RESÍDUOS DE BENOMIL EM MORANGOS TRATADOS PRÉ-COLHEITA (SOLO) E PÓS-COLHEITA (IMERSÃO) E ARMAZENADOS A 4°C *

SILVANA DE PAULA QUINTÃO SCALON **

JORGE JOSÉ DO VALE OLIVEIRA ***

MÁRIO SOBRAL DE ABREU ****

ADIMILSON BOSCO CHITARRA ****

Morangos tratados pré-colheita (solo) e pós-colheita (imersão) com Benomil, nas dosagens de 600 e 1200 mg/Kg, foram armazenados a 4°C e 90% UR, sob atmosfera modificada por 6 dias. Os resíduos de Benomil foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível a 286 nm. Os morangos tratados com ambas concentrações de Benomil apresentaram-se dentro do limite máximo recomendado pela legislação. Os resíduos de Benomil não variaram significativamente durante o período experimental.

1 INTRODUÇÃO

Devido a susceptibilidade ao ataque de fungos e à deterioração por podridão, o morango necessita da aplicação de agrotóxicos a fim de viabilizar sua comercialização, minimizando as perdas pós-colheita e prolongando sua vida útil.

Os tratamentos químicos têm sido usados em pré-colheita e pós-colheita, e embora se apresentem como a principal e obrigatória opção no combate a doenças, requerem muita cautela, tendo em vista a toxicidade dos produtos.

* Parte da Tese de Doutorado da primeira autora.

** Bolsista de Doutorado, Curso de Fisiologia Pós-Colheita de Frutos e Hortaliças, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

*** Químico, Pesquisador Científico, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

**** Professores da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A presença de resíduos de pesticidas em alimentos tem preocupado não só as autoridades, mas a população com respeito à ingestão destes alimentos. Considerando que nem sempre o agricultor segue as recomendações dos receituários agrônômicos e comercializa morangos, logo em seguida da aplicação do pesticida, existe entre os consumidores a crença de que os morangos estão contaminados, havendo inclusive pessoas que deixam de consumi-los com receio de intoxicação (19, 14).

O Benomil [methyl 1-(butilcarbamoil) 2-benzimidazol - carbamato] e o carbendazim [methyl 2-benzimidazol carbamato] (MBC) são fungicidas sistêmicos freqüentemente usados para controlar diversos fungos que afetam frutos, sementes, verduras e grandes culturas (8). O Benomil degrada-se rapidamente em carbendazim, que é reconhecidamente fungitóxico e acredita-se que a fungitoxicidade do Benomil seja devida ao carbendazim (5, 7). De qualquer forma, ambos são usados para controlar grande variedade de doenças vegetais (12).

Os Benzimidazóis podem ser aplicados no solo ou em pulverizações para controlar *Botrytis* em frutos de morangueiro (2). Assim, os Benzimidazóis são translocados das raízes para as folhas em movimentos apoplásticos e das folhas para os frutos, podendo haver translocação lateral da planta-mãe para a filha, num mesmo estolão, dentro de 24 horas após a aplicação (13, 17).

Quando os Benzimidazóis são aplicados em pulverização foliar, as novas flores e frutos produzidos diariamente para serem protegidos, devem ser pulverizados repetidas vezes. Entretanto, pulverizações repetidas resultam em níveis residuais muito altos nas folhas e possivelmente muito maiores do que os necessários para controlar a doença.

As determinações residuais de Benomil e Carbendazim na água, solo e em várias culturas são freqüentemente requeridas devido ao seu amplo uso e para assegurar o "consentimento" com a tolerância regulamentada pela legislação (8).

O Benomil tem se mostrado um produto de difícil determinação em função de sua rápida decomposição (4). Devido a esta instabilidade, os métodos analíticos que determinam os resíduos de Benomil, envolvem extração em solvente orgânico ou uma mistura do solvente orgânico com solução aquosa ácida, promovendo a hidrólise ácida, com conversão quantitativa de Benomil para Methyl 2-Benzimidazol carbamato (MBC), um composto estável. Após o particionamento com n-hexano ou solução alcalina, o MBC é analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com coluna de troca catiônica em fase reversa (1) e detectores ultravioleta ou de fluorescência (9).

Estudos sobre o comportamento residual de pesticidas aplicados pós-colheita em frutos e hortaliças frescos, especialmente durante o armazenamento em atmosfera normal, modificada, controlada ou sob resfriamento, têm sido apresentados somente para poucos compostos e limitado número de frutos e vegetais (15).

No tratamento pós-colheita de morangos com Carbendazim, Tiofanato metílico ou Benomil e o posterior armazenamento dos frutos, por 20 dias em containers com fluxo de ar a 4°C ou 15°C em atmosfera controlada ou normal, os resíduos de todos estes fungicidas diminuiram durante o armazenamento. Entretanto, a taxa de dissipação foi menor nos morangos armazenados em atmosfera controlada e baixa temperatura (15).

Para países que exportam alimentos, a execução de monitoramento é de grande importância econômica, devido ao uso de sistemas de controle para prevenir a importação de alimentos contaminados. Assim sendo, os exportadores devem atender a requisitos impostos pelos importadores, para não correrem o risco de terem seus produtos rejeitados e sofrerem graves perdas econômicas. Entretanto, no Brasil há grande dificuldade para estudos deste tipo, porque as análises são muito dispendiosas e o número de laboratórios equipados e capacitados para sua realização é pequeno (19).

Em função do amplo emprego de Benomil no combate aos fungos, que atacam a cultura do morangueiro, verificou-se a adequação dos tratamentos pré-colheita e pós-colheita, bem como a concentração de Benomil mais indicada para garantir a produção de morangos em condições de serem consumidos, sem risco à saúde do consumidor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PROCEDÊNCIA DOS MORANGOS

Os morangos da variedade Campineiro utilizados no presente estudo foram cultivados no Sítio Rio do Peixe, Km 12, Rodovia 381 - município de Cambuí, Minas Gerais.

2.2 TRATAMENTOS

Pré-colheita

Os morangos foram tratados no campo com duas concentrações de Benomil comercial 600 e 1200 mg/Kg e os frutos não tratados serviram como testemunha. O tratamento consistiu em regar o solo ao redor de cada muda de morangueiro com 150 mL da solução de Benomil. Foram realizadas 4 aplicações após o pegamento das mudas (duas durante o desenvolvimento vegetativo, uma durante a floração e uma um dia antes da colheita dos frutos).

Pós-colheita

Os morangos, não submetidos a aplicação de Benomil durante o seu cultivo, foram imersos pós-colheita em solução de 600 e 1200 ppm de Benomil em Tween 0,1% durante 5 minutos e os frutos testemunha, imersos apenas em água.

Após secagem dos frutos ao ar, os mesmos foram distribuídos em bandejas de isopor de 12 x 12 cm. As bandejas contendo 8 frutos cada foram revestidas com filme de polietileno, conhecido comercialmente por Rollopac.

Em ambos os tratamentos os frutos foram colhidos no estágio 3/4 vermelho, pela manhã, e transportados para o Laboratório de Bioquímica de Frutos e Fisiologia Pós-Colheita da UFLA, sendo imediatamente desinfetados em solução de hipoclorito de sódio 1%.

2.3 ARMAZENAMENTO

Os morangos, após serem submetidos aos tratamentos pré-colheita e pós-colheita, foram estocados durante os períodos de 0, 2, 4 e 6 dias em câmara fria a 4°C e 90% UR. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em Waring blender, acondicionadas em frascos de vidro e guardadas em freezer a -20°C até a ocasião das análises.

2.4 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2 (épocas de aplicação) x 3 (concentrações) x 4 (épocas de armazenamento) em Delineamento Inteiramente Casualizado, com duas repetições.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa de Sistema de Análise Estatística (SANEST), de autoria de Elio Paulo Zonta e Amauri Almeida Machado, do Instituto Agrônomo de Campinas.

2.5 ANÁLISE DE RESÍDUO DE BENOMIL

Utilizou-se o método modificado de BARDALAYE E WHEELER (1) que compreende as seguintes etapas:

1 - Triturou-se 10 g de polpa em erlenmeyer no homogeneizador de tecidos TEKMAR, modelo Tissumizer, com 100 mL de acetato de etila durante 2 minutos. O homogenato foi filtrado à vácuo, em papel de filtro Whatman n.5 adaptado em funil de Büchner, acoplado em kitassato.

Ambos foram lavados duas vezes com 50 mL de acetato de etila. Ao filtrado adicionou-se 2,5 mL de HCl 1M.

2 - O filtrado acidificado foi levado para funil de separação de 500 mL e o kitassato lavado duas vezes com 50 mL de HCl 2M, agitando-se vigorosamente durante dois minutos e deixando-se separar as fases orgânica e aquosa. Descartou-se a fase orgânica superior constituída pelo acetato de etila.

3 - A fase ácida foi então particionada duas vezes com 50 mL de clorofórmio, o qual foi descartado após agitação.

4 - O pH da solução ácida foi ajustado para aproximadamente 11,5 com NaOH 10M.

5 - Novamente no funil de separação, a solução alcalina foi vigorosamente agitada e particionada com três porções de 50 mL de clorofórmio. As três fases inferiores constituídas pelo clorofórmio foram eluídas em sulfato de sódio anidro (previamente muflado a 400°C e mantido em dessecador) e recolhidas em balão de 250 mL.

6 - O clorofórmio foi evaporado em rotavapor a $\pm 45^{\circ}\text{C}$ até aproximadamente 10 mL.

7 - Transferiu-se o clorofórmio com auxílio de pipeta de Pasteur para um tubo de centrifuga graduado. Evaporou-se totalmente o clorofórmio em ar comprimido, retomado-se em seguida o volume para 1 mL com a fase móvel.

8 - Os extratos foram filtrados com filtro ISO-DISC P-254 de 25 mm de diâmetro e membrana 0,45 micrômetro da SUPELCO.

A quantificação foi realizada em Cromatógrafo Líquido LC Star Varian e os resultados expressos em mg/Kg. Utilizou-se as seguintes condições cromatográficas:

- Fase móvel: 250 mL de Metanol : 750 mL Nitrato de Metilamônio 0,025M + ácido nítrico 0,025M (1:1)

- Coluna: Lichrospher 100 RP-18 5 micrômetros; 12,5 cm comprimento x 4 mm diâmetro interno (Merck 50943)

- Fluxo: 0,5 mL/minuto

- Pmax: 200 atm; Pmin: 6 atm
- Atenuação: 0,1 RCDR/AUFS
- Injetor: 10 ML
- Comprimento de onda 286 nm.

Para avaliação da metodologia modificada de BARDALAYE e WHEELER (1) determinou-se antes do início da quantificação das amostras a porcentagem de recuperação. Assim em 10 g da amostra testemunha, livre de Benomil, adicionou-se 1 mL das soluções padrões nas concentrações de 5,0 e 10 mg/Kg de Benomil.

Utilizou-se o método do padrão externo na faixa de linearidade do Benomil. Para cálculo da concentração de Carbendazim na amostra empregou-se a seguinte equação:

$$C = \frac{Aa \times Va \times Cp \times Vip}{ma \times Via \times Ap} \text{ (mg/kg)}$$

Onde:

C = Concentração da amostra (mg/Kg)
 Aa = área do pico da amostra (mm²)
 Va = volume da amostra no tubo concentrador (mL)
 ma = massa da amostra submetida à extração (g)
 Via = volume injetado da amostra (μL)
 Cp = concentração do padrão (mg/mL)
 Vip = volume injetado do padrão (μL)
 Ap = área do pico do padrão (mm²)

A concentração de carbendazim em mg/Kg foi multiplicada por 1,52, que representa a relação entre a massa do Benomil/massa do Carbendazim, obtendo assim, a concentração de Benomil.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos (85 - 106%) para as recuperações (Tabela 1) encontraram-se na faixa observada por outros pesquisadores para frutos em geral (11, 1, 12, 10). O limite de quantificação foi 0,5 mg/Kg.

TABELA 1 - RECUPERAÇÃO DOS RESÍDUOS DE BENOMIL EM MORANGOS

Morango massa (g)	Fortificação (mg/Kg)	Recuperação (%)
10	1.0	90
10	1.0	80
10	1.0	70
10	0.5	106
10	0.5	97
10	0.5	85

O método analítico empregado baseou-se na afirmação de vários pesquisadores, segundo a qual ocorre a conversão em meio ácido de Benomil para Carbendazim, com subsequente determinação deste (11, 6, 18, 1, 12, 10). A elevação do pH para aproximadamente 11,0 favoreceu a limpeza uma vez que, em meio básico, o Carbendazim permanece na fase orgânica.

O resíduo de Benomil variou apenas entre o tratamento pré-colheita e pós-colheita e as concentrações aplicadas, havendo efeito da interação entre estes dois fatores. Não ocorreu variação nos níveis residuais de Benomil durante o período de armazenamento estudado (Tabela 2).

A literatura apresenta resultados comprovando redução considerável dos resíduos de Benomil em morangos e maçãs armazenadas a baixa temperatura, embora o período de armazenamento estudado tenha sido mais longo (14, 15). Entretanto esta redução foi bem menor quando os frutos eram armazenados sob atmosfera modificada.

KIIGEMAGI et al. (10) tratando peras pós-colheita com Benomil, com e sem cera e armazenando os frutos a 1°C por 6 meses, observaram que nos frutos tratados com cera, não houve variação nos resíduos de Benomil durante o armazenamento, entretanto nos frutos sem cera, os resíduos aumentaram o valor inicial em mais de duas vezes.

TABELA 2 - RESÍDUOS DE BENOMIL (mg/Kg) EM MORANGOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO PRÉ-COLHEITA E PÓS-COLHEITA E ARMAZENADOS POR 6 DIAS

TRATAMENTO	DIAS DE ARMAZENAGEM	DOSE DE APLICAÇÃO (ppm)		
		0	600	1200
PRÉ-COLHEITA	0	nd	0,654	1,809
	2	nd	0,870	2,014
	4	nd	0,870	1,908
	6	nd	0,900	1,730
Média			0,823 Bb	1,866 Aa
PÓS-COLHEITA	0	nd	1,611	1,835
	2	nd	2,095	1,919
	4	nd	2,010	2,013
	6	nd	2,004	2,015
Média			1,930 Aa	1,945 Aa

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna são estatisticamente iguais pelo teste F (P,0,05)
nd - não detectado (abaixo do limite de quantificação)

Sabe-se que o Carbendazim é estável em pH ácido e que o pH do morango, também ácido (em média de 3,5), não varia durante o mesmo intervalo de tempo estudado neste trabalho e sob condições de atmosfera modificada (16). Tais evidências podem justificar a não variação dos resíduos deste pesticida durante o período experimental.

Os morangos tratados pré-colheita, submetidos a aplicação de Benomil no solo, apresentaram menor resíduo do que aqueles tratados por imersão pós-colheita.

O Benomil aplicado no solo normalmente é absorvido por ação sistêmica, via sistema radicular e vasos condutores. Este procedimento de aplicação deixa o pesticida exposto à ação do meio ambiente por período prolongado, sofrendo ação degradante da luz, temperatura e lixiviação. Já na imersão dos frutos em solução do pesticida, este é absorvido por contato e como a solução envolve o fruto por inteiro, a absorção ocorre de maneira mais homogênea e mais rapidamente, não havendo interferência do meio ambiente.

As diferenças de disponibilidade e absorção, talvez possam explicar a diferença de níveis residuais de Benomil nos morangos, em função da forma de aplicação.

Não sendo produto solúvel, o Benomil forma suspensão em água, a qual será tanto maior quanto maior for sua concentração. Assim, pode haver diferença na concentração da solução causada por precipitação do pesticida no recipiente de imersão, provocando uma concentração menor. Na aplicação no campo, a solução foi submetida a constante agitação, o que favoreceu a manutenção da homogeneidade da solução. A solução 600 mg/kg por ser menor que a de 1200 mg/kg poderia estar mais homogênea.

A boa prática agrícola recomenda concentração de 600 mg/kg de Benomil aplicado via pulverização foliar para controlar uma série de doenças do morangueiro. Observou-se neste trabalho que nos morangos tratados no campo, exceto aos 2 dias de armazenamento, o nível residual encontrado nos frutos tratados com 1200 ppm, está de acordo com a legislação, a qual determina limite máximo de resíduo (LMR) de 2 mg/kg de Benomil em morango (3).

Embora não tenha havido diferença significativa entre as épocas avaliadas, os morangos tratados por imersão apresentaram resíduos pouco acima do LMR previsto na legislação, após o 2º dia para 600 mg/Kg e 4º dia para 1200 mg/kg.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho verificou-se que, a dosagem recomendada pelo receituário agrônomo para pulverizar a cultura do morangueiro deixa resíduos nos frutos dentro do LMR, quando o Benomil é aplicado no solo.

As dosagens estudadas deixaram nos morangos níveis residuais dentro do LMR estabelecido pela legislação. Os níveis residuais não variaram durante o período experimental.

Abstract

Samples of pre and post-harvest strawberries treated with benomyl, respectively on the ground and by dipping, in dosages of 600 mg/kg and 1200 mg/kg, were stored at 4°C and 90% RH during 6 days and analyzed within periods of 48 hours. Benomyl residues were quantified by High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet visible detector at 286 nm. The strawberries treated with both dosages of benomyl presented residue content lower than the RML (residue maximum limit) recommended by legislation. Benomyl residue content in samples did not show significantly variation during the storage periods.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BARDALAYE, P.C., WHEELER, W.B. Simplified method for the cleanup and reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of Benomyl in Mangoes. **Journal Chromatographic**, Amsterdam, v. 330, p. 403-407, 1985.
- 2 BEN-AZZIZ, A., SACHS, M., AHARONSON, N. & IZSAK, F. Systemic fungicides in strawberry field control of fruit rot (*Botrytis cinerea* Pers.) and residue study. **Phytoparasitica**, Bel Dagan, v. 2, n. 2, p. 135-139, 1974.
- 3 BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n.37 de 30 de outubro de 1990. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 31 de outubro de 1990. Seção I.
- 4 CALMON, J.P., SAYAG, D.R. Instability of methyl 1 (butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate (benomyl) in various solvents. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 24, n. 2, p. 426-428, 1976.
- 5 CLEMENS, G.P., SISLER, H.D. Formation of a fungitoxic derivative from benlate. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 5, p. 705-706, 1969.
- 6 CLINE, S., FELSOT, A., WEI, L. Determination of methyl 2-Benzimidazolylcarbamate in black walnut fruit. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 29, n. 5, p. 1087-1088, 1981.
- 7 GUAN, X., DAVIS, M.R., JIN, L., BAILLIE, T.A. Identification of S-(n-Butylcarbamoyl) glutathione, a reactive carbamoylating agent, as biliary metabolite of benomyl in the rat. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 42, p. 2953-2957, 1994.
- 8 ITAK, J.A., SELISKER, M.Y., JOURDAN, S.W., FLEEKER, J.R., HERZOG, D.P. Determination of benomyl (as carbendazim) and carbendazim in water, soil and fruit juice by magnetic particle - based immunoassay. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 12, p. 2329-2332, 1993.
- 9 JIMENEZ, J.J., ATIENZA, J., BERNAL, J.L., TORIBIO, L. Determination of carbendazim in lettuce samples by SFE-HPLC. **Chromatographia**, New York, v. 38, n. 5/6, p. 395-399, 1994.
- 10 KIIGEMAGI, U., INMAN, R.D., MELLENTHIN, W.M., DEINZER, M.L. Residues of benomyl (determined as carbendazim) and captan in postharvest-treated pears in cold storage. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 400-403, 1991.
- 11 KIRKLAND, J.J., HOLT, R.F., PEASE, H.L. Determination of Benomyl Residues in soils and plant tissues by high-speed cation exchange liquid chromatography. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.21, n. 3, p. 368-371, 1973.
- 12 LIU, C.H., MATTERN, G.C., YU, X., ROSEN, J.D. Determination of Benomyl by High Performance liquid chromatography, Mass spectrometry/Selected ion monitoring. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 1, p. 167-171, 1990.
- 13 NICHOLSON, J.F., SINCLAIR, J.B., WHITE, J.C., KIRKPATRIK, B.L. Upward and lateral translocation of benomyl in strawberry. **Phytopathology**, St.Paul, v. 62, n. 10, p. 1183-85, 1972.
- 14 OLIVEIRA, J.J.V., TOLEDO, M.C.F. Resíduos de Agrotóxicos em Morangos. **Pesticidas: Revista Técnico Científica**, Curitiba, v. 5, p. 95-110, 1995.
- 15 PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Postharvest-applied agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. **Journal Assoc. off Analytical Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 745-65, 1991.
- 16 SCALON, S.P.Q., BITTENCURT, A.L., CHITARRA, A.B., CHITARRA, M.I.F. Avaliação da qualidade e da vida útil de morangos (*Fragaria ananassa* Dutch.) cv. Sequóia submetidos à aplicação pós-colheita de CaCl_2 e armazenados sob atmosfera modificada à temperatura ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 83-87, 1996.
- 17 SIEGEL, M.R. Distribution and metabolism of methyl 2- benzimidazole carbamate, the fungitoxic derivative of benomyl, in strawberry plants. **Phytopathology**, St.Paul, v. 63, n. 7, p. 890-96, 1973.
- 18 SPITTLER, T.D., MARAFIOTI, R.A., LAHR, L.M. Determination of Benomyl and its metabolites by catio-exchange highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 317, p. 527-531, 1984.

- 19 TOLEDO, H.H.B. Resíduos de Pesticidas em Alimentos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 199-200, 1993.