysis ozonized grains, it was observed that the residues bifenthrin and pirimiphos-methyl levels decreased by ozone application. The reduction in the insecticides levels was proportional to the increase in the ozone concentration. It was

concluded that the method SLE- LTP/GC-ECD developed is suitable for the bifenthrin and pirimiphos-methyl determination in maize grains.

Keywords: Bifenthrin, pirimiphos-methyl, residues, grains

1. INTRODUÇÃO

Os insetos-praga são responsáveis por consideráveis perdas, tanto qualitativas como econômicas, no setor de armazenamento (Faroni & Silva, 2008; Silva et al., 2012). O principal método de controle adotado é o uso de inseticidas, os quais constituem a forma mais simples, rápida e econômica de conter infestações de insetos-praga em produtos armazenados (White & Leesch, 1996). Os compostos mais utilizados são os inseticidas protetores com ação residual, pertencentes aos grupos químicos piretróides e organofosforados, uma vez que apresentam alta eficácia no controle de pragas e curta persistência no ambiente (Oviedo et al., 2003). No Brasil são indicados para o tratamento de grãos de milho armazenados, dentre outros produtos, a bifentrina e o pirimifós-metílico (MAPA, 2013) (Figura 1).

A bifentrina é um piretróide sintético com as seguintes características físico-químicas: fórmula molecular = $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$; ponto de ebulição = 453,2 °C (760 mmHg); e pressão de vapor = 0,0 mmHg (25 °C). Além disso, apresenta elevado coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow} = 6,0$), sendo pouco solúvel em água (0,1 mg L⁻¹), e elevada estabilidade em luz natural e água. O pirimifós-metílico é um organofosforado sintético, derivado heterocíclico do ácido fosfórico, que apresenta como características físico-químicas: fórmula molecular = $C_{11}H_{20}N_3O_3PS$; ponto de ebulição = 386,5 °C (760 mmHg); pressão de vapor = 0,0 mmHg (25 °C); e $\log K_{ow} = 4,2$, sendo pouco solúvel em água (2,9 mg L⁻¹) (Zalom, 2001; ChemSpider, 2013).

A falta de estruturas adequadas à armazenagem dos grãos e a falta de mão de obra especializada, aliadas a baixa disponibilidade de técnicas alternativas para o controle das pragas tem gerado o uso abusivo de inseticidas nas unidades armazenadoras. Esta situação tem sido motivo de grande preocupação, haja vista que tem se observado a persistência dos princípios ativos nos grãos e seus subprodutos, na forma de resíduos danosos aos consumidores e ao meio ambiente (Trevizan & Baptista, 2000; Coutinho et al., 2005). Diante disto, se faz necessário o monitoramento dos níveis de resíduos dos inseticidas presentes nos grãos de milho que são destinados à alimentação humana e animal.

Os métodos usados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em produtos vegetais incluem extração em fase sólida (Sharifa et al., 2006; Abhilash et al., 2007), microextração em fase sólida (Sanusi et al., 2004; Vázquez et al., 2008), extração com fluido supercrítico e dispersão de matriz em fase sólida (Gobo et al., 2004). No entanto, estas técnicas apresentam, muitas vezes, alto consumo de solvente e amostra (Rissato et al., 2005; Fenoll et al., 2007) e requerem profissional qualificado para sua execução, o que as tornam onerosas (Pinho et al., 2010). Uma técnica que vem sendo empregada com sucesso para a extração de agrotóxicos em matrizes sólidas, consiste na extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT). Esta técnica apresenta vantagens como praticidade, reduzido número de etapas e baixo consumo de solventes orgânicos, além de ser confiável e seletiva (Goulart et al., 2010; 2012).

A ESL-PBT consiste em acrescentar à amostra sólida um solvente extrator, miscível em água, menos denso que a água e que se mantenha líquido a -20 °C. Posteriormente, a mistura é agitada e levada ao freezer (-20 °C) por um determinado período de tempo. Nesta etapa, a fase aquosa juntamente com a amostra congelam e os analitos migram para a fase orgânica, a qual é isolada e posteriormente analisada. Este método, mostrou-se eficiente na extração e análise de agrotóxicos em água (Vieira et al.,

2007), leite (Goulart et al., 2008), batata (Pinho et al., 2010; Dardengo et al., 2011), maçã e tomate (Pinho et al., 2010), entre outras matrizes. No entanto, não há relatos do uso da ESL-PBT para extração de resíduos de agrotóxicos em grãos armazenados. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos: (i) otimizar e validar a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para uso na determinação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho; e (ii) utilizar a técnica ESL-PBT para avaliar a taxa de degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho expostos ao ozônio em diferentes concentrações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A determinação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico nos grãos de milho foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na otimização e validação da ESL-PBT para determinação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho, por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-DCE). A segunda etapa consistiu na aplicação do método desenvolvido para monitorar os níveis dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico nos grãos de milho, após exposição ao ozônio em diferentes concentrações. A aplicação dos inseticidas nos grãos de milho e ozonização das amostras foram realizadas no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A extração e análise dos princípios ativos, nos grãos, foram realizadas no Laboratório de Química Analítica (LAQUA) da UFV.

2.1. Reagentes e soluções

Foram preparadas soluções-padrão dos inseticidas estudados (bifentrina e pirimifós-metílico) e do padrão interno (parationa-metflica), na concentração de 1000,0 mg L⁻¹. Estas soluções foram obtidas pela solubilização dos padrões de bifentrina

(92,2% m/m – Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), pirimifós-metílico (99,5% m/m – Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) e parationa-metfílica (99,0% m/m – Chem Service, West Chester, USA) em acetonitrila grau HPLC (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). A partir das soluções-padrão foram preparadas soluções trabalho nas concentrações de 10 mg L⁻¹ para a bifentrina e a parationa-metfílica, e 400 mg L⁻¹ para o pirimifós-metílico. Tanto as soluções-padrão como as soluções trabalho foram armazenadas em geladeira à temperatura de aproximadamente 4 °C.

Os solventes acetonitrila e acetato de etila grau HPLC (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foram empregados como extratores. Para aplicação da técnica otimizada e validada foram utilizados os produtos comerciais Prostore 25 CE[®] e Actellic 500 CE[®], como fonte dos princípios ativos bifentrina e pirimifós-metílico, respectivamente.

2.2. Análise cromatográfica

As análises qualitativas e quantitativas de bifentrina e pirimifós-metílico foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17-A, Kyoto, Japão) equipado com detector por captura de elétrons. Utilizou-se uma coluna cromatográfica capilar do tipo DB-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), com 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. As corridas cromatográficas foram gerenciadas pelo Software GCsolution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

As condições analíticas otimizadas para as análises foram: programação de aquecimento da coluna cromatográfica, temperaturas do injetor e do detector, modo de injeção e vazão do gás de arraste. As determinações foram realizadas visando um menor tempo de análise, boa resolução e separação dos picos dos analitos de interesse. As condições determinadas como ideais para a bifentrina e o pirimifós-metílico encontram-se descritas a seguir:

a) Bifentrina

- Programação de aquecimento da coluna:

150 °C (1,5 min) $\xrightarrow{40\text{ °C min}^{-1}}$ 220 °C (2 min) $\xrightarrow{40\text{ °C min}^{-1}}$ 290 °C (3 min)

- Tempo total de análise: 10 min
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Temperatura do detector: 300 °C
- Volume injetado: 1,0 µL
- Divisão de fluxo: 1:5
- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min⁻¹

b) Pirimifós-metílico

- Programação de aquecimento da coluna:

150 °C (1 min) $\xrightarrow{30\text{ °C min}^{-1}}$ 210 °C $\xrightarrow{2\text{ °C min}^{-1}}$ 220 °C $\xrightarrow{60\text{ °C min}^{-1}}$ 290 °C (1 min)

- Tempo total de análise: 10 min
- Temperatura do injetor: 280 °C
- Temperatura do detector: 300 °C
- Volume injetado: 1,0 µL
- Divisão de fluxo: 1:5
- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: 1,0 mL min⁻¹

As concentrações dos analitos foram determinadas utilizando-se o método da padronização interna. As porcentagens de recuperação foram calculadas pela curva analítica construída no branco da matriz na faixa de concentração compreendida entre 0,04 e 0,20 mg L⁻¹ para bifentrina e 2,0 a 10,0 mg L⁻¹ para o pirimifós-metílico. As curvas construídas no branco visavam eliminar o efeito de matriz. Os extratos obtidos foram analisados por CG-DCE, nas condições descritas anteriormente, e os tempos de

retenção dos componentes da matriz comparados com o tempo de retenção dos inseticidas, obtidos pela injeção de solução-padrão em concentração conhecida.

2.3. Preparo das amostras de milho

Utilizaram-se grãos de milho (*Zea mays* L.), isentos de inseticidas, produzidos na safra de verão (2011/2012) no município de Senador Firmino-MG. Os grãos colhidos com teor de água em torno de 18% base úmida (b.u.) foram limpos, para a retirada de impurezas, e secos até 12% b.u. em secador de leito fixo, com potência nominal de 20 KW, desenvolvido pela UFV. Após a secagem uma amostra de 1,0 kg de grãos, representativa do lote, foi triturada em moinho de facas (Fritsch Pulverisette 14, Oberstein, Alemanha) até a obtenção de um produto com consistência de farinha. Esta farinha foi armazenada em saco plástico estéril e mantida sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises. Para confirmar a ausência dos inseticidas nas amostras foram preparados brancos utilizando-se acetonitrila como solvente extrator.

2.4. Otimização da técnica ESL-PBT

2.4.1. Extração de bifentrina

A técnica ESL-PBT foi otimizada com base na metodologia utilizada por Pinho et al. (2010) para extração de resíduos de agrotóxicos em frutos de tomate. Para fortificação das amostras utilizou-se uma solução trabalho do inseticida bifentrina na concentração de 10,0 mg L⁻¹. Amostras de 2,0000 g do milho triturado, pesadas em balança analítica com precisão de 0,1 mg (Sartorius BP 221 S, Goettingen, Alemanha), foram acondicionadas em frascos de vidro transparente com capacidade para 22,0 mL, fortificadas com 80,0 µL da solução de trabalho e deixadas em repouso por 3 h. Durante este período os frascos foram mantidos abertos, para que houvesse maior interação do inseticida com a amostra e ocorresse a evaporação do solvente. Em seguida,

acrescentou-se a cada amostra 4,0 mL de água destilada e realizaram-se os procedimentos de extração. Todos os testes foram conduzidos em triplicatas.

Para otimização da técnica ESL-PBT optou-se por trabalhar com o método da otimização univariada, em que um único fator é alterado e analisado separadamente em cada experimento enquanto os demais permanecem constantes. No processo de otimização desta técnica foram estabelecidas algumas variáveis importantes a serem avaliadas, a fim de se obter os melhores rendimentos com menor tempo de análise e baixo custo. As variáveis avaliadas foram: solvente extrator, modo de agitação, tempo de agitação e tempo de congelamento, as quais se encontram especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Arranjos experimentais utilizados no processo de otimização da técnica ESL-PBT para determinação de bifentrina em grãos de milho.

F.E.	Variáveis	Fatores Fixados			
		S.E.	M.A.	T.A. (min)	T.C. (h) ^(d)
S.E.	ACN	F.E.	Mesa agitadora ^(a)	10	3
	ACN: AE	F.E.	Mesa agitadora ^(a)	10	3
M.A.	Mesa agitadora ^(a)	ACN	F.E.	10	3
	Ultrassom ^(b)	ACN	F.E.	10	3
	Vórtex ^(c)	ACN	F.E.	1	3
T.A. (min)	1, 2 e 3	ACN	Vórtex ^(c)	F.E.	3
T.C. (h) ^(d)	3, 6 e 12	ACN	Vórtex ^(c)	1	F.E.

F.E = fator estudado, S.E. = solvente extrator, M.A. = modo de agitação, T.A. = tempo de agitação, T.C. = tempo de congelamento, ACN = acetonitrila – 8,0 mL, ACN: AE = acetonitrila: acetato de etila – 6,5: 1,5 mL (v/v), (a) = 25 °C e 200 oscilações por minuto (Tecnal TE 420, Piracicaba, Brasil), (b) = 170 W e 60 kHz (Kondortec CD-4820, São Carlos, Brasil), (c) = velocidade 7 (Certomate[®] MV, São Paulo, Brasil), (d) = freezer a -20 °C (Consul 280, São Paulo, Brasil).

Após a separação das fases pelo congelamento do milho com a fase aquosa, em cada uma das etapas da otimização do método, o extrato orgânico contendo os princípios ativos foi recuperado. Este extrato foi passado através de papel de filtro

contendo 2,0000 g sulfato de sódio anidro (99,0% m/m – Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), para eliminar a possível presença de água. Ressalta-se que o volume do extrato coletado após a filtração em todas as etapas foi de aproximadamente 6,0 mL. Deste volume foram retirados 1,5 mL, os quais foram colocados em um *vial*, onde foi acrescentado 15,0 µL do padrão interno. Estas amostras foram mantidas sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises cromatográficas.

2.4.2. *Extração de pirimifós-metílico*

A extração do pirimifós-metílico foi realizada utilizando-se a técnica ESL-PBT já otimizada para extração e análise de bifentrina. Esta técnica mostrou-se eficiente na extração do princípio ativo pirimifós-metílico nos grãos de milho, proporcionando recuperação deste composto dentro dos limites estabelecidos pela literatura (ANVISA, 2003, INMETRO, 2007). Em decorrência destes resultados não foi necessário realizar ensaios para otimização da técnica ESL-PBT para extração e análise de pirimifós-metílico em amostras de milho.

2.5. Validação da técnica ESL-PBT

A técnica ESL-PBT foi validada com base na avaliação dos parâmetros analíticos de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão.

2.5.1. *Seletividade*

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos das amostras de milho isentas de bifentrina e pirimifós-metílico (branco) com os cromatogramas dos extratos das amostras de milho fortificadas com cada inseticida. Para obtenção dos extratos as amostras foram submetidas ao procedimento de extração

ESL-PBT otimizado. Os dados cromatográficos foram analisados utilizando-se o software GCsolution (Shimadzu Scientific Instruments, 2004) e os cromatogramas obtidos com o auxílio do software Origin (OriginLab Corporation, 2007).

2.5.2. *Linearidade de resposta do método*

No estudo da linearidade de resposta do método utilizou-se extratos obtidos de amostras de milho, fortificadas com bifentrina em sete concentrações (0,30; 0,45; 0,60; 0,75; 0,90; 1,05 e 1,20 mg kg⁻¹) e pirimifós-metílico em cinco concentrações (10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0 mg kg⁻¹). Os extratos foram obtidos utilizando-se a técnica ESL-PBT otimizada. Recolheu-se uma alíquota de 1,5 mL, do extrato recuperado, e acrescentou-se a esta 15 µL do padrão interno (parationa-metflica), diluído em acetonitrila, na concentração de 10,0 mg L⁻¹. As amostras foram analisadas por CG-DCE e os dados utilizados para construção de uma curva analítica, relacionando as razões das áreas do analito de interesse pelo padrão interno com as concentrações mencionadas. A linearidade foi determinada com base no coeficiente de correlação (r) e gráfico de resíduos.

2.5.3. *Limite de detecção e limite de quantificação*

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base no método proposto por Ribani et al. (2004), utilizando-se parâmetros obtidos a partir da curva analítica. Segundo este método o LD e o LQ podem ser expressos por meio das Equações 1 e 2, respectivamente. Os parâmetros da curva foram obtidos utilizando-se a função Proj.lin do software Microsoft Office Excel®.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 2})$$

em que:

s = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação de regressão; e

S = inclinação da curva analítica.

2.5.4. Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada por meio da realização de ensaio de recuperação. Nestes ensaios analisaram-se nove amostras de milho fortificadas com bifentrina em três concentrações (0,3; 0,6 e 0,9 mg kg⁻¹) e seis amostras de milho fortificadas com pirimifós-metílico em duas concentrações (10 e 15 mg kg⁻¹). A exatidão das medidas foi avaliada pelo software Validate[®] (Lanças, 2004).

2.5.5. Precisão

A precisão foi determinada por meio de estudo da repetitividade do método. A repetitividade foi obtida com base na metodologia proposta pelo INMETRO (2007), onde se se preparou, injetou-se e analisaram-se, no mesmo dia, extratos de amostras de milho fortificadas com cada inseticida numa determinada concentração. Utilizou-se neste ensaio sete amostras fortificadas com bifentrina na concentração de 0,6 mg kg⁻¹ e seis amostras fortificadas com pirimifós-metílico na concentração de 10,0 mg kg⁻¹. Com os dados obtidos calculou-se o coeficiente de variação (CV) referente à porcentagem de recuperação das amostras. A precisão das medidas foi avaliada pelo do software Validate[®] (Lanças, 2004).

2.6. Aplicação da ESL-PBT para análise da degradação dos inseticidas em grãos de milho expostos ao ozônio

A técnica desenvolvida foi utilizada para avaliar a taxa de degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho expostos ao ozônio em diferentes concentrações. Uma massa de grãos de milho com teor de água de 12% b.u. foi pulverizada com uma calda inseticida contendo bifentrina na concentração de 0,4 mg kg⁻¹. Outra massa destes mesmos grãos foi pulverizada com uma calda contendo pirimifós-metílico na concentração de 12 mg kg⁻¹. As caldas foram preparadas a partir da diluição dos produtos comerciais, Prostore 25 CE[®] (bifentrina) na dose recomendada pelo fabricante (16 mL t⁻¹) e Actellic 500 CE[®] (pirimifós-metílico) na dose de 1,5 vezes a dose recomendada pelo fabricante (24 mL t⁻¹), em 1,0 L de água. A adoção de uma dose maior que a recomendada comercialmente para o Actellic 500 CE, se deu em função da concentração de pirimifós-metílico (8 mg kg⁻¹) proporcionada por esta dose estar muito próxima ao LMR estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (7 mg kg⁻¹) e abaixo do LMR estabelecido pela Anvisa (10 mg kg⁻¹).

A calda foi aplicada nos grãos espalhados sobre lona plástica utilizando-se um pulverizador manual. Em seguida, os grãos foram homogeneizados com auxílio de um rôdo e deixados em repouso por cerca de 3 h. Após esse período a massa de grãos foi dividida em amostras de 1,0 kg, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração até o momento da ozonização. Os grãos tratados com bifentrina foram fumigados com o ozônio nas concentrações de 0,0; 1,1; 2,1; 3,2 e 4,3 mg L⁻¹. Os grãos contendo pirimifós-metílico foram ozonizados nas concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,9 mg L⁻¹. O gás foi aplicado num fluxo contínuo de 1,0 L min⁻¹, durante 1 h. A fumigação dos grãos foi feita no interior de recipientes cilíndricos de PVC (0,20 x 0,25 m) dotados de conexões na parte inferior e superior para entrada e saída do ozônio, respectivamente. Em cada câmara foi instalada uma tela metálica, a 10

cm do fundo, para sustentação dos grãos e formação de um *plenum*, para melhor distribuição do gás. O ensaio foi conduzido com temperatura controlada de 25 ± 2 °C.

O ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio O&L3 ORM (Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil), utilizando como insumo gás oxigênio isento de umidade. O oxigênio foi retirado do ar atmosférico com o auxílio de um concentrador de oxigênio OxxiSul, Mark 5 Plus (Ozonebras, Curitiba, Brasil). Na geração do ozônio, o oxigênio passa por um reator refrigerado, onde existe uma descarga por barreira dielétrica. Esse tipo de descarga é produzido ao aplicar uma alta voltagem entre dois eletrodos paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o oxigênio. No espaço livre é produzida uma descarga em forma de filamentos, a qual ocasiona a quebra das moléculas de oxigênio, formando o ozônio.

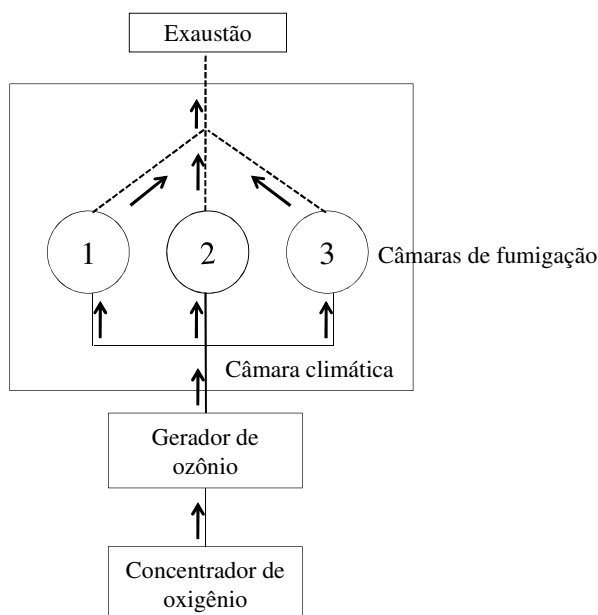


Figura 1. Esquema da fumigação dos grãos de milho com o gás ozônio.

A concentração do ozônio foi quantificada, utilizando-se o método iodométrico, por titulação indireta, conforme recomendado pela International Ozone Association (Eaton et al., 2005). Após a exposição ao ozônio as amostras de milho foram

homogeneizadas, separadamente, em homogeneizador tipo *Boerner*. Em seguida, foram trituradas e submetidas à extração do analito de interesse, utilizando-se o método ESL-PBT otimizado e validado. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições para cada concentração do ozônio.

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software SAS (SAS Institute, 2002). Os valores médios dos parâmetros otimizados foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o SAS (SAS Institute, 2002). Os resultados obtidos no ensaio de avaliação das taxas de degradação dos inseticidas nos grãos de milho pelo ozônio foram submetidos a ajustes de regressão, utilizando-se o SigmaPlot (SPSS, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise cromatográfica

A identificação de bifentrina e pirimifós-metílico foi realizada por comparação entre os tempos de retenção do analito em solução-padrão e no extrato de milho fortificado. Na Figura 2, são apresentados os cromatogramas característicos da solução-padrão contendo o inseticida e do extrato de grãos de milho fortificado com bifentrina. As condições cromatográficas estabelecidas possibilitaram uma boa separação e resolução do princípio ativo analisado. O tempo total de análise, utilizado para a avaliação dos inseticidas foi de 10 min. Os tempos de retenção (TR) dos inseticidas foram 5,7 min para o pirimifós-metílico e 7,8 min para bifentrina. Os tempos de retenção do padrão interno (parationa-metílica) foram 5,0 min na análise de bifentrina e 5,2 min na análise do pirimifós-metílico.

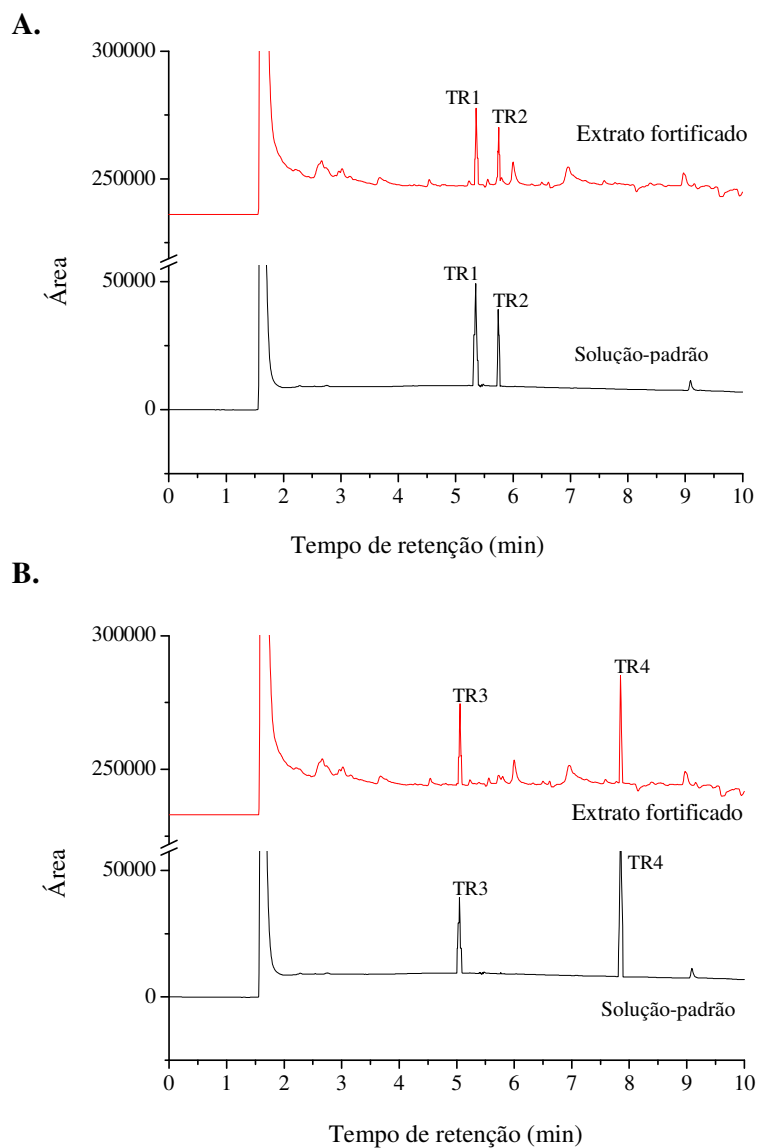


Figura 2. Cromatogramas de solução-padrão contendo pirimifós-metílico na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e extrato de milho fortificado com o inseticida na mesma concentração (A); e de solução-padrão contendo bifentrina na concentração de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ e extrato de milho fortificado com o inseticida na mesma concentração (B). TR1 (5,2 min) e TR3 (5,0 min) = tempos de retenção da parationa-metílica na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$; TR2 (5,7 min) = tempo de retenção do pirimifós-metílico e TR3 (7,8 min) = tempo de retenção da bifentrina.

3.2. Otimização da técnica ESL-PBT

3.2.1. Extração de bifentrina

As porcentagens de recuperação do inseticida bifentrina não variaram significativamente entre os tipos de solventes extratores ($F_{1,2}=0,29$ e $P=0,64$), sendo $48,00\pm 3,5\%$ para a acetonitrila e $45,96\pm 2,88\%$ para a mistura acetonitrila: acetato de etila (Figura 3A). Na escolha do solvente que melhor se adequa ao método ESL-PBT alguns aspectos devem ser considerados, tais como a habilidade de extração, capacidade de partição e compatibilidade com a técnica cromatográfica. A adição de acetato de etila à acetonitrila é feita com o intuito de reduzir a polaridade da solução extratora, e assim, favorecer a extração de compostos menos polares ou hidrofóbicos como os piretróides (Vieira et al., 2007; Marthe et al., 2010; Silvério et al., 2012). No entanto, esta mistura não favoreceu a extração de bifentrina nas amostras de milho. Desta forma, optou-se por desenvolver o método com a acetonitrila, uma vez que descarta a necessidade da mistura de solventes e, conseqüentemente, simplifica o procedimento de extração. Aliado a isto, a acetonitrila é miscível em água e apresenta baixo ponto de fusão (-45 °C) (Maštovská & Lehotay, 2004; Prestes et al., 2009), propriedades essenciais ao desenvolvimento da técnica ESL-PBT.

No que diz respeito ao modo de agitação, verificou-se que as porcentagens de recuperação variaram significativamente entre os procedimentos testados ($F_{2,3}=17,21$ e $P=0,02$). Nesta etapa da otimização constatou-se que a porcentagem de recuperação obtida com a agitação em vórtex ($70,08\pm 1,25\%$) foi significativamente maior que as porcentagens de recuperação obtidas com a agitação em mesa agitadora ($51,74\pm 4,74\%$) e ultrassom ($46,05\pm 1,94\%$) (Figura 3B). A etapa de agitação das amostras ou homogeneização é um dos fatores mais relevantes no processo de otimização de uma técnica, uma vez que, é nesta etapa que ocorre maior interação entre os solventes extratores e os analitos que estão sendo extraídos. O modo de agitação ideal é aquele

que proporciona melhor precisão, altos rendimentos de extração, melhor frequência analítica e praticidade (Prestes et al., 2009). A agitação em vórtex atendeu a estes requisitos, sendo eleito o modo de agitação que melhor se adequa ao desenvolvimento da técnica ESL-PBT para extração de bifentrina em amostras de milho.

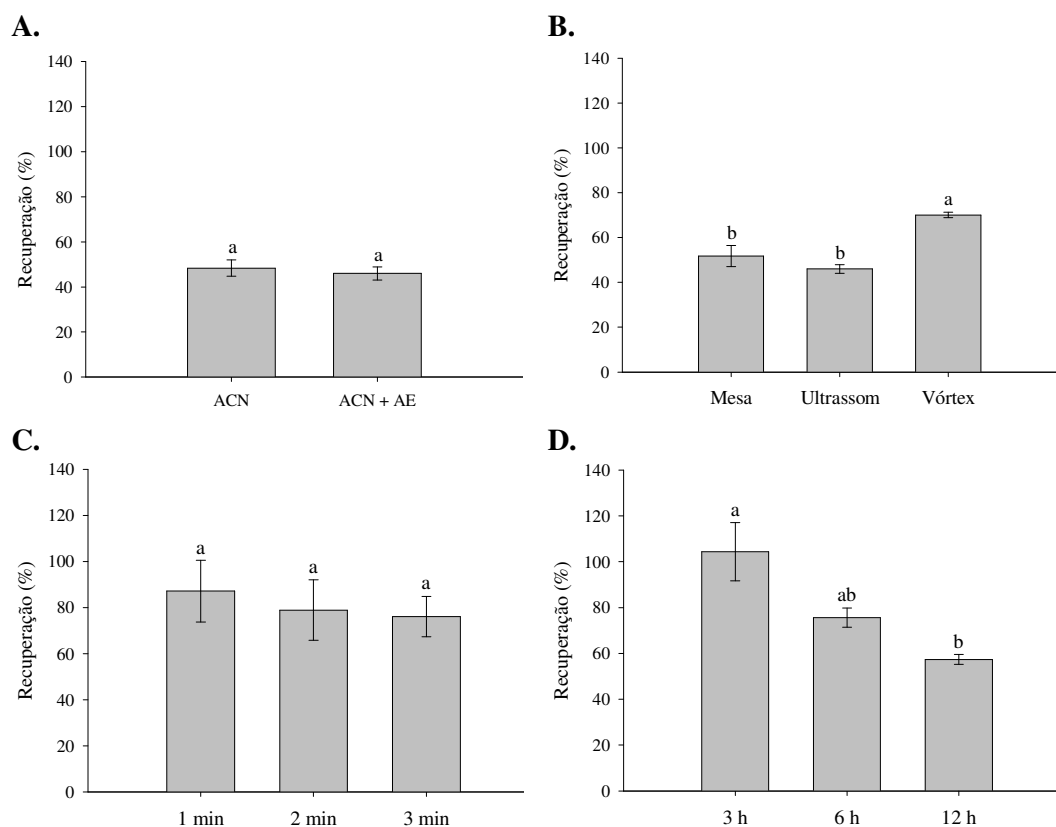


Figura 3. Porcentagens de recuperação do inseticida bifentrina em amostras de milho fortificadas com o inseticida na concentração de 10 mg L^{-1} , utilizando-se acetonitrila e acetonitrila + acetato de etila (A); agitação em mesa agitadora, ultrassom e vórtex (B); tempos de agitação em vórtex de 1, 2 e 3 min (C); e tempos de congelamento de 3, 6 e 12 h (D). Os valores nas barras representam as médias de duas replicatas.

As porcentagens de recuperação de bifentrina, também, não variaram significativamente entre os tempos de agitação avaliados ($F_{2,9}=0,60$ e $P=0,57$). Os

valores obtidos podem ser observados na Figura 3C, onde consta que as porcentagens de recuperação para os tempos de 1, 2 e 3 min de agitação foram $87,12 \pm 13,36$; $78,89 \pm 13,08$ e $76,02 \pm 8,69\%$, respectivamente. Estes resultados sugerem que no tempo mínimo de agitação em vórtex (1 min) já tenha ocorrido a máxima interação entre o analito de interesse (bifentrina) e o solvente extrator (acetoneitrila). Com isto, o aumento no tempo de agitação não contribui para o aumento na porcentagem de recuperação da técnica proposta. Tal fato, motivou a escolha do tempo de agitação de 1 min para compor a técnica ESL-PBT. Aliado a isto, a adoção do menor tempo de agitação contribui para a redução no tempo de preparo das amostras.

Com relação ao tempo de congelamento, observou-se que as porcentagens de recuperação de bifentrina variaram significativamente entre os tempos testados ($F_{2,9}=687$ e $P=0,02$). A porcentagem média de recuperação obtida no tempo de congelamento de 3 h ($104,32 \pm 12,69\%$) foi significativamente maior do que a obtida no tempo de congelamento de 12 h ($57,33 \pm 2,17\%$). Já o tempo de congelamento de 6 h ($75,56 \pm 4,19$) foi estatisticamente igual tanto ao tempo de congelamento de 3 h como ao tempo de congelamento de 12 h (Figura 3D). Com o aumento no tempo de congelamento parte da fase orgânica congela juntamente com a fase aquosa. Em decorrência disto, parte do analito fica retido na interface formada entre essas duas fases e, conseqüentemente, não é recuperado (Costa, 2011). Isto explica a menor porcentagem de recuperação obtida no tempo de congelamento de 12 h. Tendo em vista os resultados obtidos, escolheu-se o tempo de congelamento de 3 h para o desenvolvimento da técnica ESL-PBT. A escolha deste tempo de congelamento é vantajosa porque, além de promover elevada porcentagem de recuperação, contribui para a redução no tempo de preparo das amostras e extração do analito.

A técnica ESL-PBT desenvolvida para a extração de bifentrina em grãos de milho teve como variáveis selecionadas o solvente extrator acetoneitrila, o modo de

agitação em vórtex, o tempo de agitação de 1 min e o tempo de congelamento de 3 h. O método otimizado consiste em acrescentar a uma amostra de 2,0 g de milho, fortificada com a bifentrina, um volume de 4,0 mL de água e 8,0 mL de acetonitrila. Essa mistura é homogeneizada em vórtex durante 1 min, e levada ao freezer (-20 °C) por 3 h. Passado este período, o extrato é filtrado em papel de filtro contendo 2,0 g de sulfato de sódio anidro. O volume recuperado é de 6 mL, dos quais se retira uma alíquota de 1,5 mL e transfere-se para um *vial* ao qual se acrescenta 15 µL de um padrão interno. Os extratos obtidos são analisados por CG-DCE. As porcentagens de recuperação obtidas ao final do processo variaram de 73,2 a 104,3%.

3.2.1. *Extração de pirimifós-metílico*

O método desenvolvido para bifentrina adequa-se à extração e análise de pirimifós metílico por CG-DCE. O uso deste método proporcionou porcentagens de recuperação do pirimifós-metílico na faixa de 98,4 a 105,9%, dispensando a otimização do método para extração e análise deste inseticida. Vale destacar que a técnica ESL-PBT/CG-DCE proposta é simples, eficaz e com baixo consumo de solvente. Descarta a necessidade de etapas de evaporação e troca de solvente, o que consequentemente reduz os riscos de contaminação, perdas de amostras e possivelmente os custos. Com isto, pode ser aplicada em análises de rotina para determinação de bifentrina e pirimifós-metílico em amostras de milho.

3.3. Validação da técnica ESL-PBT

Os parâmetros utilizados na validação do método foram testados tanto para a bifentrina como para o pirimifós-metílico. Os resultados obtidos são apresentados nos tópicos seguintes (3.3.1 a 3.3.5).

3.3.1. *Seletividade*

Na Figura 4, é apresentada a superposição dos cromatogramas obtidos a partir da injeção de extratos de amostras de milho isentas dos inseticidas bifentrina e pirimifós-metílico (branco) e de extratos da matriz fortificada com os inseticidas. Ambos os extratos foram obtidos pelo método de extração ESL-PBT otimizado. Avaliar a seletividade consiste em avaliar a capacidade do método em separar o analito de interesse de outros componentes presentes na amostra (Ribani et al., 2004; Paschoal et al., 2008). Nota-se que os extratos das amostras de milho não apresentam interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos analisados. Desta forma, o método otimizado é seletivo tanto para a bifentrina como para o pirimifós-metílico.

3.3.2. *Limite de detecção e limite de quantificação*

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para a bifentrina foram 0,09 e 0,29 mg kg⁻¹, respectivamente. Para o pirimifós-metílico os LD e LQ foram 1,05 e 3,19 mg kg⁻¹, respectivamente. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando-se um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2007; Ribani et al., 2004). O método otimizado proporcionou valores de LD e LQ abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pela ANVISA e *Codex alimentarius*, para bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho. Estes resultados tornam o método, ESL-PBT desenvolvido, adequado à determinação de resíduos destes inseticidas em grãos de milho, atendendo às regulamentações nacionais e internacionais.

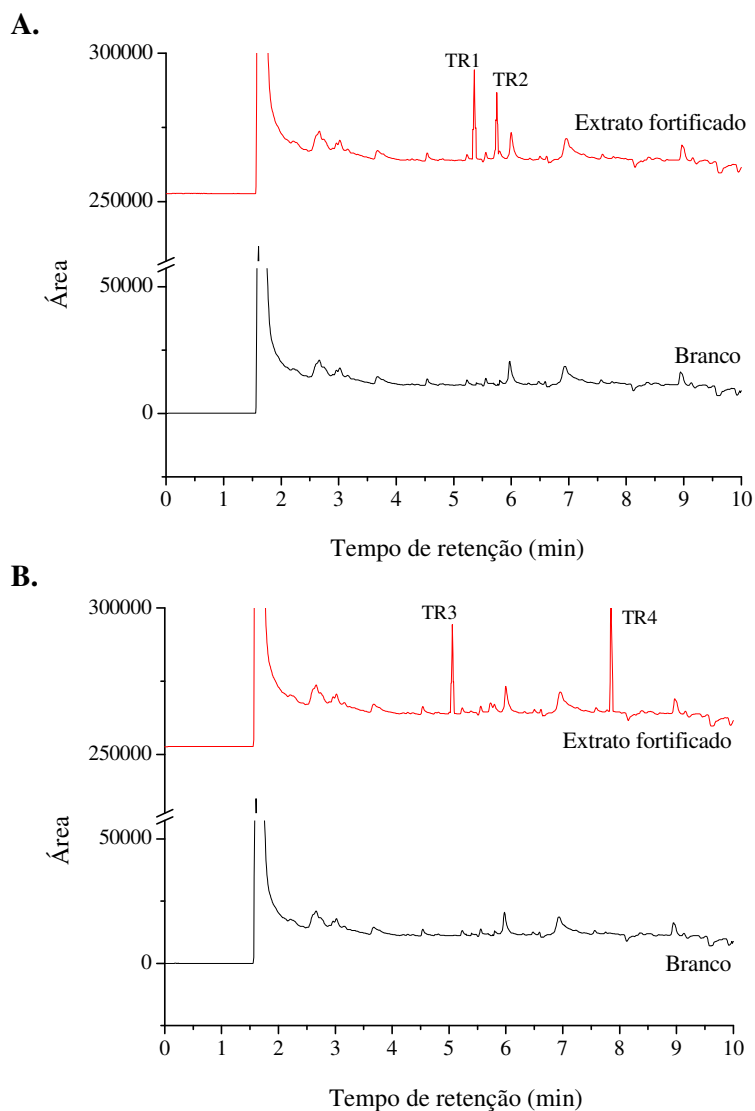


Figura 4. Cromatogramas de extrato de milho isento de pirimifós-metflico (branco) e fortificado com o inseticida na concentração de 10 mg kg^{-1} (A) e extrato de milho isento de bifentrina (branco) e fortificado com o inseticida na concentração $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ (B). TR1 (5,2 min) e TR3 (5,0 min) = tempos de retenção do padrão interno (parationa-metflica) na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$; TR2 (5,7 min) = tempo de retenção do pirimifós-metflico e TR3 (7,8 min) = tempo de retenção da bifentrina.

3.3.3. Linearidade de resposta do método

As equações ajustadas para bifentrina e pirimifós metílico foram $\hat{y} = 0,17 + 1,22x$ e $\hat{y} = -1,08 + 0,12x$, respectivamente. Estas equações geram coeficientes de correlação (r) igual a 0,99 (Figura 5). A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (Swartz & Krull, 1998; Ribani et al., 2004). O principal parâmetro utilizado para estimar a linearidade do método é o coeficiente de correlação (r) da curva analítica (Ribani et al., 2004). As recomendações da ANVISA (2003) determinam que o valor mínimo de r seja 0,99. No entanto, o INMETRO (2007) determina que valores de r acima de 0,90 indicam a linearidade do método. Os valores de r obtidos para a extração de bifentrina e pirimifós-metílico atendem as exigências tanto do INMETRO quanto da ANVISA. Aliado a isto, o gráfico de resíduos (Figura 5) demonstra que há uma forte correlação entre as concentrações e as áreas dos picos dos inseticidas em análise, uma vez que os valores dos resíduos encontram-se uniformemente distribuídos em torno da média. Estes resultados indicam que o método desenvolvido é linear para ambos os inseticidas, dentro das faixas de concentrações estudadas.

3.3.4. Exatidão

No estudo da exatidão, o método proposto apresentou porcentagem média de recuperação para bifentrina e pirimifós-metílico iguais a 100,29 e 102,36%. As concentrações obtidas pela análise dos extratos variaram de 0,22 a 0,94 mg kg⁻¹ para bifentrina e de 9,58 a 16,66 mg kg⁻¹ para o pirimifós-metílico. Os coeficientes de variação obtidos foram 4,08% para bifentrina e 2,83% para pirimifós-metílico. A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para

uma mesma amostra por repetidas vezes (Thompson et al., 2002). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. No entanto, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani et al., 2004). Desta forma, o método desenvolvido apresenta exatidão, sendo confiável para extração e análise de bifentrina e pirimifós-metílico em amostras de milho.

3.3.5. *Precisão*

No estudo da precisão observou-se que as concentrações, obtidas após a análise dos extratos fortificados com bifentrina na concentração de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$, variaram de $0,66$ a $0,84 \text{ mg kg}^{-1}$, apresentando coeficiente de variação igual a $8,9\%$. Não obstante, as concentrações obtidas após a análise dos extratos fortificados com pirimifós-metílico na concentração de $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$ variaram de $9,58$ a $10,15 \text{ mg kg}^{-1}$. Esta variação fornece um coeficiente de variação igual a $2,07\%$. A precisão é usada para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, retidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (INMETRO, 2007). Em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos coeficientes de variação de até 20% (Huber, 1998; Ribani et al., 2004). Desta forma a técnica ESL-PBT é considerada precisa, sendo adequada à análise de bifentrina e pirimifós-metílico em amostras de milho.

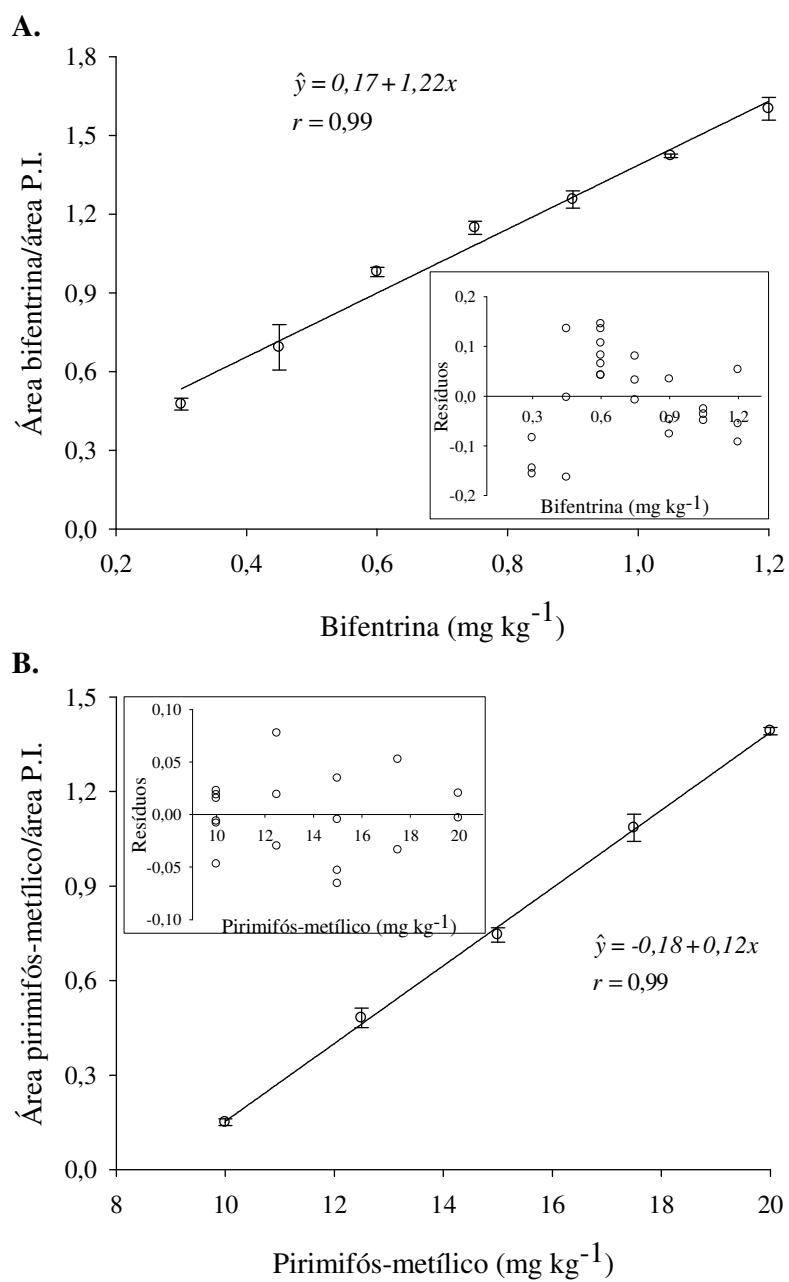


Figura 5. Curva analítica relacionando as razões entre as áreas de bifentrina e parationa-metflica (P.I.) com as concentrações de bifentrina em amostras de milho fortificadas com o inseticida (0,3 a 1,2 mg kg^{-1}); e entre as áreas de pirimifós-metílico e parationa-metflica (P.I.) com as concentrações de pirimifós-metílico em amostras de milho fortificadas com o inseticida (10,0 a 20,0 mg kg^{-1}).

3.4. Aplicação da ESL-PBT para análise da degradação dos inseticidas em grãos de milho expostos ao ozônio

Os níveis de resíduos nos grãos de milho variaram significativamente entre as concentrações do ozônio, tanto para bifentrina ($F_{4;10}=54,99$ e $P<0,0001$) como para pirimifós-metílico ($F_{4;10}=243,00$ e $P<0,0001$). A concentração de bifentrina e de pirimifós-metílico reduziu com o aumento da concentração do ozônio (Figura 6). Embora a fumigação com ozônio tenha sido eficiente na remoção dos resíduos de ambos os inseticidas, a concentração do gás ($0,64 \text{ mg L}^{-1}$) necessária para redução dos níveis de pirimifós-metílico a níveis abaixo do limite de detecção da ESL-PBT desenvolvida foi cerca de sete vezes menor do que a concentração ($4,3 \text{ mg L}^{-1}$) necessária para máxima remoção dos resíduos de bifentrina (Tabela 1). Verifica-se que os níveis de bifentrina reduziram de $0,37$ para $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$, correspondendo a uma taxa de degradação de 93,1%. Já os níveis de pirimifós metílico reduziram de $8,76$ para valores abaixo de $1,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ($< \text{LD}$), atingindo uma taxa de degradação superior a 88,0% (Figura 6 e Tabela 1).

Estes resultados se devem ao elevado potencial oxidativo do ozônio, o qual tem sido relatado em diversos estudos como altamente eficiente na degradação de resíduos de agrotóxicos, em diferentes produtos (Hwang et al., 2001; Wu et al., 2007; 2009; Ikeura et al., 2011; Lin et al., 2012). O ozônio possui grande afinidade com estruturas moleculares compostas por duplas ligações (von Guten, 2003; Miao et al., 2010). A estrutura molecular tanto da bifentrina como do pirimifós-metílico é composta por um grande número de ligações deste tipo, o que favorece o processo de quebra das moléculas e consequente a degradação pelo ozônio.

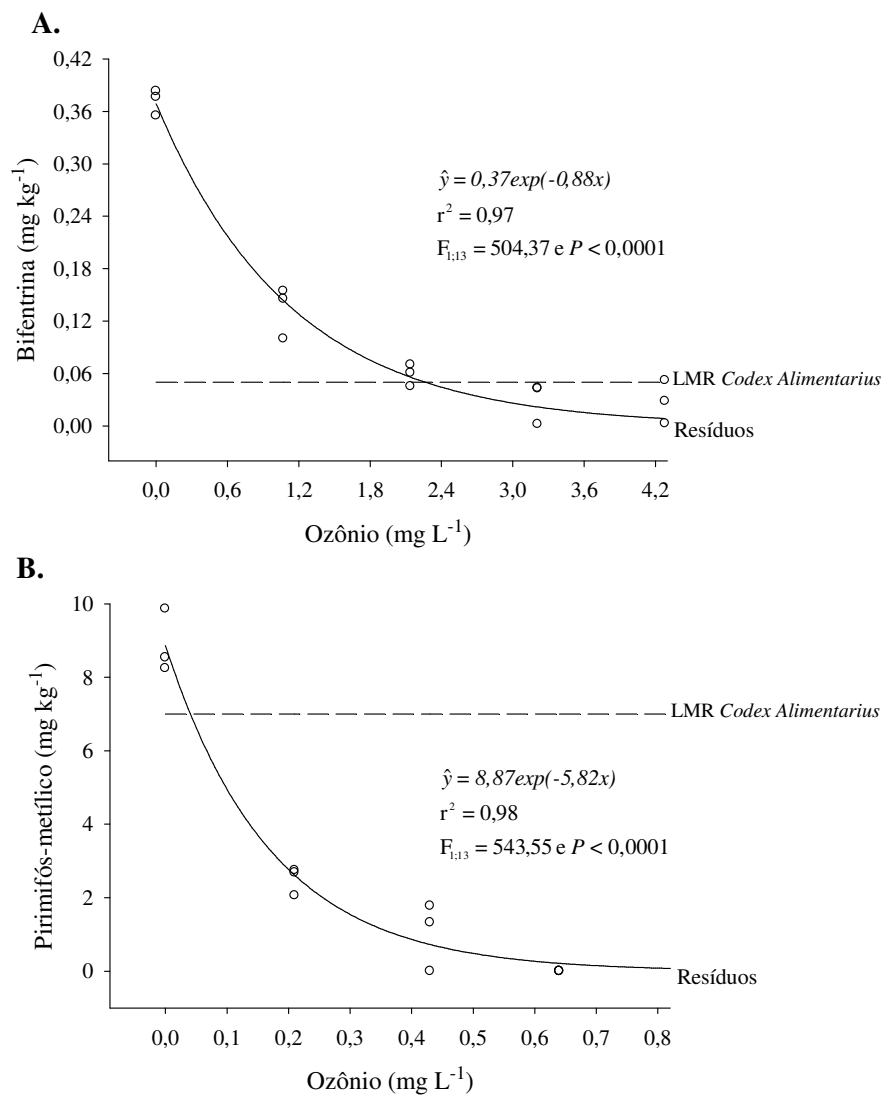


Figura 6. Concentração residual (mg kg^{-1}) de bifentrina (A) e pirimifós-metílico (B) em grãos de milho tratados com estes inseticidas e expostos ao ozônio em diferentes concentrações e fluxo contínuo de $1,0 \text{ L min}^{-1}$, durante $1,0 \text{ h}$. LMR = Limite Máximo de Resíduos.

Os resultados demonstram que o processo de degradação do pesticida se intensifica à medida que se aumenta a concentração do gás. A este respeito Miao et al. (2010) e Qiang et al. (2010) relataram que o aumento na concentração do ozônio pode

promover aumento na eficiência do processo de degradação de resíduos de agrotóxicos. Isto ocorre devido ao aumento no número de moléculas do O₃ e/ou radicais livres (O• – produzidos pela quebra da molécula O₃) disponíveis no meio, os quais interagem com as moléculas dos agrotóxicos e ocasionam sua quebra (Miao et al., 2010). No entanto, foi observado que nas maiores concentrações do ozônio utilizadas no estudo da degradação do pirimifós-metílico (0,6 e 0,9 mg L⁻¹) e da bifentrina (3,2 e 4,3 mg L⁻¹) as taxas de degradação dos inseticidas apresentaram valores muito próximos (Figura 6 e Tabela 1). Nestas concentrações é possível que os resíduos dos inseticidas encontrem-se retidos nas estruturas mais internas dos grãos, tornando-se pouco acessíveis ao ozônio.

Tabela 1. Concentração residual (mg kg⁻¹) e taxa de degradação (%) de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho fumigados com ozônio em diferentes concentrações e fluxo contínuo de 1,0 L min⁻¹, durante 1,0 h.

Ozônio (mg L ⁻¹)	Bifentrina		Pirimifós-metílico	
	Resíduos (mg kg ⁻¹)*	Degradação (%)	Resíduos (mg kg ⁻¹)*	Degradação (%)
0,0	0,37±0,01	00,0	8,88±5,06	000,0
0,2	–	–	2,50±2,22	71,9
0,4	–	–	1,55±5,40	82,5
0,6	–	–	< LD**	> 88,0
0,9	–	–	< LD**	> 88,0
1,1	0,13±0,02	64,1	–	–
2,1	0,06±0,01	84,2	–	–
3,2	0,04±0,01	89,9	–	–
4,3	0,02±0,01	93,1	–	–

* Média de três repetições ± erro padrão médio.

** LD = Limite de detecção do método ESL-PBT

4. CONCLUSÕES

A técnica ESL-PBT/CG-DCE desenvolvida é eficiente para a extração de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho. O método apresentou limites de detecção abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA e *Codex Alimentarius*, podendo ser empregado para análise de resíduos e traços de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho. A técnica otimizada e validada resultou num método simples, eficaz, com baixo consumo de solvente e de baixo custo.

A aplicação da técnica ESL-PBT otimizada e validada permitiu avaliar a taxa de degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho expostos ao ozônio. Com isto, concluiu-se que o ozônio mostrou-se eficiente na degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho, e que a eficiência na degradação dos inseticidas aumenta com o incremento na concentração do ozônio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhilash, P.C.; Jamil, S.; Singh, N. Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v.1176, n.1-2, p.43-47, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**: guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2012.
- ChemSpider. **The free chemical database**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 06 de abril de 2013.
- Costa, A.I.G. **Análise multirresíduos de agrotóxicos em alface por cromatografia gasosa**. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.
- Coutinho, C.F.B.; Tanimoto, S.T.; Galli, A.; Garbellini, G.S.; Takayama, M.; Amaral, R.B.; Mazo, L.H.; Avaca, L.A.; Machado, S.A.S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.15, n.1, p.65-72, 2005.
- 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, n.1, p.136-142, 2011.
- Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Rice, E.W.; Greenberg, A.E. **Standard methods for examination of water and wastewater**. Washington: APHA, 2005, 1368p.
- Faroni, L.R.A.; Silva, J.S. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. In: Silva, J.S. (ed.). **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2008, p.371-406.

- Fenoll, J.; Hellín, P.; López, J.; González, A.; Flores, P. Simplified multiresidue method for determination of pesticide residues in lettuce by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, n.2, p.643-651, 2007.
- Gobo, A.B.; Kurz, M.H.S.; Pizzutti, I.R.; Adaime, M.B.; Zanella, R. Development and validation of methodology for the determination of residues of organophosphorus pesticides in tomatoes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n.6, p.945-950, 2004.
- Goulart, S.M.; Alves, R.D.; Neves, A.A.; Queiroz, J.H.; Assis, T.C.; Queiroz, M.E.L.R. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v.671, n.1-2, p.41-47, 2010.
- Goulart, S.M.; Alves, R.D.; Paula, W.X.; Queiroz, J.H.; Neves, A.A.; Queiroz, M.E.L.R. Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, n.6, p.1154-1165, 2012.
- Goulart, S.M.; Queiroz, M.E.L.R.; Neves, A.A.; Queiróz, J.H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v.75, n.5, p.1320-1323, 2008.
- Huber, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, v.11, n.2, p.96-105, 1998.
- Hwang, E.S.; Cash, J.N.; Zabik, M.J. Postharvest treatments for the reduction of mancozeb in fresh apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.6, p.3127-3132, 2001.

- Ikeura, H.; Kobayashi, F.; Tamaki, M. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, n.1, p.956-959, 2011.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/...-8_03.pdf>. Acesso em: 12 de dezembro de 2012.
- Lanças, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima Editora, 2004, 62p.
- Lin, L.; Xie, M.; Liang, Y.; He, Y.; Chan, G.Y.S.; Luan, T. Degradation of cypermethrin, malathion and dichlorovos in water and on tea leaves with O₃/UV/TiO₂ treatment. **Food Control**, v.28, n.2, p.374-379, 2012.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrofit**: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 14 de janeiro de 2013.
- Marthe, D.B.; Bittencourt, L.M.; Queiroz, M.E.L.R.; Neves, A.A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1389-1393, 2010.
- Maštovská, K.; Lehotay, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v.1040, n.2, p.259-272, 2004.
- Miao, H.F.; Qin, F.; Tao, G.J.; Tao, W.Y.; Ruan, W.Q. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. **Chemosphere**, v.79, n.4, p.355-361, 2010.
- OriginLab Corporation. **Origin User Guide**, Versão 8.0. Northampton: OriginLab Corporation, 2007.

- Oviedo, M.T.P.; Toledo, M.C.F.; Vicente, E. Resíduos de agrotóxicos piretróides em hortaliças. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, n.1, p.9-18, 2003.
- Paschoal, J.A.R.; Rath, S.; Airoidi, 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.; 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.
- Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; Adaime, M.B.; Zanella, R. Quechers – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1620-1634, 2009.
- Qiang, Z.; Liu, C.; Dong, B.; Zhang, Y. Degradation mechanism of alachlor during direct ozonation and O₃/H₂O₂ advanced oxidation process. **Chemosphere**, v.78, n.5, p.517-526, 2010.
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Carol, H.C.; 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.
- Rissato, S.R.; Galhiane, M.S.; Souza, A.G.; Apon, B.M. Development of a supercritical fluid extraction method for simultaneous determination of organophosphorus, organohalogen, organonitrogen and pyrethroids pesticides in fruit and vegetables and its comparison with a conventional method by GC-ECD and GC-MS. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.16, n.5, p.1038-1047, 2005.
- Sanusi, A.; Guilet, V.; Montury, M. Advanced method using microwaves and solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the

- determination of pyrethroid residues in strawberries. **Journal of Chromatography A**, v.1046, n.1-2, p.35-40, 2004.
- SAS Institute. **SASSTAT User Guide**, Versão 8.0. Cary: SAS Institute, 2002.
- Sharifa, Z.; Man, Y.B.C.; Hamid, N.S.A.; Keat, C.C. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. **Journal of Chromatography A**, v.127, n.1-2, p.254-261, 2006.
- Silva, G.N.; Faroni, L.R.A.; Sousa, A.H.; Freitas, R.S. Bioactivity of *Jatropha curcas* L. to insect pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v.48, n.1, p.111-113, 2012.
- Silvério, F.O.; Silva, J.G.S.; Aguiar, M.C.S.; Cacique, A.P.; Pinho, G.P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.35, n.10, p.2052-2056, 2012
- SPSS. **Sigma Plot Users Guide**, Versão 7.0. Chicago: SPSS, 2001.
- Swartz, M.E.; Krull, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n.3, p.12-20, 1998.
- Thompson, M.; Stephen, L.R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.5, p.835-855, 2002.
- Trevizan, L.R.P.; Baptista, G.C. Resíduos de deltametrina em grãos de trigo e em seus produtos processados, determinados por cromatografia gasosa. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.199-203, 2000.
- Vázquez, P. P.; Mughari, A. R.; Galera, M. M. Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry

- derivatization and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v.607, n.1, p.74-82, 2008.
- Vieira, H.P.; Neves, A.A.; Queiroz, M.E.L.R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v.30, n.3, p. 535-540, 2007.
- Von Gunten, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v.37, n.7, p.1443-1467, 2003.
- White, N.D.G.; Leesch, J.G. Chemical control. In: Subramanyam, B.; Hagstrum, D.W. (Orgs.). **Integrated Management of Insects in Stored Products**. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. p.287-330.
- Wu, J.; Lan, C.; Chan, G.Y.S. Organophosphorus pesticide ozonation and formation of oxon intermediates. **Chemosphere**, v.76, n.9, p.1308-1314, 2009.
- Wu, J.; Luan, T.; Lan, C.; Lo, T.W.H.; Chan, G.Y.S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v.18, n.5, p.466-472, 2007.
- Zalom, F.G. Pesticide use practices in integrated pest management. In: Krieger, R.; Doull, J.; Ecobichon, D.; Gammon, D.; Hodgson, E.; Reiter, L.; Ross, J. (eds.). **Handbook of pesticide toxicology: Principles**. Academic Press: San Diego, 2001, p.276-284.

Capítulo 2

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DOS RESÍDUOS DE INSETICIDAS EM GRÃOS DE MILHO EXPOSTOS AO OZÔNIO

RESUMO

Este trabalho teve como o objetivo estudar a cinética de degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho sob exposição ao ozônio e avaliar o efeito da ozonização sobre a qualidade dos grãos de milho. Na realização dos ensaios utilizaram-se grãos de milho tratados com os inseticidas Prostore 25 CE[®] (bifentrina) e Actellic 500 CE[®] (pirimifós-metílico) nas doses de 16,0 e 24,0 mL t⁻¹, respectivamente. Estes grãos foram expostos ao ozônio na concentração de 0,86 mg L⁻¹ e fluxo contínuo de 1,0 L min⁻¹ em diferentes períodos de exposição. Os períodos de exposição ao ozônio variaram de 0,0 a 12,0 h para os grãos tratados com a bifentrina e de 0,0 a 1,5 h para os grãos tratados com o pirimifós-metílico. Os resíduos dos inseticidas foram extraídos dos grãos utilizando-se a técnica ESL-PBT. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons. Os dados das concentrações residuais da bifentrina e do pirimifós-metílico, em função do período de exposição ao ozônio, foram ajustados aos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem. As características físico-químicas avaliadas foram o teor de água, a condutividade elétrica e a capacidade de germinação dos grãos de milho. Observou-se que o ozônio foi eficiente na degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico, sendo o aumento na eficiência do processo de degradação dos inseticidas diretamente proporcional ao aumento no período de exposição ao gás. O modelo cinético que melhor se ajustou aos dados de degradação dos resíduos do pirimifós-metílico e da bifentrina pelo ozônio foi o de primeira ordem. Além disso, o ozônio não alterou as características qualitativas dos grãos de milho.

Palavras-chave: Bifentrina, pirimifós-metílico, resíduos, grãos

DEGRADATION KINETICS OF INSECTICIDES RESIDUES IN MAIZE GRAIN UNDER EXPOSURE TO OZONE

ABSTRACT

This work aimed to study the degradation kinetics of bifenthrin and pirimiphos-methyl in maize grains under exposure to ozone and evaluate the ozonation effect on the quality of maize grain. It was used maize grains free of pesticide residues. The insecticides used were ProStore 25 EC (bifenthrin) and Actellic 500 EC (pirimiphos-methyl) at 16.0 and 24.0 mL t⁻¹, respectively. The grains were exposed to ozone at a concentration of 0.86 mg L⁻¹ and continuous flow of 1.0 L min⁻¹ at different exposure periods. The periods of ozone exposure ranged from 0.0 to 12.0 h for grain treated with bifenthrin and from 0.0 to 1.5 h for grains treated with pirimiphos-methyl. The insecticides residues were extracted from the grain using the SLE-LTP (Chapter 1). The obtained extracts were analyzed by gas chromatography with electron capture detection. The data of bifenthrin and pirimiphos-methyl concentrations, depending on the ozone exposure, were adjusted to zero order, first and second order kinetic models. The maize physico-chemical characteristics measured were moisture content, electrical conductivity and germination. It was observed that ozone degradation was effective in bifenthrin and pirimiphos-methyl residues, being the increase in the degradation efficiency of the insecticides directly proportional to the increase in the exposure period of the gas. The kinetic model that best adjusted to pirimiphos-methyl and bifenthrin degradation by ozone was first order. In addition, ozone did not affect the maize qualitative characteristics.

Key words: Bifenthrin, pirimiphos-methyl, residues, grains

1. INTRODUÇÃO

O uso dos inseticidas residuais constitui uma importante estratégia na proteção dos grãos e produtos armazenados contra o ataque de insetos-praga (Arthur, 1996; Wakil et al., 2013). O principal objetivo na aplicação destes produtos consiste em manter a integridade dos grãos e garantir o abastecimento de alimentos por longo período após a colheita (Wakil et al., 2013). Os inseticidas comumente empregados com esta finalidade pertencem aos grupos químicos piretróides e organofosforados (Collins, 2006; Nighat et al., 2007). Estes inseticidas apresentam elevada toxicidade para os insetos, baixa toxicidade para os mamíferos e curta persistência no ambiente quando aplicados de forma adequada (Oviedo et al., 2003; Santos et al., 2007). No Brasil é registrado para o tratamento de grãos armazenados de milho diversos inseticidas, dentre os quais se encontram a bifentrina (piretróide) e o pirimifós-metílico (organofosforado) (MAPA, 2013).

Nas últimas décadas tem se observado a necessidade de doses de inseticidas cada vez maiores para o controle efetivo dos insetos, o que é decorrente do desenvolvimento de resistência pelos insetos-praga aos inseticidas (McDonough et al., 2011). Esta situação gera sérios riscos à população, uma vez que os resíduos dos inseticidas podem permanecer nos alimentos em níveis capazes de ocasionar danos à saúde dos consumidores (Wakil et al., 2013). Vale ressaltar que a principal forma de exposição da população aos inseticidas se dá pela presença de resíduos nos alimentos (Santos et al., 2007). As moléculas dos inseticidas sintéticos são facilmente degradadas pela temperatura e radiação solar. No entanto, quando os inseticidas são aplicados em doses muito superiores às recomendadas, o processo natural de quebra das moléculas não é suficiente para reduzir os resíduos a níveis considerados seguros para consumo, dentro do período de carência (Chen & Wang, 1996; Trevizan & Baptista, 2000).

A elevada exigência dos consumidores, decorrente de um novo padrão de consumo no mercado de alimentos, tem ocasionado o aumento na demanda por produtos isentos de resíduos de agrotóxicos (Tiwari et al., 2010; Wakil et al., 2013). Essa situação tem motivado o desenvolvimento de tecnologias capazes de degradar os resíduos dos agrotóxicos nos alimentos antes do consumo. As tecnologias modernas adotadas com este fim incluem o uso de radiação ultra-violeta (UV), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido de titânio (TiO_2) e o gás ozônio (O_3). Todavia, o uso do ozônio vem se destacando, graças ao elevado poder oxidativo e facilidade de obtenção deste gás (Ikeura et al., 2011; Lin et al., 2012). Alguns estudos têm apontado o potencial do ozônio como agente de degradação de resíduos de agrotóxicos (Wu et al., 2009; Gabler et al., 2010) e micotoxinas (Alencar et al., 2012) em produtos vegetais.

A eficiência do ozônio na degradação de resíduos de agrotóxicos em produtos vegetais vem sendo relatada em diversos trabalhos. A este respeito, ressalta-se a degradação de pesticidas em alface (Ikeura et al., 2011), folhas de chá frescas (Lin et al., 2012), maçã (Hwang et al., 2001), morango (Ikeura et al., 2011), nabo (Wu et al., 2007) e tomate cereja (Ikeura et al., 2011), dentre outros produtos. No entanto, não há relatos sobre o uso do ozônio para a degradação de resíduos de pesticidas em grãos armazenados. Em decorrência disto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar a cinética de degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em grãos de milho sob exposição ao ozônio. Aliado a isto, avaliou-se o efeito do processo de ozonização sobre a qualidade dos grãos de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola e no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química, ambos na Universidade Federal de

Viçosa (UFV), Campus Viçosa-MG. Utilizaram-se grãos de milho (*Zea mays* L.), isentos de inseticidas, produzidos na safra de verão (2011/2012) no município de Senador Firmino-MG. Os grãos apresentavam-se com as seguintes características: teor de água = 12,0% base úmida (b.u.); infestação por insetos-praga = 1,0 %; massa específica aparente = 714,6 kg m⁻³; condutividade elétrica = 8,5 μS cm⁻¹ g⁻¹; e capacidade de germinação = 91,8%. Estes grãos foram tratados com os inseticidas bifentrina e pirimifós-metílico e, em seguida, expostos ao ozônio para a degradação dos resíduos dos inseticidas.

2.1. Aplicação dos inseticidas na massa de grãos de milho

Os grãos de milho foram espalhados sobre lona plástica, em camada fina, e tratados com os princípios ativos bifentrina e pirimifós-metílico. Os princípios ativos foram aplicados, separadamente, sobre os grãos com auxílio de um pulverizador manual. Os inseticidas utilizados foram o Prostore 25 CE e o Actellic 500 CE, cujos princípios ativos são a bifentrina e o pirimifós-metílico, respectivamente. As doses utilizadas foram 16,0 mL t⁻¹ para o Prostore 25 CE e 24,0 mL t⁻¹ para o Actellic 500 CE. Estas doses fornecem as concentrações teóricas de bifentrina e pirimifós-metílico iguais a 0,4 mg kg⁻¹ e 12,0 mg kg⁻¹, respectivamente. A aplicação dos inseticidas foi feita seguindo a recomendação do fabricante, sendo cada dose diluída em 1,0 L de água e as caldas pulverizadas sobre os grãos. Em seguida, os grãos foram homogeneizados com auxílio de um ródio e deixados em repouso por cerca de 6 h, para que fosse evaporado o excesso de água deixado pela calda inseticida nos grãos. Após esse período a massa de grãos foi dividida em amostras de 1,0 kg, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração até o momento da ozonização.

2.2. Ozonização dos grãos de milho

As amostras de grãos de milho tratadas com os inseticidas foram expostas ao ozônio, individualmente, no interior de recipientes cilíndricos de PVC (0,20 x 0,25 m). Nas tampas inferior e superior destes cilindros foram instaladas conexões para entrada e saída do ozônio, respectivamente. Em cada recipiente foi instalada uma tela metálica a 10,0 cm do fundo para sustentação dos grãos e formação de um *plenum*, visando melhor distribuição do gás. O ozônio foi aplicado na concentração de 0,86 mg L⁻¹ e fluxo contínuo de 1,0 L min⁻¹ em diferentes períodos de exposição. Os grãos contendo bifentrina foram expostos ao ozônio em períodos de tempo variando de 0,0 a 12,0 h e intervalos regulares de 1,0 h. Os grãos contendo pirimifós-metílico foram expostos ao ozônio por períodos de tempo compreendidos entre 0,0 e 1,0 h, em intervalos regulares de 0,17 h. A concentração do ozônio foi quantificada, utilizando-se o método iodométrico, por titulação indireta, conforme recomendado pela International Ozone Association (Eaton et al., 2005). Como controle, os grãos de milho tratados com os inseticidas foram expostos ao oxigênio nas mesmas condições e períodos utilizados para ozonização (Figura 1).

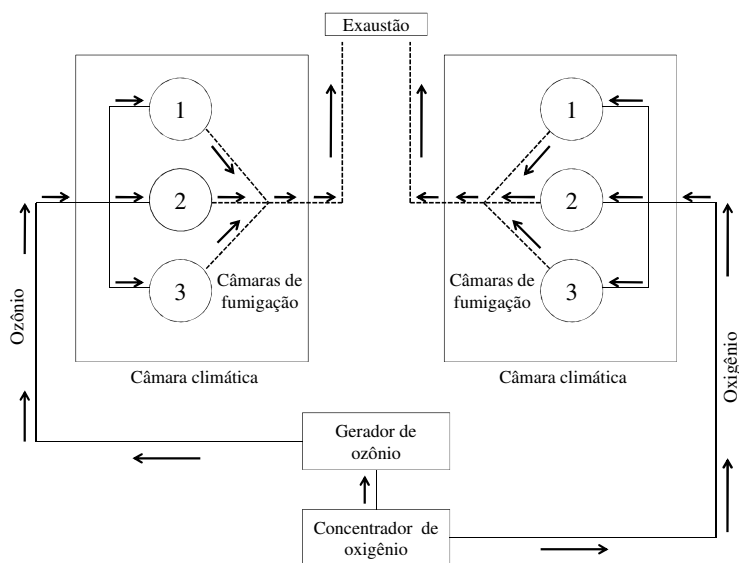


Figura 1. Esquema da fumigação dos grãos de milho com o gás ozônio (adaptado de Sousa, 2007).

2.3. Determinação dos resíduos dos inseticidas nos grãos de milho

As amostras de grãos de milho (ozonizadas ou expostas ao oxigênio) foram retiradas das câmaras de fumigação e homogeneizadas, separadamente, em homogeneizador tipo *Boerner*. Em seguida, cada amostra foi triturada em moinho de facas (Fritsch Pulverisette 14, Oberstein, Alemanha) até a obtenção de um produto com consistência de farinha. Este produto foi submetido ao processo de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura, para quantificação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico remanescentes nos grãos. A técnica desenvolvida permite recuperações de bifentrina na faixa de 73,2 a 104,3% e de pirimifós-metílico na faixa de 98,4 a 105,9%.

O preparo das amostras para extração dos princípios ativos bifentrina e pirimifós-metílico consistiu em pesar uma massa de 2,0000 g do milho triturado, acondicionar este material em frascos de vidro transparente com capacidade para 22,0 mL e acrescentar 4,0 mL de água destilada e 8,0 mL de acetonitrila. Esta mistura foi agitada em vórtex (Certomate® MV, São Paulo, Brasil) durante 1,0 min e mantida em freezer (-20 °C) por cerca de 3 h. Decorrido este período, a fase aquosa foi coletada e passada através de papel filtro contendo 2,0 g de sulfato de sódio anidro, para eliminar a presença de água no extrato. Após a filtragem, recolheu-se uma alíquota de 1,5 mL do extrato obtido, transferiu-se para um *vial* com capacidade para 1,8 mL e acrescentou-se 15 µL de parationa metílica (padrão interno).

As análises cromatográficas dos extratos foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-17-A, Kyoto, Japão) equipado com detector por captura de elétrons (DCE). Utilizou-se uma coluna cromatográfica capilar do tipo DB-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), com 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. As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes:

- a) Programação de aquecimento da coluna para bifentrina
150 °C (1,5 min) $\xrightarrow{40\text{ °C min}^{-1}}$ 220 °C (2 min) $\xrightarrow{40\text{ °C min}^{-1}}$ 290 °C (3 min)
- b) Programação de aquecimento da coluna para pirimifós-metílico
150 °C (1 min) $\xrightarrow{30\text{ °C min}^{-1}}$ 210 °C $\xrightarrow{2\text{ °C min}^{-1}}$ 220 °C $\xrightarrow{40\text{ °C min}^{-1}}$ 290 °C (1 min)
- c) Tempo total de análise: 10 min
- d) Temperaturas do injetor e do detector: 280 e 300 °C
- e) Volume injetado: 1,0 µL
- f) Divisão de fluxo: 1:5
- g) Gás de arraste: nitrogênio
- h) Vazão do gás de arraste: 1,2 mL min⁻¹ para bifentrina e 1,0 mL min⁻¹ para pirimifós-metílico

2.4. Cinética de degradação dos inseticidas

A literatura reporta que o processo de degradação de compostos orgânicos pelo ozônio normalmente ajusta-se a modelos cinéticos de primeira ordem em relação aos compostos orgânicos (Chiron et al., 1998; Herrmann et al., 1999; Farre et al., 2005; Chelme-Ayala et al., 2010; Bourgin et al., 2011). No entanto, alguns autores relatam ajustes a este processo de modelos cinéticos de ordem zero (Farre et al., 2005) e segunda ordem (Chelme Ayala et al., 2010). Em decorrência disto, os níveis de resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico em função da exposição ao ozônio foram ajustados aos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem em relação aos inseticidas (Tabela1). A escolha do modelo, que melhor se ajustou aos dados, foi feita com base no valor do coeficiente de determinação e significância dos parâmetros da equação referentes ao coeficiente linear e inclinação da curva.

Tabela 1. Modelos cinéticos ajustados à degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico pelo ozônio.

Ordem	Modelos de cinética	Equação
Zero	$C = C_0 - kt$	(1)
Primeira	$\ln C = \ln C_0 - kt$	(2)
Segunda	$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + kt$	(3)

em que:

C = concentração dos inseticidas em um determinado tempo (mg kg^{-1});

C_0 = concentração dos inseticidas no tempo inicial (mg kg^{-1});

k = constante da taxa de degradação; e

t = tempo (h).

2.5. Avaliação da qualidade dos grãos de milho

A avaliação da qualidade dos grãos foi realizada imediatamente após a aplicação dos inseticidas e ao fim de cada período de exposição dos grãos ao ozônio, em três repetições. As análises realizadas foram de teor de água, condutividade elétrica e capacidade de germinação dos grãos.

O teor de água dos grãos foi determinado utilizando-se o método de estufa, segundo as normas descritas pela ASAE (2004), que prescrevem a utilização de estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 103 ± 1 °C, durante 72 h. Utilizaram-se três repetições de 30 g de grãos para cada tratamento. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem base úmida (b.u.)

A condutividade elétrica da solução contendo grãos de milho foi medida utilizando-se o Sistema de Copo ou Condutividade de Massa (Vieira & Carvalho, 1994).

Os testes foram realizados com três repetições de 50 grãos, retirados aleatoriamente de cada tratamento. O valor da condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) foi dividido pela massa total dos grãos, obtendo-se o valor expresso em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de massa total.

O percentual de germinação foi determinado pelo teste-padrão de germinação conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), com 50 grãos por amostras, utilizando-se quatro repetições. A contagem foi realizada aos sete dias, considerando-se o número de plântulas normais, e os dados expressos em porcentagem média de germinação.

2.6. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas, sendo as parcelas compostas pelos tratamentos com o gás ozônio e o controle e as subparcelas compostas pelos períodos de exposição ao ozônio. O experimento foi conduzido com três repetições para cada interação entre tratamento e período de exposição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software SAS (SAS Institute, 2002). Em seguida, foram submetidos a ajustes de modelos matemáticos por meio de análise de regressão, utilizando-se o software SigmaPlot (SPSS, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cinética de degradação dos inseticidas

Os níveis dos resíduos do piretróide bifentrina variaram significativamente entre os grãos expostos ao ozônio e ao oxigênio ($F_{1,2}=382,25$ e $P=0,0026$). Também houve variação significativa entre os períodos de exposição a estes tratamentos ($F_{12,50}=11,45$ e $P<0,0001$), bem como interação significativa entre os tratamentos e períodos de exposição ($F_{12,50}=15,01$ e $P<0,0001$). Observou-se que a concentração de bifentrina nos

grãos de milho reduziu significativamente ao longo do período de exposição ao ozônio, porém manteve-se constante no controle (Figura 2A). A concentração do inseticida nos grãos ozonizados apresentou redução de 0,38 para 0,05 mg kg⁻¹, o que corresponde a uma taxa de 87% de degradação do princípio ativo. Os resíduos remanescentes nos grãos ao final da ozonização foram equivalentes ao LMR estabelecido pelo *Codex Alimentarius* como seguro para consumo humano.

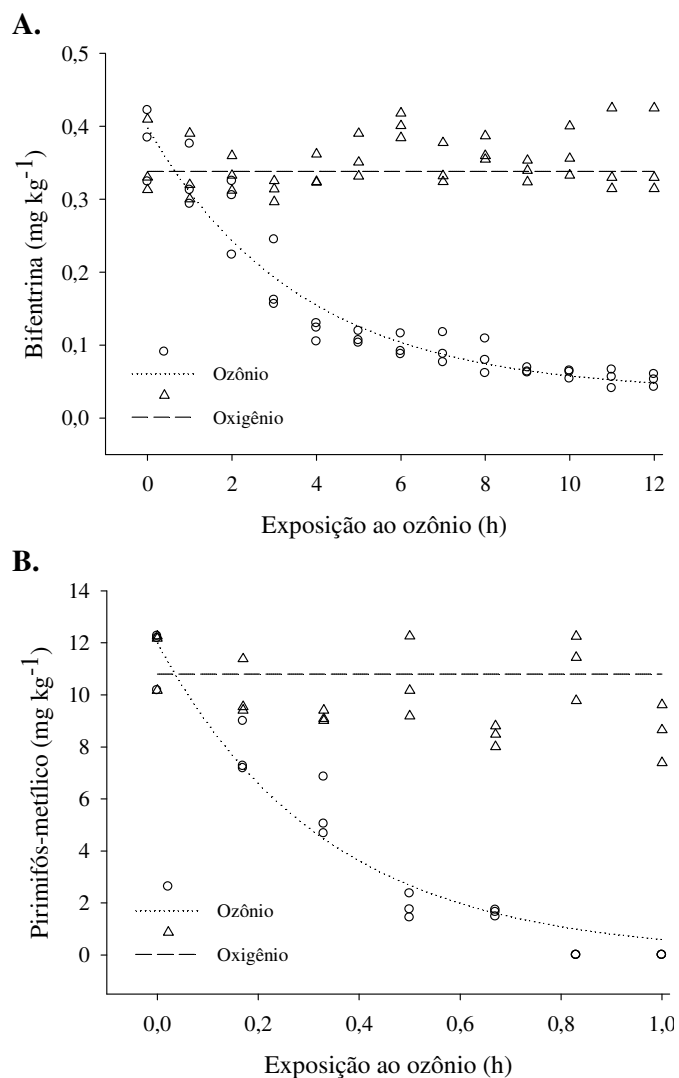


Figura 2. Concentração residual de bifentrina (A) e pirimifós-metílico (B) em função do período de exposição ao ozônio (0,86 mg L⁻¹) e ao oxigênio. As curvas traçadas não constituem ajustes de modelos, somente representam a tendência dos dados.

A concentração residual do organofosforado pirimifós-metílico variou significativamente entre os grãos de milho expostos ao ozônio e ao oxigênio ($F_{1,2}=1200,00$ e $P=0,0008$). Os níveis de resíduos deste inseticida também variaram significativamente entre os períodos de exposição ($F_{6,26}=30,44$ e $P<0,0001$). Além disso, verificou-se interação significativa entre a exposição aos gases e períodos de exposição ($F_{6,26}=18,11$ e $P<0,0001$). Todavia, a variação ocorrida ao longo do período de exposição foi significativa apenas nos grãos ozonizados (Figura 2B). A concentração residual média do pirimifós-metílico nos grãos ozonizados apresentou uma queda de 11,53 para valores abaixo de $1,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ($< \text{LD}$), o que corresponde a 91% de degradação do princípio ativo.

Estes resultados se devem ao elevado poder oxidativo do ozônio, o qual tem sido reportado na literatura como eficiente agente de degradação de resíduos de diversos agrotóxicos, incluindo piretróides (Wu et al., 2007; Lin et al., 2012) e organofosforados (Wu et al., 2009; Meng et al., 2010; Yang et al., 2010; Muñoz et al., 2011). Vale destacar que a eficiência do ozônio na degradação de diversos pesticidas está relacionada à capacidade que este gás possui em reagir, sobretudo, com estruturas moleculares contendo duplas ligações, compostos aromáticos e aminas (von Guten, 2003). Os inseticidas bifentrina e pirimifós-metílico apresentam em suas estruturas moleculares tanto cadeias aromáticas quanto radicais contendo duplas ligações (Figura 3), os quais constituem sítios de ação para o ozônio e justificam a eficiência do gás no processo de remoção dos resíduos destes inseticidas.

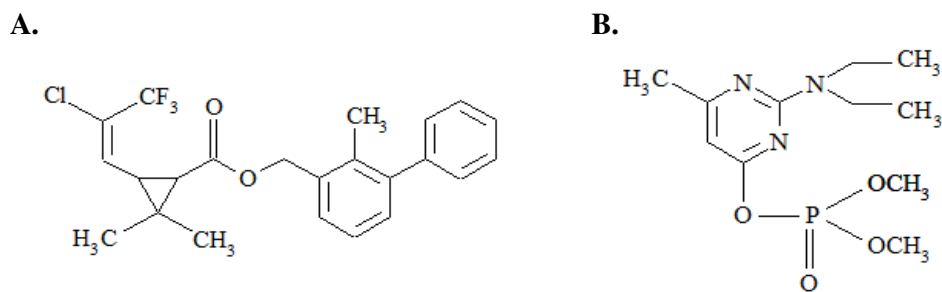


Figura 3. Estrutura molecular dos inseticidas bifentrina (A) e pirimifós-metílico (B).

Na Tabela 2, encontram-se os modelos cinéticos ajustados aos dados de degradação da bifentrina e do pirimifós-metílico em função do período de exposição ao gás ozônio. No estudo da cinética de degradação da bifentrina pelo ozônio, verificou-se que o modelo cinético de segunda ordem apresentou maior coeficiente de determinação ($r^2 = 0,96$) em relação aos demais. Por outro lado, o modelo cinético de primeira ordem também apresentou coeficiente de determinação elevado ($r^2 = 0,91$), consistindo no segundo maior valor de r^2 . Considerando-se que ambos os modelos são lineares e que a diferença nos valores de r^2 entre os modelos é pequena, pode-se utilizar tanto o de primeira como o de segunda ordem para descrever o processo de degradação da bifentrina pelo ozônio.

Tabela 2. Modelos cinéticos ajustados à degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico nos grãos de milho, em função do período de exposição ao ozônio.

Ordem	Bifentrina		Pirimifós-metílico	
	Equação linearizada	r^2	Equação linearizada	r^2
Zero	$C = 0,2982 - 0,0254t$	0,79	$C = 9,8527 - 11,6115t$	0,90
Primeira	$\ln C = -1,1513 - 0,1677t$	0,91	$\ln C = 2,5347 - 3,2144t$	0,94
Segunda	$1/C = 1,7059 + 1,4498t$	0,96	$1/C = 0,0159 - 0,0147t$	0,88

Com relação ao estudo da cinética de degradação do pirimifós-metílico pelo ozônio, observou-se que o modelo de primeira ordem apresentou maior coeficiente de determinação ($r^2 = 0,94$) em relação aos demais modelos testados (Tabela 2), podendo ser considerado como o modelo que melhor representa o processo de degradação do pirimifós-metílico pelo gás. Com base neste resultado e no fato de que o modelo cinético de primeira ordem, também apresenta bom ajuste à degradação da bifentrina pelo ozônio, optou-se por utiliza-lo para representar o processo de degradação de ambos

os inseticidas nos grãos de milho expostos ao ozônio (Figura 3). Estes resultados são reforçados pelas informações encontradas na literatura (Chiron et al., 1998; Herrmann et al., 1999; Farre et al., 2005; Chelme-Ayala et al., 2010; Bourgin et al., 2011), onde é frequente o relato de ajustes de modelos cinéticos de primeira ordem para descrever o processo de degradação de pesticidas pelo ozônio. O modelo cinético ajustado neste estudo descreve a linearização dos dados por meio do logaritmo neperiano (ln) da concentração do inseticida em função do período de exposição ao ozônio. A equação obtida apresenta constante de degradação (k) negativa, indicando que o processo de degradação é diretamente proporcional ao aumento no período de exposição ao ozônio.

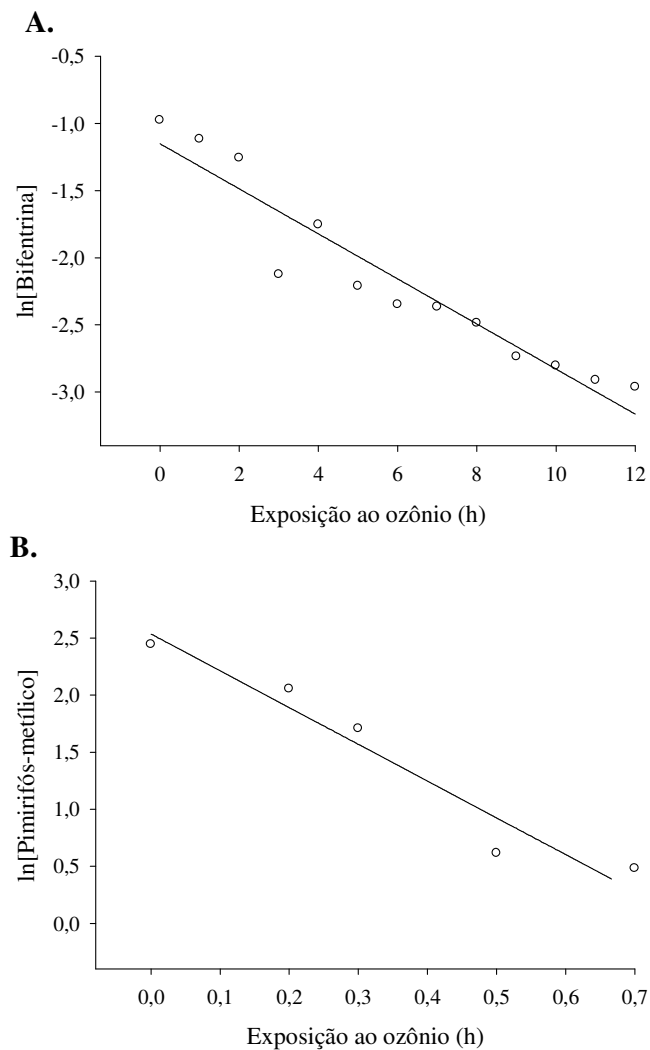


Figura 4. Modelos cinéticos ajustados à concentração residual de bifentrina (A) e pirimifós-metílico (B) em função do período de exposição ao ozônio.

Os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) calculados para bifentrina e pirimifós-metílico ($t_{1/2} = \ln(2)/k$) nos grãos de milho expostos ao ozônio, segundo o modelo cinético de primeira ordem linearizado foram 4,1 e 0,2 h, respectivamente. Tal resultado se deve às diferenças nas estruturas moleculares da bifentrina e do pirimifós-metílico, as quais conferem propriedades específicas a cada inseticida. Os piretróides são pouco voláteis e altamente lipofílicos quando comparados aos organofosforados (Zalom, 2001; Manna et al., 2004; Santos et al., 2007; Chen et al., 2012). A alta lipofilicidade pode manter as moléculas da bifentrina fortemente adsorvidas aos lipídios presentes nos grãos de milho. A baixa volatilidade, por sua vez, pode dificultar o processo de dissipação dos resíduos deste inseticida nos grãos de milho (Santos et al., 2007). Estas características podem dificultar o processo de quebra das moléculas de bifentrina pelo ozônio e, conseqüentemente, aumentar o período de exposição necessário para redução dos resíduos do inseticida nos grãos, a níveis considerados seguros para o consumo. Por outro lado, os organofosforados são bem reativos quimicamente quando comparados aos piretróides, sendo facilmente degradados por fatores químicos (Zalom, 2001). Esta característica pode ter promovido maior interação do ozônio com o pirimifós-metílico do que com a bifentrina. Isto pode favorecer o processo de quebra do pirimifós-metílico pelo ozônio, justificando a elevada degradação em menor período de tempo.

3.2. Avaliação da qualidade dos grãos de milho

As características físico-químicas avaliadas não variaram significativamente entre os grãos expostos ao ozônio e ao oxigênio, tanto no processo de remoção da bifentrina (teor de água: $F_{1,2}=1,00$ e $P=0,4226$; condutividade elétrica $F_{1,2}=0,632$ e $P=0,5101$; germinação: $F_{1,2}=4,197$ e $P=0,1770$) como no processo de remoção do pirimifós-metílico (teor de água: $F_{1,2}=4,00$ e $P=0,1835$; condutividade elétrica $F_{1,2}=0,750$ e $P=0,4778$; germinação: $F_{1,2}=0,00$ e $P=0,9978$). Aliado a isto, as variáveis

analisadas também não variaram significativamente entre os períodos de exposição aos gases, permanecendo inalteradas ao final dos processos aplicados tanto para a degradação da bifentrina (teor de água: $F_{1,6}=2,455$ e $P=0,1682$; condutividade elétrica $F_{1,6}=28,710$ e $P=0,1700$; germinação: $F_{1,6}=19,183$ e $P=0,4700$) como para a degradação do pirimifós-metílico (teor de água: $F_{1,6}=4364$ e $P=0,8170$; condutividade elétrica: $F_{1,6}=30,375$ e $P=0,1500$; germinação: $F_{1,6}=0,878$ e $P=0,3849$).

Tabela 3. Características físico-químicas dos grãos de milho expostos ao ozônio e oxigênio para degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico.

Variável	Período	Bifentrina		Pirimifós-metílico	
		Ozônio	Controle	Ozônio	Controle
Teor de água (% b.u.)	Inicial	12,3Aa	12,3Aa	11,9Aa	11,9Aa
	Final	11,7Aa	12,0Aa	11,3Aa	12,0Aa
C. E. ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)*	Inicial	8,7Aa	8,7Aa	9,0Aa	9,0Aa
	Final	13,0Aa	14,0Aa	9,7Aa	10,0Aa
Germinação (%)	Inicial	80,0Aa	80,0Aa	87,0Aa	87,0Aa
	Final	84,0Aa	85,0Aa	86,0Aa	86,0Aa

* C.E. – condutividade elétrica

** Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

Os valores observados encontram-se dispostos na Tabela 3, a qual demonstra a comparação entre os valores de teor de água, condutividade elétrica e germinação dos grãos de milho em dois níveis. O primeiro nível (linhas) demonstra a comparação entre os grãos expostos ao ozônio e oxigênio; e o segundo nível (colunas) demonstra a comparação entre os períodos de exposição em cada um dos tratamentos utilizados. Os

resultados obtidos corroboram os observados em estudos anteriores, onde foi relatado que o ozônio não afetou a qualidade dos grãos de milho (Pereira et al., 2007) e amendoim (Alencar et al., 2011). Em decorrência do exposto, sugere-se o uso do ozônio como uma importante ferramenta para a remoção de resíduos de agrotóxicos em grãos e subprodutos armazenados.

4. CONCLUSÕES

O ozônio mostrou-se eficiente na degradação dos resíduos de bifentrina e pirimifós-metílico nos grãos de milho, sendo o aumento na eficiência do processo de degradação dos inseticidas diretamente proporcional ao aumento no período de exposição ao gás. O modelo cinético que melhor explica o processo de degradação da bifentrina e do pirimifós-metílico foi o de primeira ordem, o qual é linearmente representado pelo logaritmo natural (\ln) da concentração dos inseticidas em função do período de exposição ao gás. Este modelo apresenta constante de degradação negativa, a qual indica que quanto maior é o período de exposição ao ozônio maior é a taxa de degradação da bifentrina e do pirimifós-metílico. Além disto, o ozônio não alterou o teor de água, a condutividade elétrica e a capacidade de germinação dos grãos de milho. Desta forma, o uso do ozônio torna-se atraente e promissor para o tratamento de resíduos de agrotóxicos em produtos armazenados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alencar, E.R.; Faroni, L.R.A.; Soares, N.F.F.; Carvalho, M.C.S.; Pereira, K.F. Effect of the ozonation process on the quality of peanuts and crude oil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.2, p.154-160, 2011.
- Alencar, E.R.; Faroni, L.R.A.; Soares, N.F.F.; Silva, W.A.; Carvalho, M.C.S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, n.4, p.899-905, 2012.
- Arthur, F.H. Grain protectants: current status and prospects for the future. **Journal of Stored Products Research**, v.32, n.4, p.293-302, 1996.
- ASAE. American Society of Agricultural Engineers. **Moisture measurement: unground grain and seeds**. St. Joseph: ASAE, 2004. p.567.
- Bourgin, M.; Violleau, F.; Debrauwer, L.; Albert, J. Ozonation of imidacloprid in aqueous solutions: reaction monitoring and identification of degradation products. **Journal of Hazardous Materials**, v.190, n.1-3, p.60-68, 2011.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análises de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.
- Chelme-Ayala, P.; Gamal El-Din, M.; Smith, D.W. Kinetics and mechanism of the degradation of two pesticides in aqueous solutions by ozonation. **Chemosphere**, v.78, n.5, p.557-562, 2010.
- Chen, S.; Luo, J.; Hu, M.; Geng, P.; Zhang, Y. Microbial detoxification of bifenthrin by a novel yeast and its potential for contaminated soils treatment. **Plos One**, v.7, n.2, e30862, 2012.
- Chen, Z.; Wang, Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v.754, n.1-2, p.367-395, 1996.

- Chiron, S.; Rodriguez, A.; Fernandez-Alba, A. Application of gas and liquid chromatography-mass spectrometry to the evaluation of pirimifós methyl degradation products in industrial water under ozone treatment. **Journal of Chromatography A**, v.823, n.1-2, p.97-107, 1998.
- Collins, D.A. A review of alternatives to organophosphorus compounds for the control of storage mites. **Journal of Stored Products Research**, v.42, n.4, p.395-426, 2006.
- Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Rice, E.W.; Greenberg, A.E. **Standard methods for examination of water and wastewater**. Washington: APHA, 2005, 1368p.
- Farré, M.J.; Franch, M.I.; Malato, S.; Ayllón, J.A.; Peral, J.; Doménech, X. Degradation of some biorecalcitrant pesticides by homogeneous and heterogeneous photocatalytic ozonation. **Chemosphere**, v.58, n.8, p.1127-1133, 2005.
- Gabler, F.M.; Smilanick, J.L.; Mansour, M.F.; Karaca, H. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.55, n.2, p.85-90, 2010.
- Herrmann, J.M.; Guillard, C.; Arguello, M.; Aguera, A.; Tejedor, A.; Piedra, L. Fernández-Alba, A. Photocatalytic degradation of pesticide pirimifós-methyl determination of the reaction pathway and identification of intermediate products by various analytical methods. **Catalysis Today**, v.54, n.2-3, p.353-367, 1999.
- Hwang, E.S.; Cash, J. N.; Zabik, M.J. Postharvest treatments for the reduction of mancozeb in fresh apples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.6, p.3127-3132, 2001.
- Ikeura, H.; Kobayashi, F.; Tamaki, M. Removal of residual pesticides in vegetables using ozone microbubbles. **Journal of Hazardous Materials**, v.186, n.1, p.956-959, 2011.

- Lin, L.; Xie, M.; Liang, Y.; He, Y.; Chan, G.Y.S.; Luan, T. Degradation of cypermethrin, malathion and dichlorovos in water and on tea leaves with O₃/UV/TiO₂ treatment. **Food Control**, v.28, n.2, p.374-379, 2012.
- Manna, S.; Bhattacharyya D.; Mandal, T.K.; Dey, S. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. **Journal of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.133-136, 2004.
- MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrofit**: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 14 de janeiro de 2013.
- McDonough, M.X.; Mason, L.J.; Woloshuk, C.P. Susceptibility of stored product insects to high concentrations of ozone at different exposure intervals. **Journal of Stored Products Research**, v.47, n.4, p.306-310, 2011.
- Meng, J.; Yang, B.; Zhang, Y.; Dong, X.; Shu, J. Heterogeneous ozonation of suspended malathion and chlorpyrifos particles. **Chemosphere**, v.79, n.4, p.394-400, 2010.
- Muñoz, A.; Vera, T.; Sidebottom, H.; Mellouki, A.; Borrás, E.; Ródenas, M.; Clemente, E.; Vázquez, M.. Studies on the Atmospheric Degradation of Chlorpyrifos-Methyl. **Environmental Science & Technology**, v.45, n.5, p.1880-1886, 2011.
- Nighat, S.A.; Munir, M.; Ali, S.S.; Shakoori, A.R. Efficacy of mixtures of an organophosphate malathion and a synthetic pyrethroid deltamethrin against lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. **Pakistan Journal of Zoology**, v.39, p.179-184, 2007.
- Oviedo, M.T.P.; Toledo, M.C.F.; Vicente, E. Resíduos de agrotóxicos piretróides em hortaliças. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, n.1, p.9-18, 2003.

- Pereira, A.M.; Faroni, L.R.A.; Sousa, A.H.; Urruchi, W.I.; Roma, R.C.C. Efeito imediato e latente da fumigação com ozônio na qualidade dos grãos de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.32, n.2, p.100-110, 2007.
- Santos, M.A.T.; Areas, M.A.; Reyes, F.G. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.3, p.339-349, 2007.
- SAS Institute. **SASSTAT User Guide**, Versão 8.0. Cary: SAS Institute, 2002.
- Sousa, A.H. **Ozônio como alternativa de manejo de resistência à fosfina**. 2007. 60f. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- SPSS. **Sigma Plot Users Guide**, Versão 7.0. Chicago: SPSS, 2001.
- Tiwari, B.K.; Brennan, C.S.; Curran, T.; Gallagher, E.; Cullen, P.J.; O'Donnell, C.P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v.51, n.3, p.248-255, 2010.
- Trevizan, L.R.P.; Baptista, G.C. Resíduos de deltametrina em grãos de trigo e em seus produtos processados, determinados por cromatografia gasosa. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.199-203, 2000.
- Vieira, R.D.; Carvalho, N.M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.
- Von Gunten, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v.37, n.7, p.1443-1467, 2003.
- Wakil, W.; Riasat, T.; Lord, J.C. Effects of combined thiamethoxam and diatomaceous earth on mortality and progeny production of four Pakistani populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) on wheat, rice and maize. **Journal of Stored Products Research**, v.52, n.1, p.28-35, 2013.
- Wu, J.; Lan, C.; Chan, G.Y.S. Organophosphorus pesticide ozonation and formation of oxon intermediates. **Chemosphere**, v.76, n.9, p.1308-1314, 2009.

- Wu, J.; Luan, T.; Lan, C.; Lo, T.W.H.; Chan, G.Y.S. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. **Food Control**, v.18, n.5, p.466-472, 2007.
- Yang, B.; Zhang, Y.; Meng, J.; Gan, J.; Shu, J. Heterogeneous reactivity of suspended pirimiphos-methyl particles with ozone. **Environmental Science & Technology**, v.44, n.9, p.3311-3316, 2010.
- Zalom, F.G. Pesticide use practices in integrated pest management. In: Krieger, R.; Doull, J.; Ecobichon, D.; Gammon, D.; Hodgson, E.; Reiter, L.; Ross, J. (eds.). **Handbook of pesticide toxicology: Principles**. Academic Press: San Diego, 2001, p.276-284.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ozônio é uma tecnologia promissora para o tratamento pós-colheita de produtos vegetais. Diversas pesquisas apontam este gás como uma importante ferramenta para o controle de insetos-praga e microorganismos em grãos armazenados. Neste sentido, o ozônio torna-se atraente porque além de ser eficiente no controle das pragas também não altera as características qualitativas dos grãos, bem como não apresenta risco de desenvolvimento de resistência em insetos. A comprovada eficiência do ozônio na degradação dos resíduos de inseticidas em grãos de milho vem se somar às potencialidades do ozônio. Os resultados obtidos, aliado as informações disponíveis na literatura, confirmam a versatilidade do ozônio, o qual pode ser empregado com objetivos múltiplos. No entanto, é válido destacar que a aplicação prática do ozônio requer uma série de cuidados, entre os quais respeitar o tempo máximo de exposição humana ao gás, estabelecido pelas leis trabalhistas, ser aplicado em estruturas não oxidantes e o devido cuidado com o resíduo liberado para o ambiente.

Com relação à aplicação para a degradação de resíduos de agrotóxicos em alimentos é necessário que se busque conhecer os produtos formados pela degradação dos princípios ativos por ozonização. A falta de informações a respeito da toxicidade e persistência dos produtos da degradação não eliminam os riscos oferecidos pelos agrotóxicos à sociedade e ao meio ambiente. Assim sendo, é importante a realização de trabalhos futuros para identificação e estudo da toxicidade e persistência dos produtos da degradação da bifentrina e do pirimifós-metílico pelo ozônio em grãos armazenados. Aliado a isto, é importante o estudo da viabilidade de aplicação do ozônio em unidades armazenadoras e processadoras, para a degradação dos resíduos de agrotóxicos em grãos e subprodutos armazenados.