

ADRIANA DE LOS ANGELES ESQUIVEL HERNÁNDEZ

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS MULTIRRESÍDUOS PARA DETERMINAÇÃO DE
PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS EM POLPA E CASCA DE BANANA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

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

T

E77c
2015

Esquivel Hernández, Adriana de los Ángeles, 1986-
Comparação de métodos multirresíduos para determinação
de produtos fitossanitários em polpa e casca de banana / Adriana
de los Ángeles Esquivel Hernández. – Viçosa, MG, 2015.
xviii, 99f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.87-98.

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Pesticidas. 3. Banana -
Análise. 4. Cromatografia gasosa. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Química. Programa de pós-graduação
em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 632.95

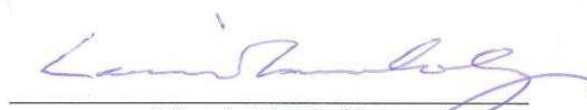
ADRIANA DE LOS ANGELES ESQUIVEL HERNÁNDEZ

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS MULTIRRESÍDUOS PARA DETERMINAÇÃO DE
PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS EM POLPA E CASCA DE BANANA**

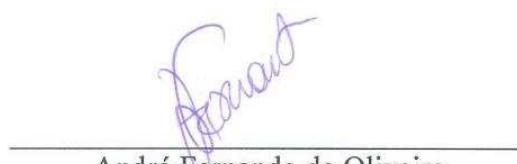
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 19 de março de 2015.


Renata Pereira Lopes Moreira


Láercio Zambolim


Antônio Augusto Neves
(Coorientador)


André Fernando de Oliveira
(Coorientador)


Maria Eliana Lopes de Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

À Deus principalmente, á minha família, minha mãe, Libia e meu pai Jaime (in memoriam).

Às minhas irmãs: Andrea e Kattia e meu cunhado Roberto.

Às minhas sobrinhas: Ariela e Lucía

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser a minha força, quem me manteve firme e não me deixou sozinha em nenhum só instante. Ele me deu a confiança para seguir em frente e sei que nenhum obstáculo é maior se Ele está comigo. Ele é a minha arma secreta. À minha família, porque acreditaram em mim, porque, apesar da distância eu senti o apoio em todos os momentos e porque eu sei com certeza que a família é o mais importante e a coisa mais valiosa que posso ter, realmente amo muito vocês. Para os meus amigos na Costa Rica que, apesar do tempo e da distância estiveram sempre ali, atenciosos, me apoiando, me mostrando o que é realmente a verdadeira amizade. A Liss por ser uma amiga leal e estar nos bons e maus momentos. A Belbelzinha por sua amizade e seu apoio quando eu estava perdida. A Maria Eliana, Totonho e André Fernando por me deixar ser parte da família Laqua e serem mais que só Professores para mim. Agradeço a todos os Laquarianos que de uma ou de outra forma me ajudaram, e tiveram a paciência com meu “portunhol”, muito obrigado e lembrarei sempre de vocês. Para todas as pessoas que fizeram parte da minha história em Viçosa, muito obrigada.

BIOGRAFIA

ADRIANA DE LOS ÁNGELES ESQUIVEL HERNÁNDEZ, filha de Jaime Antonio Esquivel Cortes e María Libia Hernández Ramírez, nasceu em Heredia, Costa Rica.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Bacharelado em Química Industrial, pela Universidad Nacional de Costa Rica – UNA, diplomando-se como Bacharel em junho de 2011.

Em abril de 2013, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa – UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em março de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Considerações Gerais	3
2.2. Características da cultura da Banana	4
2.2.1. Origem	4
2.2.2. Classificação botânica da banana	5
2.2.3. Composição nutricional da banana.....	5
2.2.4. Principais cultivares de bananeira do Brasil.....	6
2.2.5. Doenças da bananeira.....	7
2.3. Agrotóxicos	7
2.3.1. Classificação dos agrotóxicos em estudo	8
2.4. Agrotóxicos escolhidos para estudo	13
2.5. Métodos de extração multirresíduo	15
2.6. Técnicas de análise multirresíduo.....	17
2.7. Efeito de matriz	18
2.8. Validação de métodos	19
2.8.1. Seletividade.....	20
2.8.2. Linearidade e sensibilidade.....	20
2.8.3. Limite de detecção e quantificação	21
2.8.4. Precisão.....	21
2.8.5. Exatidão.....	22

3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Preparo das soluções padrão.....	24
4.2. Análise cromatográfica	25
4.3. Amostras de banana.....	25
4.4. ESL/PBT	26
4.4.1. Preparo e fortificação das amostras de banana	26
4.4.2. Extração dos agrotóxicos	27
4.4.3. Otimização da técnica ESL/PBT	27
4.4.4. Adição de água.....	28
4.4.5. Velocidade de centrifugação.....	28
4.4.6. Tempo de congelamento	28
4.4.7. Solventes extratores	28
4.5. QuEChERS.....	29
4.5.1. Preparo e fortificação das amostras de banana	29
4.5.2. Extração dos agrotóxicos	29
4.5.3. Solventes extratores	29
4.6. Efeito de matriz	30
4.7. Validação dos métodos	30
4.7.1. Seletividade.....	30
4.7.2. Linearidade da resposta do detector	30
4.7.3. Linearidade de resposta dos métodos	31
4.7.4. Limites de detecção e quantificação.....	31
4.7.5. Precisão	31
4.7.6. Exatidão.....	32
4.8. Efeito do estágio de maturação da banana	32
4.9. Estabilidade do analito no extrato da matriz	33

4.10.	Análise da banana inteira	34
4.11.	Aplicação do método.....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1.	Análise cromatográfica	35
5.2.	Otimização da técnica ESL/PBT.....	37
5.2.1.	Adição de água.....	37
5.2.2.	Velocidade de centrifugação.....	37
5.2.3.	Tempo de congelamento	38
5.2.4.	Solventes extratores	38
5.3.	Método otimizado.....	40
5.4.	Efeito de matriz	40
5.5.	Validação dos métodos analíticos.....	51
5.5.1.	Seletividade dos métodos	51
5.5.2.	Linearidade de resposta do detector	53
5.5.3.	Linearidade de resposta dos métodos	55
5.5.4.	Limites de detecção e quantificação	66
5.5.5.	Precisão e Exatidão	67
5.5.6.	Exatidão.....	72
5.6.	Efeito do estágio de maturação da banana	72
5.7.	Estabilidade do analito no extrato da matriz	78
5.8.	Análise da banana inteira	82
5.9.	Aplicação dos métodos.....	83
6.	CONCLUSÕES.....	85
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8.	ANEXO	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG-DCE	Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons
CV	Coefficiente de variação
DMFS	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
DPR	Desvio Padrão Relativo
EFS	Extração em Fase Sólida
ELP	Extração com Líquido Pressurizado
ESBA	Extração Sortiva em Barra de Agitação
ESL	Extração Sólido-Líquido
ESL/PBT	Extração Sólido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura
EPA	Environmental Protection Agency
FAO	Organização para Alimentos e Agricultura das Nações Unidas
LANAGRO-MG	Laboratório Nacional Agropecuária-Minas Gerais
LAQUA	Laboratório de Química Analítica
LD	Limite de detecção
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LQ	Limite de quantificação
MEFS	Microextração em Fase Sólida
MELLD	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Method
r	Coefficiente de correlação da equação de regressão linear
%R	Porcentagem de recuperação
t_R	Tempo de retenção
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de componentes na casca e nas partes comestíveis em 100 gramas de amostra “in natura” da banana.

Tabela 2. Caracterização química dos agrotóxicos escolhidos para estudo.

Tabela 3. Limites máximos de resíduos (LMR) dos agrotóxicos estudados.

Tabela 4. Concentração de cada um dos agrotóxicos nas soluções utilizadas para a fortificação das matrizes nas diferentes técnicas de extração, em função do LQ.

Tabela 5. Volume adicionado da solução padrão para fortificação das amostras da polpa e casca, em função dos valores de LQ.

Tabela 6. Concentrações dos agrotóxicos nas amostras empregadas para construção das curvas analíticas por superposição da matriz.

Tabela 7. p-valores obtidos para ANOVA para avaliação da mistura extratora dos métodos ESL/PBT e QuEChERS.

Tabela 8. Parâmetros das equações de regressão linear preparadas em solvente puro e nos extratos de polpa da banana para cada método de extração.

Tabela 9. Parâmetros das equações de regressão linear preparadas em solvente puro e nos extratos de casca da banana para cada método de extração.

Tabela 10. Teste t-pareado para comparar os métodos na polpa e na casca.

Tabela 11. Parâmetros das equações de regressão linear das respostas cromatográficas das soluções padrão dos agrotóxicos em acetonitrila.

Tabela 12. Faixas de concentração e parâmetros das equações de regressão linear das curvas analíticas preparadas em extratos de amostras de polpa fortificadas e submetidas à extração ESL/PBT e QuEChERS.

Tabela 13. Faixas de concentração e parâmetros das equações de regressão linear das curvas analíticas preparadas em extratos de amostras de casca fortificadas e submetidas à extração ESL/PBT e QuEChERS.

Tabela 14. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos métodos para cada um dos agrotóxicos estudados na polpa e na casca da banana.

Tabela 15. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após extrações dos agrotóxicos na polpa da banana em três níveis de concentração, com a técnica ESL/PBT e QuEChERS em três dias não consecutivos, em sextuplicata.

Tabela 16. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após seis extrações dos agrotóxicos na casca da banana em três níveis de concentração, com a técnica ESL/PBT e QuEChERS em três dias não consecutivos, em sextuplicata.

Tabela 17. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (%CV) obtidos pela análise de extratos de amostras de polpa e casca de banana fortificadas com os agrotóxicos em três níveis de concentração para cada técnica de extração, em sextuplicata.

Tabela 18. Valores das coordenadas L^* , a^* , b^* e parâmetros relacionados Chroma (C), e diferença de cor (ΔE) para avaliação da cor na polpa e na casca da banana em três dias não consecutivos.

Tabela 19. Classificação de bananas segundo o seu estágio de maturação.

Tabela 20. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtida para cada Agrotóxico analisando a banana total.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Participação dos continentes na produção mundial de banana em 2011.
- Figura 2.** Participação dos principais países na produção mundial de banana em 2012.
- Figura 3.** Estrutura química do fungicida azoxistrobina.
- Figura 4.** Estrutura química dos estereoisômeros da bifentrina.
- Figura 5.** Estrutura química do fungicida clorotalonil.
- Figura 6.** Estrutura química do inseticida clorpirifós.
- Figura 7.** Estrutura química do fungicida difenoconazol.
- Figura 8.** Estrutura química do fungicida imazalil.
- Figura 9.** Cromatograma de uma solução padrão de agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em que 1-clorotalonil $t_R = 5,05 \text{ min}$; 2-clorpirifós $t_R = 5,95 \text{ min}$; 3-imazalil $t_R = 7,45 \text{ min}$; 4- bifentrina $t_R = 8,86 \text{ min}$; 5-difenoconazol $t_R = 11,48 \text{ min}$; 6-azoxistrobina $t_R = 12,07 \text{ min}$.
- Figura 10.** Cromatograma de extratos de amostras de polpa de banana submetidas à ESL/PBT e QuEChERS.
- Figura 11.** Cromatograma de extratos de amostras de casca de banana submetidas à ESL/PBT e QuEChERS.
- Figura 12.** Curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente e extrato de amostras de polpa de banana submetidas à QuEChERS e ESL/PBT.

Figura 13. Curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente e extrato de amostras de casca de banana submetidas à QuEChERS e ESL/PBT.

Figura 14. Grau do efeito de matriz para os agrotóxicos em estudo em amostras de polpa de banana.

Figura 15. Grau do efeito de matriz para os agrotóxicos em estudo em amostras de casca de banana.

Figura 16. Cromatogramas dos extratos das amostras de polpa submetidas à ESL/PBT (rosa) contendo os agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (azul) isenta de agrotóxicos. 1-clorotalonil $t_R = 5,05$ min; 2-clorpirifós $t_R = 5,95$ min; 3-imazalil $t_R = 7,45$ min; 4- bifentrina $t_R = 8,86$ m, 5-difenoconazol $t_R = 11,48$ min; 6-azoxistrobina $t_R = 12,07$.

Figura 17. Cromatogramas dos extratos das amostras de polpa submetidas à extração QuEChERS (rosa) contendo os agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (azul) isenta de agrotóxicos. 1-clorotalonil $t_R = 5,05$ min; 2-clorpirifós $t_R = 5,95$ min; 3-imazalil $t_R = 7,45$ min; 4- bifentrina $t_R = 8,86$ min; 5-difenoconazol $t_R = 11,48$ min; 6-azoxistrobina $t_R = 12,07$.

Figura 18. Cromatogramas dos extratos das amostras de casca submetidas à ESL/PBT (rosa) contendo os agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (azul) isenta de agrotóxicos. 1-clorotalonil $t_R = 5,05$ min; 2-clorpirifós $t_R = 5,95$ min; 3-imazalil $t_R = 7,45$ min; 4- bifentrina $t_R = 8,86$ min; 5-difenoconazol $t_R = 11,48$ min; 6-azoxistrobina $t_R = 12,07$.

Figura 19. Cromatogramas dos extratos das amostras de casca submetidas à extração QuEChERS (rosa) contendo os agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (azul) isenta de agrotóxicos. 1-clorotalonil $t_R = 5,05$ min; 2-clorpirifós $t_R = 5,95$ min; 3-imazalil $t_R = 7,45$ min; 4- bifentrina $t_R = 8,86$ min; 5-difenoconazol $t_R = 11,48$ min; 6-azoxistrobina $t_R = 12,07$.

Figura 20. Curvas analíticas preparadas a partir das respostas cromatográficas das soluções padrão dos agrotóxicos na faixa de concentração entre $10,0$ e $1750,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ analisadas por CG-DCE.

Figura 21. Curvas analíticas preparadas a partir dos extratos de amostras de polpa fortificadas e submetidas à extração ESL/PBT.

Figura 22. Curvas analíticas preparadas a partir dos extratos de amostras de polpa fortificadas e submetidas à extração pelo QuEChERS.

Figura 23. Curvas analíticas preparadas a partir dos extratos de amostras de casca fortificadas e submetidas à extração ESL/PBT.

Figura 24. Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de casca fortificadas e submetidas à extração QuEChERS.

Figura 25. Gráficos de resíduos das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de polpa de banana pela técnica ESL/PBT.

Figura 26. Gráficos de resíduos das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de polpa de banana pela técnica QuEChERS.

Figura 27. Gráficos de resíduos das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de casca de banana pela técnica ESL/PBT.

Figura 28. Gráficos de resíduos das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de casca de banana pela técnica QuEChERS.

Figura 29. Variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos devido ao efeito da maturação da polpa de banana utilizando ESL/PBT.

Figura 30. Variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos devido ao efeito da maturação da polpa de banana utilizando QuEChERS.

Figura 31. Variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos devido ao efeito da maturação da casca de banana utilizando ESL/PBT.

Figura 32. Variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos devido ao efeito da maturação da casca de banana utilizando QuEChERS.

Figura 33. Variação das respostas cromatográficas ao longo do tempo para os agrotóxicos no extrato de polpa utilizando a ESL/PBT.

Figura 34. Variação das respostas cromatográficas ao longo do tempo para os agrotóxicos no extrato de polpa utilizando a QuEChERS.

Figura 35. Variação das respostas cromatográficas ao longo do tempo para os agrotóxicos no extrato de casca utilizando a ESL/PBT.

Figura 36. Variação das respostas cromatográficas ao longo do tempo para os agrotóxicos no extrato de casca utilizando a QuEChERS.

Figura 37. Cromatogramas dos extratos das amostras comerciais de: (A) polpa submetida à ESL/PBT; (B) polpa submetida à QuEChERS; (C) casca submetida à ESL/PBT; (D) casca submetida à QuEChERS.

Figura 38. Bananas utilizadas para o análise do estágio de maturação ao decorrer dos dias. A) dia 1; B) dia 3; C) dia 5.

RESUMO

ESQUIVEL HERNÁNDEZ, Adriana de los Ángeles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Comparação de métodos multirresíduos para determinação de produtos fitossanitários em polpa e casca de banana.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Antônio Augusto Neves e André Fernando de Oliveira.

Este estudo buscou otimizar e validar a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT), adaptar e validar a extração QuEChERS (do inglês Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe Method) e comparar os dois métodos validados para determinação de seis agrotóxicos (azoxistrobina, bifentrina, clorotalonil, clorpirifós, difenoconazol e imazalil) na polpa e na casca de banana da cultura Prata, seguida da análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE). Os resultados obtidos para os parâmetros analíticos avaliados mostraram eficiência adequada na etapa de clean-up, tanto para a ESL/PBT, como para QuEChERS em ambas as matrizes. Em relação ao efeito de matriz observou-se que os componentes da matriz influenciam na quantificação dos agrotóxicos, sendo que cada composto apresentou comportamento distinto. Comparando as curvas analíticas dos extratos utilizando a ESL/PBT e o QuEChERS, não existem diferenças significativas para nenhum dos agrotóxicos estudados. Os métodos apresentaram-se seletivos para as duas matrizes. O coeficiente de correlação para ambos os métodos foram $\leq 0,995$ nas duas matrizes, indicando boa linearidade. Na polpa, a ESL/PBT apresentou menores valores de limite de detecção (LD entre 2,1-5,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e quantificação (LQ entre 6,8-17,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) comparado com o QuEChERS (LD entre 4,2-14,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LQ entre 12,9-44,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Para a casca, o QuEChERS apresentou menores valores de limite de detecção (LD entre 3,1-14,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e quantificação (LQ entre 9,5-44,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$) comparado com a ESL/PBT (LD entre 3,0-29,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LQ entre 9,2-90,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Tanto a polpa como a casca, em ambos os métodos, apresentaram limites de quantificação abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela União Europeia e Codex Alimentarius. Os métodos foram precisos, apresentando coeficientes de variação entre 0,5%-16,4%. Os métodos se mostraram exatos para a maioria dos agrotóxicos, tanto na polpa, como na casca da banana. Foi observado que, de modo geral, as mudanças químicas ocorridas nos diferentes estádios de maturação da banana, não interferiram nas respostas cromatográficas dos agrotóxicos. Além disso, foi observado também que os extratos obtidos em ambos os métodos se mantêm estáveis por mais de cinco semanas, independente da matriz. Os métodos validados podem ser aplicados para determinação desses agrotóxicos na banana inteira (polpa e casca) apresentando

porcentagens de recuperação entre 80,1%-140,1%. Os métodos validados foram aplicados em amostras de banana adquiridas no comércio de Viçosa, utilizando tanto a ESL/PBT como o QuEChERS, na polpa como na casca. Não foram encontrados resíduos dos agrotóxicos estudados em nenhuma das amostras.

ABSTRACT

ESQUIVEL HERNÁNDEZ, Adriana de los Ángeles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. **Comparison of multiresidue methods for phytosanitary products determination in banana's pulp and peel.** Adviser: Maria Eliana Ribeiro Lopes de Queiroz. Co-Advisers: Antônio Augusto Neves and André Fernando de Oliveira.

This study aimed to optimize and validate the solid-liquid extraction with partition at low temperature (SLE/PLT), adapt and validate QuEChERS extraction (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe Method) and compare both of validated methods for determination of six pesticides (azoxystrobin, bifenthrin, chlorothalonil, chlorpyrifos, difenoconazole and imazalil) in banana's pulp and peel, followed by gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD) analysis. The results for analytical parameters showed adequate efficiency for the clean-up stage for both SLE/PLT, and QuEChERS in both matrixes. In relation to matrix effect has been observed that matrix's components influence the quantification of pesticides, each compound showed different behavior. Comparing analytical curves of the extracts using SLE/PLT and QuEChERS, there are no significant differences for any of the pesticides studied. The methods presented were selective for the two matrixes. The correlation coefficients for both methods were for both matrixes were ≤ 0.995 , indicating good linearity. In pulp, SLE/PLT showed lower detection limits values (LOD between 2.1 to 5.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and quantification limits (LOQ between 6.8 to 17.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) compared to QuEChERS (LOD between 4.2 to 14.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and LQ between 12.9 to 44.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$). For peel, QuEChERS showed lower detection limit values (LOD between 3.1 to 14.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and quantification limits (LOQ between 9.5 to 44.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$) compared to SLE/PLT (LOD between 3.0 to 29.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and LQ between 9.2 to 90.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Both, pulp and peel, with both methods, presented quantification limits below the maximum residue limits (MRLs) established by the European Union and Codex Alimentarius. The methods used were accurate, with coefficients of variation between 0.5% -16.4%. The methods proved accurate for most pesticides, both in banana's pulp and peel. It was observed that, in general, the chemical changes occurring in different banana ripening stages, did not interfere with chromatographic responses of pesticides. Furthermore, it was also observed that the extracts obtained with both methods are stable for more than five weeks, regardless of the matrix. Validated methods can be applied to determination of these pesticides in the whole banana (peel and pulp) having recovery percentages between 80.1% -140.1%. The validated methods were applied in banana samples

collected in Viçosa, using both SLE/PLT as QuEChERS, for both matrixes. No pesticide residues were found in any of the samples studied.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento agrícola há cerca de 10.000 anos permitiu o estabelecimento de grupos humanos, aumentando dessa forma a densidade populacional. O aumento das áreas cultivadas, no entanto, atraiu insetos, roedores, fungos e bactérias, que começaram a atacar os campos cultivados e alimentos armazenados, aumentando assim as populações dessas espécies, que se tornaram pragas (BARBOSA, 2004).

Na antiguidade a utilização de substâncias químicas usadas na agricultura surgiu principalmente para combater insetos, mas foi no começo do século XX que foram realizados diversos estudos para a proteção de plantas e com a segunda guerra mundial apareceram os primeiros agrotóxicos sintéticos (MARQUES & LEMOS, 2006). A partir daí, nas décadas seguintes se deu um aumento na produção e síntese de novas substâncias, principalmente devido ao aumento da resistência dos insetos e à competição industrial (LARA & BATISTA, 1992).

No Brasil o uso de agrotóxicos na última década aumentou, sendo que entre os anos 2001 e 2008 a venda de agroquímicos passou de pouco mais de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões e no ano 2009 o consumo no Brasil era de 15% das vendas de agrotóxicos no planeta, tendo um consumo de US\$ 7,2 bilhões, o que representa 5,2 kg de produto por habitante. Para o ano 2011 este mercado alcançou os US\$ 8,5 bilhões, com perspectiva de alcançar até US\$ 15 bilhões (LONDRES, 2011; RADAR, 2012).

Mesmo que os agrotóxicos sejam empregados de modo correto, podem causar problemas ecológicos, pela persistência no meio ambiente, de onde podem ser transferidos para várias formas de vida e para os diversos compartimentos ambientais (terra, água e ar) causando problemas na saúde pública, pela presença de resíduos em alimentos (LARA & BATISTA, 1992).

Devido a este risco potencial para a saúde humana o Governo Federal do Brasil criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no ano 1999, sendo uma autarquia que tem como campo de atuação todos os setores relacionados a produtos e serviços que possam afetar a saúde da população brasileira. Atualmente, a ANVISA autoriza o uso de 2400 formulações de agrotóxicos em diversas culturas e de 490 ingredientes ativos, dos quais 29 ingredientes estão autorizados para a cultura da banana (ANVISA, 2014).

Em 2001 o Governo Federal através da ANVISA, propôs um Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), com o objetivo de conferir se os alimentos

comercializados apresentavam agrotóxicos autorizados em níveis de resíduos dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA nos alimentos de origem vegetal que chegam ao consumidor. Em 2013 o PARA já havia analisado mais de 23.000 amostras em 13 alimentos de origem vegetal, sendo constatado em seus relatórios que algumas amostras têm mostrado níveis de contaminação com agrotóxicos acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira, bem como resíduos de princípios ativos não autorizados para determinadas culturas. Porém a banana não foi analisada em nenhum período, apesar da importância que tem no Brasil (ANVISA, 2014).

A banana segundo a Organização para Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) é a quarta espécie de planta cultivada mais importante do mundo, depois dos principais cereais e é a fruta mais consumida no Brasil. Pelo fato de ser uma das frutas mais populares, relativamente barata, frente às demais, disponível durante praticamente todo o ano e encontrada na maioria dos estabelecimentos hortifrúteis do país (FAOSTAT, 2014).

No mundo a produção de banana para o ano 2012 foi de 102 milhões de toneladas, dos quais 17 milhões de toneladas foram produzidos na América do Sul (FAOSTAT, 2014). No Brasil a produção de banana foi de 6,9 milhões de toneladas sendo o quinto país com maior produção (IBGE, 2012). Para o estado de Minas Gerais a produção foi de 687 293 toneladas sendo o quarto estado com maior produção no país (EMBRAPA, 2013). Para o ano de 2008 o consumo foi de 7,68 kg por pessoa por ano (IBGE, 2008). Em função disso, a banana é uma cultura que merece destaque. Sendo assim, selecionada como a matriz de análise.

Neste sentido, este trabalho pretende adaptar, otimizar e validar a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT) para extração de agrotóxicos em banana (casca e polpa) por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE). Adaptar e validar laboratorialmente o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) desenvolvido pelo Laboratório Nacional Agropecuário - MG (LANAGRO-MG) do Ministério da Agricultura em parceria com o Departamento de Química da Universidade de Minas Gerais (UFMG) para determinação de agrotóxicos em banana. Comparar as duas técnicas e aplicar as técnicas validadas em amostras de banana da cidade de Viçosa – MG. Os agrotóxicos estudados são autorizados e utilizados na cultura de banana.

Com o desenvolvimento deste projeto, almeja-se disponibilizar técnicas confiáveis para análise multirresíduos em polpa e casca de banana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações Gerais

A produção mundial de frutas e vegetais tem experimentado um aumento notável. A safra vem crescendo a uma taxa anual de cerca de 3 por cento na última década. Em 2011, quase 640 milhões de toneladas de frutas e mais de 1 bilhão de toneladas de vegetais foram produzidas em todo o mundo. A área total utilizada no mundo para a produção de frutas, exceto o melão, no ano 2010 foi de 55.856.000 ha, sendo empregadas no Brasil 2.383.000 ha (FAO, 2013).

Para a cultura da banana no ano 2012 utilizaram-se 4.953.315,46 ha no mundo, com uma produção de 101.992.743,3 toneladas. A Ásia ocupou o primeiro lugar de produção, seguido pelas Américas, África, Oceania e por último a Europa, como apresentado na Figura 1 (FAOSTAT, 2014).

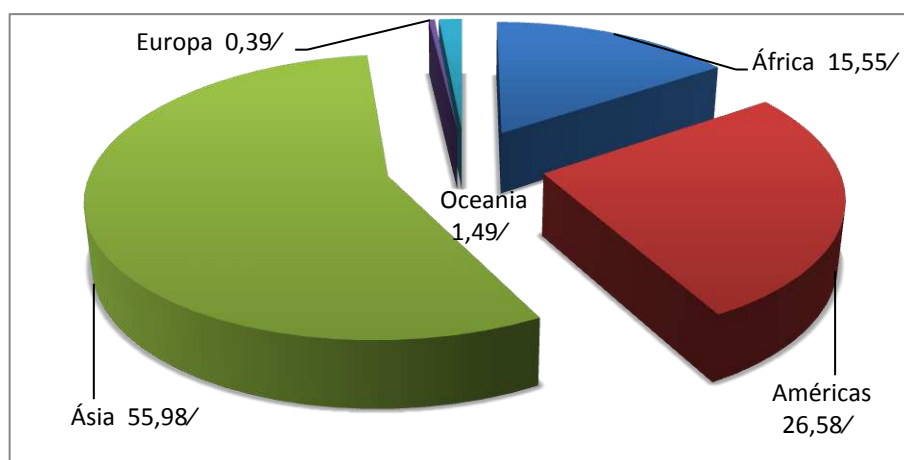


Figura 1. Participação dos continentes na produção mundial de banana em 2011.

Fonte: FAOSTAT, 2014

Os países com maior taxa de produção nesse ano foram Índia, China e Filipinas na Ásia e Equador e Brasil nas Américas. Esses países lideraram essa taxa com valores de 701 224 434 e 690 218 400 toneladas, o que representam 6,2 e 6,1% no mundo, respectivamente (Figura 2) (FAOSTAT, 2014).

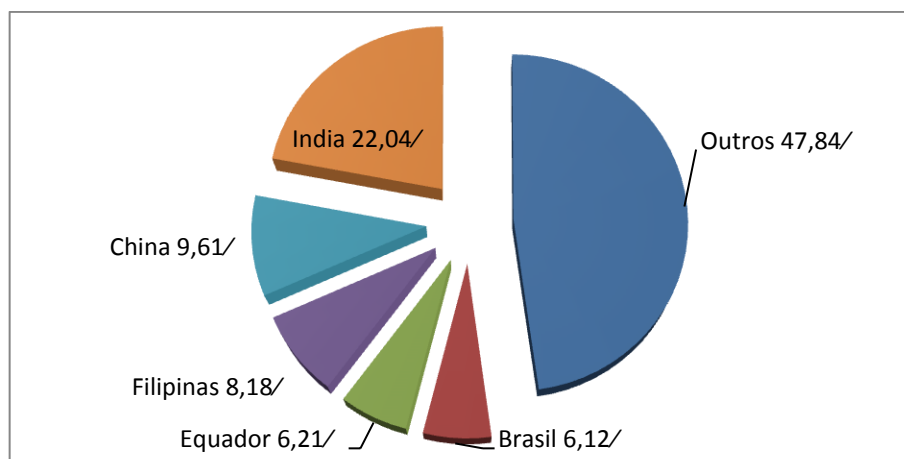


Figura 2. Participação dos principais países na produção mundial de banana em 2012.

Fonte: FAOSTAT, 2014

No Brasil a banana é produzida de Norte a Sul. Em 2011, os maiores estados produtores foram: Bahia (3.396.195 t), Tocantins (2.731.389), São Paulo (2.217.060 t), Santa Catarina (665.697 t) e Minas Gerais (654.566 t) (IBGE, 2012).

2.2. Características da cultura da Banana

2.2.1. Origem

Não se pode afirmar exatamente a origem da banana, pois é um fruto antigo que se perde na mitologia grega e indiana. Há referência da sua presença na Índia, Malásia e Filipinas, onde tem sido cultivada há mais de 4000 anos (MOREIRA, 1979). Estudos baseados na análise do ADN (ácido desoxirribonucleico) sugerem que a origem geográfica da banana das variedades comestíveis atualmente foram cultivadas em Papua Nova-Guiné e nas Filipinas (SOLURI, 2008).

Na Índia tem sido encontradas referências de bananeiras desde o século VI a.C. e uma dessas tem interesse em particular por sugerir a existência de uma mutação da espécie há 2000 anos. No ano 1000 a.C. continuou sua expansão pela Polinésia e sua introdução nas áreas Mediterrâneas (ROBINSON & GALÁN, 2010). Entre os anos 600 e 300 a.C. escritas indianas já mencionavam as bananas, enquanto na China os primeiros relatos apareceram no ano 200 d.C. (HAARER, 1965). Seguindo com os viajantes, sua expansão continuou até chegar a Madagascar (ROBINSON & GALAN, 2010).

Na Europa se difundiu na Renascença. Em 1402, o fruto foi descoberto pelos navegadores portugueses em suas viagens ao continente africano e propagaram a banana nas Ilhas Canárias, onde realizaram suas primeiras plantações. Alguns estudiosos consideram também que a banana chegou à América do Sul por via de viajantes polinésios (SOLURI, 2008). Continuando sua viagem para o ocidente, em 1516 foram colocadas mudas de bananeiras em um navio que as levou para a ilha caribenha de Santo Domingo, onde hoje é a República Dominicana e o Haiti, onde se expandiu pelo Caribe, América Central e sucessivamente para outros países de clima tropical (ROBINSON & GALÁN, 2010).

No entanto foi apenas a partir do final do século XIX que as bananas começaram a ser comercializadas internacionalmente, uma vez que antes desta data a falta de meios adequados para o seu comércio impedia o transporte para os países que não produziam bananas (ROBINSON & GALAN, 2010).

2.2.2. Classificação botânica da banana

Bananeira é denominação genérica para diversas espécies. A família Musaceae, um membro da ordem Scitaminales, da classe Monocotyledoneae compreende três subfamílias: Musoideae, Strelitzoideae e Heliconoideae. A primeira compõe-se de dois gêneros: Ensete, que são utilizadas para a extração de suas fibras e o gênero Musa, com quatro seções: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys e Eumusa (MARTIN et al., 1985). A Australimusa compreende 5 espécies utilizadas para a extração de suas fibras, consumo de frutos e na forma de vegetal (MANICA, 1997). A Callimusa e Rhodochlamys abrangem 5 a 6 espécies de pequeno tamanho e de interesse ornamental e a Eumusa que abrange as bananas comestíveis, que tem grande valor comercial as quais pertencem à Musa acuminata Colla (genoma AA) e a Musa balbisiana Colla (genoma BB). Atualmente todas as bananeiras cultivadas derivam dessas duas espécies selvagens (BEZERRA et al., 2010).

2.2.3. Composição nutricional da banana

A banana é um alimento energético à base de glicídios complementados por sais minerais e oligo-elementos. A composição nutricional desse fruto é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Teor de componentes na casca e nas partes comestíveis em 100 gramas de amostra “in natura” da banana.

Parâmetro	Polpa	Casca
Umidade (g)	64	89,47
Cinzas (g)	0,8	0,95
Lipídeos (g)	0	0,99
Proteínas (g)	1	1,69
Fibras (g)	1,5	1,99
Carboidratos (g)	34	4,91
Calorias (kcal)	128	35,30
Cálcio (mg)	0	66,71
Ferro (mg)	0,3	1,26
Sódio (mg)	<0,4	54,27
Magnésio (mg)	24	29,96
Zinco (mg)	0,3	1,0
Cobre (mg)	0,05	0,10
Potássio (mg)	328	300,92

Fonte: Gondim et al., 2005.

2.2.4. Principais cultivares de bananeira do Brasil

O número de cultivares que foram introduzidos nos trópicos americanos é relativamente limitado, sendo poucos os explorados comercialmente. Em contraste, o número de cultivares de banana no Extremo Oriente é muito elevado (MARTIN et al., 1985).

No mercado diferem as variedades de banana com relação às características do seu cultivo e ao uso que delas se faz. Dentre os cultivares mais comuns no Brasil, destacam-se a banana Ouro, Nanicão, Nanica, Maçã, Mysore, Pacovan, Prata Anã, Terra, D'Angola, Figo, Grande Naine e Prata (BEZERRA et al., 2010).

A banana Prata é uma planta de coloração verde-clara, de porte alto com 2,96 a 4,8 metros de altura, com pseudocaule bastante cônico. No cultivar o peso do cacho tem variado de 5,91 a 17,70 kg, com 5 a 9 pencas, contendo de 83 a 112 frutos por cacho. Os frutos tem tamanho médio, um comprimento de 10 a 13 cm e com um diâmetro de 3,5 a 4,1 cm. A casca do fruto é muito fina. O rendimento por hectare é muito variado e vai de 11,12 a 43,8

toneladas em clima tropical e nas áreas irrigadas ou com chuvas frequentes. O cultivar Prata é muito susceptível ao Mal-de-sigatoka e ao Mal-do-panamá, sendo também muito atacada pela broca-da-bananeira (MANICA, 1997).

2.2.5. Doenças da bananeira

Como todas as plantas cultivadas de importância econômica, a bananeira é afetada por diferentes espécies de insetos e doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (CORDEIRO, 1999).

As principais doenças e pragas que afetam a bananicultura brasileira e no mundo são a Sigatoka-negra; Sigatoka-amarela; Mal-do-panama; Moko; viroses tais como topo-em-leque, mosaico e estrias, doenças de frutos como manchas dos frutos, podridão-da-coroa e antracnose; nematoses como nematoide-cavernícola, nematoide-das-galhas, das lesões radiculares e espirilados e broca do rizoma (BEZERRA et al., 2010).

Para combater estas pragas e doenças, são recomendados alguns agrotóxicos como: azoxistrobina, clorotalonil, difenoconazol, imazalil, bifentrina e clorpirifós. Estes serão os agrotóxicos estudados neste trabalho.

2.3. Agrotóxicos

A utilização de substâncias químicas como defensivos agrícolas iniciou-se desde a antiguidade. Apesar da indústria de agrotóxicos ter surgido após a Primeira Guerra Mundial, seu uso foi difundido nos Estados Unidos e na Europa após a Segunda Guerra Mundial. No Brasil começou durante o período conhecido como a modernização da agricultura nacional entre os anos 1945 e 1985, mas foi especialmente após 1975, que se concretizou a instalação da indústria de agrotóxicos no país (FARIA, 2003; SANTOS, 2012).

Agrotóxicos, segundo EPA (Environmental Protection Agency), são defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e biocidas, são designações dadas a qualquer substância ou misturas que tem por finalidade prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer peste ou praga incluindo vetores de doenças humanas ou de animais. Estão incluídos também neste conceito os desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (EPA, 2014).

No Brasil, segundo a Lei nº 7.802/1989, regulamentada através do Decreto 98.816 no seu Artigo 2º, Inciso I, o termo agrotóxico e afins é definido como:

“Os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; ou como substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

A utilização de agrotóxicos na produção agrícola dentro de um manejo adequado evita que a produção diminuía 40%, mas o uso inadequado destas substâncias pode acarretar danos ambientais, muitas vezes irreparáveis, e trazer sérias consequências à saúde humana (MARQUES, 2005).

2.3.1. Classificação dos agrotóxicos em estudo

Dada a grande diversidade de produtos com centenas de princípios ativos em mais de mil formulações comerciais diferentes no Brasil, é importante conhecer a classificação dos agrotóxicos (REVELO, 2010). Estes podem ser classificados de diversas maneiras: quanto ao seu modo de ação no organismo alvo, em relação aos efeitos que causa à saúde humana e quanto à sua estrutura química (SAVOY, 2011).

Neste estudo seis agrotóxicos foram avaliados segundo sua estrutura química e podem ser divididos em: estrobilurinas, piretróides, isoftalonitrilas, organofosforados, triazóis e imidazóis.

2.3.1.1. Estrobilurinas

As estrobilurinas são usadas na agricultura como fungicidas. São grupos de compostos químicos extraídos do fungo *Strobilurus tenacellus* (PARREIRA et al., 2009). O uso das estrobilurinas tem aumentado nos últimos anos, devido não só à sua eficiência no controle de doenças, mas também ao efeito fisiológico proporcionado em plantas (SOARES et al., 2011).

As estrobilurinas foram descobertas a partir de um grupo de ácidos b-metoxiacrilatos naturais, os mais simples são a Estrobilurina A e Oudemansina A (DA SILVA, 2009). Os produtos naturais foram inadequados como fungicidas agrícolas, mas o conhecimento de sua

estrutura e de suas propriedades forneceu o início de pesquisas para o desenvolvimento das estrobilurinas, azoxistrobina (Sygenta) e kresoximetila (BASF) (PEREIRA, 2013).

A partir dessas descobertas a indústria química melhorou os fungicidas naturais, fazendo modificações químicas que resultaram em compostos menos susceptíveis a luz solar (VINCELLI, 2002).

As estrobilurinas atuam inibindo a respiração mitocondrial no fungo, interferindo com a produção de energia na célula. Eles bloqueiam a transferência de elétrons no local da oxidação quinol (local Qo) no complexo citocromo bc₁, impedindo assim a formação de ATP (VINCELLI, 2002).

As estrobilurinas oferecem níveis elevados de atividade contra uma ampla gama de doenças de plantas. Por exemplo, a azoxistrobina é um fungicida sistêmico, que foi comercializado pela primeira vez em 1998 e foi descoberto durante estudo com cogumelos (DA SILVA, 2009). Ele provê controle de uma combinação de fungos patógenos que antes somente era possível através de misturas de dois ou mais fungicidas. A estrutura da estrobilurina azoxistrobina é mostrada na Figura 3.

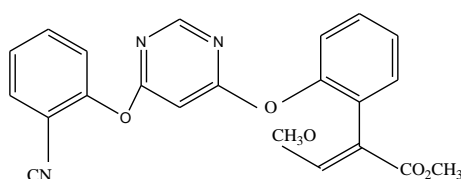


Figura 3. Estrutura química do fungicida azoxistrobina.

2.3.1.2. Piretróides

Os piretróides são inseticidas utilizados em uma grande variedade de culturas e são os derivados sintéticos das piretrinas, que são ésteres tóxicos da reação dos ácidos crisantêmico e pirétrico com os álcoois piretolona, cinerolona e jasmolona, isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas (HIRATA, 1995).

O uso dos piretróides sintéticos na agricultura iniciou-se na década de 70, após mudança estrutural introduzida nas piretrinas, para transformar a estrutura química com o fim de se obter substâncias com maior estabilidade e potencial inseticida (BBSRC, 2012).

Os piretróides ocorrem naturalmente como mistura de formas estereoisoméricas, e sua atividade biológica é dependente da estrutura química e da configuração estérica, sendo que

os isômeros *cis* demonstram uma toxicidade mais elevada em relação ao *trans*. Assim, os efeitos da intoxicação por piretróides estão relacionados à sua estrutura química. Os inseticidas sintéticos podem ser estruturalmente divididos em dois grupos segundo a ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupo ciano (CN) na porção fenoxibenzil. Os piretróides do tipo I parecem agir principalmente nos nervos periféricos e os piretróides do tipo II agem preferencialmente no sistema nervoso central (SANTOS et al., 2007a).

Em geral, os piretróides são menos tóxicos para mamíferos e são considerados bons candidatos para substituir os inseticidas organofosforados (EPA, 2009).

A bifentrina foi o primeiro tipo de piretróide registrado para uso pela EPA no ano de 1985. Comercialmente se encontra como uma mistura dos estereoisômeros 1*S*, 3*S* e 1*R*, 3*R* mostrados na Figura 4 (NPIC, 2012). Por seu modo de ação é considerado um inseticida do tipo I. Pode ser utilizado como inseticida, formicida e acaricida em lavouras (20%), projetos comerciais (40%), e em casas ou jardins (40%) (RIAR, 2012).

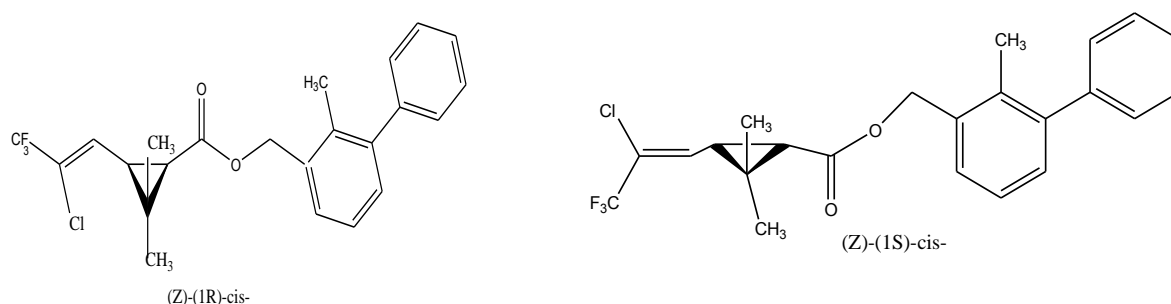


Figura 4. Estrutura química dos estereoisômeros da bifentrina.

2.3.1.3. Isoftalonitrilas

As isoftalonitrilas são fungicidas que foram introduzidos no mercado em 1960. Podem ser utilizadas isoladamente ou em misturas. Seu mecanismo de ação ocorre através da união do fungicida aos grupos sulfidril e mercapto dos fungos. A conjugação com sulfidrilas (particularmente glutatona) na germinação de células fúngicas, conduz à interrupção da glicólise no ciclo de Krebs, e conseqüentemente o ATP não é produzido. Assim, as células fúngicas morrem, pois não completam processos essenciais para sua formação por falta de energia (RODRIGUES, 2006).

O principal representante das isoftalonitrilas é o clorotalonil, cuja estrutura química é mostrada na Figura 5. Este fungicida é formulado em mistura com outros compostos químicos

e é utilizado para o controle de muitas doenças fúngicas numa ampla gama de culturas como arroz, banana, batata, manga, soja e outras (ANVISA, 2002).

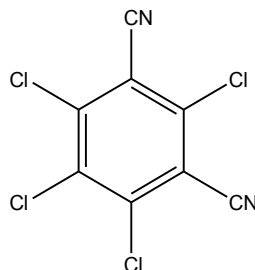


Figura 5. Estrutura química do fungicida clorotalonil.

2.3.1.4. Organofosforados

A descoberta das propriedades tóxicas e inseticidas de alguns compostos de fósforo em 1930 auxiliou no desenvolvimento de novos compostos organofosforados nas indústrias, mas foi em 1949 que a química dos compostos organofosforados foi estudada (SANTOS et al., 2007b).

O mecanismo de ação dos agrotóxicos organofosforados se baseia na inibição da acetilcolinesterase (AChE), uma serina esterasa distribuída amplamente. A AChE ocorre no sistema nervoso central e periférico dos vertebrados, e sua ação fisiológica normal é a hidrólise dos neurotransmissores acetilcolina (ACh). A inibição da AChE resulta em um aumentando do nível de acetilcolina nas sinapses, com consequente toxicidade colinérgica (MILESON et al., 1998)

O clorpirifós foi comercializado pela primeira vez nos Estados Unidos, no ano de 1965. Sua estrutura química é mostrada na Figura 6. Este princípio ativo é amplamente utilizado para controlar insetos em várias culturas, incluindo cereais, frutos, e vegetais, bem como para fins sanitários (YUAN et al., 2014). O clorpirifós é um inseticida persistente no ambiente. Isto foi confirmado em 2010, quando Watts encontrou em um gelo do Ártico, datado de 1971, resíduos de clorpirifós (WATTS, 2012).

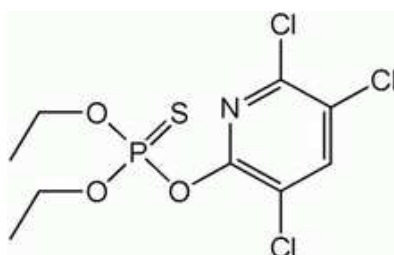
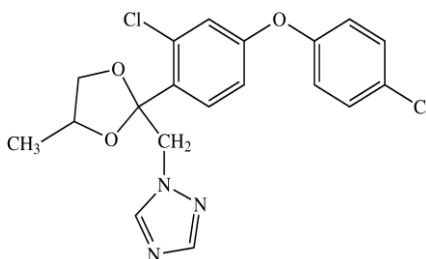


Figura 6. Estrutura química do inseticida clorpirifós.**2.3.1.5. Triazois**

Os triazóis foram introduzidos comercialmente nos Estados Unidos em 1980. São agentes antifúngicos de largo espectro, utilizados como agrotóxicos e produtos farmacêuticos. Eles inibem a biossíntese do esterol, o qual é um componente essencial das membranas de fungos (FISCHEL, 2005). No grupo dos fungicidas, são alguns dos mais largamente utilizados em vegetais e frutos no mundo, por sua elevada ação inibitória sobre a formação de componentes da membrana celular, rápida absorção e translocação pela planta, eficiência em doses pequenas, ação curativa, entre outros (SOARES et al., 2011).

O difenoconazol é um triazol de largo espectro utilizado para o controle das doenças em muitas frutas, legumes, cereais e outras culturas de campo. Tem ação preventiva e curativa. Sua estrutura química é apresentada na Figura 7 (HAMILTON, 2008).

**Figura 7.** Estrutura química do fungicida difenoconazol.**2.3.1.6. Imidazoles**

Imidazoles são fungicidas, seguros e eficazes utilizados como um anti-metabolito da histamina e do ácido nicotínico (PENCKE, 1963).

O imazalil pertence a este grupo sendo um fungicida sistêmico, ativo contra cepas de fungos resistentes ao benzimidazole. Sua estrutura é mostrada na Figura 8 (KRIEGER, 2001).

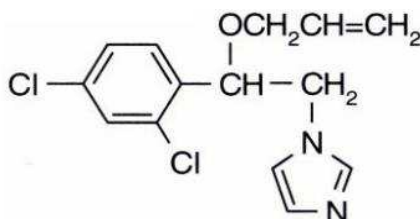


Figura 8. Estrutura química do fungicida imazalil.

2.4. Agrotóxicos escolhidos para estudo

Com base na vulnerabilidade da cultura da bananeira foi escolhido um conjunto de seis agrotóxicos. A Tabela 2 apresenta o grupo químico, a fórmula química, a classe, a modalidade de emprego, o coeficiente de partição octanol-água em pH 7 a 20 °C, a solubilidade em água a 20 °C, a temperatura de ebulição e a massa molar. A Tabela 3 apresenta os Limites Máximos de Resíduos em $\mu\text{g kg}^{-1}$ determinados por várias organizações internacionais.

Tabela 2. Caracterização química dos agrotóxicos escolhidos para estudo.

Agrotóxico	Grupo químico	Formula química	Classe	Modalidade de emprego	K_{ow}	S_w ($mg L^{-1}$)	TE °C	MM ($g mol^{-1}$)
Azoxistrobina	Estrobilurina	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	Fungicida	Foliar	$3,16 \cdot 10^2$	6,7	360	403,40
Bifentrina	Piretróide	$C_{23}H_{22}ClF_3O_2$	Inseticida, formicida e acaricida	Localizada	$3,98 \cdot 10^6$	0,01	sd	422,88
Clorotalonil	Isoftalonitrila	$C_8Cl_4N_2$	Fungicida	Foliar	$8,71 \cdot 10^2$	0,81	350	265,91
Clorpirifós	Organofosforado	$C_9H_{11}C_{13}NO_3PS$	Inseticida, formicida e acaricida	Localizada	$5,01 \cdot 10^4$	1,05	375,9	350,89
Difenoconazol	Triazol	$C_{19}H_{17}C_{12}N_3O_3$	Fungicida	Foliar	$2,29 \cdot 10^4$	15,0	101	406,26
Imazalil	Imidazol	$C_{14}H_{14}C_{12}N_2O$	Fungicida	Pós-colheita	$3,63 \cdot 10^2$	184	>644	297,18

Kow: coeficiente de partição octanol-água. Sw: solubilidade em água. TE: temperatura de ebulição. MM: massa molar. Sd: se descompõe antes da ebulição. Fonte. ANVISA, 2014; IUPAC, 2014.

Tabela 3. Limites máximos de resíduos (LMR) dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	ANVISA	Codex Alimentarius	União Europeia (EU)
Azoxistrobina	200	2000	2000
Bifentrina	20	100	100
Clorotalonil	3000	15000	200
Clorpirifós	10	2000	3000
Difenoconazol	500	100	100
Imazalil	1000	2000	2000

Fonte. ANVISA, 2014; FAO – Codex alimentarius, 2014; EU pesticides database, 2014.

2.5. Métodos de extração multirresíduo

Devido ao crescimento da demanda mundial por alimentos, a utilização de agrotóxicos nas lavouras aumentou, sendo que alguns deles têm uma persistência nos compartimentos ambientais e podem ser encontrados depois de certo tempo. No solo são encontrados devido a derramamentos ou descartes inadequados, que por lixiviação podem atingir lençóis de águas subterrâneas. Nas águas superficiais estão presentes pela lavagem do solo por enxurradas e pela ação do vento. No ar, são originários dos procedimentos de pulverização na forma de aerossóis (SANCHES et al., 2003; KOMATSU & MOREIRA, 2004).

Os agrotóxicos, quando são usados corretamente, tem pouco impacto adverso no meio ambiente. Contudo é evidente que traços de resíduos de agrotóxicos presentes no solo, água, ar e alimentos podem ser perigosos à saúde do homem e ao meio ambiente (DAMS, 2006).

Com a finalidade de controlar e regulamentar os resíduos dos agrotóxicos em alimentos, diversos métodos são usados para a identificação e quantificação dos mesmos. Estes métodos exigem uma técnica de extração do analito da matriz, limpeza do extrato ou clean up para remoção de impurezas, e em alguns casos, pré-concentração dos mesmos, para posterior análise instrumental (COLLINS et al., 2006).

Os métodos mais usados para determinação de resíduos de agrotóxicos são, extração em fase sólida (EFS) (YANG et al. 2011), dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) (MENEZES et al., 2010), microextração em fase sólida (MEFS) (GAO et al., 2014), extração com líquido pressurizado (ELP) (GAO et al., 2014), etc. No entanto, muitos deles não tem um bom desempenho em aplicações multirresíduos ou são complicados, tediosos ou demorados (CARNEIRO et al., 2013).

Atualmente as técnicas para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais evoluíram significativamente em termos de rapidez, simplicidade e eficiência de extração e purificação das amostras. Neste cenário, as técnicas extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) e QuEChERS tem relevado bons resultados na extração de agrotóxicos em alimentos devido à possibilidade de se realizar simultaneamente a extração de agrotóxicos e o clean up dos extratos.

Goulart et al. (2008) desenvolveram um método simples e de baixo custo, denominado extração líquido-líquido e purificação por partição em baixa temperatura, para análise de piretróides em leite, sem etapas de clean up, por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, obtendo taxas de recuperação elevada para os compostos analisados.

A partir de então a metodologia proposta foi adaptada para determinação de resíduos de agrotóxicos em diversas matrizes como: água (GOULART et al., 2010), batatas (DARDENGO et al., 2011), carne bovina (SILVA, 2008), tomates (PINHO et al., 2010), maçã (PUSSENTE, 2008), alface (COSTA et al., 2015), uva (SOARES, 2011), abacaxi (COSTA, 2010) e outras matrizes sólidas.

O princípio da extração sólido-líquido e partição em baixa temperatura consiste em colocar a amostra líquida ou sólida em contato com um solvente extrator, miscível em água, menos denso que esta e que tenha ponto de fusão abaixo de -20°C . Em seguida a mistura, constituída da amostra e a mistura extratora é agitada e levada ao freezer por um período suficiente que permita o congelamento da fase aquosa. Nesta etapa, a fase aquosa junto com a amostra congelada, fica na parte inferior, e a fase sobrenadante, contendo o solvente e os agrotóxicos extraídos, é separada. Finalmente, a amostra é analisada por cromatografia gasosa.

Em 2003, Anastassiades et al. (2003), desenvolveram um procedimento para extração multirresíduo denominado QuEChERS para determinação de resíduos em frutas e vegetais. Este método apresenta como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro.

O método tem sido objeto de várias modificações e aperfeiçoamentos ao longo dos anos desde a sua primeira apresentação. Estes foram projetados para melhorar a recuperação de agrotóxicos em diversos tipos de alimentos (WILKOWSKA et al., 2011).

O método se baseia na extração e centrifugação de uma matriz com acetonitrila. A água é separada da acetonitrila pela adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. O extrato é, então, submetido a uma etapa de clean up usando extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) com uma amina primária secundária (PSA), que remove eficientemente muitas substâncias polares interferentes presentes na matriz. O extrato obtido está pronto para a determinação final. Atualmente existem metodologias modificadas da técnica QuEChERS, no entanto o princípio é o mesmo para todos os análises (WILKOWSKA et al., 2011).

Assim, a aplicação e validação de técnicas que permitam a extração simultânea de resíduos de agrotóxicos em alimentos, com uma menor quantidade de solvente e com um número menor de etapas de preparação e purificação de amostras complexas devem ser estudadas.

2.6. Técnicas de análise multirresíduo

No mundo, mais de 800 agrotóxicos pertencentes a mais de 100 classes químicas são utilizados nas diversas culturas de frutas e legumes. A presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos é uma preocupação importante para os consumidores, devido ao seu possível efeito adverso à saúde em longo prazo (CAMINO et al., 2011).

Portanto, com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores há uma necessidade de desenvolver métodos analíticos rápidos e precisos para a determinação de agrotóxicos em produtos agrícolas (CAMINO et al., 2011).

A determinação de agrotóxicos envolve muitas etapas preliminares, como amostragem, extração e limpeza para remoção de interferências. Além disso, geralmente os produtos agrícolas são matrizes complexas, cujos co-extrativos podem afetar a precisão da análise.

Tradicionalmente, as metodologias para determinação de pesticidas são baseadas em técnicas de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida, devido à sua capacidade de separar um grande número de analitos semelhantes em uma mistura (MEYER, 2004).

A cromatografia gasosa é utilizada para a separação de amostras gasosas, líquidos voláteis e termicamente estáveis. A técnica possui alto poder de resolução e detecta compostos em escala de nano a picogramas dependendo da técnica de extração e do detector utilizado. Essa quantificação pode ser atingida pela utilização de detectores cromatográficos específicos, tais como detector por captura de elétrons, nitrogênio-fósforo, fluorescência e ionização em chama, entre outros. Estas técnicas também podem ser utilizadas em conjunto com outras, como as espectroscópicas e eletroanalíticas (DA SILVA, 2009; COSTA, 2011).

O detector por captura de elétrons (ECD) destina-se principalmente à análise de compostos que têm afinidade por elétrons como nitrilas, nitratos, compostos organometálicos, halogenados e aldeídos conjugados. Este detector tem a vantagem de ser um dos mais sensíveis entre todos os detectores, sendo possível a detecção de 1 a 0,01 pg de espécies eletroafins (COLLINS et al., 2006).

Recentes trabalhos mostram a eficiência da cromatografia gasosa acoplada com o ECD para determinação de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes (CHO et al., 2014, BAKIRCI et al., 2014, KO et al., 2014).

2.7. Efeito de matriz

Efeito de matriz é um estudo de seletividade que procura averiguar possíveis interferências causadas pelos diversos componentes que compõem a matriz, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal ou resposta instrumental (MAPA, 2011).

O efeito de matriz é utilizado para explicar as taxas de recuperação de agrotóxicos maiores que 100% e a baixa precisão nos resultados (HAJŠLOVÁ et al., 1998).

O efeito de matriz pode ocorrer em várias partes do sistema cromatográfico como injetor, coluna e detector. O problema acontece devido à presença de vários sítios ativos na porta de injeção e também na coluna de separação, que podem ser responsáveis pela adsorção irreversível e/ou decomposição de analitos susceptíveis. Além disso, os grupos silanóis e os metais originam também sítios ativos que podem induzir a degradação ou adsorver o composto de interesse (HAJŠLOVÁ et al., 2003).

Segundo Ribani et al. (2004) uma das maneiras para minimizar ou eliminar o efeito de matriz é preparando as soluções analíticas no extrato da matriz. A principal vantagem sobre o

método de padronização externa é que as mesmas fornecem uma melhor correspondência com a composição da amostra.

Alguns autores acreditam que o efeito dos co-extrativos sobre a resposta da substância de interesse deveria ser avaliado pela comparação pelo método de superposição de matriz com a padronização externa (padrões preparados nos solventes). Esta foi a estratégia utilizada neste trabalho para avaliar o efeito de matriz (FRIGGI, 2008).

O efeito de matriz pode ser calculado conforme na Equação (1).

$$\%EM = \frac{(X_1 - X_2)}{X_2} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

%EM: Valor em porcentagem do efeito de matriz.

X₁: média das áreas da solução padrão do agrotóxico, preparada em extrato da matriz, numa dada concentração.

X₂: média das áreas da solução padrão do agrotóxico, preparada em solvente puro, numa dada concentração.

2.8. Validação de métodos

A validação de um método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, ou seja, que as figuras de mérito avaliadas atendem aos critérios de aceitação preestabelecidos. (BASSANI, 2002; MAPA, 2011)

O nível de concentração de interesse dos analitos deve estar dentro dos critérios de validação aplicáveis às determinações dos resíduos ou contaminantes. Para as substâncias permitidas, devem ser levados em consideração os Limites Máximos permitidos tanto para os Resíduos (LMR), como para os Contaminantes (MAPA, 2011). Esta foi a opção adotada neste trabalho, uma vez que a ANVISA disponibiliza as monografias autorizadas dos agrotóxicos em estudo.

Na etapa de validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade de resposta do detector e do método; limite de detecção e limite de quantificação; exatidão (ensaios de recuperação); precisão (repetitividade e precisão intermediária).

2.8.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade do procedimento analítico de determinar analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outras substâncias de comportamento semelhante. A verificação da seletividade do método analítico deve ser realizada a partir da comparação entre a resposta instrumental dos analitos no solvente puro e na matriz fortificada, após passar pelo método de extração (MAPA, 2011).

2.8.2. Linearidade e sensibilidade

A linearidade é a capacidade de o procedimento analítico produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa dada, isto é, produzir curvas analíticas que podem ser adequadamente ajustadas pela equação de uma reta (BASSANI, 2002; MAPA, 2011).

A sensibilidade do método analítico é a inclinação da curva analítica. Se a curva analítica é uma reta, a sensibilidade é constante em toda a faixa de trabalho. Um dos fatores que pode reduzir o tamanho da faixa de trabalho é a redução da sensibilidade (inclinação) da curva de calibração em algum de seus extremos. É importante ressaltar que a faixa de trabalho deve compreender os valores de LMR (MAPA, 2011). Podem ser construídos três tipos de curvas analíticas:

- I. Curva Analítica do Analito em Solução: elaborada a partir dos padrões do analito em solvente puro.
- II. Curva Analítica da Matriz Fortificada: construída a partir da matriz fortificada com os padrões do analito, após passar pelo método de extração.
- III. Curva Analítica do Extrato da Matriz Fortificada: elaborada a partir do extrato da matriz fortificada com os padrões do analito.

Estas curvas analíticas devem ser obtidas a partir de, no mínimo, cinco níveis de concentração, preferencialmente distribuídos de forma equidistante, em triplicata (MAPA, 2011).

2.8.3. Limite de detecção e quantificação

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando determinado procedimento experimental. Por sua vez, o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável (BASSINI, 2002; MAPA, 2011).

Para o cálculo do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi adotado neste trabalho o método baseado em parâmetros da curva analítica. Onde o limite de detecção e o limite de quantificação podem ser expressos como:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \qquad LQ = 10 \times \frac{s}{S} \qquad \text{Equação (2)}$$

Em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

2.8.4. Precisão

A precisão de um método representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Seu valor numérico é estimado pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (%CV).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \qquad \text{Equação (3)}$$

Em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e \bar{x} é a média dos resultados (RIBEIRO et al., 2008)

Normalmente em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos %CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. (RIBANI et al., 2004).

Neste trabalho, a precisão foi avaliada por meio da repetitividade e da precisão intermediária. A repetitividade ou precisão intra-corridas, define a precisão dos resultados obtidos dentro do próprio laboratório, por um mesmo analista e com a mesma instrumentação (RIBEIRO et al., 2008).

A precisão intermediária engloba o conceito de repetitividade, porém variando sempre que possível os operadores, os instrumentos, as condições ambientais, lotes de reagentes e solventes, entre outros fatores experimentais. (MAPA, 2011)

Para a determinação da repetitividade deve-se preparar e analisar um conjunto de matrizes brancas fortificadas com os analitos, no mínimo em três níveis de concentração, sendo que para cada nível a análise deve ser realizada em pelo menos, seis réplicas independentes (MAPA, 2011).

Para este trabalho, o procedimento para determinar a precisão intermediária consistiu em executar os passos da repetitividade ao longo de três dias não consecutivos e analisar os extratos obtidos no mesmo dia.

2.8.5. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão (RIBANI et al., 2004).

Neste trabalho optou-se pelos ensaios de recuperação, sendo que a recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004).

Para isso, deve-se fortificar a matriz branca, em sextuplicata, em três níveis de concentração e executar o procedimento de extração. A exatidão será confirmada se o fator de recuperação estiver entre 70% a 120% (MAPA,2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- ✓ Adaptar, otimizar e validar métodos multirresíduos para determinação de agrotóxicos em polpa e casca de banana por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-DCE).
- ✓ Comparar os métodos validados para determinação de agrotóxicos em polpa e casca de banana.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Otimizar e validar a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL/PBT) para análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de banana.
- ✓ Adaptar e validar laboratorialmente o método QuEChERS para análise multirresíduo de agrotóxicos em amostras de banana.
- ✓ Estabelecer as condições de análise dos agrotóxicos azoxistrobina, bifentrina, clorotalonil, clorpirifós, difenoconazol e imazalil por cromatografia gasosa.
- ✓ Avaliar a influência dos co-extrativos da banana na quantificação dos agrotóxicos por cromatografia gasosa.
- ✓ Empregar as metodologias validadas para determinação dos agrotóxicos em amostras de banana comercializadas em Viçosa – MG.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo das soluções padrão

A partir da solubilização dos sólidos dos padrões em acetonitrila da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil) grau HPLC foram preparadas soluções padrão estoque de cada agrotóxico, na concentração de 1000 mg L⁻¹ para clorotalonil (99,3% m/m), imazalil (99,7% m/m), difenoconazol (97,0% m/m), azoxistrobina (99,9% m/m) –padrões adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha); e 1000 mg L⁻¹ para bifentrina (92,2% m/m) da FNC (Brasil); e 1000 mg L⁻¹ para clorpirifós (99,0% m/m)-padrão adquirido da Chem Service, West Chester, PA, USA. Essas soluções foram armazenadas em freezer.

A partir da diluição das soluções estoque, foram preparadas soluções de trabalho contendo os agrotóxicos em função do LQ de cada composto para cada uma das matrizes (Tabela 4). Essas soluções foram armazenadas em geladeira à temperatura de aproximadamente 4,0 °C.

Tabela 4. Concentração de cada um dos agrotóxicos nas soluções utilizadas para a fortificação das matrizes nas diferentes técnicas de extração, em função do LQ.

Agrotóxico	Polpa		Casca	
	Solução 1 µg kg ⁻¹	Solução 2 µg kg ⁻¹	Solução 3 µg kg ⁻¹	Solução 4 µg kg ⁻¹
Clorotalonil	7	23	91	45
Clorpirifós	10	13	10	10
Imazalil	18	19	18	19
Bifentrina	12	13	16	9
Difenoconazol	15	45	78	32
Azoxistrobina	14	23	24	21

As soluções 1 e 2 foram utilizadas para fortificar as amostras da polpa, submetidas aos procedimentos da extração ESL/PBT e QuEChERS, respectivamente. As soluções 3 e 4 foram utilizadas para fortificar as amostras da casca, submetidas aos mesmos procedimentos.

4.2. Análise cromatográfica

As análises qualitativas e quantitativas dos princípios ativos estudados foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2014, com detector por captura de elétrons (CG/ECD), equipado com auto-injetor AOC-20i.

As condições analíticas tais como programação de aquecimento da coluna cromatográfica, temperaturas do injetor e do detector, modo de injeção, e vazão do gás de arrastre, foram determinadas visando um tempo de análise curto, boa resolução e separação dos picos dos agrotóxicos de interesse. Desta forma, as condições cromatográficas foram:

- ❖ Coluna capilar DB-5 da Agilent Technologies, com fase estacionária composta de 5% difenil e 95% dimetilsiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de espessura de filme.

- ❖ Programação de aquecimento da coluna:

$$150\text{ °C (1min)} \xrightarrow{15\text{ °C min}^{-1}} 220\text{ °C (1min)} \xrightarrow{30\text{ °C min}^{-1}} 290\text{ °C (4min)}$$

- ❖ Tempo total de análise: 13 min
- ❖ Temperatura do injetor: 280 °C
- ❖ Temperatura do detector: 300 °C
- ❖ Volume injetado: 1,0 µL
- ❖ Divisão de fluxo: 1:5
- ❖ Gás de arrastre: Nitrogênio
- ❖ Vazão do gás de arrastre: 1,2 mL min⁻¹

4.3. Amostras de banana

Para a otimização e validação das técnicas de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura e QuEChERS foram utilizadas bananas do tipo Prata quando se encontravam amarelas (Estádio de maturação 6 – Tabela 19). Estas foram adquiridas na feira do agricultor da cidade de Viçosa/MG. Os experimentos foram realizados no Laboratório de

Química Analítica (LAQUA) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As amostras de polpa e de casca da banana foram trituradas separadamente em um liquidificador, marca Philips Walita Paris, até total homogeneização, para posterior análise. Uma parte de cada matriz foi submetida às técnicas de extração a fim de confirmar a ausência dos agrotóxicos em estudo.

Considerando para a técnica ESL/PBT 2,0000 g de amostra e para a técnica QuEChERS 5,0000 g da amostra, cada matriz foi fortificada com as soluções descritas no item 4.1, em função do LQ dos agrotóxicos (Tabela 5).

Tabela 5. Volume adicionado da solução padrão para fortificação das amostras da polpa e casca, em função dos valores de LQ.

Solução		Concentração de fortificação (x LQ, $\mu\text{g kg}^{-1}$)						
x LQ	1	5	10	15	20	25	30	
ESL/PBT (Polpa)								
V/(μL)	1	10	50	100	150	200	250	300
QuEChERS (Polpa)								
V/(μL)	2	10	50	100	150	200	250	300
x LQ	1	2	4	6	8	10	12	
ESL/PBT (Casca)								
V/(μL)	3	10	20	40	60	80	100	120
QuEChERS (Casca)								
V/(μL)	4	10	20	40	60	80	100	120

LQ: Apresentados na Tabela 4

4.4. ESL/PBT

4.4.1. Preparo e fortificação das amostras de banana

Na extração dos agrotóxicos na polpa e na casca, cerca de 2,0000 g de amostra picada e triturada foram adicionados em fracos de vidro com capacidade de 22,0 mL com tampa rosqueável. As amostras foram fortificadas nos níveis estabelecidos no item 4.1 com os

volumes das soluções descritas no item 4.3. Os frascos destampados foram deixados em repouso por 1h para permitir a interação dos agrotóxicos com a matriz e a evaporação do solvente. Posteriormente, as amostras foram submetidas aos procedimentos de extração.

4.4.2. Extração dos agrotóxicos

Aos frascos de vidro contendo amostras da polpa da banana, adicionou-se 0,50 mL de água deionizada juntamente com a fase extratora composta de 3,25 mL de acetonitrila e 0,75 mL de acetato de etila. Em seguida a mistura foi submetida à agitação em vortex (modelo Certomat[®] MV. B. Braun (Bioteck International, Alemmar- Comercial e Industrial S.A.)) por 1 min na velocidade de 6 do aparelho. Em seguida a mistura foi centrifugada (Centrifuga Excelsa[®] II modelo 206 MP), por 5 min a 2500 rpm, e posteriormente resfriada a -20 °C por 3 h.

Para a extração dos agrotóxicos na casca, aos frascos de vidro adicionaram-se 1,50 mL de água deionizada juntamente com a fase extratora composta de 3,25 mL de acetonitrila e 0,75 mL de acetato de etila. Em seguida a mistura foi submetida à agitação em vortex por 1 min na velocidade de 6 do aparelho. Em seguida a mistura foi centrifugada por 5 min a 2500 rpm e resfriada a -20 °C durante 3 h.

O tempo de congelamento adotado para ambos os métodos foi suficiente para separar o sistema em duas fases: a fase aquosa congelada com a polpa ou com a casca, na fase inferior e a fase líquida superior contendo o solvente orgânico e os analitos extraídos. Isto ocorre porque os solventes orgânicos acetonitrila e acetato de etila possuem temperaturas de fusão de -48 °C e de -84 °C, respectivamente. (SIGMA ALDRICH, 2011)

Após a separação das fases 1600 µL da fase superior foram retirados e transferidos para um vial, para posterior análise por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG/DCE).

4.4.3. Otimização da técnica ESL/PBT

A otimização da técnica ESL/PBT para os agrotóxicos clorotalonil, clorpirifós, imazalil, bifentrina, difenoconazol e azoxistrobina em amostras de polpa e casca de banana se baseou no trabalho desenvolvido por Goulart et al. (2008) para extração de piretróides em leite.

Optou-se em utilizar a otimização univariada, em que um único fator é alterado e analisado em cada experimento enquanto os outros parâmetros permanecem constantes.

No processo de otimização desta técnica vários fatores foram avaliados a fim de obter os melhores rendimentos. Entre eles foram: adição da água, velocidade de centrifugação, tempo de congelamento e solventes extratores.

4.4.4. Adição de água

Avaliou-se a quantidade de água a ser adicionada na amostra. Os volumes adicionados a 2,0000 g de amostra e 4,0 mL de mistura extratora, foram: 0,5; 1,0 e 1,5 mL de água. Em seguida, a técnica ESL/PBT foi utilizada como descrito no item 4.4.2.

4.4.5. Velocidade de centrifugação

Outro parâmetro que também foi avaliado na otimização da técnica de ESL/PBT foi à velocidade de centrifugação. Para fazer essa avaliação foram utilizados os procedimentos descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.2, com o parâmetro otimizado no item anterior. As velocidades testadas foram: 2000, 2500 e 3000 rpm.

4.4.6. Tempo de congelamento

Foram testados diferentes tempos de congelamento como outro parâmetro na otimização da ESL/PBT para a extração dos agrotóxicos na polpa e na casca da banana. As amostras foram preparadas conforme descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2. Utilizando os fatores otimizados nos itens anteriores. Avaliaram-se os tempos de 2 e 3 h.

4.4.7. Solventes extratores

O solvente extrator foi outro parâmetro estudado na otimização da ESL/PBT para a extração dos agrotóxicos na polpa e na casca de banana. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.4.1. O método foi aplicado, variando o volume de solvente e mantendo os fatores otimizados nos itens anteriores. Foram testados como solventes

extratores 4,0 mL de acetonitrila e a mistura acetonitrila: acetato de etila nos volumes de 3,25 mL e 0,75 mL, respectivamente.

4.5. QuEChERS

4.5.1. Preparo e fortificação das amostras de banana

Para a extração dos agrotóxicos na casca e na polpa se adaptou a metodologia proposta por Carneiro e colaboradores (2013). Em frascos de centrifuga de polipropileno de capacidade de 50,0 mL foram adicionados 5,0000 g de amostra, que foram fortificados nos níveis estabelecidos no item 4.1 com os volumes das soluções descritas no item no item 4.3. Os frascos destampados foram deixados em repouso por 1h para permitir a interação dos agrotóxicos com a matriz e a evaporação do solvente.

4.5.2. Extração dos agrotóxicos

Aos frascos de polipropileno contendo as amostras de banana, adicionou-se a fase extratora composta de 4,06 mL de acetonitrila e 0,94 mL de acetato de etila. Em seguida a mistura foi agitada vigorosamente em vortex por 1 min na velocidade de 6 do aparelho. Em seguida foram adicionadas 0,5000 g de cloreto de sódio e 2,0000 g de sulfato de magnésio. A mistura foi agitada novamente por 1 min em vortex e centrifugada por 9 min a 2500 rpm.

Depois da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro de capacidade de 22,0 mL contendo 0,7500 g de sulfato de magnésio. A mistura foi agitada novamente por 1 min em vortex e centrifugada por 9 min a 2500 rpm. Finalmente cerca de 1600 µL da fase superior foram retirados e transferidos para um vial, para posterior análise por CG/DCE. (CARNERO et al., 2013)

4.5.3. Solventes extratores

O solvente extrator também foi avaliado para o método QuEChERS. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.5.1. Foram testados como solventes extratores 5,0 mL de acetonitrila e a mistura acetonitrila: acetato de etila nos volumes de 4,06 mL e 0,94 mL, respectivamente. Os outros parâmetros foram mantidos constantes.

4.6. Efeito de matriz

Para verificar o efeito de matriz foram construídas curvas analíticas em solvente puro e para cada matriz e método. A primeira curva foi construída com soluções padrão dos agrotóxicos preparadas em acetonitrila. As outras curvas foram construídas pela injeção de soluções dos padrões preparadas em extratos orgânicos obtidos de cada matriz pelos dois métodos propostos, contendo conseqüentemente todos os interferentes e co-extrativos da matriz.

As concentrações das soluções padrão preparadas para construção das curvas analíticas foram de 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0; 350,0 e 400,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ independente da matriz e do método.

A porcentagem do efeito de matriz (%EM) foi calculada segundo a Equação 1.

4.7. Validação dos métodos

Os parâmetros considerados para a validação dos métodos foram os seguintes: seletividade, linearidade da resposta do detector; linearidade do método; limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ); exatidão (ensaios de recuperação); precisão (repetitividade e precisão intermediária). Estes parâmetros considerados foram baseados em recomendações do MAPA (2011) e Ribani et al. (2004).

4.7.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada pela comparação dos cromatogramas dos extratos obtidos após a extração das amostras da casca e polpa, isentas dos agrotóxicos em estudo, com os cromatogramas dos extratos obtidos das matrizes fortificadas e submetidas aos procedimentos descritos anteriormente.

4.7.2. Linearidade da resposta do detector

A linearidade de resposta do detector por captura de elétrons foi avaliada pela injeção de soluções padrão preparadas em acetonitrila em concentrações crescentes. Neste trabalho, as

concentrações injetadas foram de: 10,0; 200,0; 450,0; 750,0; 1125,0; 1550,0 e 1750,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada agrotóxico.

4.7.3. Linearidade de resposta dos métodos

A linearidade dos métodos foi verificada por meio da construção de curvas analíticas obtidas da extração dos agrotóxicos de amostras fortificadas, submetidas aos métodos de extração. Neste trabalho, as concentrações foram calculadas em função do LQ de cada agrotóxico na referida matriz (Tabela 6).

Tabela 6. Concentrações dos agrotóxicos nas amostras empregadas para construção das curvas analíticas por superposição da matriz.

	Polpa	Casca
Ponto 1	LQ	LQ
Ponto 2	5LQ	2LQ
Ponto 3	10LQ	4LQ
Ponto 4	15LQ	6LQ
Ponto 5	20LQ	8LQ
Ponto 6	25LQ	10LQ
Ponto 7	30LQ	12LQ

4.7.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados baseando-se nos parâmetros das curvas analíticas obtidas pela análise dos extratos das amostras fortificadas. As amostras foram fortificadas nas seguintes concentrações de 10,0 a 120,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o clorotalonil, imazalil e azoxistrobina, de 5,0 a 60,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o clorpirifós e bifentrina e de 30,0 a 180,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o difenoconazol, independente da matriz e do método.

4.7.5. Precisão

A precisão dos métodos foi avaliada por meio da repetitividade e da precisão intermediária.

4.7.5.1. Repetitividade

Este estudo consistiu em preparar, injetar e analisar no mesmo dia, seis extratos de amostras fortificadas com os agrotóxicos em três níveis de concentrações. As amostras fortificadas foram submetidas às técnicas de extração otimizadas. As amostras foram fortificadas para que os agrotóxicos na polpa apresentassem concentrações iguais a LQ, 15LQ e 30LQ e na casca concentrações iguais a LQ, 6LQ e 12LQ, tendo como parâmetro de avaliação o coeficiente de variação (CV%) referente às porcentagens de recuperação de cada agrotóxico em cada matriz.

4.7.5.2. Precisão intermediária.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do coeficiente de variação (CV%) referente às porcentagens de recuperação dos agrotóxicos em estudo, obtidos da análise dos extratos de seis amostras fortificadas, submetidas às técnicas de extração, em concentrações iguais ao LQ, 15LQ e 30LQ para polpa e ao LQ, 6LQ e 12LQ para casca para cada um dos agrotóxicos, em três dias diferentes não consecutivos.

4.7.6. Exatidão

Para avaliar a exatidão, foram realizados ensaios de recuperação por sextuplicata em cada nível de concentração. As amostras foram fortificadas para que os agrotóxicos na polpa apresentassem concentrações iguais a LQ, 15LQ e 30LQ e na casca concentrações iguais a LQ, 6LQ e 12LQ.

4.8. Efeito do estágio de maturação da banana

Para avaliar o efeito do estágio de maturação da banana na eficiência de extração dos agrotóxicos pelos métodos considerados, foram medidas as cores da polpa e da casca em três dias diferentes não consecutivos utilizando um colorímetro (marca Konica Minolta (Ramsey, EUA) CR400 (iluminante C e ângulo 10°) pelo sistema CIE (Comissão Internacional de

l'Eclairage)), com leitura direta de reflectância das coordenadas "L" correspondente a luminosidade, "a*" leitura relativa de verde(-) a vermelho (+) e "b*" leitura relativa de azul (-) a amarelo (+). (HARDEBERG, 2001)

Com os valores das coordenadas L*, a*, b* foi possível gerar parâmetros relacionados à saturação da cor, Chroma (C) (Equação 4) e à diferença de cor (ΔE) (Equação 5) (HARDEBERG, 2001; TIANO,2009;).

$$\text{Chroma} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad \text{Equação (4)}$$

$$\Delta E = \sqrt{((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)} \quad \text{Equação (5)}$$

Após a determinação da cor, prepararam-se 5,0 mL de extratos para cada matriz de acordo com os métodos propostos nos itens 4.4 e 4.5, sem a fortificação.

Em seguida 1600 μL do extrato foram fortificados com a solução de trabalho respectiva para cada matriz descritas no item 4.1 para ter concentrações de 15LQ para polpa e de 6LQ para casca. Cada alíquota, logo após o preparo, foi analisada por cromatografia. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9. Estabilidade do analito no extrato da matriz

Para avaliação da estabilidade do analito no extrato da matriz, foram preparados cerca de 50 mL de extrato para cada matriz de acordo com os métodos propostos e descritos nos itens 4.4 e 4.5, sem a fortificação.

Em seguida 10,0 mL de extrato foram fortificados com a respectiva solução de trabalho para cada matriz, conforme descrito no item 4.1, para ter concentrações de 15LQ para polpa e de 6LQ para casca.

Cada solução foi dividida em cinco alíquotas de 2,0 mL. A partir de uma dessas alíquotas, logo após o preparo, retirou-se 1600 μL colocando direito no vial para imediata análise cromatográfica. As demais alíquotas foram rotuladas e guardadas no freezer a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Após 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem as análises cromatográficas foram feitas para cada alíquota. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10. Análise da banana inteira

Para analisar a banana inteira, isto é com casca e polpa, foram realizados ensaios de recuperação em triplicata. As amostras de banana foram preparadas de acordo com os métodos propostos nos itens 4.4. e 4.5 para a casca. Cada amostra foi fortificada com as soluções de trabalho descritas no item 4.1 com um nível de concentração 6LQ, para posterior análise cromatográfica.

4.11. Aplicação do método

Os métodos otimizados e validados foram aplicados no estudo das concentrações residuais dos agrotóxicos em amostras de polpa e de casca de banana. As amostras de banana foram adquiridas na feira local de agricultores da região de Viçosa e em dois estabelecimentos hortifrúti de Viçosa-MG. As amostras foram adquiridas de produtores diferentes. As bananas da feira foram obtidas de dois produtores de Teixeira e um de Cajuri. Os hortifrúti recebem amostras provenientes de um produtor de Teixeira e do Ceasa de Belo Horizonte.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise cromatográfica

As condições cromatográficas estabelecidas permitiram separar adequadamente os agrotóxicos em estudo, com um tempo de análise de 13 min.

Um cromatograma de uma solução padrão em acetonitrila contendo os agrotóxicos em estudo sob as condições descritas no item 4.2 está representado na Figura 9.

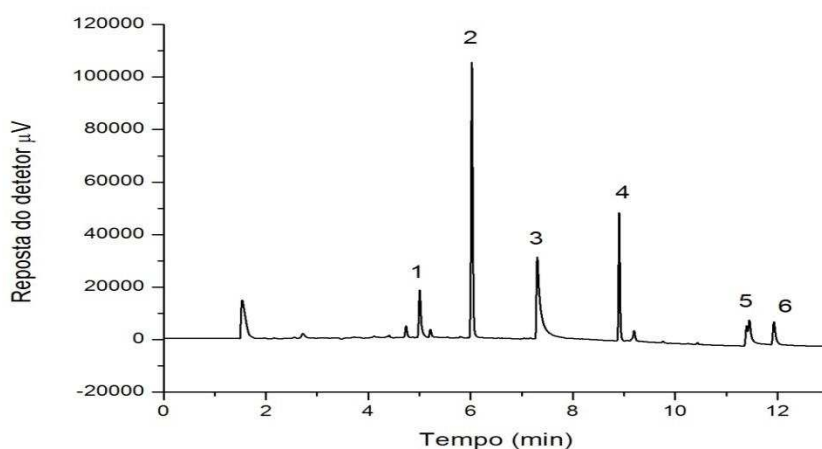


Figura 9. Cromatograma de uma solução padrão de agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$. Em que 1-clorotalonil $t_R = 5,05 \text{ min}$; 2-clorpirifós $t_R = 5,95 \text{ min}$; 3-imazalil $t_R = 7,45 \text{ min}$; 4- bifentrina $t_R = 8,86 \text{ min}$; 5-difenoconazol $t_R = 11,48 \text{ min}$; 6-azoxistrobina $t_R = 12,07 \text{ min}$.

Para a identificação dos compostos de interesse, comparou-se o tempo de retenção (t_R) referente a cada pico no cromatograma de uma solução padrão com o cromatograma dos extratos, após a extração. (COLLINS et al., 2006)

Sobre a capacidade de clean up dos métodos, nas Figuras 10 e 11 são apresentados os cromatogramas dos extratos de polpa e da casca da banana obtidos pelas duas técnicas de extração.

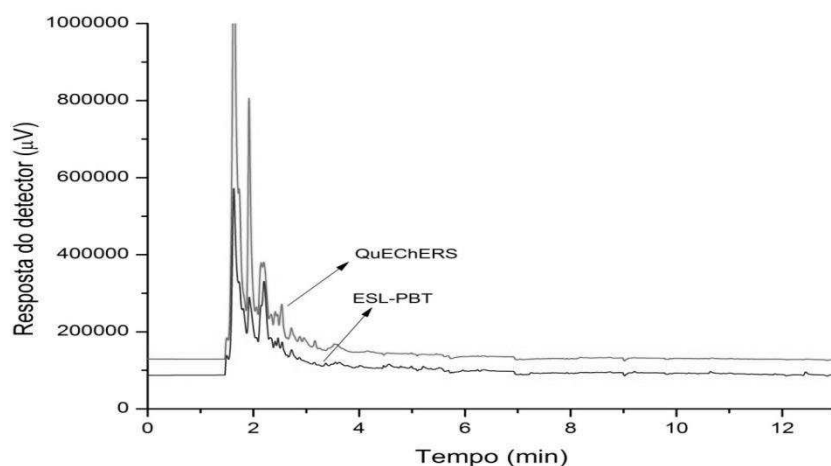


Figura 10. Cromatograma de extratos de amostras de polpa de banana submetidas à ESL/PBT e QuEChERS.

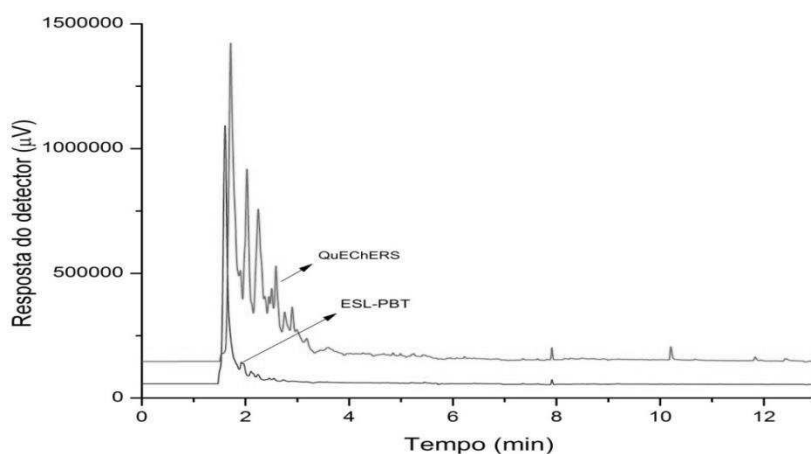


Figura 11. Cromatograma de extratos de amostras de casca de banana submetidas à ESL/PBT e QuEChERS.

Como pode ser visto nas Figuras 10 e 11, a técnica ESL/PBT produz extratos com menores picos dos co-extractivos tanto na polpa, como na casca nos primeiros 4 min de corrida cromatográfica. Dessa forma a ESL/PBT apresenta uma eficiência melhor de clean up para a remoção dos interferentes tanto na polpa como na casca, para ambos os métodos.

5.2. Otimização da técnica ESL/PBT

A técnica de extração sólido líquido com partição em baixa temperatura é uma técnica que tem sido utilizada para análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa em diferentes amostras como água, alimentos, etc. (GOULART et al., 2010; DARDENGO et al., 2011; PINHO et al., 2010; COSTA et al. 2015; SOARES, 2011; COSTA, 2010). Por este motivo foi adaptado e otimizado neste trabalho, um método utilizando a ESL/PBT para identificar e quantificar seis agrotóxicos em amostras de banana, tanto na polpa como na casca da mesma. Verifica-se, no entanto, que para cada matriz e para cada grupo de analitos é necessário um ajuste do método para se obter as condições analíticas ideais.

Por este motivo alguns parâmetros como adição da água, velocidade de centrifugação, tempo de congelamento e solventes extratores, foram avaliados.

5.2.1. Adição de água

Observou-se que, a adição de 500 μ L de água foi suficiente para que o gelo formado cobrisse totalmente a polpa. Isso permitiu uma melhor visualização da separação das fases após o congelamento e obtendo suficiente volume do extrato orgânico (> 2,0 mL). Para a casca, parte da fase orgânica ficava retida na casca após o congelamento, sendo o volume de solvente orgânico coletado muito pequeno. Dessa forma, com o objetivo de disponibilizar maior volume de fase orgânica após a etapa de congelamento, a influência da adição de água foi avaliada. Observou-se que ao utilizar maior quantidade de água na casca, maior volume de extrato orgânico foi recuperado, ficando a casca coberta pelo gelo formado. Um volume de 1,5 mL de água foi suficiente para cobrir totalmente a casca e obter volumes do extrato orgânico maiores do que 2,0 mL.

Portanto, optou-se por utilizar um volume de água de 0,5 mL para a polpa e de 1,5 mL para a casca.

5.2.2. Velocidade de centrifugação

Após a etapa de homogeneização no vortex por 1 min, onde ocorre o maior contato da amostra com a solução orgânica, a matriz se dispersa muito no solvente orgânico, sendo

preciso a centrifugação. Observou-se que para uma rotação de 2000 rotações por minuto (rpm) ficavam sólidos suspensos no solvente orgânico em ambas matrizes, mas utilizando 2500 e 3000 rpm, os sólidos suspensos sedimentavam. Por tanto, optou-se por trabalhar com 2500 rpm tanto para polpa como para casca.

5.2.3. Tempo de congelamento

O tempo de congelamento além de permitir a separação de fases, permite, com o abaixamento gradual da temperatura, que os agrotóxicos migrem para a fase com que têm maior afinidade (COSTA, 2011).

De acordo com Alves (2010) a separação de fases entre o solvente orgânico e a fase aquosa (água + amostra) ocorre 30 min após a mistura ser colocada no freezer a uma temperatura de cerca de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mas como o método utilizado neste trabalho é a cromatografia gasosa, é preciso diminuir a presença de água no extrato orgânico, assim optou-se por deixar a mistura por mais tempo no freezer.

COSTA (2011) e SOARES (2011) verificaram que o congelamento da fase aquosa ocorreu entre 2-3 h a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obtendo-se boa porcentagem de recuperação com 3 h de congelamento. Porém pelos resultados obtidos neste trabalho, para 2 h o congelamento das amostras às vezes foi parcial, enquanto que para 3 h foi completo. Por isso optou-se por trabalhar com um tempo de congelamento de 3 h.

5.2.4. Solventes extratores

Análise de resíduos de agrotóxicos têm utilizado solventes puros ou misturas de solventes na etapa de extração, tais como a acetonitrila, a acetona e o acetato de etila, ou misturas destes. Utilizando a técnica ESL/PBT, Santos (2012) tentou substituir o uso da acetonitrila na mistura extratora por outros solventes, mas todas as misturas extratoras que não continham acetonitrila mostraram-se ineficazes no processo, devido à não formação de fase única ou porque não se conseguia boa separação das fases durante o abaixamento da temperatura. Entanto Dardengo et al.(2011) e Pinho et al. (2010) durante seus trabalhos observaram que a polaridade da mistura extratora influenciava na porcentagem de recuperação dos agrotóxicos. Santos (2012), Costa (2010) e Costa et al. (2015) acharam

melhores níveis de recuperação de agrotóxicos, quando a mistura era menos polar, pelo fato dos agrotóxicos terem características apolares favorecendo a extração dos mesmos.

Com o objetivo de avaliar a influência da polaridade do solvente extrator nas respostas cromatográficas (áreas) obtidas para os agrotóxicos em amostras de polpa e casca de banana, utilizou-se como solventes extratores a acetonitrila pura e uma mistura de acetonitrila: acetato de etila (aproximadamente 0,8:0,2) tanto para ESL/PBT como para QuEChERS. A adição de acetato de etila diminui a polaridade do solvente extrator, favorecendo a extração dos agrotóxicos menos polares.

As áreas obtidas com a acetonitrila e a mistura acetonitrila: acetato de etila foram comparadas por meio da ANOVA com 95% de confiança. Os p-valores obtidos na ANOVA com valores menores do que 0,05 apresentam diferenças entre a acetonitrila pura e a mistura acetonitrila: acetato de etila. Os resultados do teste são apresentados na Tabela 7 para cada agrotóxico em cada uma das matrizes, para ambos os métodos.

Tabela 7. p-valores obtidos para ANOVA para avaliação da mistura extratora dos métodos ESL/PBT e QuEChERS.

Agrotóxicos	Polpa		Casca	
	ESL/PBT	QuEChERS	ESL/PBT	QuEChERS
Clorotalonil	0,0657	0,0985	0,0173	0,3085
Clorpirifós	0,8825	0,0734	0,1175	0,2882
Imazalil	0,3906	0,8370	0,0983	0,001
Bifentrina	0,9593	0,6401	0,3019	0,5512
Difenoconazol	0,025	0,0273	0,0973	-
Azoxistrobina	0,9446	0,0488	0,1703	0,4330

De acordo com os resultados obtidos, para o difenoconazol na polpa, tanto na ESL/PBT como no QuEChERS, para a azoxistrobina na polpa com QuEChERS, para o clorotalonil na casca com a ESL/PBT e para o imazalil na casca com o QuEChERS, existem diferenças significativas entre as respostas cromatográficas, quando se utiliza o solvente puro e a mistura acetonitrila: acetato de etila. Optou-se em trabalhar com a mistura acetonitrila: acetato de etila por apresentar maiores respostas cromatográficas para os analitos nas duas matrizes, tanto para a ESL/PBT como para o QuEChERS.

5.3. Método otimizado

O método ESL/PBT-CG/DCE foi otimizado para determinação dos agrotóxicos clorotalonil, clorpirifós, imazalil, bifentrina, difenoconazol e azoxistrobina em amostras de polpa e casca de banana.

O método otimizado consiste em adicionar 0,5 mL de água, 3,25 mL de acetonitrila e 0,75 mL de acetato de etila em 2,0000 g de polpa. Essa mistura é agitada em vortex por 1 min. Para a casca segue-se o mesmo procedimento, empregando, neste caso, 1,5 mL de água.

Posteriormente a mistura é centrifugada a 2500 rpm por 5 min e deixada em freezer a aproximadamente -20 °C por 3 h. Decorrido o tempo estabelecido, são coletados 1600 µL do extrato orgânico e colocados em um vial para posterior análise cromatográfica.

A análise cromatográfica dos extratos foi feita nas condições estabelecidas e descritas no item 4.2.

5.4. Efeito de matriz

A análise dos extratos de amostras complexas pode apresentar diversos problemas causados por interferentes da matriz quando injetadas no sistema cromatográfico.

Conforme descrito no item 4.6, o efeito de matriz é avaliado pela construção de curvas analíticas nos extratos das amostras isentas de agrotóxicos e também em solvente puro. As curvas analíticas foram comparadas para cada agrotóxico e estão apresentadas nas Figuras 12 e 13, para polpa e para casca, respectivamente e os parâmetros das equações de regressão linear estão nas Tabelas 8 e 9.

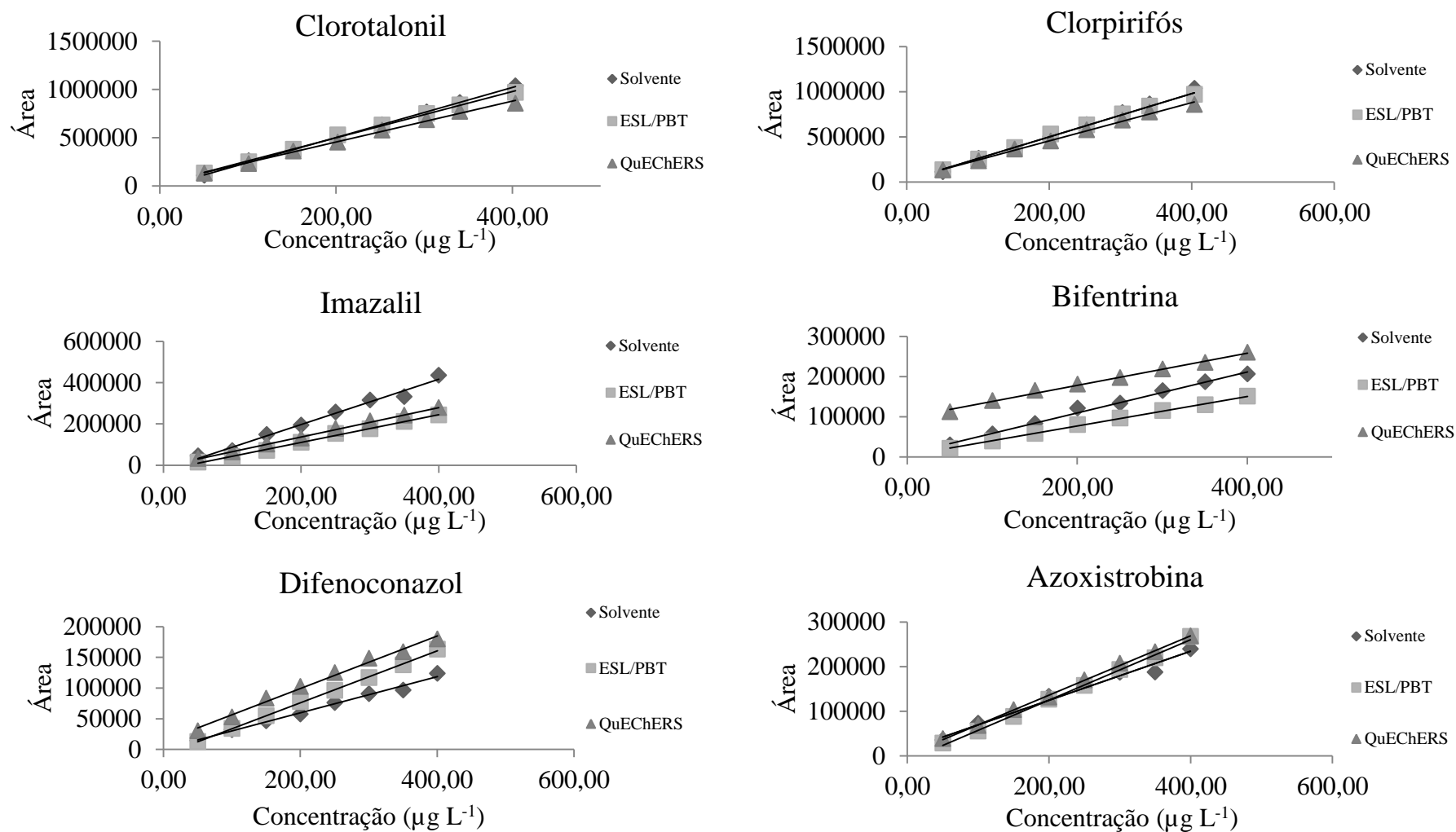


Figura 12. Curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente e extrato de amostras de polpa de banana submetidas à QuEChERS e ESL/PBT.

Tabela 8. Parâmetros das equações de regressão linear preparadas em solvente puro e nos extratos de polpa da banana para cada método de extração.

	Agrotóxico	Sensibilidade	Branco	Coefficiente de correlação
Clorotalonil	Solvente	2585,5	-14645	0,999
	ESL/PBT	2392,1	21518	0,999
	QuEChERS	2120,0	30704	0,998
Clorpirifós	Solvente	1604,6	31173	0,998
	ESL/PBT	1119,3	31193	0,998
	QuEChERS	1051,2	8603	0,996
Imazalil	Solvente	1143,8	-28034	0,997
	ESL/PBT	669,2	-23155	0,998
	QuEChERS	711,2	-5269	0,999
Bifentrina	Solvente	510,0	7687	0,996
	ESL/PBT	368,5	3308	0,999
	QuEChERS	400,8	98144	0,997
Difenoconazol	Solvente	306,6	-701	0,999
	ESL/PBT	423,4	-88516	0,999
	QuEChERS	427,3	13756	0,995
Azoxistrobina	Solvente	582,5	10379	0,998
	ESL/PBT	677,7	-10564	0,999
	QuEChERS	665,9	26191	0,999

Segundo Sousa et al. (2012), a variação nas inclinações nas curvas (solvente e matriz) indica que os componentes da matriz contribuem para introdução de um erro sistemático na análise cromatográfica.

Observa-se na Figura 12 que existem diferenças nas inclinações das curvas analíticas em solvente puro e nos extratos QuEChERS e ESL/PBT. Se a inclinação da curva no solvente puro for maior que a inclinação da curva no extrato, indica que a resposta cromatográfica é maior em solvente puro, comparada a um extrato. Isto é, o composto em questão sofreu interferência negativa pelos componentes da matriz. Se o coeficiente angular é maior para o extrato que para o solvente puro, é porque a resposta cromatográfica é maior no extrato devido que o composto apresenta interferências positivas pelos componentes da matriz. Nota-se na Tabela 8 que em ambas as extrações os co-extrativos favoreceram a interferência negativa na quantificação do clorotalonil, clorpirifós, imazalil e bifentrina. Este fato pode estar relacionado com problemas associados à injeção dos analitos em presença de co-

extrativos no extrato da matriz. Nessas injeções pode ocorrer o acúmulo gradual de componentes da matriz não voláteis no sistema cromatográfico, resultando na formação de novos sítios ativos no injetor, diminuindo assim as respostas dos analitos. (MAŠTOVSKÁ et al., 2004)

Enquanto que para o difenoconazol e a azoxistrobina os co-extrativos favoreceram a interferência positiva na quantificação, proporcionando maiores respostas cromatográficas dos analitos, quando comparado com o solvente puro.

Para a ESL/PBT o clorotalonil, o clorpirifós e a azoxistrobina apresentaram maior inclinação da curva que para QuEChERS. Enquanto o imazalil, a bifentrina e o difenoconazol apresentaram maiores inclinações para o QuEChERS do que para a ESL/PBT.

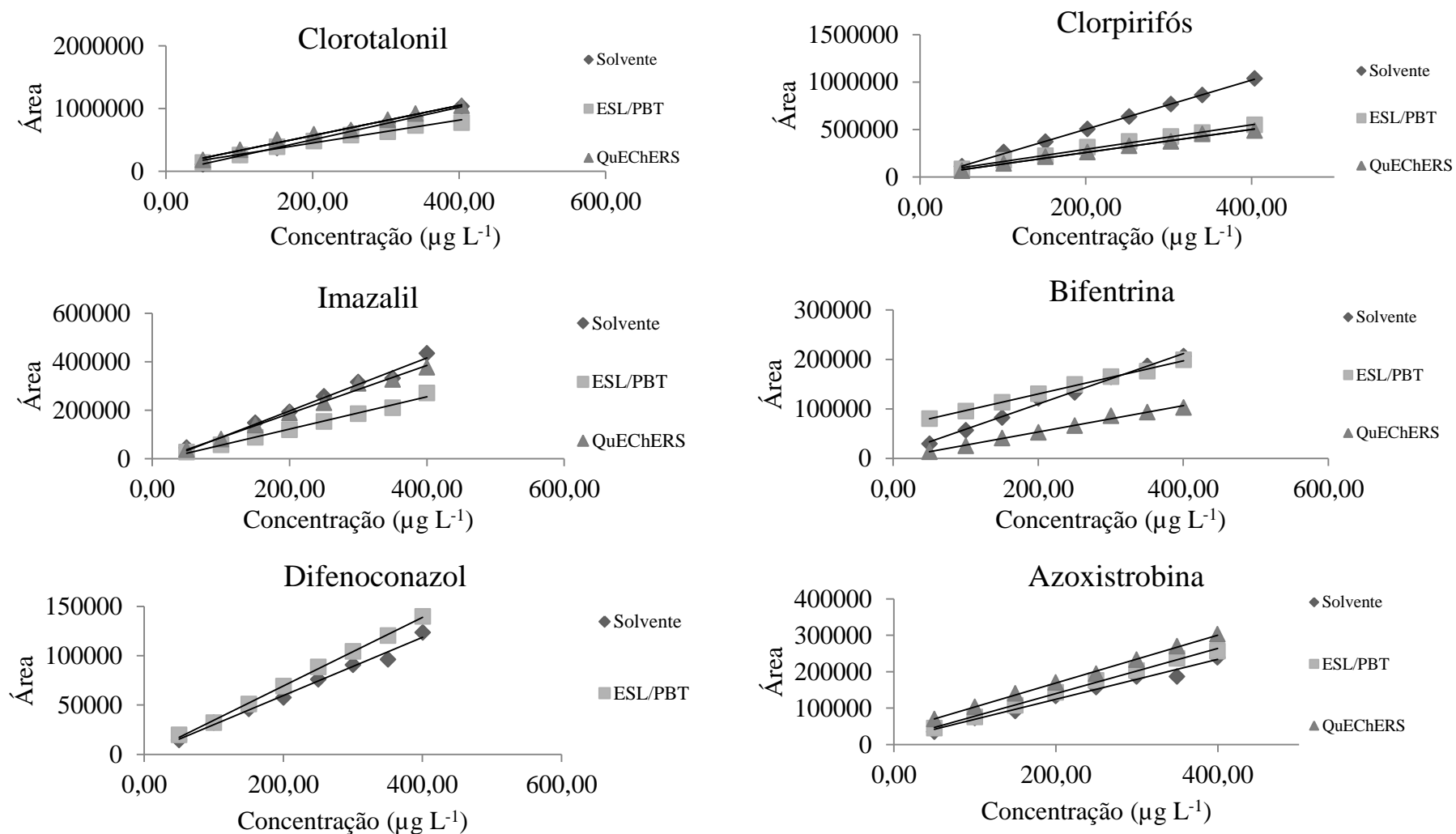


Figura 13. Curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente e extrato de amostras de casca de banana submetidas à QuEChERS e ESL/PBT.

Tabela 9. Parâmetros das equações de regressão linear preparadas em solvente puro e nos extratos de casca da banana para cada método de extração.

	Agrotóxico	a	b	r
Clorotalonil	Solvente	2585,5	-14645	1,000
	ESL/PBT	1819,6	86771	0,990
	QuEChERS	2391,8	91650	0,995
Clorpirifós	Solvente	1604,6	31173	0,998
	ESL/PBT	1279,5	36988	0,996
	QuEChERS	1204,1	17544	0,997
Imazalil	Solvente	1143,8	-28034	0,997
	ESL/PBT	667,9	-11451	0,995
	QuEChERS	991,1	-11930	0,996
Bifentrina	Solvente	510,0	7687	0,996
	ESL/PBT	335,1	63038	0,999
	QuEChERS	265,8	142	0,996
Difenoconazol	Solvente	306,6	-701	0,999
	ESL/PBT	347,2	-42777	0,999
Azoxistrobina	Solvente	582,5	10379	0,998
	ESL/PBT	621,0	15923	0,999
	QuEChERS	658,5	37353	0,999

Nota-se na Figura 13 que existem pequenas diferenças nas inclinações das curvas analíticas em solvente puro e nos extratos QuEChERS e ESL/PBT, exceto para o clorpirifós. Como já foi mencionado anteriormente para a polpa, se a inclinação da curva no solvente puro for maior que a inclinação da curva no extrato é devido que o composto em questão sofreu interferência negativa pelos componentes da matriz.

Observe-se na Tabela 9 que em ambas as extrações os co-extrativos favoreceram a interferência negativa na quantificação de todos os agrotóxicos. Como já foi mencionado este fato pode ocorrer devido ao acúmulo gradual de componentes da matriz não voláteis no sistema cromatográfico, resultando na formação de novos sítios ativos, diminuindo as respostas dos analitos. (MAŠTOVSKÁ et al., 2004)

Para a ESL/PBT o clorpirifós e a bifentrina apresentaram maior inclinação da curva que para QuEChERS. Enquanto o clorotalonil, o imazalil e a azoxistrobina apresentaram maiores inclinações para o QuEChERS que para a ESL/PBT. Para o difenoconazol não foi

possível a construção da curva para QuEChERS pois o extrato apresentou um co-extrativo no mesmo tempo de retenção. Porém nem todas as amostras apresentavam esse co-extrativo.

Para avaliação do grau do efeito de matriz dos extratos da polpa e da casca, foi feita uma comparação entre as áreas obtidas para as soluções em solvente puro com as obtidas com soluções preparadas nos extratos da matriz. O cálculo foi realizado através da equação (1) do item 2.7. Os resultados são apresentados nas Figuras 14 e 15.

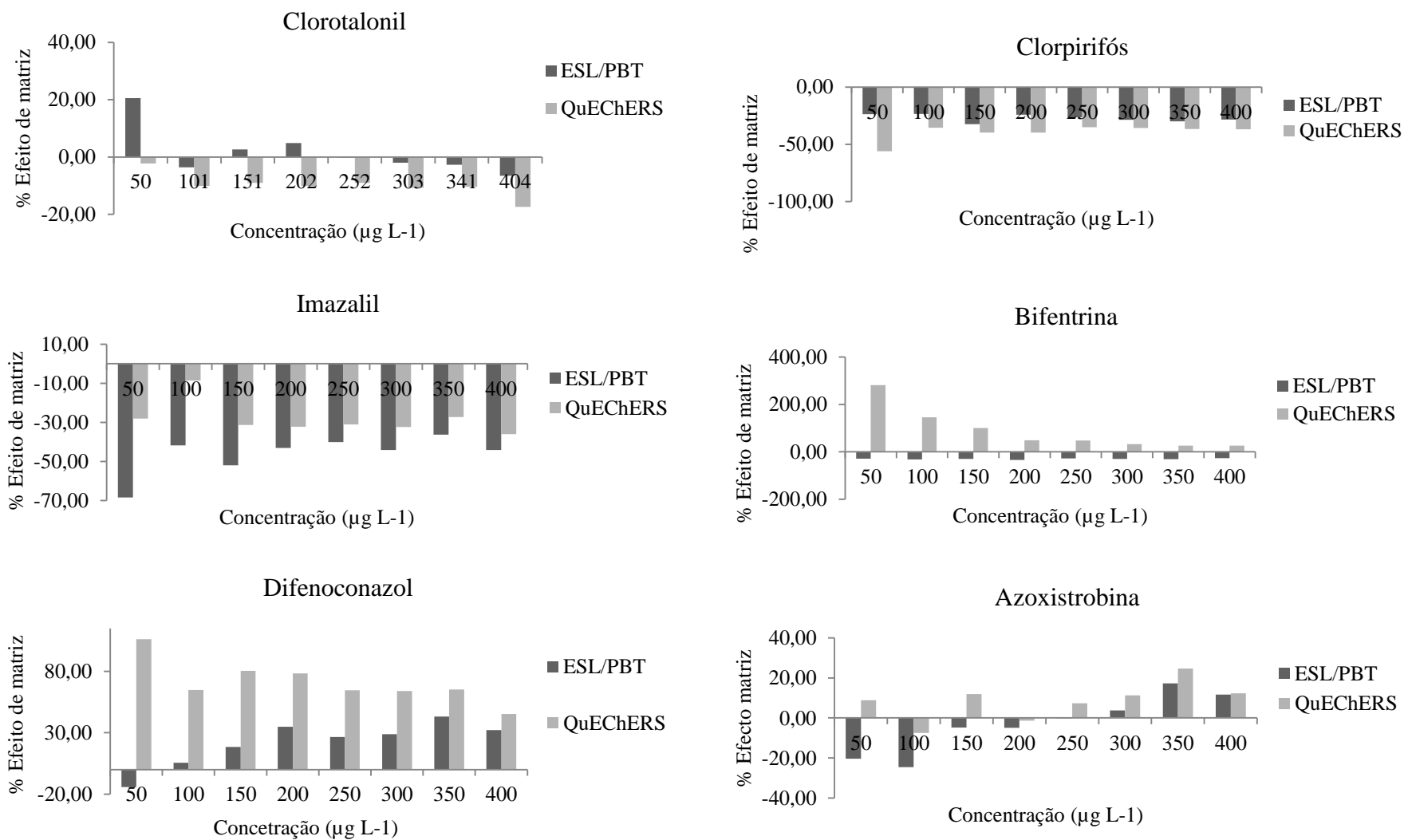


Figura 14. Grau do efeito de matriz para os agrotóxicos em estudo em amostras de polpa de banana.

Observa-se na Figura 14 que a ESL/PBT para o clorotalonil em concentrações menores tem um efeito de matriz positivo e para concentrações maiores, a partir de 252,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ esse efeito passa a ser negativo, enquanto que para QuEChERS em todas as concentrações o efeito da matriz suprime a resposta cromatográfica. Nota-se que para todas as concentrações o efeito de matriz é maior no QuEChERS do que para ESL/PBT, exceto para a concentração de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, em que a ESL/PBT apresentou o maior efeito de matriz de 20,54%, enquanto que para o QuEChERS foi -17,38% para a concentração maior, de 404,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para o clorpirifós a presença de co-extrativos na matriz suprime a resposta cromatográfica por ambas as técnicas, sendo maior o efeito de matriz para o QuEChERS em todas as concentrações utilizadas. Observa-se que o efeito de matriz é maior em concentrações menores, principalmente para a concentração de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para o imazalil aconteceu o mesmo que para o clorpirifós, porém a ESL/PBT é a técnica que apresenta maior efeito de matriz em todas as concentrações, sendo maior o efeito de matriz para a concentração de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para a bifentrina o efeito de matriz é positivo para QuEChERS em todas as concentrações, diminuindo conforme aumenta a concentração; enquanto que para a ESL/PBT o efeito de matriz suprime a resposta cromatográfica sendo constante para todas as concentrações. Além disso, o efeito de matriz em geral é muito maior para o QuEChERS (na faixa de 281,42% e 25,75%) que para a ESL/PBT (faixa entre -33,74% e -26,90%), tendo uma maior influência dos co-extrativos da matriz.

Para o difenoconazol, tanto para QuEChERS como para a ESL/PBT, o efeito de matriz é positivo em todas as concentrações, exceto na concentração de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ que foi negativo para a ESL/PBT. Observe-se que a QuEChERS apresenta maior interferência pelos co-extrativos que a ESL/PBT.

Para a azoxistrobina com a ESL/PBT em concentrações menores o efeito matriz é negativo e maior, que o efeito de matriz em concentrações maiores, nas quais o efeito é menor e além disso vira positivo. Para o QuEChERS, o efeito de matriz é positivo para quase todas as concentrações, exceto para 100,0 e 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

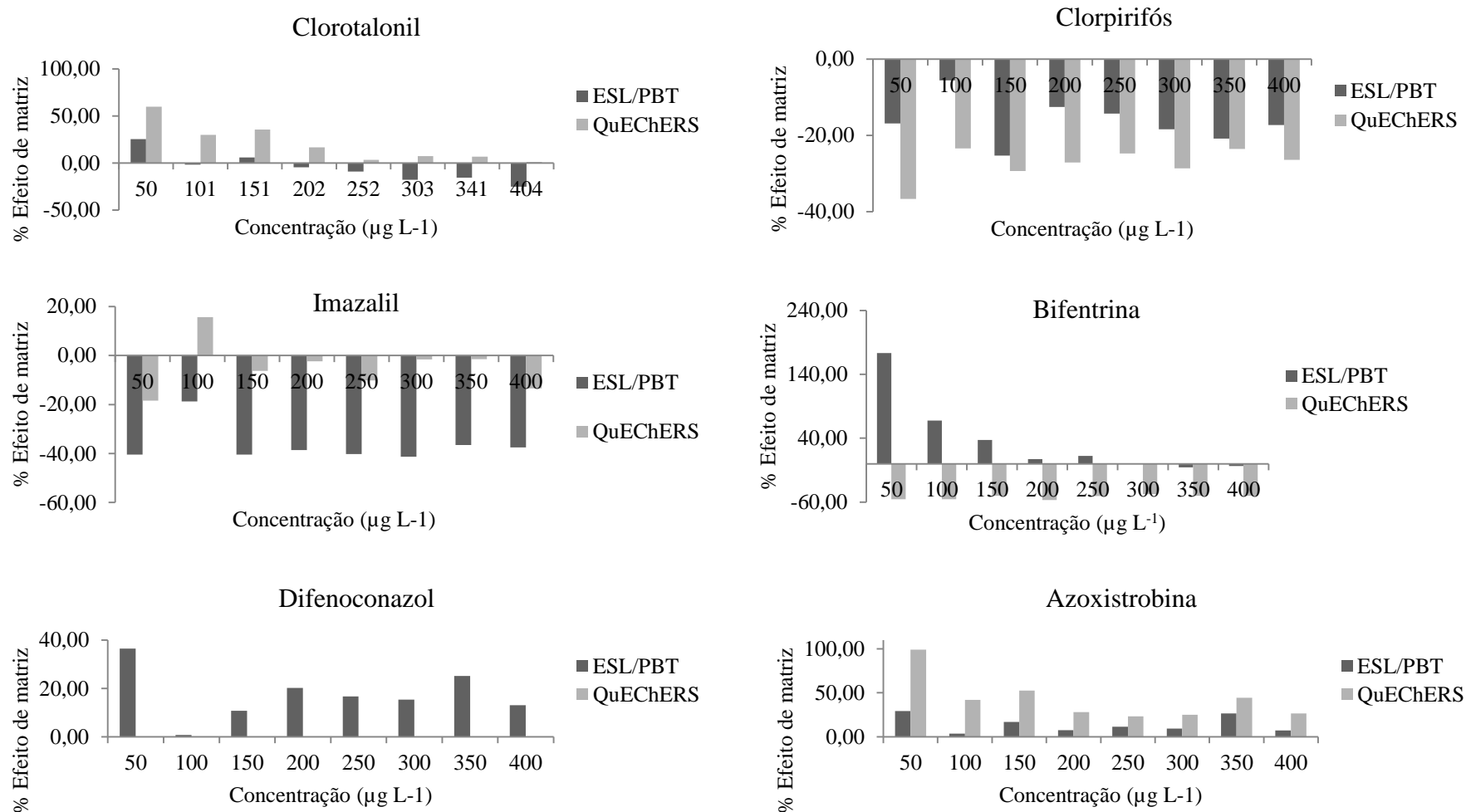


Figura 15. Grau do efeito de matriz para os agrotóxicos em estudo em amostras de casca de banana.

Na Figura 15 observe-se para o clorotalonil com a extração QuEChERS, que o efeito de matriz é positivo e maior para as concentrações menores e diminui conforme aumenta a concentração. Para a ESL/PBT o efeito de matriz é positivo em concentrações menores e negativo para as concentrações maiores, a partir de $202,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Nota-se que o efeito vai aumentando conforme aumenta a concentração. Porém o QuEChERS apresenta maior efeito de matriz que a ESL/PBT.

Para o clorpirifós o efeito de matriz para ambas as técnicas é negativo, sendo maior para o QuEChERS em todas as concentrações. Portanto os co-extrativos presentes no extrato diminuem a resposta cromatográfica do analito.

Para o imazalil ambas as técnicas apresentam efeitos de matriz negativos para todas as concentrações, exceto a $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$, que o efeito com QuEChERS foi positivo. Para este composto a ESL/PBT apresenta maior efeito de matriz que o QuEChERS.

Para a bifentrina na ESL/PBT apresenta efeito de matriz positivo para as concentrações menores e negativo para as concentrações maiores. Nota-se que tem uma diminuição do efeito com o aumento da concentração. Para o QuEChERS em todas as concentrações o efeito de matriz é negativo e constante de uma concentração para outra.

Para o difenoconazol o efeito de matriz é positivo em todas as concentrações, sendo maior para a concentração de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para a azoxistrobina o efeito de matriz é positivo tanto para QuEChERS como para ESL/PBT, sendo maior para o QuEChERS em todas as concentrações, principalmente em concentrações menores.

Como explicado por HAJŠLOVÁ et al., 1998, o efeito de matriz é maior para as baixas concentrações de agrotóxicos. Resultados obtidos para todos os compostos tanto na polpa como na casca.

Pode-se concluir dessa forma que para todos os agrotóxicos, os componentes da matriz contribuem para a variação da resposta cromatográfica de forma positiva ou negativa dependendo do agrotóxico e da matriz.

Compararam-se os métodos de extração utilizando o test t-pareado com um 95% de confiança por meio das inclinações das curvas analíticas utilizadas para determinar o efeito de matriz, tanto para polpa como para casca, apresentadas nas Tabelas 8 e 9. Valores maiores a 2,2 apresentam diferenças significativas entre ambos os métodos. Na Tabela 10 estão apresentados os t-calculados para cada agrotóxico tanto na polpa como na casca.

Tabela 10. Teste t-pareado para comparar os métodos na polpa e na casca.

	Polpa	Casca
	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{calculado}}$
Clorotalonil	0,1	0,1
Clorpirifós	0,1	0,0
Imazalil	0,2	0,3
Bifentrina	0,3	1,0
Difenoconazol	1,1	-
Azoxistrobina	0,1	0,2

t_{critico} : 2,2

Observa-se que não existe diferenças significativas para nenhum dos agrotóxicos estudados utilizando a ESL/PBT e o QuEChERS nem para a polpa, nem para a casca. Porém para o difenoconazol não foi possível comparar as técnicas na casca devido à interferência apresentada utilizando a técnica QuEChERS.

Devido que tanto para polpa como para casca utilizando a ESL/PBT e o QuEChERS existe efeito de matriz optou-se por trabalhar com o método de superposição de matriz.

5.5. Validação dos métodos analíticos

A validação de um método tem como finalidade demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. Assim, para que um método analítico gere informações interpretáveis sobre uma amostra, este deve passar por uma avaliação denominada validação. (BRITO et al., 2003).

5.5.1. Seletividade dos métodos

Para avaliar a seletividade da ESL/PBT e QuEChERS, compararam-se os cromatogramas dos extratos obtidos após as extrações em amostras isentas dos agrotóxicos com os extratos das amostras fortificadas com os compostos em estudo.

Nas Figuras 16 à 19 são apresentadas uma superposição entre os cromatogramas, sendo o cromatograma em azul referente ao extrato do branco da matriz isenta de contaminação e o cromatograma em rosa do extrato do branco fortificado com os agrotóxicos.

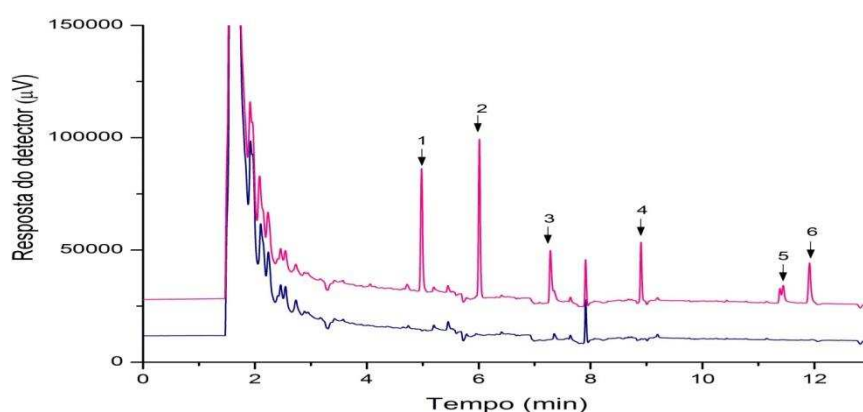


Figura 16. Cromatogramas dos extratos das amostras de polpa submetidas à ESL/PBT (rosa) contendo os agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (azul) isenta de agrotóxicos. 1-clorotalonil $t_R= 5,05$ min; 2-clorpirifós $t_R= 5,95$ min; 3-imazalil $t_R= 7,45$ min; 4- bifentrina $t_R= 8,86$ m, 5-difenoconazol $t_R= 11,48$ min; 6-azoxistrobina $t_R= 12,07$.

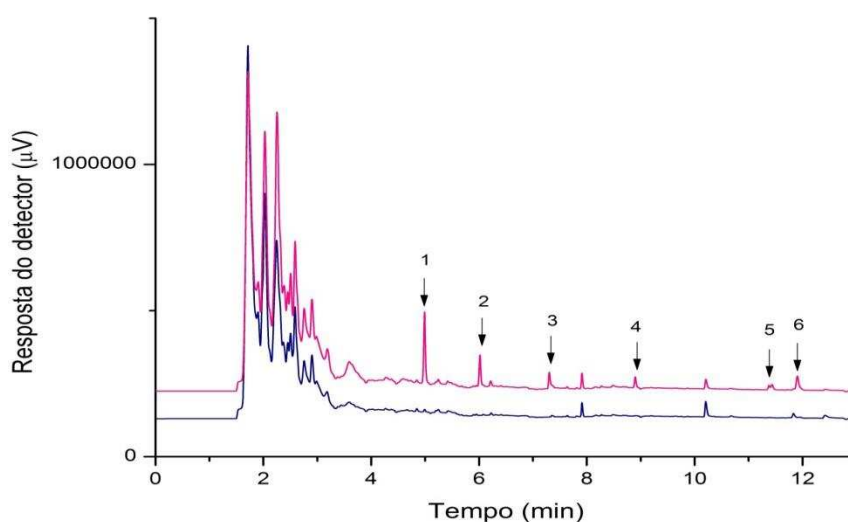


Figura 17. Cromatogramas dos extratos das amostras de polpa submetidas à extração QuEChERS (rosa) contendo os agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (azul) isenta de agrotóxicos. 1-clorotalonil $t_R= 5,05$ min; 2-clorpirifós $t_R= 5,95$ min; 3-imazalil $t_R= 7,45$ min; 4- bifentrina $t_R= 8,86$ min; 5-difenoconazol $t_R= 11,48$ min; 6-azoxistrobina $t_R= 12,07$.

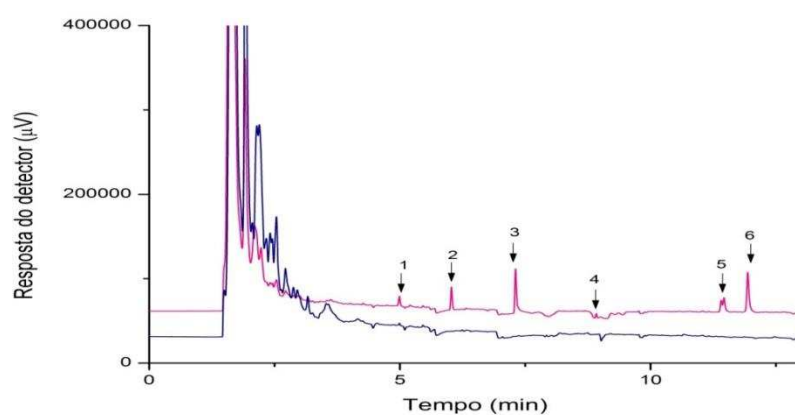


Figura 18. Cromatogramas dos extratos das amostras de casca submetidas à ESL/PBT (rosa) contendo os agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (azul) isenta de agrotóxicos. 1-clorotalonil $t_R= 5,05$ min; 2-clorpirifós $t_R= 5,95$ min; 3-imazalil $t_R= 7,45$ min; 4- bifentrina $t_R= 8,86$ min; 5- difenoconazol $t_R= 11,48$ min; 6-azoxistrobina $t_R= 12,07$.

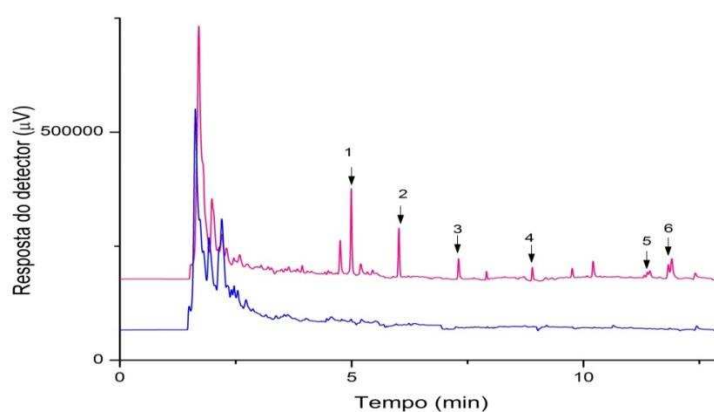


Figura 19. Cromatogramas dos extratos das amostras de casca submetidas à extração QuEChERS (rosa) contendo os agrotóxicos a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e (azul) isenta de agrotóxicos. 1-clorotalonil $t_R= 5,05$ min; 2-clorpirifós $t_R= 5,95$ min; 3-imazalil $t_R= 7,45$ min; 4- bifentrina $t_R= 8,86$ min; 5-difenoconazol $t_R= 11,48$ min; 6-azoxistrobina $t_R= 12,07$.

Nos cromatogramas das Figuras 16 a 19, observa-se que, apesar da complexidade na composição das matrizes, nenhuns de seus interferentes apresentam picos coincidentes com os picos dos analitos analisados. Assim, se confirma a seletividade das técnicas de extração.

5.5.2. Linearidade de resposta do detector

Para avaliar a qualidade da curva analítica, considera-se o coeficiente de correlação (r), de modo que, se este valor for próximo a 1,0, menor será a dispersão do conjunto de

pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Como referência a ANVISA recomenda que o valor de r seja maior que 0,99 (ANVISA, 2003).

A qualidade do ajuste do modelo de regressão da resposta do detector foi avaliada pelas curvas analíticas preparadas conforme o item 4.7.2. Na Figura 20 estão representadas as curvas analíticas quando as soluções padrão foram analisadas por CG-DCE. NA Tabela 11 estão apresentados os parâmetros das equações de regressão linear para cada agrotóxico. A linearidade foi avaliada pelo valor obtido no coeficiente de correlação.

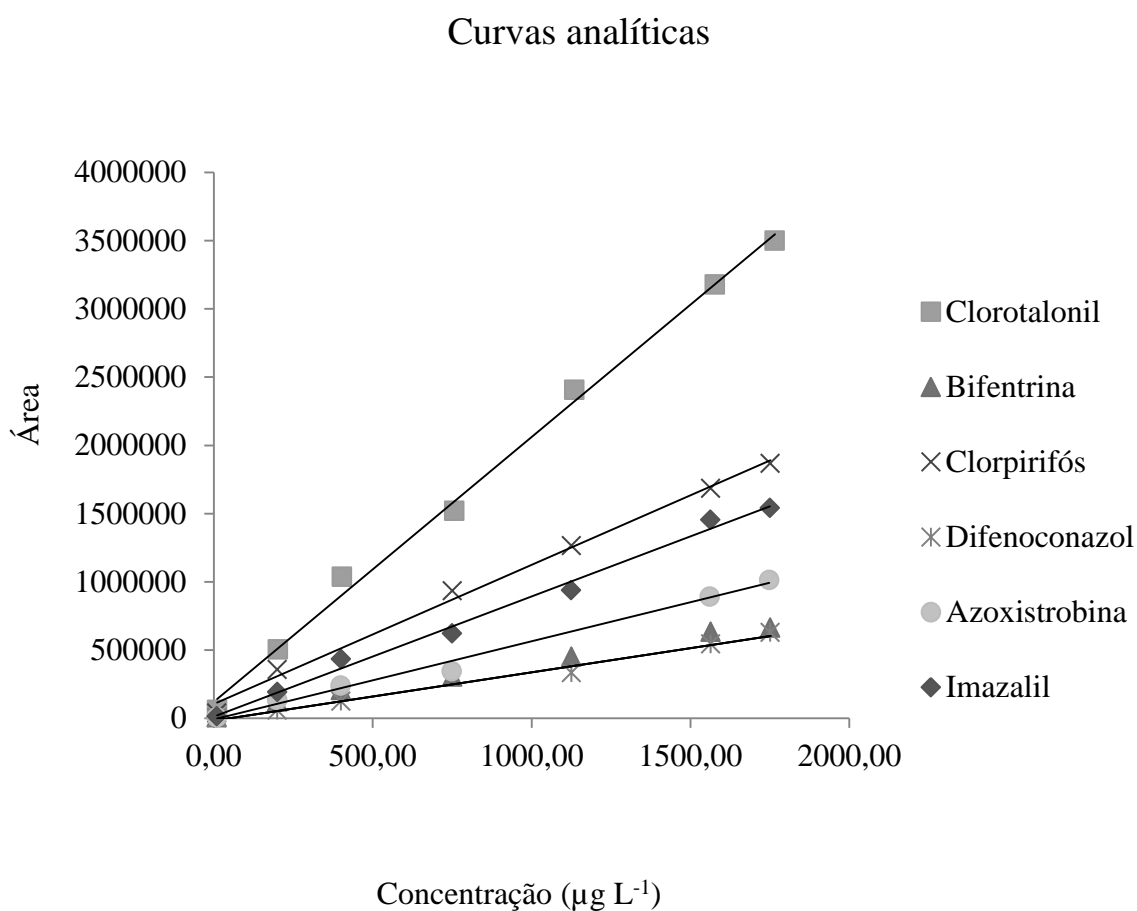


Figura 20. Curvas analíticas preparadas a partir das respostas cromatográficas das soluções padrão dos agrotóxicos na faixa de concentração entre 10,0 e 1750,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ analisadas por CG-DCE.

Tabela 11. Parâmetros das equações de regressão linear das respostas cromatográficas das soluções padrão dos agrotóxicos em acetonitrila.

Agrotóxicos	Sensibilidade	Branco	Coefficiente de correlação
Clorotalonil	1939,1	122706	0,998
Clorpirifós	1019,2	105782	0,998
Imazalil	879,2	13999	0,996
Bifentrina	370,8	33062	0,997
Difenoconazol	353,3	-16194	0,995
Azoxistrobina	571,3	-6176	0,996

Observa-se na Tabela 11, em termos de coeficiente de correlação, obtidos pelo modelo de regressão linear ($y=ax+b$), que a linearidade das respostas cromatográficas dos compostos estudados são maiores ou iguais a 0,995. Além disso, pode-se notar pela inclinação das curvas analíticas, que representa a sensibilidade analítica, que o detector por captura de elétrons é mais sensível aos compostos clorotalonil, clorpirifós e imazalil. Esta sensibilidade está relacionada com a presença e quantidade de átomos eletronegativos presentes na estrutura dos analitos que capturam elétrons, tais como cloro, oxigênio e nitrogênio.

5.5.3. Linearidade de resposta dos métodos

A linearidade do método corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de concentração onde o método será aplicado. Isto é avaliado por meio de curvas analíticas construídas com dados de amostras fortificadas e submetidas às extrações (VALDERRAMA et al., 2009).

Desta forma, após análise dos extratos preparados a partir de amostras de polpa e casca de banana pelos dois métodos de extração e fortificadas em função do LQ de cada agrotóxico (item 4.1), foram construídas curvas analíticas para cada um dos agrotóxicos. Essas curvas foram avaliadas pela regressão linear através do método de mínimos quadrados.

Na Figura 21 e 22 são mostradas as curvas analíticas obtidas para polpa, para cada composto, pelo método de superposição da matriz do método ESL/PBT e QuEChERS respectivamente. Na Tabela 12 são apresentadas as faixas de concentração utilizadas, assim como os parâmetros das equações de regressão linear dessas curvas.

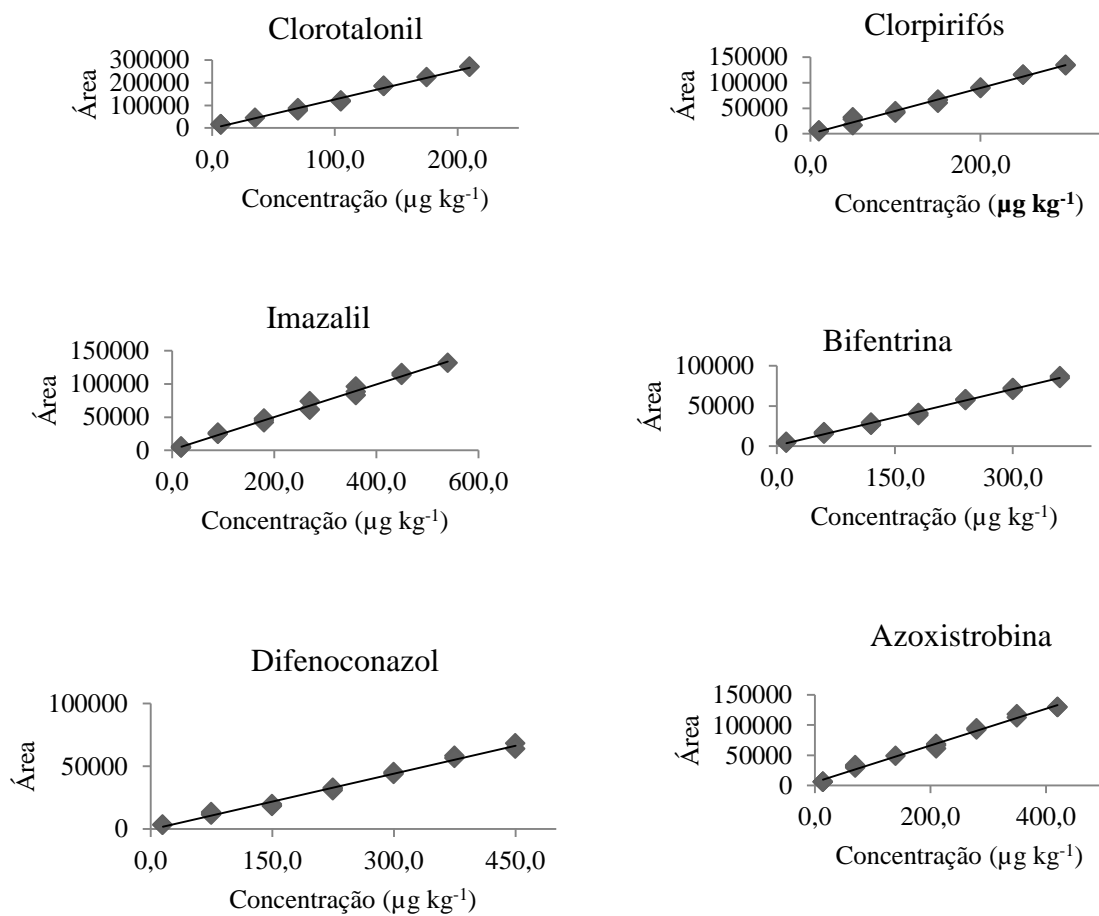


Figura 21. Curvas analíticas preparadas a partir dos extratos de amostras de polpa fortificadas e submetidas à extração ESL/PBT.

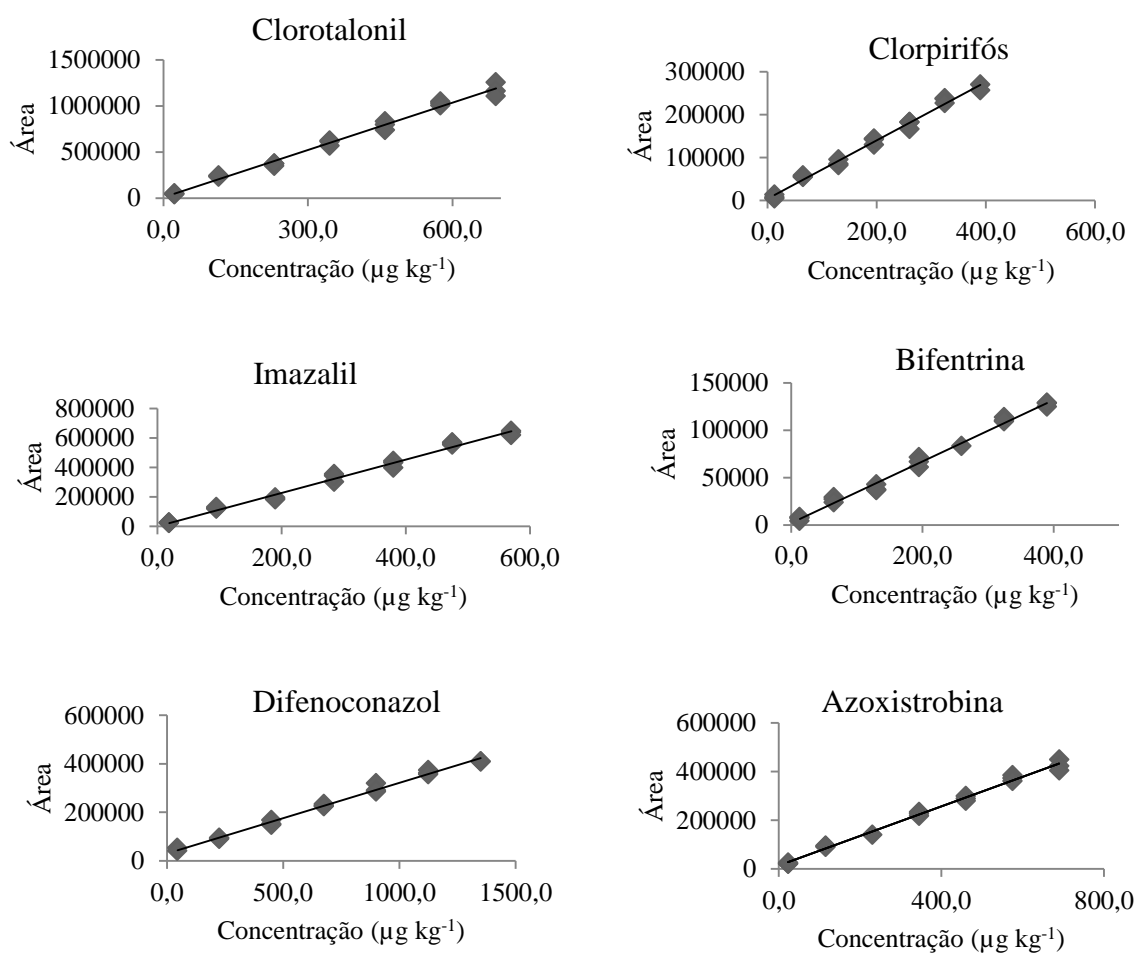


Figura 22. Curvas analíticas preparadas a partir dos extratos de amostras de polpa fortificadas e submetidas à extração pelo QuEChERS.

Tabela 12. Faixas de concentração e parâmetros das equações de regressão linear das curvas analíticas preparadas em extratos de amostras de polpa fortificadas e submetidas à extração ESL/PBT e QuEChERS.

	Agrotóxico	Sensibilidade	Branco	Coefficiente de correlação	Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
ESL/PBT	Clorotalonil	1273,6	1162,9	0,995	7,0-210,0
	Clorpirifós	446,1	316,3	0,996	10,0 - 300,0
	Imazalil	245,8	930,5	0,995	18,0- 540,0
	Bifentrina	232,8	113,6	0,998	12,0 - 360,0
	Difenoconazol	147,8	-211,0	0,995	15,0 - 450,0
	Azoxistrobina	304,6	5228,0	0,995	14,0 - 420,0
QuEChERS	Clorotalonil	1709,6	9898,4	0,995	23,0-690,0
	Clorpirifós	682,8	3464,8	0,996	13,0 - 390,0
	Imazalil	1132,2	1309,2	0,995	19,0- 570,0
	Bifentrina	324,9	2060,0	0,996	13,0 - 390,0
	Difenoconazol	290,3	31021,0	0,996	45,0 - 1350,0
	Azoxistrobina	606,5	14182,0	0,996	23,0 - 690,0

Os dados da Tabela 12 permitem observar que os coeficientes de correlação dos dois métodos são iguais ou maiores a 0,995 e para ambos os métodos a linearidade não difere muito entre si. Em relação à sensibilidade tanto para a ESL/PBT como para o QuEChERS, o clorotalonil apresenta uma maior inclinação da curva em comparação ao demais agrotóxicos estudados. Para todos os agrotóxicos o método QuEChERS apresentou maior sensibilidade do que a ESL/PBT. Se são comparadas com as sensibilidades no solvente puro (Tabela 11), todos os agrotóxicos apresentam sensibilidades menores para ambos os métodos, exceto para imazalil e azoxistrobina, utilizando o QuEChERS.

Nas Figuras 23 e 24 são mostradas as curvas analíticas obtidas para casca para cada composto pelo método de superposição da matriz dos métodos ESL/PBT e QuEChERS, respectivamente. Na Tabela 13 são apresentadas as faixas de concentração utilizadas, assim como os parâmetros das equações de regressão linear dessas curvas.

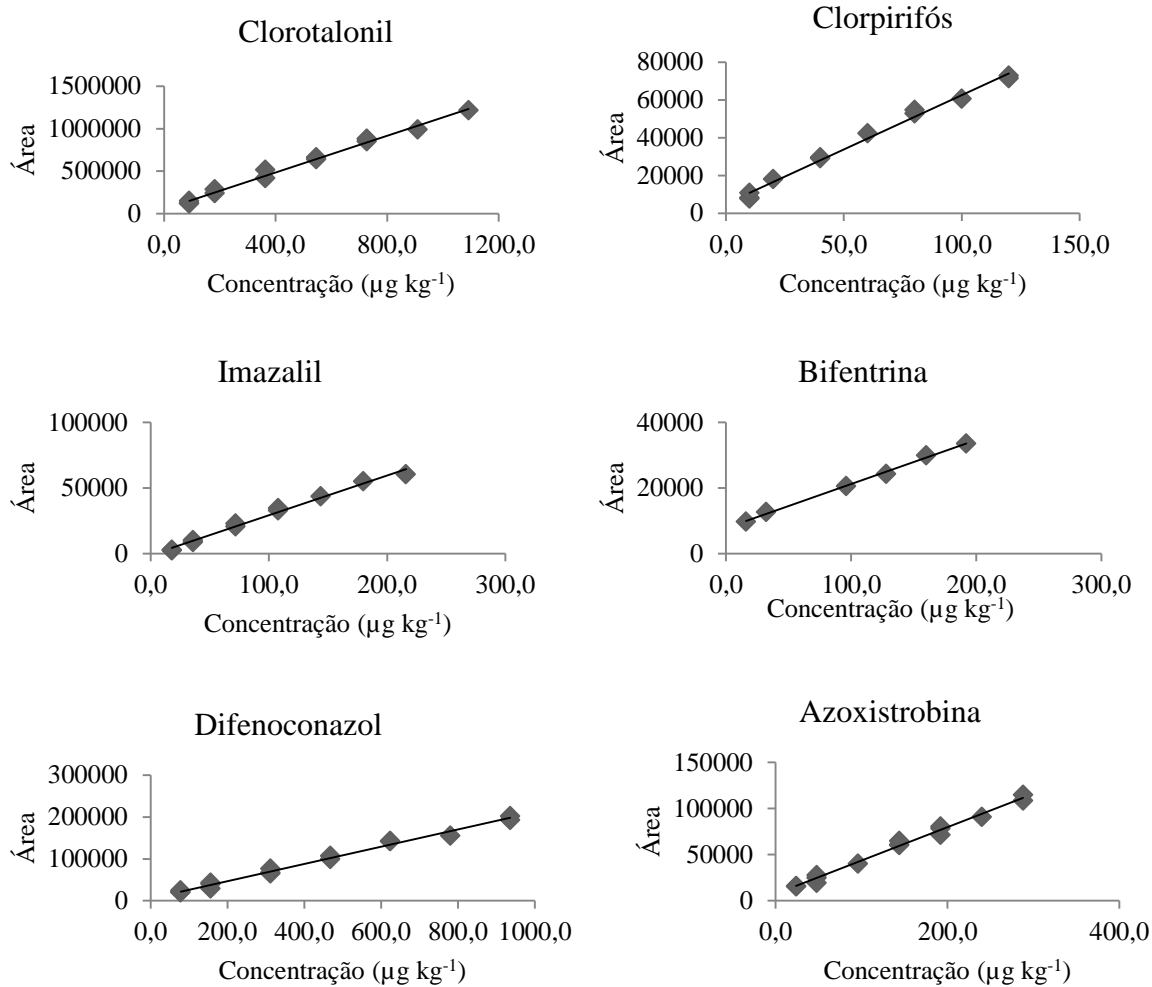


Figura 23. Curvas analíticas preparadas a partir dos extratos de amostras de casca fortificadas e submetidas à extração ESL/PBT.

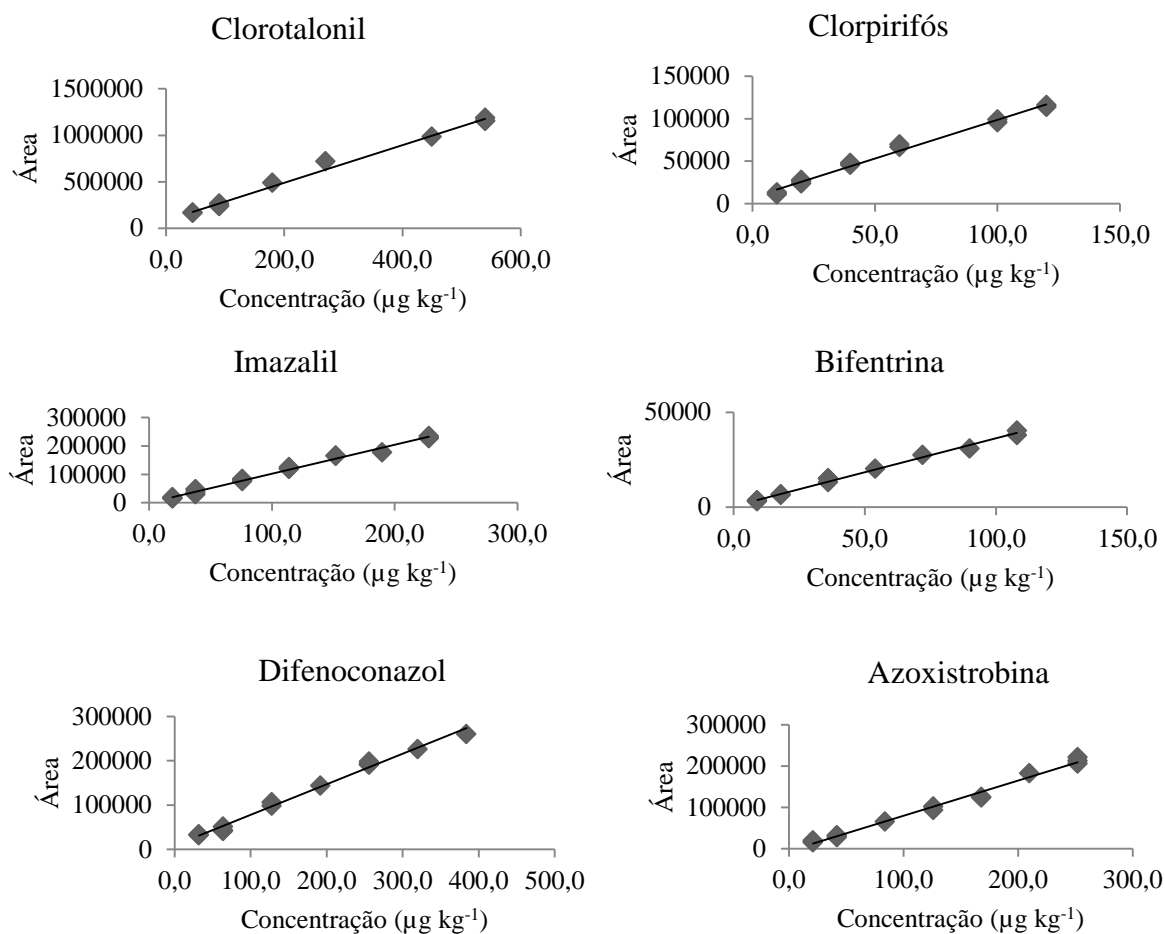


Figura 24. Curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de casca fortificadas e submetidas à extração QuEChERS.

Tabela 13. Faixas de concentração e parâmetros das equações de regressão linear das curvas analíticas preparadas em extratos de amostras de casca fortificadas e submetidas à extração ESL/PBT e QuEChERS.

	Agrotóxico	Sensibilidade	Branco	Coefficiente de correlação	Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
ESL/PBT	Clorotalonil	1075,6	55221,0	0,996	91,0 - 1092,0
	Clorpirifós	573,5	5128,8	0,995	10,0 - 120,0
	Imazalil	303,7	-1236,1	0,995	18,0 - 216,0
	Bifentrina	134,2	7744,6	0,998	16,0 - 192,0
	Difenoconazol	205,3	5881,2	0,995	78,0 - 936,0
	Azoxistrobina	362,3	7161,5	0,995	24,0 - 288,0
QuEChERS	Clorotalonil	2021,6	33714	0,999	45,0 - 540,0
	Clorpirifós	1041,1	606,2	0,996	10,0 - 120,0
	Imazalil	1173,1	9238,4	0,996	19,0 - 228,0
	Bifentrina	356,7	580,6	0,996	9,0 - 108,0
	Difenoconazol	690,3	8616,1	0,996	32,0 - 384,0
	Azoxistrobina	642,2	-6310,3	0,997	21,0 - 252,0

Para as curvas obtidas para cada agrotóxico (Tabela 13) os coeficientes de correlação dos dois métodos são iguais ou maiores a 0,995. Porém o QuEChERS apresenta maiores coeficientes de correlação que a ESL/PBT, exceto para a bifentrina. Em relação à sensibilidade tanto na ESL/PBT como para QuEChERS, o clorotalonil apresenta uma maior inclinação da curva em comparação aos outros agrotóxicos. O método QuEChERS apresentou maior sensibilidade para todos os agrotóxicos do que a ESL/PBT. Entretanto, se essas são comparadas com as sensibilidades obtidas para o solvente puro (Tabela 11), todos os agrotóxicos apresentam sensibilidades menores utilizando a ESL/PBT. Enquanto que para o método QuEChERS, somente a bifentrina apresenta menor sensibilidade.

A construção do gráfico de resíduos também permite verificar o ajuste de um modelo de regressão, de modo que quanto mais dispersos estiverem os resíduos, mais adequado é o modelo de regressão. Nas Figuras 25 a 28 são apresentados os gráficos de resíduos para todos os agrotóxicos em cada matriz para cada uma das técnicas de extração.

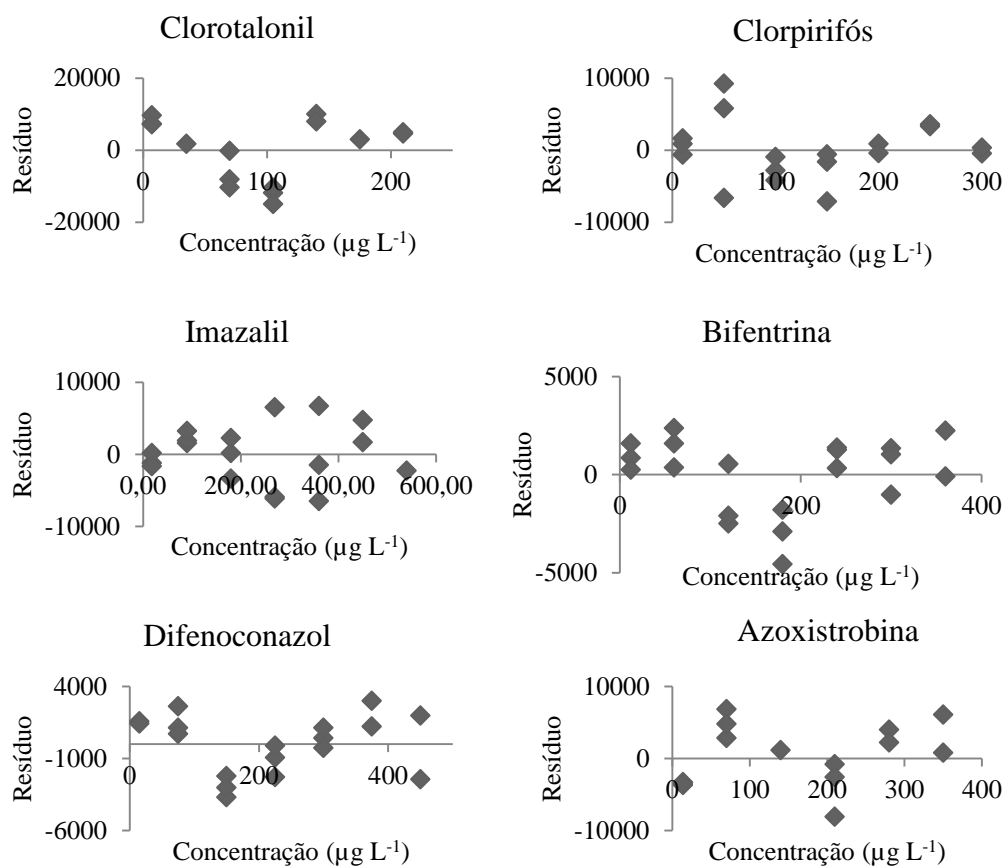


Figura 25. Gráficos de resíduos das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de polpa de banana pela técnica ESL/PBT.

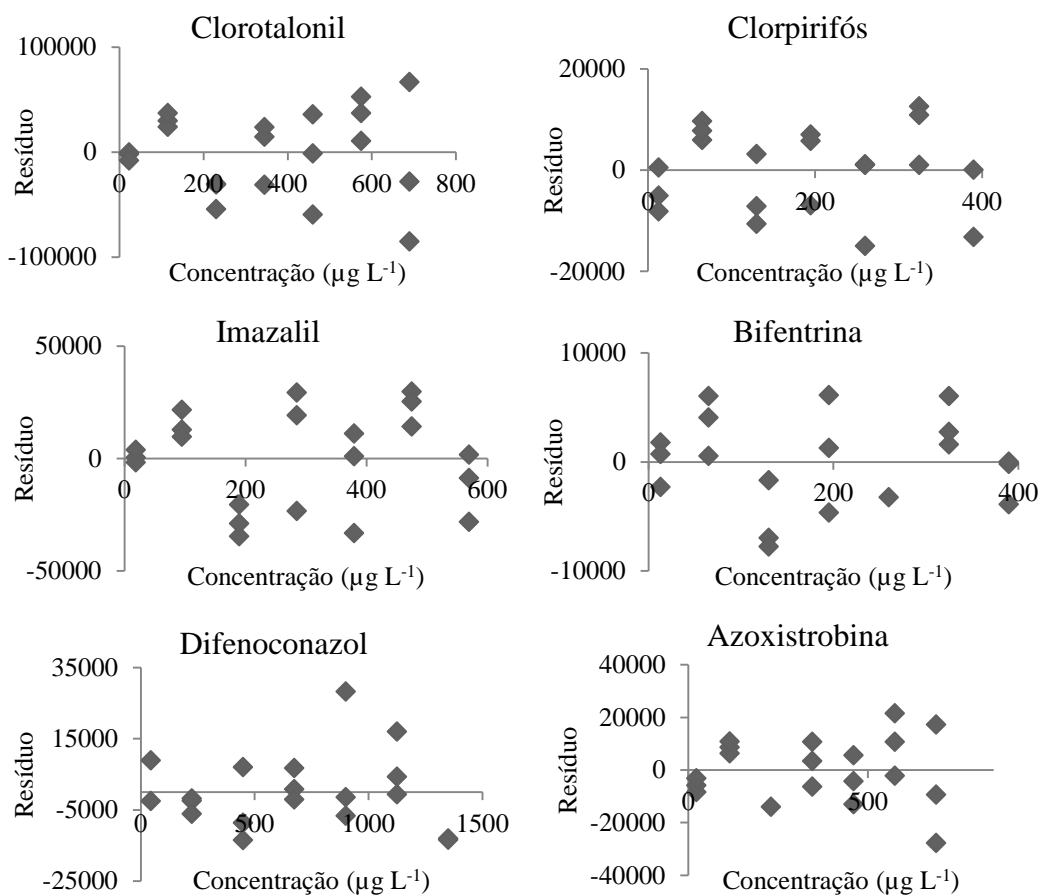


Figura 26. Gráficos de resíduos das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de polpa de banana pela técnica QuEChERS.

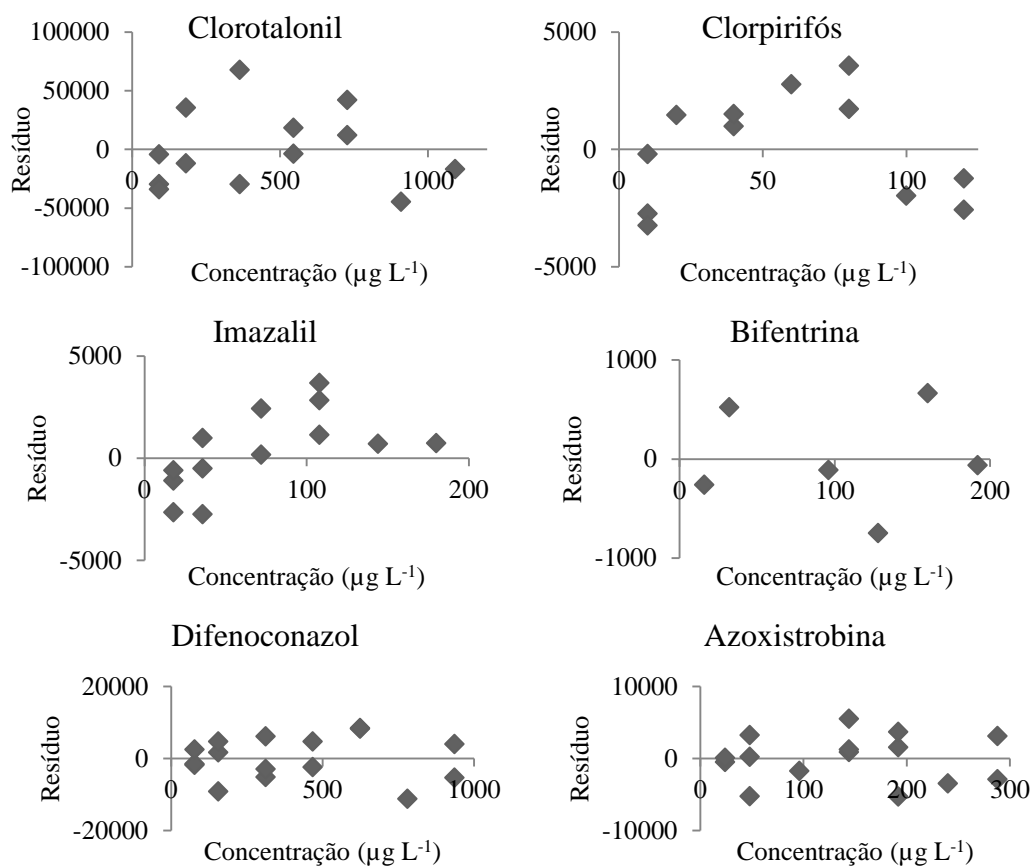


Figura 27. Gráficos de resíduos das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de casca de banana pela técnica ESL/PBT.

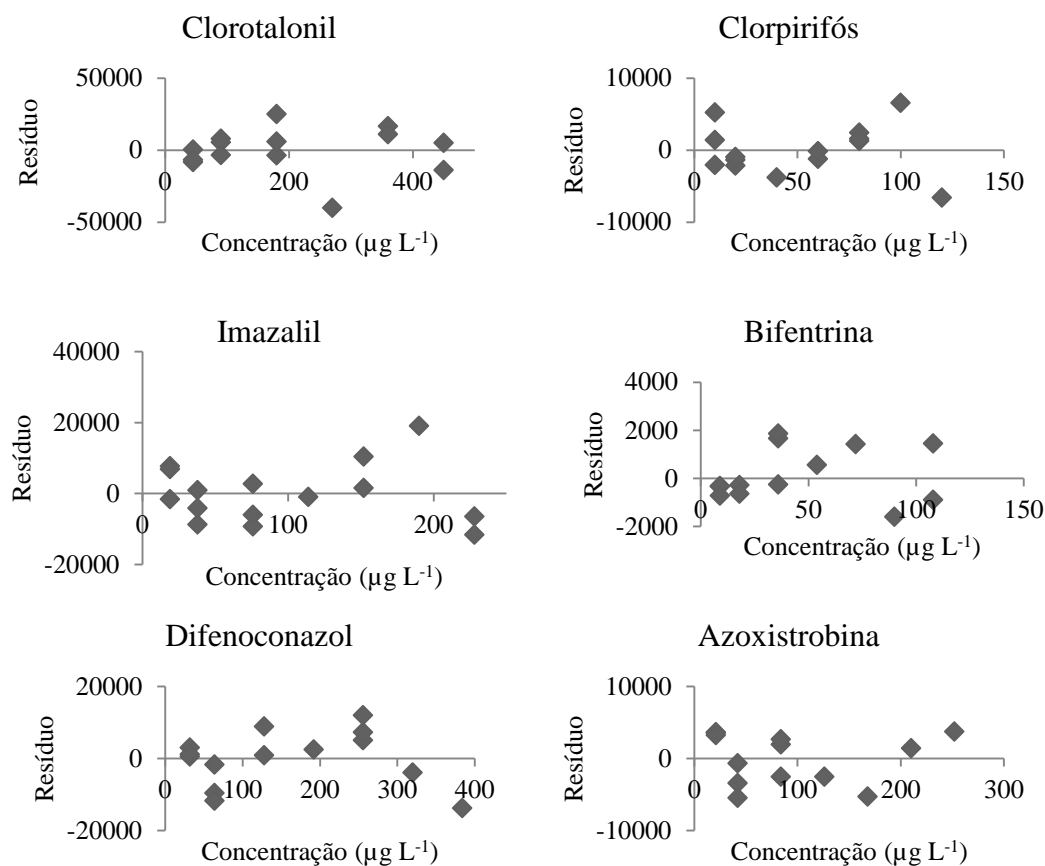


Figura 28. Gráficos de resíduos das curvas analíticas preparadas a partir de extratos de amostras de casca de banana pela técnica QuEChERS.

Uma condição do modelo de regressão linear é a homocedasticidade, que ocorre quando a variância dos termos de erro são constantes no intervalo de valores de uma variável independente. Para a aplicação adequada de regressão linear é importante a suposição de que os dados tenham uma variância do erro da população igual. Quando os termos do erro têm variância crescente ou flutuante, diz-se que os dados são heteroscedásticos (HAIR et al., 2009). Observa-se de forma geral que os dados para os agrotóxicos tanto na polpa como na casca, independente do método, estão dispersos no gráfico, ou seja, apresentam homocedasticidade. Assim, se verifica que eles se ajustam ao modelo de regressão linear.

5.5.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos agrotóxicos em cada matriz, após a ESL/PBT e QuEChERS, foram calculados utilizando a Equação 2 e são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos métodos para cada um dos agrotóxicos estudados na polpa e na casca da banana.

	Agrotóxico	ESL/PBT $\mu\text{g kg}^{-1}$		QuEChERS $\mu\text{g kg}^{-1}$	
		LD	LQ	LD	LQ
Polpa	Clorotalonil	2,1	6,8	7,4	22,3
	Clorpirifós	3,1	9,5	4,2	12,9
	Imazalil	5,7	17,3	6,0	18,1
	Bifentrina	3,7	11,2	4,3	13,0
	Difenoconazol	4,8	14,7	14,7	44,6
	Azoxistrobina	4,4	13,4	7,7	23,0
Casca	Clorotalonil	29,8	90,2	14,7	44,4
	Clorpirifós	3,0	9,2	3,1	9,5
	Imazalil	5,8	17,7	6,1	18,5
	Bifentrina	5,2	15,5	2,9	8,8
	Difenoconazol	25,5	77,3	10,6	32,0
	Azoxistrobina	7,8	23,5	6,7	20,4

Observa-se na Tabela 14 que para ESL/PBT dos agrotóxicos na polpa os limites de detecção e quantificação variam entre 2,1 e 5,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 6,8 e 17,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo ao clorotalonil e ao imazalil, respectivamente. No caso da extração QuEChERS na polpa, os LD atingiram a faixa entre 4,2 e 14,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto os LQ variaram de 12,9 e 23,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo aos compostos clorpirifós e o difenoconazol, respectivamente.

Para a ESL/PBT dos agrotóxicos na casca os limites de detecção e quantificação variaram entre 3,03 e 29,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 9,2 e 90,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo ao clorpirifós e ao clorotalonil, respectivamente. No caso da extração QuEChERS na casca, os LD atingiram a faixa entre 2,9 e 14,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os LQ variaram de 8,8 e 44,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo aos compostos bifentrina e clorotalonil, respectivamente.

Na polpa para a ESL/PBT, todos os analitos apresentaram menores valores de LD e LQ do que o QuEChERS. Porém na casca o QuEChERS apresentou menores LD e LQ do que a ESL/PBT para todos os agrotóxicos, exceto o clorpirifós e o imazalil.

Considerando os limites máximos de resíduos permitidos pela ANVISA, Codex Alimentarius e União Europeia apresentados na Tabela 3 para os compostos em estudo, pode-se observar que os valores de LQ obtidos estão abaixo do LMR permitido para todos os compostos, exceto para o clorpirifós na polpa empregando a técnica QuEChERS. O limite de quantificação obtido foi $12,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, que é ligeiramente superior ao LMR estabelecido pela ANVISA, que é de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Entretanto, este valor está abaixo dos LMRs estabelecidos pelo Codex Alimentarius e pela União Europeia.

5.5.5. Precisão e Exatidão

A precisão foi avaliada pela precisão intermediária e a repetitividade em termos de coeficiente de variação, conforme descrito no item 4.7.5. A exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação, conforme descrito no item 4.7.6.

5.5.5.1. Precisão intermediária

A avaliação da precisão intermediária de cada método foi verificada pelos coeficientes de variação (%CV) dos agrotóxicos em amostras de polpa e casca de banana, fortificadas em três níveis de concentração, em três dias diferentes. As análises foram realizadas ao terceiro e quinto dia após o primeiro teste, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. Os resultados estão apresentados na Tabela 15 para polpa utilizando a ESL/PBT e QuEChERS, respectivamente. Na Tabela 16 estão apresentados os resultados para casca utilizando a ESL/PBT e QuEChERS, respectivamente.

Tabela 15. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após extrações dos agrotóxicos na polpa da banana em três níveis de concentração, com a técnica ESL/PBT e QuEChERS em três dias não consecutivos, em sextuplicata.

Agrotóxicos	Polpa-ESL/PBT										Polpa-QuEChERS							
	$\mu\text{g kg}^{-1}$	1° dia		3° dia		5° dia		Media %R	Media %CV	$\mu\text{g kg}^{-1}$	1° dia		3° dia		5° dia		Media %R	Media %CV
		% R	% CV	% R	% CV	% R	% CV				% R	% CV	% R	% CV	% R	% CV		
Clortalonil	7,0	90,4	2,3	95,1	7,6	87,6	2,0	91,0	8,2	23,0	122,3	5,7	111,1	2,4	126,7	5,4	120,0	8,2
	105,0	101,2	3,8	97,2	7,2	101,6	3,1	100,0	8,7	345,0	97,1	4,7	98,6	2,8	96,6	1,5	97,4	5,6
	210,0	99,7	6,3	100,7	8,7	99,6	6,2	100,0	12,3	690,0	100,7	2,6	100,3	1,7	100,8	11,0	100,6	11,4
Clorpirifós	10,0	117,9	0,6	99,1	1,4	92,5	3,1	103,1	3,5	13,0	109,3	1,0	142,4	3,4	157,8	0,7	136,5	3,6
	150,0	97,7	4,2	100,1	3,4	103,3	5,2	100,4	7,5	195,0	98,4	0,5	94,7	3,3	91,3	2,6	94,8	4,3
	300,0	100,6	6,7	100,0	4,7	110,5	2,1	103,7	8,4	390,0	100,4	9,0	101,5	6,1	105,5	10,8	102,4	15,3
Imazalil	18,0	111,2	1,8	93,6	3,0	138,0	0,5	114,3	3,6	19,0	128,5	0,9	154,9	1,6	129,3	0,4	137,5	1,9
	270,0	97,1	1,5	100,8	7,4	121,6	9,2	106,5	11,9	285,0	85,0	9,0	92,7	7,8	96,2	3,0	91,3	12,3
	540,0	112,5	9,8	99,8	4,8	107,3	8,0	106,5	13,6	570,0	92,8	8,0	101,1	5,5	100,9	12,1	98,3	15,5
Bifentrina	12,0	114,2	0,9	70,5	0,3	131,3	0,6	105,3	1,1	13,0	103,6	1,1	83,6	2,2	74,7	1,8	87,3	3,0
	180,0	97,6	2,6	103,5	2,3	95,9	5,1	99,0	6,2	195,0	99,5	4,8	102,1	5,2	104,4	2,3	102,0	7,4
	360,0	100,8	3,8	99,0	6,8	101,0	3,6	100,3	8,6	390,0	100,1	3,1	99,5	3,7	98,9	8,5	99,5	9,8
Difenoconazol	15,0	111,2	1,0	111,1	0,3	103,6	1,1	108,7	1,5	45,0	80,6	8,5	76,2	3,9	77,9	3,1	78,2	9,9
	225,0	98,2	8,4	107,4	3,1	99,5	2,4	101,7	9,3	675,0	103,0	8,5	103,1	7,7	103,3	7,4	103,1	13,7
	450,0	97,3	7,7	111,5	3,3	100,1	5,9	103,0	10,2	1350,0	98,7	7,9	100,0	8,1	100,5	6,7	99,7	13,1
Azoxistrobina	14,0	94,6	2,2	113,1	0,9	135,9	1,4	114,5	2,8	23,0	84,5	2,3	81,0	1,8	80,5	1,1	82,0	3,1
	210,0	100,7	10,7	92,2	2,4	94,9	6,3	95,9	12,7	345,0	102,0	1,4	102,4	6,2	104,1	3,4	102,8	7,2
	420,0	99,8	0,9	101,2	2,8	101,2	3,9	100,8	4,9	690,0	99,5	6,6	99,4	8,2	98,5	7,1	99,2	12,7

Tabela 16. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após seis extrações dos agrotóxicos na casca da banana em três níveis de concentração, com a técnica ESL/PBT e QuEChERS em três dias não consecutivos, em sextuplicata.

Agrotóxicos	Casca-ESL/PBT										Casca-QuEChERS							
	$\mu\text{g kg}^{-1}$	1° dia		3° dia		5° dia		Media %R	Media %CV	$\mu\text{g kg}^{-1}$	1° dia		3° dia		5° dia		Media %R	Media %CV
		% R	%CV	% R	%CV	% R	%CV				% R	%CV	% R	%CV	% R	%CV		
Clorotalonil	91,0	80,8	2,0	85,4	9,5	98,8	3,4	88,3	10,3	45,0	67,0	6,6	99,0	3,1	73,7	2,4	79,9	7,7
	546,0	105,9	9,4	105,7	6,8	100,4	2,5	104,0	11,9	270,0	108,3	11,7	114,2	8,9	107,5	7,1	110,0	16,4
	1092,0	98,7	6,8	98,7	2,5	99,9	10,1	99,1	12,4	540,0	97,7	8,1	95,3	4,1	100,2	9,9	97,8	13,4
Clorpirifós	10,0	84,5	3,5	81,0	1,6	107,4	1,0	91,0	3,9	10,0	100,4	1,5	74,3	4,3	76,5	1,5	83,7	4,8
	60,0	104,7	3,2	105,8	2,7	97,7	0,9	102,8	4,3	60,0	99,9	2,3	121,1	4,0	107,2	6,1	109,4	7,7
	120,0	98,9	1,1	98,7	1,6	133,4	3,9	110,3	4,4	120,0	100,0	5,7	103,2	1,8	98,4	1,6	100,5	6,2
Imazalil	18,0	126,3	0,6	132,8	1,3	78,0	0,2	112,4	1,5	19,0	86,8	3,6	127,1	3,6	92,0	4,2	102,0	6,6
	108,0	92,0	3,0	90,0	4,0	106,7	0,8	96,2	5,1	114,0	104,0	8,5	91,7	2,3	99,3	8,9	98,3	12,5
	216,0	101,8	1,8	102,3	2,4	98,5	1,3	100,9	3,3	228,0	99,1	4,7	101,9	2,1	99,4	3,9	100,1	6,4
Bifentrina	16,0	71,9	3,0	69,8	3,0	95,3	0,7	79,0	4,3	9,0	150,6	1,3	143,8	2,4	96,3	6,8	130,2	7,3
	96,0	108,6	3,5	109,2	1,2	101,4	3,2	106,4	4,9	54,0	89,3	3,0	86,6	4,7	101,1	3,3	92,4	6,5
	192,0	98,0	1,1	97,9	2,0	99,7	3,3	98,5	4,0	108,0	102,4	3,9	103,0	3,6	99,7	2,8	101,7	6,0
Difenoconazol	78,0	93,0	9,8	84,1	3,3	73,0	4,6	83,4	11,3	32,0	120,6	2,6	154,9	10,2	150,2	6,5	141,9	12,4
	468,0	102,1	7,3	104,9	6,5	109,1	3,7	105,4	10,5	192,0	93,7	3,0	81,1	9,5	90,9	7,4	88,5	12,4
	936,0	99,5	8,4	98,9	2,1	98,5	8,1	99,0	11,8	384,0	101,4	4,9	104,9	7,3	103,7	7,0	103,3	11,2
Azoxistrobina	24,0	90,0	1,0	98,4	1,4	92,3	1,6	93,6	2,3	21,0	153,9	0,4	140,0	2,4	125,4	6,1	139,8	6,5
	144,0	103,1	3,8	100,5	3,4	102,3	1,7	102,0	5,4	126,0	129,4	0,6	95,5	12,2	95,0	9,1	106,6	15,2
	288,0	99,3	2,6	99,9	1,5	99,5	1,1	99,6	3,3	252,0	105,1	3,5	99,4	10,4	103,6	8,8	102,7	14,0

Segundo o MAPA para avaliar a precisão intermediária em amostras complexas são aceitáveis coeficientes de variação de até 20% para concentrações entre $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e de 15% para concentrações entre $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 1mg kg^{-1} (MAPA, 2011).

Os resultados, apresentados nas Tabelas 15 e 16, mostram que a precisão intermediária para todos os agrotóxicos, estão na faixa aceitável pelo MAPA, já que os coeficientes de variação apresentaram valores menores que 15% em todas as concentrações ao longo dos três dias para os dois métodos utilizados. Porém os coeficientes de variação médios foram maiores que 15%, para os agrotóxicos tais como o clorpirifós na concentração de $390,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o imazalil na concentração de $570,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, na polpa com a técnica QuEChERS e na casca, o clorotalonil na concentração de $270,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a azoxistrobina na concentração de $126,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, empregando a técnica QuEChERS.

Os coeficientes de variação obtidos na polpa variam entre 0,5%-13,6% para a ESL/PBT e entre 1,9%-15,5% para o QuEChERS. Na casca, a faixa varia entre 1,5%-12,4% para ESL/PBT e entre 4,8%-16,4% para o QuEChERS.

5.5.5.2.Repetitividade

Após realizar a extração dos respectivos agrotóxicos de seis amostras de polpa e de casca de banana fortificadas em três níveis de concentração diferentes, os analitos foram quantificados nos extratos orgânicos por CG/DCE. O tratamento dos dados permitiu calcular os valores de recuperação e do coeficiente de variação (%CV), que são apresentados na Tabela 17 para ambas as matrizes utilizando os dois métodos de extração.

Segundo o MAPA, para amostras complexas são aceitáveis coeficientes de variação de até 13% para concentrações entre $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e de 10% para concentrações entre $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 1mg kg^{-1} (MAPA, 2011).

Os resultados apresentados na Tabela 17 mostram que tanto para polpa como para casca utilizando os dois métodos de extração, os coeficientes de variação são menores do que os valores estabelecidos pelo MAPA (2011), sendo que os coeficientes de variação para polpa estão na faixa entre 0,3%- 8,7% para a ESL/PBT e de 0,5%-9,0% para o QuEChERS. Na casca a faixa varia entre 0,2%- 10,1% para ESL/PBT e entre 1,5%-9,9% para o QuEChERS.

Tabela 17. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação (%CV) obtidos pela análise de extratos de amostras de polpa e casca de banana fortificadas com os agrotóxicos em três níveis de concentração para cada técnica de extração, em sextuplicata.

Agrotóxico	Polpa-ESL/PBT			Polpa-QuEChERS			Casca-ESL/PBT			Casca-QuEChERS		
	$\mu\text{g kg}^{-1}$	% R	%CV	$\mu\text{g kg}^{-1}$	% R	%CV	$\mu\text{g kg}^{-1}$	% R	%CV	$\mu\text{g kg}^{-1}$	% R	%CV
Clorotalonil	7,0	95,1	7,6	23,0	122,3	5,7	91,0	98,8	3,4	45,0	73,7	2,4
	105,0	97,2	7,2	345,0	97,1	4,7	546,0	100,4	2,5	270,0	107,5	7,1
	210,0	100,7	8,7	690,0	100,7	2,6	1092,0	99,9	10,1	540,0	100,2	9,9
Clorpirifós	10,0	99,1	1,4	13,0	109,3	1,0	10,0	107,4	1,0	10,0	76,5	1,5
	150,0	100,1	3,4	195,0	98,4	0,5	60,0	97,7	0,9	60,0	107,2	6,1
	300,0	100,0	4,7	390,0	100,4	9,0	120,0	133,4	3,9	120,0	98,4	1,6
Imazalil	18,0	93,6	3,0	19,0	128,5	0,9	18,0	78,0	0,2	19,0	92,0	4,2
	270,0	100,8	7,4	285,0	85,0	9,0	108,0	106,7	0,8	114,0	99,3	8,9
	540,0	99,8	4,8	570,0	92,8	8,0	216,0	98,5	1,3	228,0	99,4	3,9
Bifentrina	12,0	70,5	0,3	13,0	103,6	1,1	16,0	95,3	0,7	9,0	96,3	6,8
	180,0	103,5	2,3	195,0	99,5	4,8	96,0	101,4	3,2	54,0	101,1	3,3
	360,0	99,0	6,8	390,0	100,1	3,1	192,0	99,7	3,3	108,0	99,7	2,8
Difenoconazol	15,0	111,1	0,3	45,0	80,6	8,5	78,0	73,0	4,6	32,0	150,2	6,5
	225,0	107,4	3,1	675,0	103,0	8,5	468,0	109,1	3,7	192,0	90,9	7,4
	450,0	111,5	3,3	1350,0	98,7	7,9	936,0	98,5	8,1	384,0	103,7	7,0
Azoxistrobina	14,0	113,1	0,9	23,0	84,5	2,3	24,0	92,3	1,6	21,0	125,4	6,1
	210,0	92,2	2,4	345,0	102,0	1,4	144,0	102,3	1,7	126,0	95,0	9,1
	420,0	101,2	2,8	690,0	99,5	6,6	288,0	99,5	1,1	252,0	103,6	8,8

5.5.6. Exatidão

As porcentagens de recuperação para cada agrotóxico em amostras de polpa e casca de banana estão apresentadas na Tabela 17.

Segundo o MAPA as faixas de aceitação das porcentagens de recuperação devem estar entre 70% e 120% (MAPA, 2011). Os resultados obtidos para a extração dos agrotóxicos tanto na polpa, como na casca da banana para ESL/PBT e QuEChERS mostram que a maioria dos agrotóxicos estão dentro da faixa aceitável. Algumas exceções foram o clorotalonil a 23,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e o imazalil a 19,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com o método QuEChERS na polpa. Na casca com o método ESL/PBT foi o clorpirifós a 120,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e com o método QuEChERS foram o difenoconazol a 32,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e a azoxistrobina a 21,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

As porcentagens de recuperação (%R) para a ESL/PBT na polpa variaram de 70,5-113,1%. Para o QuEChERS na polpa as porcentagens de recuperação variaram entre 80,6-128,5%

Para a casca utilizando a ESL/PBT as porcentagens de recuperação variaram entre 73,0-133,4% e para o QuEChERS os valores variaram entre 73,7-150,2%.

5.6. Efeito do estágio de maturação da banana

A avaliação do efeito do estágio de maturação da polpa e da casca da banana foi feita para verificar se existem diferenças nas recuperações dos agrotóxicos, devido às mudanças químicas que ocorrem na banana em função do tempo.

Os resultados da determinação da cor tanto para a polpa como para a casca estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Valores das coordenadas L*, a*, b* e parâmetros relacionados Chroma (C), e diferença de cor (ΔE) para avaliação da cor na polpa e na casca da banana em três dias não consecutivos.

	L	a	Polpa b	C	ΔE
Dia 1	82,7	-1,9	16,4	16,5	-
Dia 3	82,4	-1,6	16,4	16,5	0,4
Dia 5	82,8	-1,7	17,5	17,6	1,2
	L	a	Casca b	C	ΔE
Dia 1	71,8	-4,1	40,1	40,4	-
Dia 3	68,5	-2,3	39,0	39,2	3,9
Dia 5	69,3	0,0	37,9	37,9	2,7

Valores de L* mais próximos a 100 representam luminosidade mais clara, ou seja, mais próximo ao branco. Observa-se que o valor de L*, tanto para a polpa como para a casca, não teve uma variação expressiva, porém a polpa apresenta valores maiores de L* que a casca, indicando que, a casca tende ser mais escura que a polpa. O valor de a* está relacionado com a leitura relativa de verde (-) a vermelho (+). Observa-se que para ambas as matrizes os valores são negativos, exceto para o 5º dia para a casca, sendo que os valores mais negativos tendem a ser mais verdes e os valores positivos tendem ao vermelho. O valor de a* na polpa aumentou do primeiro dia para o terceiro dia, porém diminuiu de novo do terceiro para o quinto dia. Na casca os valores de a* aumentam ao decorrer dos dias passando de mais verde a mais vermelha, mostrando que a banana está menos verde e consequentemente mais madura.

Valores de b* correspondem à leitura relativa de azul (-) a amarelo (+). Observa-se que valores maiores tendem a ser mais amarelos, portanto os valores de b* para a casca são maiores que para a polpa. Embora na polpa os valores de b* tendam a aumentar, ou seja, a cor tende a ser mais amarela. Na casca os valores diminuem, ou seja, tende a ser menos amarela, tornando-se mais escura. (HARDEBERG, 2001)

O Chroma (C) indica se as cores são vivas (fortes) ou apagadas (fracas), valores de C maiores indicam cores mais vivas. Observa-se que os valores para a casca são maiores que para a polpa. No entanto ao longo dos dias os valores na polpa tendem a aumentar e os valores da casca tendem a diminuir.

A diferença de cor (ΔE) relaciona os dados anteriores permitindo determinar se existem diferenças de cor entre os dias. Observa-se na polpa que existem diferenças do primeiro dia para o terceiro dia, mas esta diferença é maior do terceiro dia para o quinto dia. Enquanto que na casca a diferença é maior do primeiro para o terceiro dia, do que do terceiro para o quinto dia (Anexo 1).

Os resultados obtidos para o comportamento dos analitos estão apresentados nas Figuras 29 a 32 para polpa e casca, respectivamente. O erro é apresentado como intervalo de confiança calculado como $(s \cdot t_{critico})/\sqrt{N}$, com 95% de confiança.

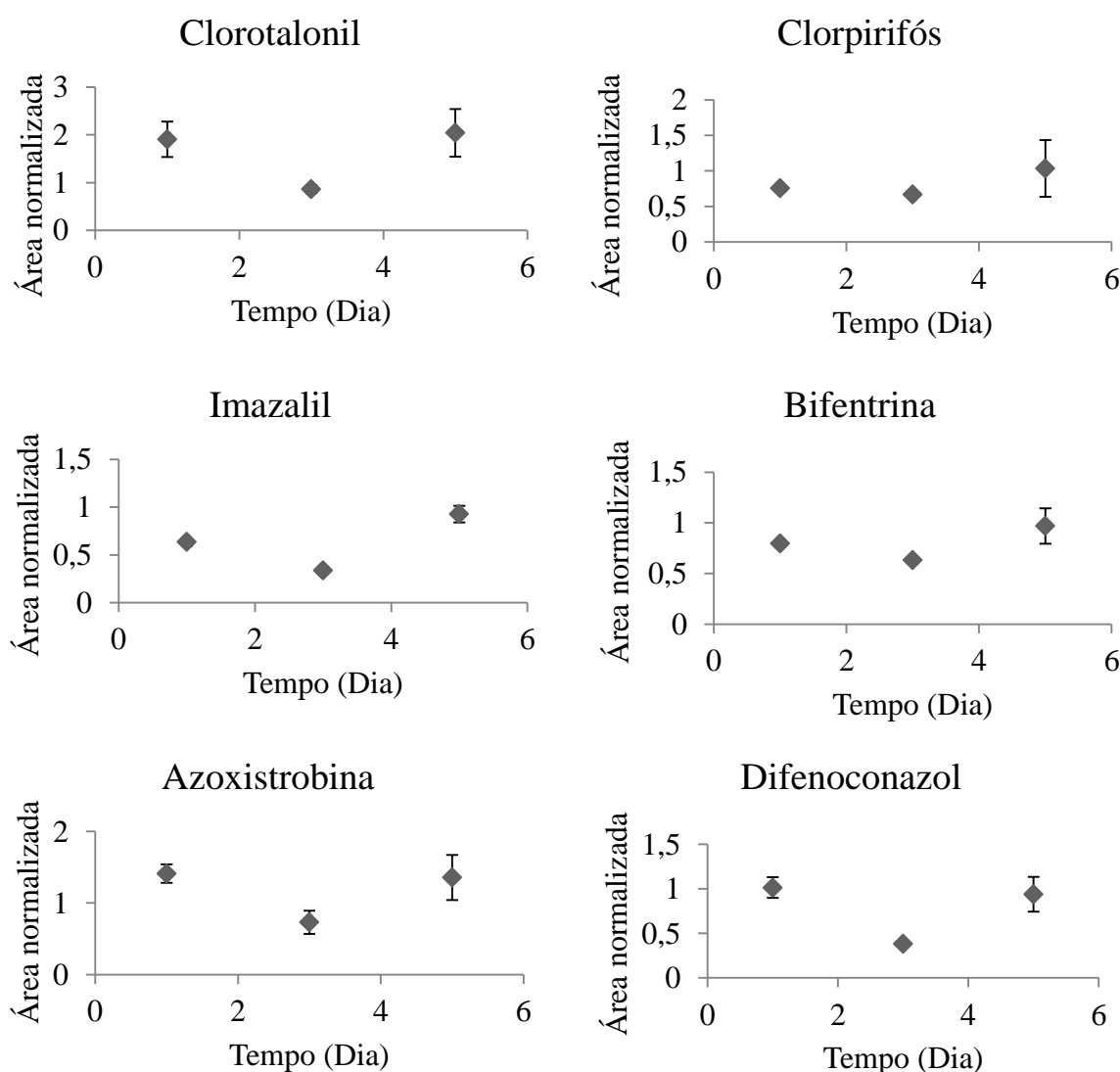


Figura 29. Variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos devido ao efeito da maturação da polpa de banana utilizando ESL/PBT.

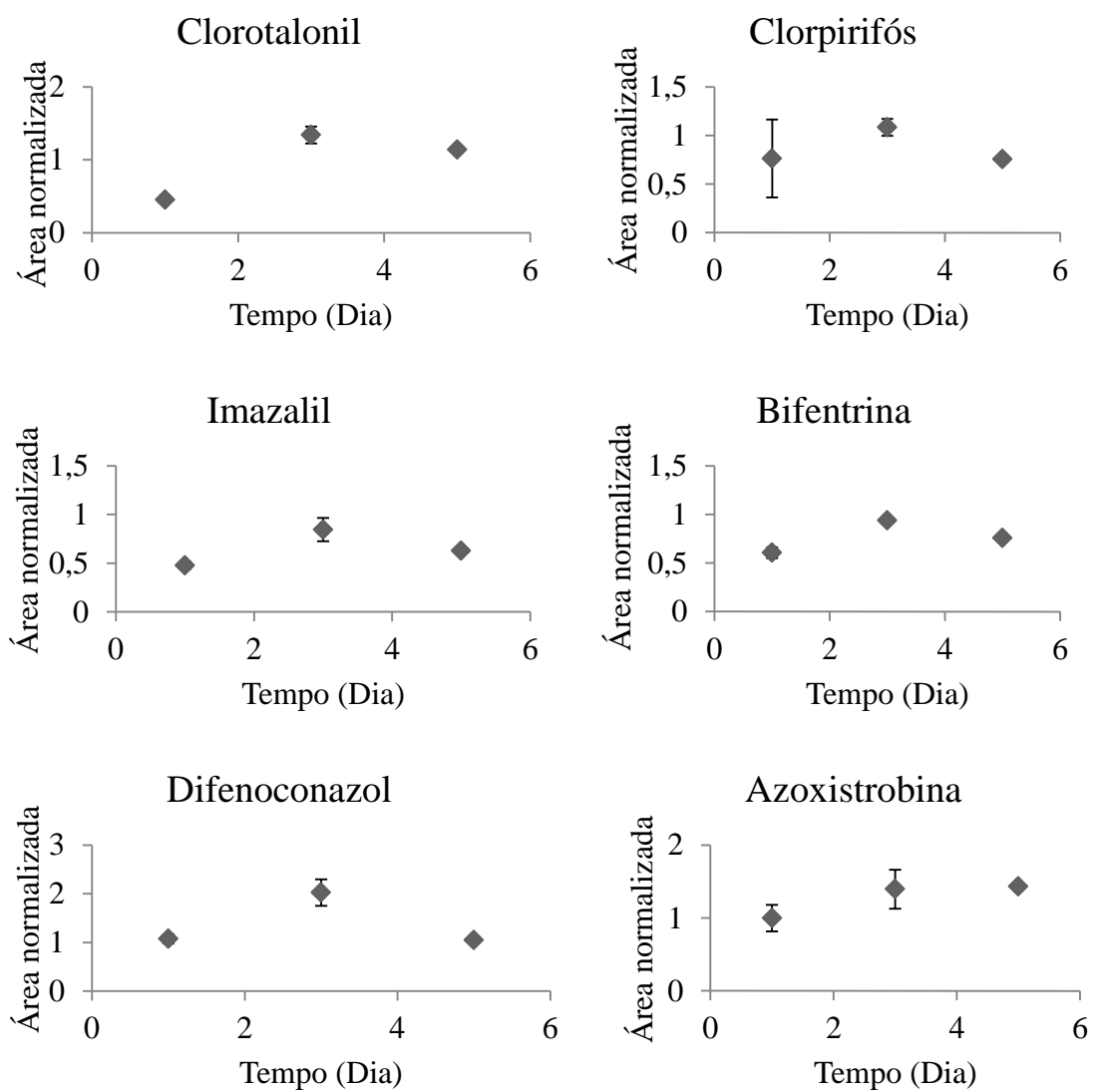


Figura 30. Variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos devido ao efeito da maturação da polpa de banana utilizando QuEChERS.

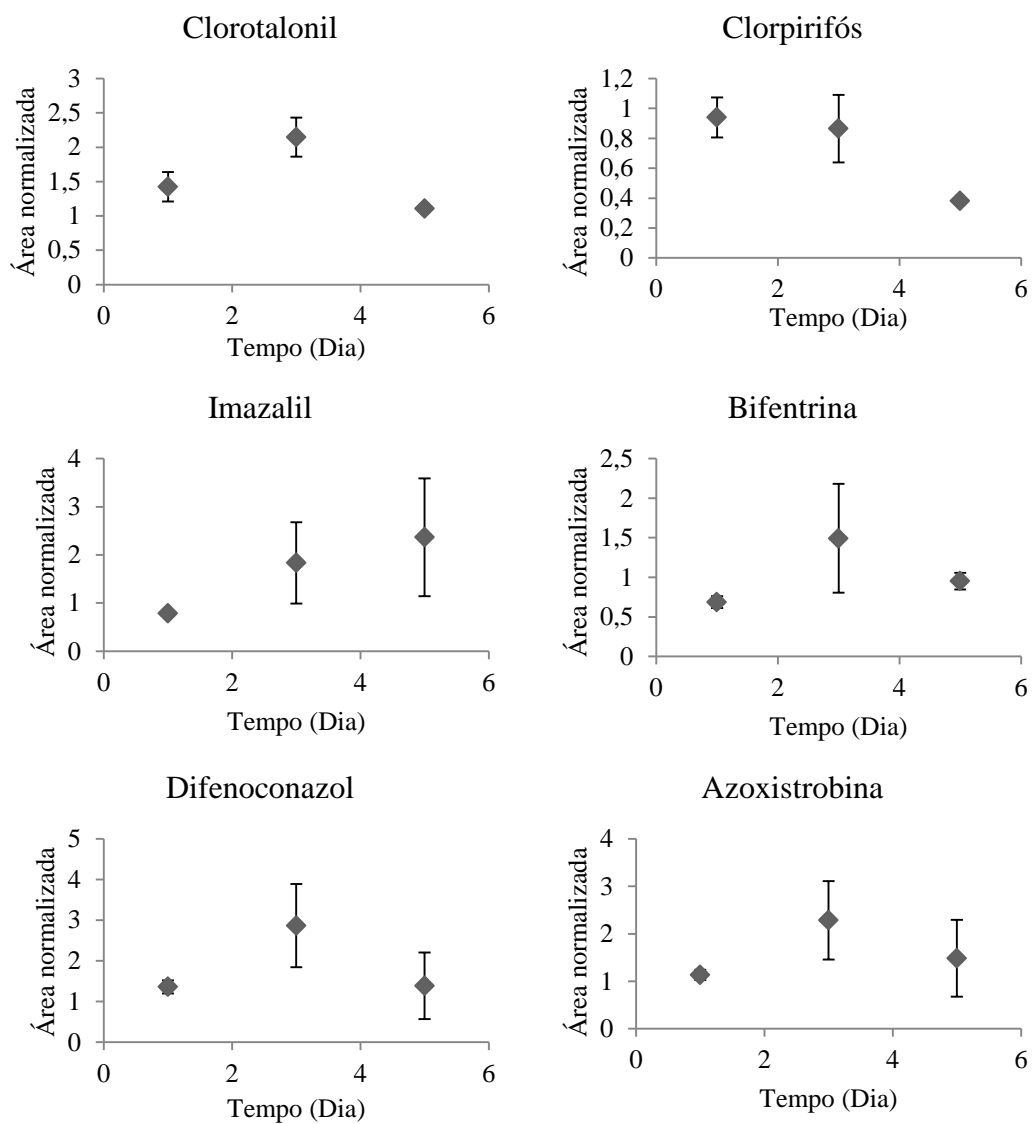


Figura 31. Variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos devido ao efeito da maturação da casca de banana utilizando ESL/PBT.

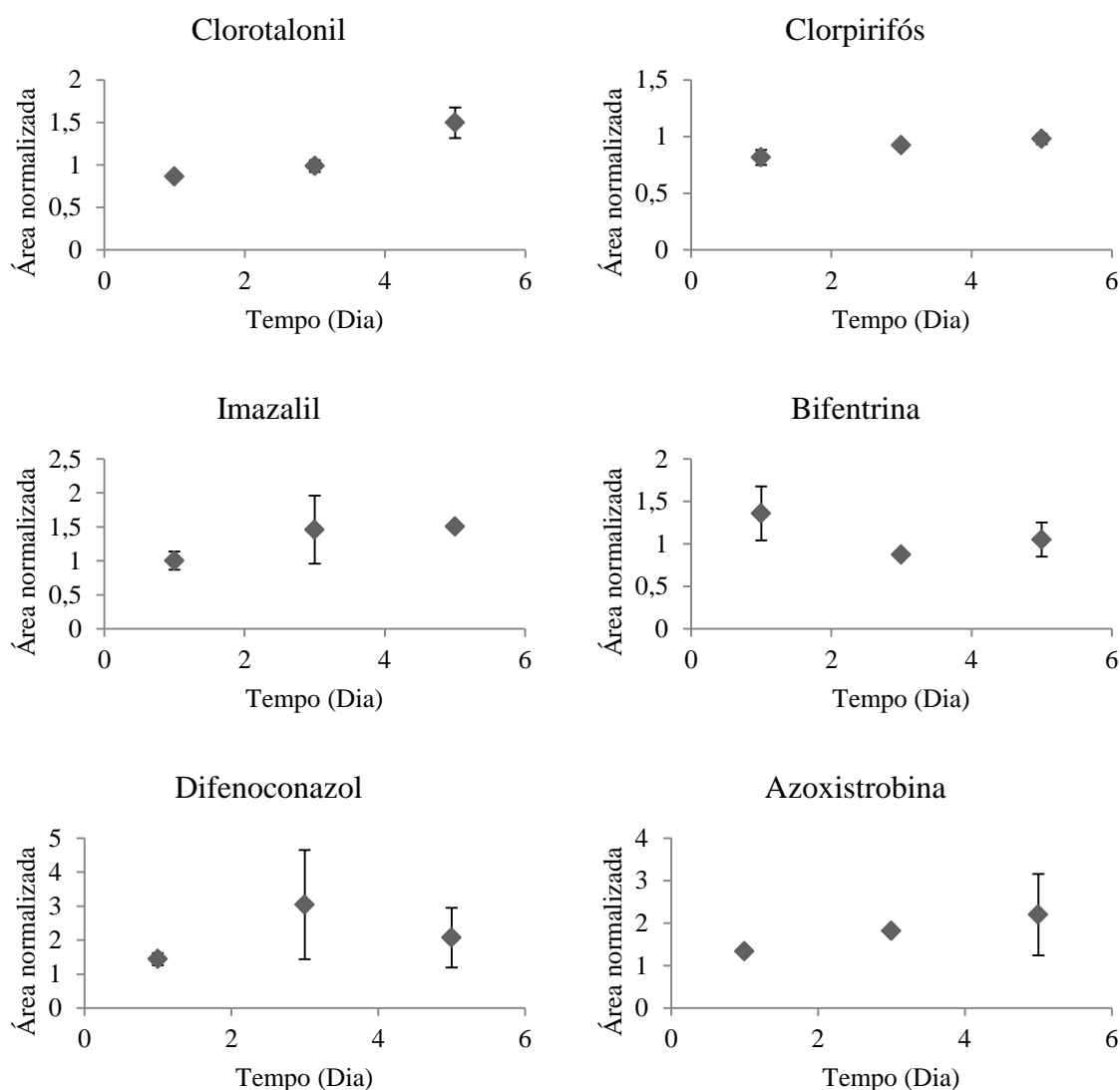


Figura 32. Variação da resposta cromatográfica dos agrotóxicos devido ao efeito da maturação da casca de banana utilizando QuEChERS.

Observa-se nas Figuras 29 a 32 que para todos os agrotóxicos, tanto na polpa como na casca, utilizando a ESL/PBT ou QuEChERS, as áreas não apresentam uma alteração significativa ao longo dos dias.

Estudos realizados por outros pesquisadores com o objetivo de caracterizar o processo de amadurecimento da banana em diferentes cultivares (Caipira, Nanicão, Maçã) mostraram que ocorrem mudanças nas propriedades químicas, pH, % de amido, açúcares totais, sólidos solúveis, etc., conforme o estágio de maturação. (LIMA et al, 2008; DITCHFIELD et al., 2002; CARVALHO et al., 2011). Com relação ao estágio de maturação a banana é classificada de 1 a 8 (Tabela 19), caracterizando uma variação da cor.

Tabela 19. Classificação de bananas segundo o seu estágio de maturação.

Estádio de Maturação	Característica da Fruta
1	Fruta verde
2	Fruta verde com traços amarelos
3	Fruta mais verde que amarela
4	Fruta mais amarela que verde
5	Fruta amarela com extremidade verde
6	Fruta amarela
7	Fruta amarela com pequenas manchas pardas
8	Fruta amarela com grandes manchas pardas

Fonte. Ditchfield et al., 2002

Relacionando os dados da cor com os dados apresentados nas Figuras 29 a 32, as bananas utilizadas no primeiro dia estavam no estágio 5 (amarelo com pontas verdes). Para o terceiro dia analisado as bananas estavam no estágio de maturação 6 (todo amarelo) e para o quinto dia as bananas estavam no estágio de maturação 7 (amarelo com manchas marron). Figuras representativas dos estádios de maturação se encontram no Anexo 1. Os resultados obtidos por Lima et al. (2008) mostram as variações químicas que ocorrem durante o amadurecimento da banana em cada estágio de maturação. Portanto esperava-se que houvesse diferenças na extração dos agrotóxicos nos diferentes estádios de amadurecimento, porém, os resultados obtidos mostraram que, independente da matriz, não existem diferenças significativas nas respostas cromatográficas dos agrotóxicos.

5.7. Estabilidade do analito no extrato da matriz

A avaliação da estabilidade do analito no extrato da matriz foi feita para avaliar se existem diferenças nas recuperações dos agrotóxicos ao decorrer das semanas, devido à degradação dos co-extrativos da matriz quando o extrato é armazenado em freezer.

Nas Figuras de 33 a 36 são mostrados os resultados da estabilidade dos agrotóxicos no extrato tanto para a polpa como para a casca ao longo de 5 semanas.

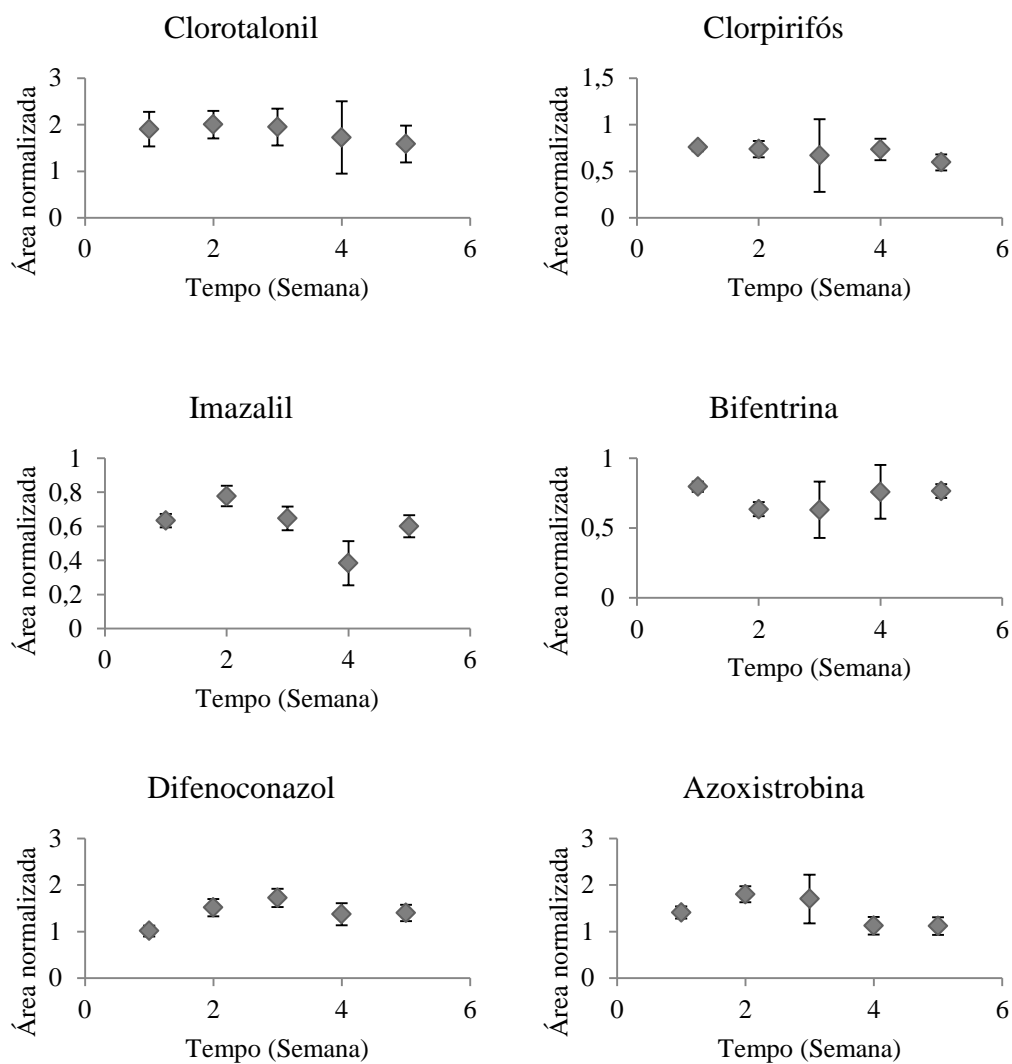


Figura 33. Variação das respostas cromatográficas ao longo do tempo para os agrotóxicos no extrato de polpa utilizando a ESL/PBT.

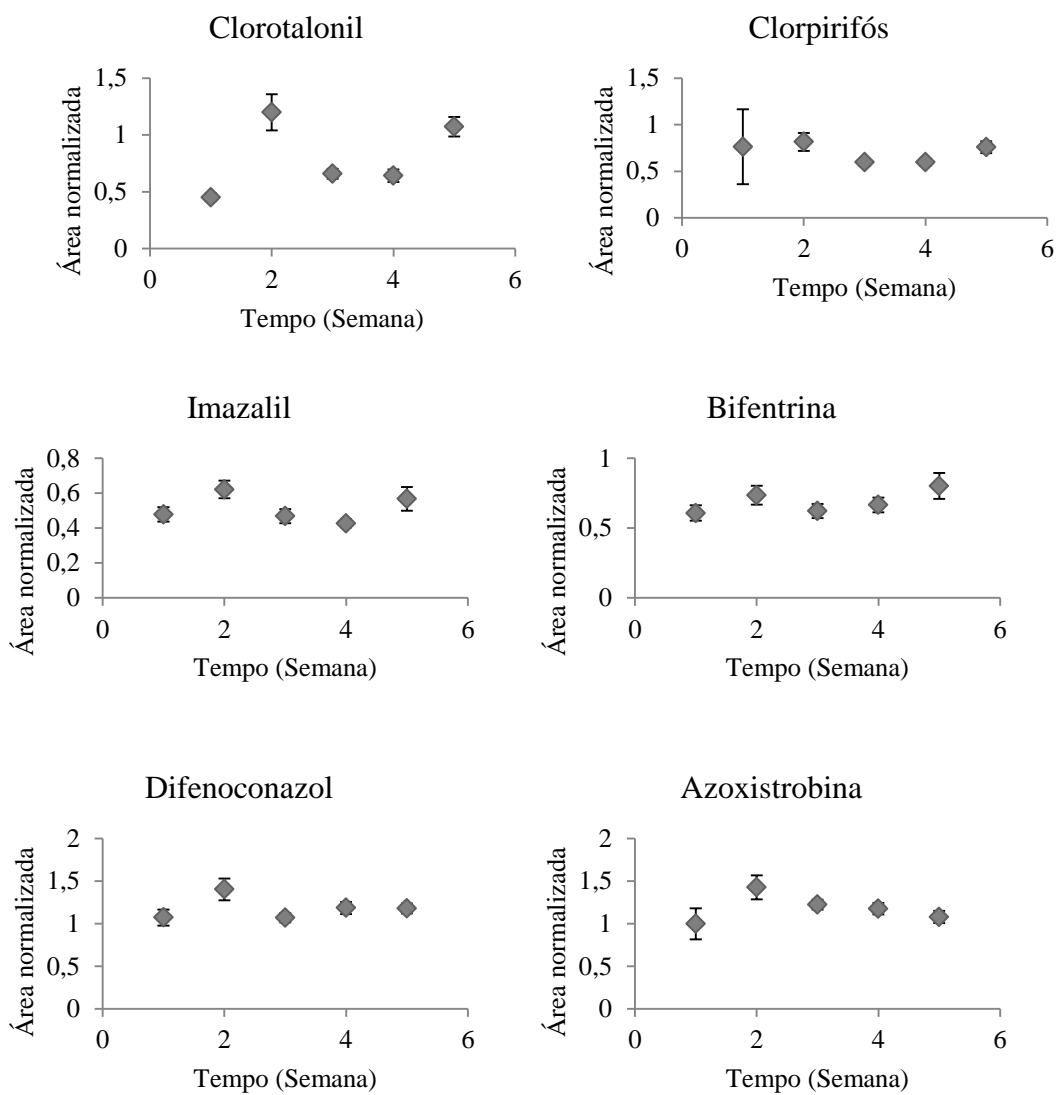


Figura 34. Variação das respostas cromatográficas ao longo do tempo para os agrotóxicos no extrato de polpa utilizando a QuEChERS.

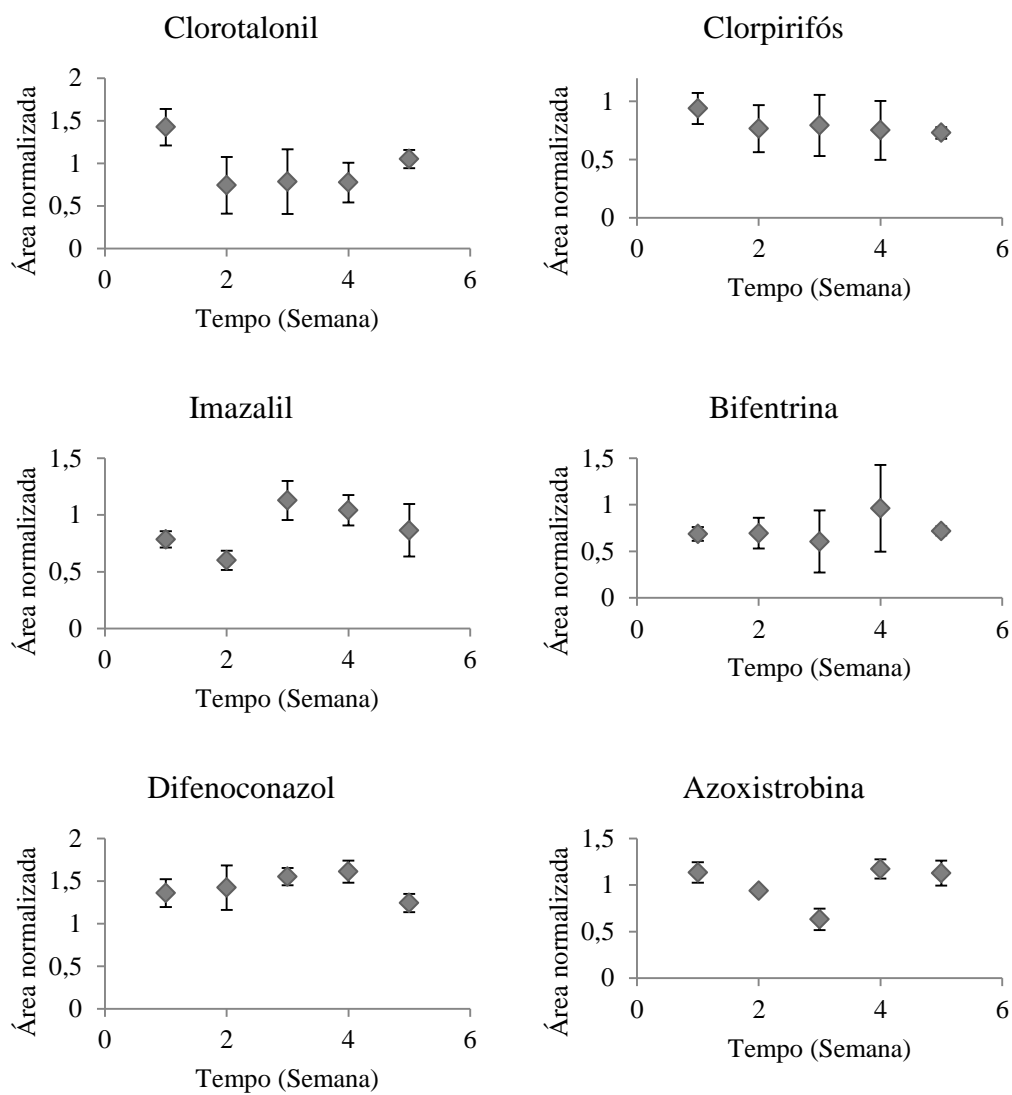


Figura 35. Variação das respostas cromatográficas ao longo do tempo para os agrotóxicos no extrato de casca utilizando a ESL/PBT.

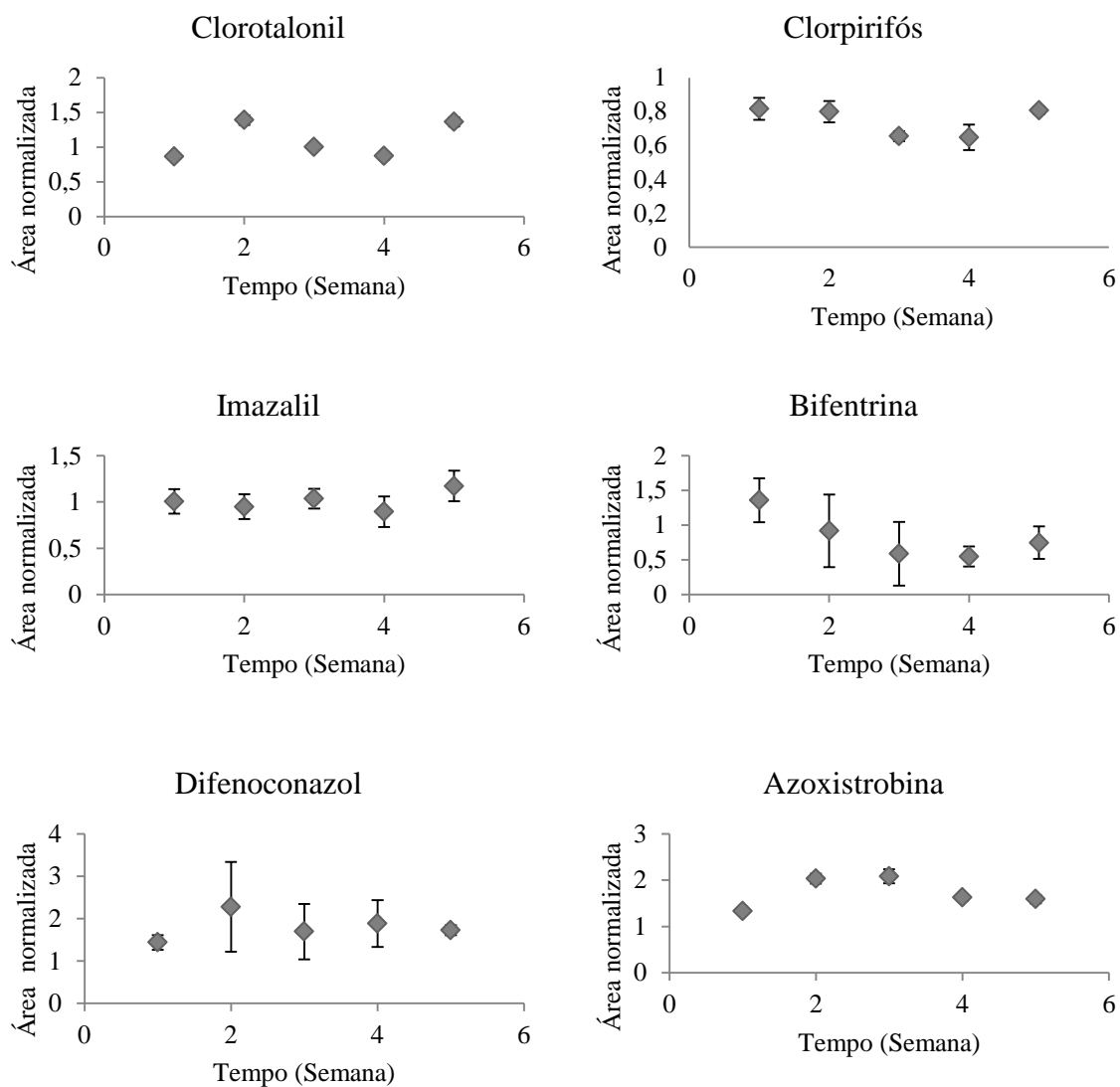


Figura 36. Variação das respostas cromatográficas ao longo do tempo para os agrotóxicos no extrato de casca utilizando a QuEChERS.

De modo geral observou-se que não existe uma tendência de degradação significativa para os agrotóxicos analisados na polpa e na casca utilizando a ESL/PBT ou QuEChERS, ou seja, os analitos são estáveis durante as 5 semanas posteriores do preparo do extrato.

5.8. Análise da banana inteira

O método otimizado e validado para casca foi aplicado para análise da banana inteira, conforme descrito no item 4.10. Os resultados dos ensaios de recuperação são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Porcentagens de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtida para cada Agrotóxico analisando a banana total.

	ESL/PBT			QuEChERS		
	$\mu\text{g kg}^{-1}$	%R	%CV	$\mu\text{g kg}^{-1}$	%R	%CV
Clorotalonil	546,0	103,6	17,8	270,0	85,3	10,0
Clorpirifós	60,0	126,5	9,2	60,0	81,0	5,3
Imazalil	108,0	113,0	3,8	114,0	80,1	0,1
Bifentrina	96,0	122,9	1,5	54,0	90,8	0,8
Difenoconazol	468,0	104,5	7,2	192,0	97,6	19,0
Azoxistrobina	144,0	109,1	3,1	126,0	140,1	14,4

Como foi dito para a exatidão, segundo o MAPA as faixas de aceitação das porcentagens de recuperação devem estar entre 70% a 120% (MAPA, 2011). Observa-se que utilizando a ESL/PBT as porcentagens de recuperação para todos os agrotóxicos são maiores que 100%, indicando um efeito de matriz, que deve ser corrigido utilizando curvas analíticas preparadas no extrato de banana inteira isenta de agrotóxicos. Para o QuEChERS as porcentagens de recuperação são menores que 100%, exceto para a azoxistrobina.

Para a ESL/PBT o clorpirifós e a bifentrina estão com valores acima do aceitável pelo MAPA, enquanto que para o QuEChERS, a azoxistrobina é o único agrotóxico acima do valor aceitável.

5.9. Aplicação dos métodos

Como descrito no item 4.11 os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados em amostras comerciais utilizando tanto a ESL/PBT como o QuEChERS tanto na polpa, como na casca e não foram encontrados os agrotóxicos estudados em nenhuma das matrizes.

Na Figura 37 são apresentados cromatogramas de extratos de polpa e casca de banana submetidas às técnicas ESL/PBT e QuEChERS de uma amostra comercial.

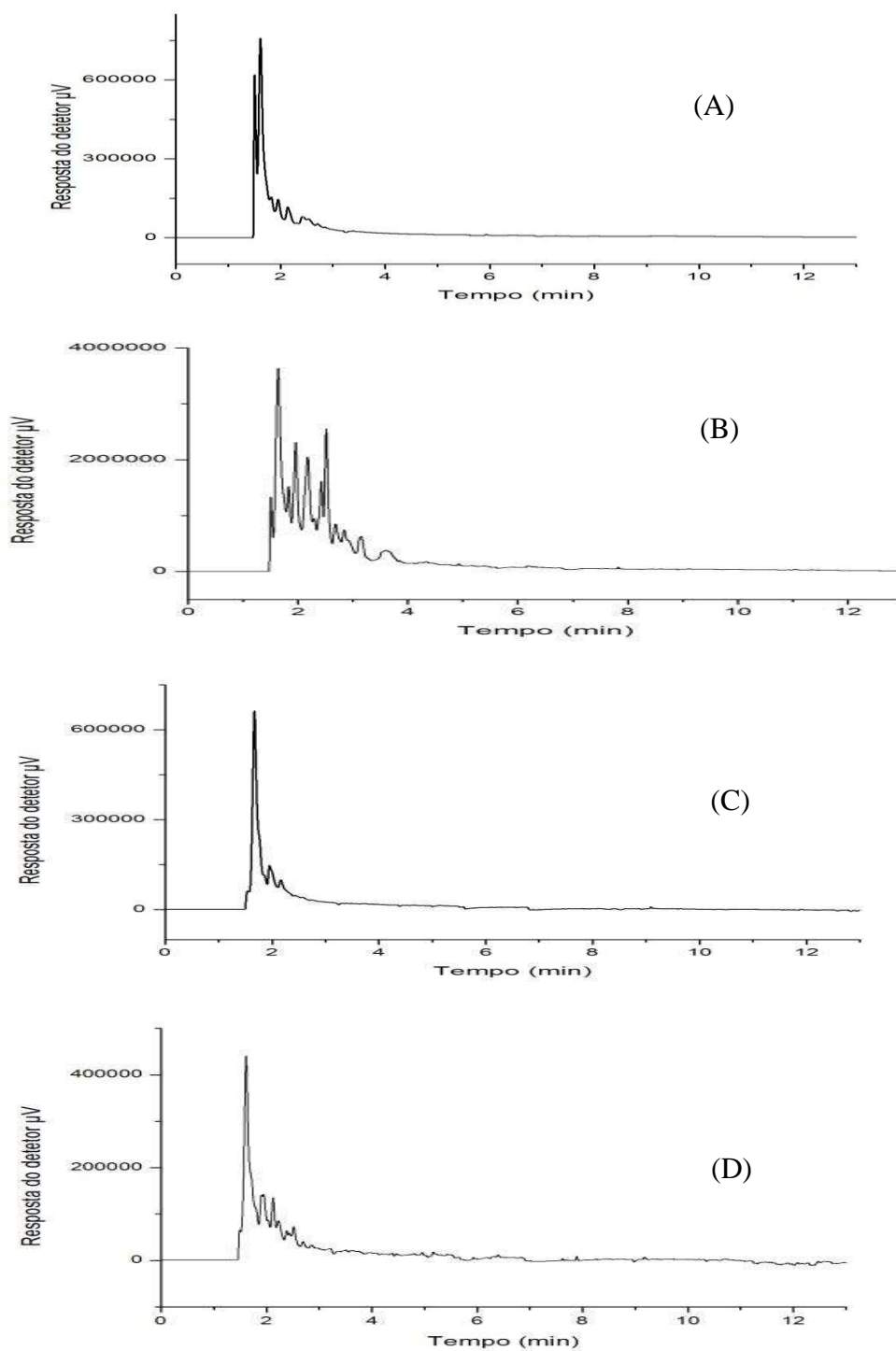


Figura 37. Cromatogramas dos extratos das amostras comerciais de: (A) polpa submetida à ESL/PBT; (B) polpa submetida à QuEChERS; (C) casca submetida à ESL/PBT; (D) casca submetida à QuEChERS.

6. CONCLUSÕES

A técnica de ESL/PBT foi otimizada e validada para a determinação de clorotalonil, clorpirifós, imazalil, bifentrina, azoxistrobina, difenoconazol e azoxistrobina na polpa e na casca da banana. A técnica QuEChERS foi adaptada e validada para os mesmos agrotóxicos para as duas matrizes.

A partir dos resultados, nota-se que a linearidade de resposta do detector apresentou-se satisfatória para todos os agrotóxicos (0,995). Em relação aos aspetos cromatográficos, ESL/PBT apresentou maior eficiência na etapa de clean-up para ambas as matrizes comparado com o QuEChERS. O efeito de matriz mostrou-se presente na quantificação dos agrotóxicos para os dois métodos em ambas as matrizes, portanto é preciso realizar as análises nas curvas preparadas no extrato da matriz. Comparando as duas técnicas de extração não existem diferenças significativas entre elas. Na validação dos métodos, a linearidade para ambas as matrizes foi maior a 0,995 tanto para ESL/PBT como para o QuEChERS. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para a ESL/PBT na polpa estão na faixa de $2,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $5,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $6,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $17,3 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Enquanto os limites de detecção e quantificação para a QuEChERS na polpa estão entre $4,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $14,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $12,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $44,6 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para a ESL/PBT na casca os limites de detecção e quantificação variaram entre $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $29,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $9,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $90,2 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. No caso da extração QuEChERS na casca, os LD atingiram a faixa entre $3,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $14,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ e os LQ variaram de $9,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ - $44,6 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Para a precisão intermediária todos os agrotóxicos, apresentaram coeficientes de variação menores de 20% em todas as concentrações para os dois métodos utilizados na polpa e na casca. Na repetitividade todos os agrotóxicos apresentaram coeficientes de variação menores de 15% tanto para a ESL/PBT como para o QuEChERS. Em relação à exatidão, a maioria dos agrotóxicos apresentou porcentagens de recuperação próximas a 100% para ambos os métodos, para as duas matrizes. No estudo do efeito de maturação da banana, de modo geral, os agrotóxicos estudados não apresentaram diferenças significativas nas áreas obtidas devido às mudanças químicas ocorridas nos diferentes estádios de maturação. No estudo da estabilidade do extrato, observou-se que os agrotóxicos analisados não apresentaram alteração nas respostas cromatográficas obtidas, devido à presença dos co-extrativos da matriz nas 5 semanas posteriores ao preparo do extrato. As técnicas validadas foram aplicadas para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras comerciais, não sendo encontrados nenhum dos

agrotóxicos estudados nem na polpa, nem na casca. As porcentagens de recuperação para análise da banana inteira empregando a ESL/PBT e QuEChERS ficaram entre 103,6%-126,5% e entre 80,1%-140,1% respectivamente. Entretanto, a maioria dos agrotóxicos está dentro da faixa de porcentagem de recuperação recomendada pelo MAPA (2011).

De forma geral, os resultados obtidos mostram que tanto a ESL/PBT como o QuEChERS podem ser utilizados como métodos de análise de resíduos de agrotóxicos tanto para polpa, quanto para casca.

Recomenda-se empregar a ESL/PBT como método de análise quando é requerido analisar muitas amostras. Isto, se fundamenta no fato que o QuEChERS, demanda um tempo maior para a medição de sais, lavagem de vidrarias (a qual é o dobro da utilizada na ESL/PBT), etapas de agitação e centrifugação das amostras do que a ESL/PBT. Portanto o tempo requerido para levar a cabo a técnica QuEChERS acaba sendo maior que o tempo requerido com a ESL/PBT e a frequência analítica da técnica QuEChERS diminui.

7. REFERENCIAS BLIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. D. **Otimização e validação de metodologia para determinação de aldicarbe e carbofurano em amostras de café bebida.** 2010. 133f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., STAJNBAHER, D., & SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v 86, n 2, p 412-431, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, Brasília, DF, de 02 de jun. 2003, Seção 2, p. 4.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. 2013. Relatório complementar 2012, Brasília, 2014.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografias autorizadas**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em 27 jan. 2014.

BAKIRCI, G.; YAMAN, D.; BAKIRCI, F.; ÖTLEŞ, S. Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. **Food Chemistry**, v.160, p 379-392, 2014.

BARBOSA, L. C. A. Os pesticidas o homem e o meio ambiente. 1 ed. Viçosa: UFV, 2004.

BASSANI, C. Palestra Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002

BBSRC- Biotechnology and Biological Sciences Research Council. **The history of the pyrethroid insecticides.** United Kingdom. [2012]. Disponível em

<<http://www.bbsrc.ac.uk/web/FILES/Publications/pyrethroid-timeline.pdf>> Acessado em 16 de set. 2014.

BEZERRA, M. DE OLIVEIRA, S. FORTES, C. **Banana: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2 ed. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2010.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002 que regulamenta a Lei Federal nº 7082 de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 jan. 2002, Seção 1, p. 1.

BRITO N.M.; AMARANTE O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO M.L. **Validação de Métodos Analíticos**: estratégia e discussão. *Pesticidas*; 13, p129-46, dez/jan 2003.

CAMINO, F.J.; ZAFRA, A.; RUIZ, J.; BERMUDEZ, R.; BALLESTEROS, O.; NAVALON, A.; VILCHEZ, J. UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 Accredited Method for the Determination of 121 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by Gas Chromatography–tandem Mass Spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, p.427–440, 2011.

CARNEIRO, R. OLIVEIRA, F. MADUREIRA, F. SILVA, G. SOUZA, W. LOPES, R. Development and Method Validation for Determination of 128 Pesticides in Bananas by Modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS analysis. **Food Control**, v. 33, p 413-423, 2013.

CARVALHO, A.; LIMA, L. MOURÃO, M.; OLIVEIRA, W. Qualidade pós-colheita de cultivares de bananeira do grupo ‘maçã’, na região de Belém – PA. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal - SP, v.33, n.4, p.1095-1102, 2011.

CHO, S.K; EL-ATY, A.M.; RAHMAM, M.M.; CHOI, J.H.; SHIM J.H. Simultaneous multi-determination and transfer of eight pesticide residues from green tea leaves to infusion using gas chromatography. **Food Chemistry**, v.165, p532-539, 2014.

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

CORDEIRO, Z.J.M. Doenças. In: ALVES, E.J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2 ed. Brasília: Embrapa,1999. p. 353-391.

COSTA, A.I.G. **Análise multirresíduos de agrotóxicos em alface por cromatografia gasosa**. 2011. 118f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011

COSTA, A. I. G.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A.A.; DE SOUSA, F. A.; ZAMBOLIM, L. Determination of pesticides in lettuce using solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v.181, p64–71, 2015.

COSTA, E.H. **Análise Multirresíduos de Agrotóxicos em Abacaxi por CG/DCE**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

DA SILVA, J. **Desenvolvimento e Validação de Método para Determinação de Agrotóxicos em sedimento por Cromatografia Gasosa Monodimensional e Bidimensional Abrangente com micro Detector por Captura de Elétrons**. 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

DAMS, R.I. Pesticidas: Usos e Perigos à Saúde e ao Meio Ambiente. **Revista Saúde e Ambiente**, v.7, n.2, p.38-44, 2006.

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.03, p.136–142, 2011.

DITCHFIELD, C.; TADINI, C.C. Acompanhamento do processo de amadurecimento da banana nanicao (Musa cavendishii Lamb.) In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002, Porto Alegre, RS. Anais do XVIII CBCTA. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p.1629-1632.

EMBRAPA-Empresa de Pesquisa Agropecuária: **Mandioca e Fruticultura**. Produção Mundial de Banana, 2013. Disponível em: < http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Banana_Brasil_2012.pdf> Acessado em 27 de jan. 2014

EPA- US Environmental Protection Agency. **Pesticides**. United States of America, 2013. Disponível em < <http://www.epa.gov/pesticides/about/>> Acessado em 7 de fev. 2014.

EPA- US Environmental Protection Agency. **A Review of the Relationship between Pyrethrins, Pyrethroid Exposure and Asthma and Allergies**. 2009. Disponível em < <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethrins-pyrethroids-asthma-allergy-9-18-09.pdf>> Acessado em 7 de fev. 2014.

EU- Union Europeia. Pesticides Database. **Pesticidas residues**. Disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage>Acessado em 28 de nov. 2014.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Statistical Yearbook 2013: World Food and Agriculture**. Rome, 2013.

FAO- Organizações das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação / OMS- Organização Mundial de Saúde. **Codex Alimentarius: Normas Internacionais dos alimentos**. 2014. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/about-codex/es/> Acessado em: 3 de fev. 2014.

FAOSTAT- Food and Agriculture Organization of the United Nations: **Crops**. 2014. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>> Acessado em 27 de jan. 2014

FARIA, M. Avaliação de Ambientes e Produtos Contaminados por Agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. **É Veneno Ou É Remédio?** Agrotóxicos, Saúde e Ambiente, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003a, cap.9, p.177- 209.

FISCHEL, F. **Pesticide Toxicity Profile: Triazole Pesticides**. UF- University of Florida/ IFAS- Institute of Food and Agricultural Sciences. PI-68. 2005.

FRIGGI, C.A. **Avaliação de um modulador de ar comprimido para CGxCG e sua aplicação para determinação de resíduos de pesticidas piretroides em uva**, 2008. 107f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, SC, 2008.

GAO, Z.; DENG, Y.; YUANA, W.; HEA, H.; YANG, S.; SUN, C. Determination of organophosphorus flame retardants in fish by pressurized liquid extraction using aqueous solutions and solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame photometric detector. **Journal of Chromatography A**, v.1366, p.31–37, 2014.

GONDIM, J.; MOURA, M.F.; DANTAS, A.; MEDEIROS, R.; SANTOS, K.. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25 n.4, p.825-827, 2005.

GOULART, S.M; QUEIROZ, M.E.L.R; NEVES, A.A.; QUEIROZ, J. H. Low-temperature Clean-up Method for the Determination of Pyrethroids in Milk Using Gas Chromatography with Electron Capture Detection. **Talanta**, v.75, p.1320-1323, 2008.

GOULART, S.M; ALVES, R.M.; 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, p.41–47, 2010.

HAARER. **Producción moderna de bananas**. 1ed. Acribia: Zaragoza, 1965.

HAIR, F.J.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. Análise multivariada de dados. 6 ed. Bookman Editora Companhia: São Paulo, 2009.

HAMILTON, D. **Difenoconazole (224)**. Brisbane: FAO- Food and Agricultural Organization, 2008. p 353-466. Disponível em <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation07/Difenoconazole.pdf> Acessado 11 de fev. 2014

HAIŠLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNY, M. Matrix induced effects: a critical point in the gas chromatography analysis of pesticides residues. **Journal of Chromatography A**, v.800, p.283–295, 1998.

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

HARDEBERG, J. **Acquisition and Reproduction of Color Images: Colorimetric and Multispectral Approaches**. 1999. 236 p. Thèse (Docteur Signal et Images) – Ecole Nationale Supérieure des Télécommunications, Paris, France, 1999.

HIRATA, R. Piretróides: Estrutura Química- Atividade Biológica. **Química Nova**, v.18, n.4. p.368- 374, 1995.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil**. Rio de Janeiro, v.25, n.2, p.1-88, 2012.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares: Tabela 2393 - Aquisição alimentar domiciliar per capita anual por grupos, subgrupos e produtos**. Brasil. 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=2393&z=p&o=13&i=P>> Acessado em 28 de jan. 2014

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasil, 2010. Disponível em:

<http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CCGRE/DOQ/DOQ-CCGRE-8_03.pdf>

Accesado em 12 de fev. 2015

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. **Global availability of information on agrochemical.** Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>>. Accesado em 28 de nov. 2014

KO, A.Y.; RAHMAN, M.; EL-ATY, A.M.; JANG, J.; PARK, J.H.; CHO, K.; SHIM, J.H. Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography. **Food Chemistry**, v.148, p.402-409, 2014.

KOMATSU, E.; MOREIRA, J. Otimização dos Parâmetros de Extração para Determinação Multiresíduo de Pesticidas em Amostras de Água Empregando Microextração em Fase Sólida. **Química Nova**, v.27, n. 5, p.720-724, 2004.

KRIEGER, R. **Handbook of Pesticides Toxicology.** Volume 1. 2 ed. United States of America: Academic Press. 2001.

LARA, W.; BATISTA, G. Pesticidas. **Química Nova**, v.15, n.2, p.161-166, 1992.

LIMA, M.; SILVA, E. FIGUEIREDO, R.; OSTER, A.; GARRUTI, D. DA COSTA, J. Caracterização dos estádios de maturação de banana resistente à Sigatoka negra – variedade caipira. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 20, 2008, Vitoria, ES. **Anais do XXCBF.** Vitoria: SBF, 2008.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** 1. ed. Rio de Janeiro: Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

MANICA, I. **Fruticultura Tropical 4: Banana.** 1 ed. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997.

MAPA. Garantia da qualidade analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Brasília, 2011.

MARQUES, L.; LEMOS, L. Agroquímica: O Sector de Agroquímicos. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, Brasil, n. 24, p. 69-96, set. 2006

MARQUES, M. **Avaliação do Impacto de Agrotóxicos em Áreas de Proteção Ambiental, Pertencentes à Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo**. Uma Contribuição à Análise Crítica da Legislação sobre o Padrão de Potabilidade. 2005. 218 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Materiais)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, 2005.

MARTIN, Z.J.; TRAVAGLINI, D.A.; OKADA, M.; QUAST, D.G; HASHIZUME, T. Processamento: produtos, características e utilização. In: MEDINA, J.C.; BLEINROTH, E.W.; MARTIN, Z.J.; TRAVAGLINI, D.A.; OKADA, M.; QUAST, D.G.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V.A.; BICUDO NETO, L.C.; ALMEIDA, L.A.S.B.; RENESTO, O.V. **Banana: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2 ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1985, (Série Frutas Tropicais, 3).

MAŠTOVSKÁ, K. LEHOTAY, S.J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatography analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v.1040, n.2, p.259-272, 2004.

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

MEYER, V. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**, 4 ed. United States of America: John Wiley & Sons, 2004.

MILESON, B. CHAMBERS, J. CHEN, W. L. DETTBARN, W. EHRLICH, M. ELDEFRAWI, A. GAYLOR, D. HAMERNIK, K. HODGSON, E. KARZMAR, A. PADILLA, S. POPE, C. RICHARDSON, R. SAUNDERS, D. SHEETS, L. SULTATOS, L. WALLACE, K. Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides. **Toxicological Sciences**, v.41, p 8-20, 1998.

MOREIRA, R. **Cultura da bananeira**. 1 ed. Belo Horizonte: Emater MG, 1979.

NPIC-National Pesticide Information Center. **Bifenthrin**: technical fact sheet. Corvallis, OR. [2012]. Disponível em <<http://npic.orst.edu/factsheets/biftech.pdf>> Acessado em 7 de fev. 2014.

PARREIRA, D.; NEVES, W.; ZAMBOLIM, L. Resistência de Fungos a Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica**, v.3, n.2, p.24-34, 2009.

PENCE, R. The Antimetabolite, Imidazole as a Pesticide. **Journal of Economic Entomology**, v.56, n.1, p. 1-7,1963.

PEREIRA, W.L. **Síntese e avaliação das atividades fitotóxica e antiproliferativa de isobenzofuran-1(3H)-onas C-3 funcionalizadas**. 2013. 152f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

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

PUSSENTE, I. G. Extração sólido-líquido e partição em baixa temperatura de Clorpirifós, thiamethoxam e deltametrina em maçã e análise por cromatografia gasosa. 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

RADAR: Tecnologia, Produção e Comércio Exterior. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada-IPEA**, Brasília, n.20, p.1-54, jun. 2012.

REVELO, R. Produtos Agrotóxicos e Afins Comercializados em 2009 no Brasil: uma Abordagem Ambiental. **IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Brasília, BR. 84p. 2010.

RIAR, N. **Impacts of Hypersaline Conditions on the Biotransformation and Toxicity of the Pesticide Bifenthrin in Salmonid Species of the San Francisco Bay Delta**. 2012. 147f. Thesis (Master in Environmental Toxicology)- University of California, Riverside, CA, 2012.

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

RIBEIRO, F. CASTRO, M. Planilha de Validação: Uma nova ferramenta para estimar Figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v.31, n.1, p.164-171, 2008.

ROBINSON, J.C. GALÁN, V. **Bananas and Plantains**. 2 ed. Oxfordshire: CABI, 2010.

RODRIGUES, M.A. **Classificação de Fungicidas de Acordo com o Mecanismo de Ação Proposto pelo Frac**. 2006. 249f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2006.

SANCHES, S. DA SILVA, C.H. CAMPOS, S. X. VIEIRA, E. M. Pesticidas e Seus Respectivos Riscos Associados à Contaminação da Água. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p.53-58, 2003.

SANTOS, G. **Agrotóxicos em frutos de tomate no Estado do Espírito Santo**. 2012. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Vila Velha, Vila Velha, ES, 2012.

SANTOS, M.A.; AREAS, M.; REYES, F.G. Piretróides- uma Visão Geral. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.18, n.3, p.339-349, 2007a.

SANTOS, V. DONNICI, C. L. DACOSTA J. B. CAIXEIRO, J. Compostos Organofosforados Pentavalentes: Histórico, Métodos Sintéticos de Preparação e Aplicações como Inseticidas e Agentes Antitumorais. **Quimica Nova**, v.30, n.1, p.159-170, 2007b.

SAVOY, V.L. Classificação dos Agrotóxicos. **Biológico**, São Paulo, SP, v.73, n.1, p.91-92, 2011.

SIGMA ALDRICH. Acetonitrila 99,8% anidra. Ficha de dados de segurança de acordo com o Regulamento (CE) No. 1907/2006. São Paulo, Brasil, 2011.

SIGMA ALDRICH. Acetato de etila anidro 99,8%. Ficha de dados de segurança de acordo com o Regulamento (CE) No. 1907/2006. São Paulo, Brasil, 2011.

SILVA, E. **Validação de método de extração e análise multirresíduo de agrotóxicos em carne bovina por cromatografia gasosa**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

SOARES, C.E. **Extração sólido-líquido com partição a baixa temperatura e seu emprego na análise multirresíduos de agrotóxicos em uva e derivados**. 2011. 108f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 2011.

SOARES, L.H. FAGAN, E. CASAROLI D. ANDRADE, D. SOARES, A. L. MARTINS, K. ROCHA F. J. Aplicação de Diferentes Estrobilurinas na Cultura da Soja. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.18, n.1, p.78-97. 2011.

SOLURI, J. Consumo de massas, biodiversidade e fitomelhoramento da banana de exportação 1920 a 1980. **Varia Historia**, Belo Horizonte, BH, v.24, n.39: p.47-70, 2008.

SOUSA, F.A.; COSTA, A.I.G.; QUEIROZ, M. E.L.R.; TEÓFILO, R.F; PINHO, G.P.; NEVES, A.A. Influence of pH and Matrix Components in the Chromatographic Response of Pesticides. **Chromatographia**, 76, p.67-73, 2013.

TIANO, C. **Cor e Colorimetria**. Conselho Regional de Química, IV Região, São Paulo, 2009. Disponível em: < www.crq4.org.br/sms/files/file/apostila_cor_site.pdf> Acessado em 24 fev. 2015.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.; POPPI, R. Estado da arte de Figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1278-1287, 2009.

VINCELLI, P. QoI (Strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks. **The Plant Health Instructor**. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-02. 2002.

WATTS, M. **Clorpirifos: Un posible COP a nivel global**. PANNA- Pesticide Action Network Norteamérica. 2012. Disponível em <http://www.rap-al.org/articulos_files/Clorpirifos_Rev_.pdf> Accesado em 7 de fev. 2014.

WILKOWSKA, A. BIZIUK, M. Determination of Pesticide Residues in Food Matrices Using the QuEChERS Methodology. **Food Chemistry**, v.125, p.803-812, 2011.

YANG, X.; ZHANG, H.; LIU, Y.; WANG, J.; ZHANG, Y.C.; DONG, A.J.; ZHAO, H.T.; SUN, C.H.; CUI, J. Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC–MS. **Food Chemistry**, v.127, p.855–865, 2011.

YUAN, Y. CHEN, C. ZHENG, C. WANG, X. YANG, G. WANG, Q. ZHANG, Z. Residue of Chlorpyrifos and Cypermethrin in Vegetables and Probabilistic Exposure Assessment for Consumers in Zhejiang Province, China. **Food Control**, v.36, p.63-68, 2014.

8. ANEXO

Anexo 1. Estadio de maturação da casca da banana

(A)



(B)



(C)



Figura 38. Bananas utilizadas para o análise do estágio de maturação ao decorrer dos dias. A) dia 1; B) dia 3; C) dia 5.