



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**JORDANA ALVES FERREIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO  
DE AGROTÓXICOS EM ESTIPE DE COQUEIRO (*Cocos nucifera* Linn.), ÁGUA-  
DE-COCO E ALBÚMEN SÓLIDO POR UHPLC-MS/MS E AVALIAÇÃO DA  
TRANSLOCAÇÃO POR ENDOTERAPIA**

**CAMPINAS  
2016**

**JORDANA ALVES FERREIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ESTIPE DE COQUEIRO (*Cocos nucifera* Linn.), ÁGUA-DE-COCO E ALBÚMEN SÓLIDO POR UHPLC-MS/MS E AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO POR ENDOTERAPIA**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências**

**Orientadora: Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli**

**CAMPINAS  
2016**

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli (Orientadora)

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG-RS)

Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende (IQSC-USP)

Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner Raimundo (IQ-UNICAMP)

Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **JORDANA ALVES FERREIRA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de novembro de 2016.

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2012/18318-4

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

F413d Ferreira, Jordana Alves, 1986-  
Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de agrotóxicos em estipe de coqueiros (*Cocos nucifera* Linn.), água-de-coco e albúmen sólido por UHPLC-MS/MS e avaliação da translocação por endoterapia / Jordana Alves Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Carla Beatriz Grespan Bottoli.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cocos nucifera L. 2. Endoterapia. 3. LC-MS/MS. 4. Translocação vegetal. 5. Agrotóxicos. I. Bottoli, Carla Beatriz Grespan, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development of analytical methods for the determination of pesticides in coconut stem (*Cocos nucifera* Linn.), coconut water and pulp by UHPLCMS/MS and evaluation of translocation by endotherapy

**Palavras-chave em inglês:**

Cocos nucifera L.

Endotherapy

LC-MS/MS

Translocation in plants

Pesticides

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:** Carla Beatriz Grespan Bottoli [Orientador]

Ednei Gilberto Primel

Maria Olimpia de Oliveira Rezende

Cassiana Carolina Montagner Raimundo

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

**Data de defesa:** 10-11-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Química



“O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las.” Mário  
Sergio Cortela

“Demora o tempo que for para ver o que você quer da vida, e depois que  
decidiu não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te  
dissuadir.” profeta Zaratustra – Nietzsche

“O que vale na vida não é o ponto de partida, e sim a  
caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o  
que colher.” Cora Coralina

**Calling – Dan Torres** 

Don't let what anyone says get you down  
You can rise above it all and get to higher ground  
I know something's gonna change, don't be afraid  
Don't let what anyone does get to you  
You can find a way to let the light, shine through  
I know something's gonna change, don't be afraid  
Keep calling never lose your faith  
You're falling but everything's ok  
And I know, help is on the way  
So keep on calling, calling everyday

**Coisas que eu sei – Dudu Falcão** 

Eu quero ficar perto  
De tudo o que acho certo  
Até o dia em que eu mudar de opinião  
A minha experiência  
Meu pacto com a ciência  
Meu conhecimento é minha distração

**Coração pirata – Roupa Nova** 

As pessoas se convencem  
De que a sorte me ajudou  
Mas plantei cada semente  
Que o meu coração desejou

**Stronger – Kelly Clarkson** 

What doesn't kill you makes you stronger  
Stand a little taller  
Doesn't mean I'm lonely when I'm alone  
What doesn't kill you makes a fighter  
Footsteps even lighter  
Doesn't mean I'm over cause you're gone

Obs.: Algumas das músicas que embalaram esta tese e de alguma forma me ajudaram a superar as fases difíceis.

## **Dedicatória**

Dedico esta tese aos meus pais Antônio e Marta, ao meu irmão Danilo e ao meu primo Thiago pelo carinho, amor e apoio incondicional. Também, por suportarem essa distância que nos separa, a saudade que nos tortura, mesmo eu não estando presente nos bons ou maus momentos, saibam que eu os amos muito mais do que imaginam! Esses anos longe de casa, não nos afastou, e sim, aumentou o amor e sabemos disso todas as vezes que sentimos Saudades. Obrigada por estarem comigo em todas as minhas decisões. Amo vocês!

À Cristina Barros, minha companheira de todas as horas e dias. Amo você!!

# Agradecimentos

✿ A Deus, por ser meu refúgio e minha fortaleza em todos os momentos!!

✿ À prof. Dra. Carla Bottoli pela orientação, por sempre me receber com um sorriso em sua sala, sua amizade, nossas viagens, conselhos e sábias palavras. Obrigada por acreditar neste trabalho, ter aceitado o desafio de começar um trabalho sem referências na literatura e me incentivado em todas as nossas decisões. Saiba que você tem o meu respeito e minha admiração;

✿ À Dra. Joana Ferreira, pesquisadora da Embrapa (CPATC), o meu respeito e admiração pelo seu conhecimento. Obrigada por sempre me direcionar na pesquisa da cocoicultura, por todas as nossas viagens, idas aos campos, pela sua amizade e sempre me receber muito bem em sua casa, e muitas vezes, com um churrasco à beira da piscina;

✿ Ao casal, Drs. Viviane Talamini, pesquisadora da Embrapa (CPATC), e Frederico Oliveira, professor da UFS, pelo conhecimento construído, amizade, nossas idas ao campo e às nossas rodas de violão e muitas cantorias;

✿ Aos funcionários da Embrapa – Tabuleiros Costeiros (CPATC) do campo do Cajú em Itaporanga d’Ajuda-SE, Erivaldo, Cleverson e todos os demais, que mesmo sob um sol escaldante não mediram esforços para que este trabalho tivesse esses resultados. Obrigada, vocês são demais!!!

✿ Aos amigos da Embrapa (CPATC) Drs. Cleso Pacheco e Edson Passos pela amizade e comentários brilhantes sugeridos neste projeto;

✿ Aos professores da UFSM Renato Zanella, Martha Adaime, Osmar Prestes, aos colegas do LARP, em especial às colegas Janice Facco e Tiele Rizzette pela oportunidade de aprender com vocês. Saibam que vocês foram fundamentais para este trabalho;

✿ Ao Dr. Paulo Lins, uma das pessoas mais competentes/inteligentes que conheço, por ter aberto as portas da Sococo em Mojú-PA, para que de alguma forma pudéssemos realizar a parte experimental na Fazenda Sococo com todo apoio logístico e infraestrutura;

✿ Aos amigos e funcionários da Sococo, em especial, ao Vado, Gerson, Bastos e Aldir. Vocês são queridos e super profissionais! Obrigada pela enorme contribuição nas partes experimentais de campo. Vocês fizeram toda a diferença e sempre tiveram muito cuidado/atenção com a minha estadia na Fazenda Sococo;

✿ Ao meu amado amigo Macksuel Fernandes pela boa vontade em confeccionar as lâminas para as análises dos tecidos do coqueiro. Amo você!

✿ Ao amigo Daimone Poliard pela arte do trabalho;

✿ Aos funcionários das Oficinas da Unicamp, em especial, ao Mário (Mecânica Fina) pela paciência e prestatividade;

✿ Ao Iveraldo (setor de desenho) pela paciência e capricho nas impressões dos pôsteres e elaboração do desenho do coqueiro;

✿ À Fabi Agnelo pela amizade, simpatia e auxílio nas prestações de contas.

✿ Às prof. Isabel Jardim, Márcia Breitreitz, Sandra Guerreiro (IB-Unicamp) e a Lucília Vilela muito obrigada pela amizade e todas as sugestões!

✿ Aos prof. Lucio Montecchio (Università Degli Studi di Padova, Itália), Jim Hanan (University of Queensland, Austrália) e Timothy K. Broschat (University of Florida, EUA) por todas as nossas discussões agronômicas que certamente contribuíram para este trabalho;

✿ Aos amigos Leandro Wang e Bruna Toledo pela amizade construída e fortalecida na pós-graduação;

✿ Aos colegas do LabCrom;

✿ À Karen Lima pela amizade e por ter me ajudado nas análises finais. Você terá um futuro brilhante! Acredite nisso!!

✿ Ao Instituto de Química pela oportunidade de realizar a minha pós-graduação;

✿ À FAPESP por ter financiado este projeto e a concessão de bolsa;

✿ Ao INCT-Bioanalítica pelo apoio financeiro a este projeto.

## RESUMO

O coqueiro é a palmeira de maior importância nos ecossistemas tropical e subtropical, pois várias partes dele podem ser aproveitadas, garantindo assim a geração de empregos, renda e a alimentação, com a exploração de seu fruto na forma de água-de-coco, óleo e albúmen sólido. No entanto, a cultura do coqueiro está sujeita ao ataque de pragas e doenças que causam prejuízos à produção e afetam a qualidade dos frutos colhidos. A aplicação de agrotóxicos é ainda uma das práticas mais utilizadas para o controle de pragas e doenças. O principal objetivo desta tese foi analisar os aspectos no movimento/translocação dos agrotóxicos no coqueiro, após aplicação pelo método endoterápico e posterior avaliação da contaminação da água e do albúmen sólido do coco. Foi realizada uma avaliação qualitativa experimental para compreender os principais mecanismos de translocação por sistemas via raiz e tronco através da aplicação de traçadores (rodamina B e azul brilhante FCF). Foi realizada a dissecação do coqueiro para compreender a sua anatomia e distribuição dos feixes vasculares. Desenvolveram-se e validaram-se métodos para a determinação de 10 agrotóxicos em estipe de coqueiro, 9 agrotóxicos em albúmen sólido e 9 agrotóxicos em água-de-coco. Todos os métodos para a determinação de agrotóxicos foram desenvolvidos e validados utilizando como técnica de extração e método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*) acetato modificado e, como técnica de análise, a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS). O principal desafio no desenvolvimento dos métodos de extração foi a interferência do alto teor lipídico do albúmen sólido e da água-de-coco no isolamento dos analitos de interesse. Esta interferência foi eliminada com o congelamento do extrato em gelo seco durante a etapa de partição. A aplicabilidade destes métodos foi avaliada em quatro Testes. No Teste 1, foram monitoradas 36 amostras em triplicatas sendo, 18 de água-de-coco e 18 de albúmen sólido de 3 regiões brasileiras, Campinas-SP, Goianésia-GO e Neópolis-SE, nos quais foram detectados carbofurano em todas as amostras de ambas as matrizes. Em algumas amostras de Neópolis foram detectados outros agrotóxicos como carbendazim, tiabendazol, ciproconazol e difenoconazol na água-de-coco e, no albúmen sólido foram detectados ciproconazol, difenoconazol e espirodiclofeno. Em todas as amostras analisadas, os valores de concentração ficaram abaixo do limite de quantificação dos métodos ( $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) garantindo a qualidade dos frutos analisados. No Teste 2, foram testadas as duas modalidades de aplicação endoterápica de agrotóxicos: infusão e injeção. Os resultados indicaram que a translocação ocorre uma vez que os agrotóxicos foram detectados e quantificados no estipe a 15 cm acima do ponto de aplicação. Já no Teste 3, foram testados 6 diferentes tratamentos utilizando a endoterapia de injeção, sendo 5 destes com diferentes adjuvantes. Através de um delineamento inteiramente casualizado foram selecionadas 12 plantas, sendo coletadas amostras de estipe próximo aos pontos de aplicação, à copa do coqueiro, e nos frutos do cacho 17 (plena formação de água-de-coco) com 2 e 30 dias após as aplicações. A partir destes resultados, o *Break-thru®* foi selecionado como adjuvante (agente permeabilizante ou penetrante) e o estudo foi ampliado para 60 plantas divididas em dois tratamentos: (a) *mix*, 7 agrotóxicos comerciais e (b) ciproconazol. Estes tratamentos foram subdivididos em dois procedimentos: injeção e infusão e foi utilizado o equipamento comercial *Bite Infusion®*. As amostras de estipe foram coletadas a 50 e 100 cm acima do ponto de aplicação, em intervalos de 2 a 45 dias. A água-de-coco e o albúmen sólido das amostras de frutos do cacho 19 e coco seco também foram analisadas em intervalos de 45 a 120 dias após as aplicações. Os resultados mostraram que em ambas as técnicas endoterápicas, injeção e infusão, houve a translocação de todos os agrotóxicos no estipe.

Já no fruto não foi detectado nenhum agrotóxico, indicando que o método endoterápico pode ser eficaz para o controle de doenças e pragas sem risco de contaminar o fruto. No procedimento utilizando apenas o ciproconazol, o método endoterápico de infusão mostrou que a translocação pode ser mais rápida, com isto o método endoterápico de infusão seria o recomendado utilizando um volume menor de agrotóxico do que no método de injeção. Contudo, os equipamentos para esta finalidade precisam ser melhorados para tornar esta prática viável numa área produtiva.

**Palavras-chaves:** *Cocos nucifera* Linn., QuEChERS, UHPLC-MS/MS, translocação, agrotóxicos, endoterapia

# ABSTRACT

The coconut palm is the most important palm in tropical and subtropical ecosystems because different parts of it can be useful, thus ensuring job generation, income and alimentation, due to the exploitation of its fruit in the form of coconut water, oil and solid albumen. However, the coconut crop is subject to attack by pests and diseases that cause damage to production and affect fruit quality. The application of pesticides is still one of the practices used to control pests and diseases. The main objective of this thesis is to analyze the aspects of movement/translocation of pesticides in coconut palm, after pesticide application by endotherapy and subsequent evaluation of the contamination of the coconut water and pulp. A qualitative assessment was performed to understand the main mechanisms of translocation through the root systems and trunk by applying tracers (rhodamine B and brilliant blue FCF). The dissection of the coconut palm was performed to understand its anatomy and distribution of vascular bundles. Methods for the determination from 10 pesticides in coconut stem, 9 pesticides in pulp and 9 pesticides in coconut water were developed and validated. All methods for the determination of pesticides used the QuEChERS (Quick Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) modified acetate extraction technique and ultra high efficiency liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) as the analysis technique. The main challenge in the development of methods of extraction was the interference of the high lipid content from the pulp and coconut water on the isolation of the analytes of interest. This interference was eliminated with the freezing of the extract in dry ice during the partition step. The applicability of these methods was evaluated by four tests. In the first test, 36 samples were monitored, in triplicate, being 18 coconut waters and 18 pulps, from three Brazilian regions, Campinas-SP, Goianésia-GO and Neópolis-SE. Carbofuran was detected in all samples. In some samples from Neópolis other pesticides such as carbendazim, thiabendazole, cyproconazole and difenoconazole were detected in coconut water. Cyproconazole, difenoconazole and spirodiclofen were detected for the pulp. In all samples analyzed the concentration values were below the limit of quantification ( $<10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) ensuring the quality of the fruits. In Test 2 both the endotherapeutic application modalities for pesticides were evaluated: infusion and injection. The results showed that translocation occurs because pesticides were detected and quantified in the stem 15 cm above the point of application. In Test 3 six different treatments using endotherapy by injection were tested, and 5 of these with different adjuvants. Through a completely randomized design, 12 plants were selected, stem samples were collected close to points of application, in the canopy of the coconut trees, and in fruits of bunch 17 (full formation of coconut water) at 2 and 30 days after applications. From these results, *Break-thru*<sup>®</sup> was selected as the adjuvant and the study was extended to 60 plants divided into two treatments: (a) mix of seven commercial pesticides and (b) cyproconazole. These treatments were divided into two procedures: injection and infusion, and used the commercial equipment *Bite Infusion*<sup>®</sup>. The stem samples were collected 50 and 100 cm above the point of application with intervals from 2 to 45 days. The coconut water and pulp from bunch 19 fruit samples and dried coconut were also analyzed with intervals from 45 to 120 days after application. The results showed that in both endotherapeutic techniques, injection and infusion, there was translocation of all pesticides in the stem. Pesticides were not detected in the fruit, indicating that the endotherapeutic method can be effective for the control of diseases and pests without the risk of contaminating the fruit. With the procedure using only cyproconazole, the infusion endotherapeutic method has shown that translocation may be

faster using a smaller volume of the pesticide in the injection method. However, the equipment for this purpose needs to be improved to make this practice viable for production.

**Keywords:** *Cocos nucifera* Linn., QuEChERS, UHPLC-MS/MS, translocation, pesticides, endotherapy

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais benefícios do enquadramento ecossistêmicos do coqueiro .....	33
Figura 2 – Perfil do estipe com corte horizontal.....	37
Figura 3 – Estrutura foliar do coqueiro .....	38
Figura 4 – Fruto do coco .....	39
Figura 5 – Fotos ilustrativas da estrutura e germinação do coco .....	41
Figura 6 – Fruto germinado sem o exocarpo para melhorar a visualização das raízes e a muda de coqueiro .....	42
Figura 7 – Demonstração do “ângulo de ouro” com 137,5° .....	43
Figura 8 – Perfil da filotaxia do coqueiro com vista do topo .....	44
Figura 9 – A não-herança da direção de espirais foliares do coqueiro.....	44
Figura 10 – Foto representando o equilíbrio entre a translocação e transpiração .....	47
Figura 11 – Relação entre o coeficiente de dissociação ácida ( $pK_a$ ), coeficiente de partição octan-1-ol/água ( $K_{ow}$ ) e a mobilidade do floema e xilema .....	53
Figura 12 - Simulação do comportamento gotas na fonte de eletropulverização em diferentes níveis de diluição .....	68
Figura 13 - Tratamento endoterápico de injeção. ....	84
Figura 14 - Foto ilustrando os detalhes do equipamento de infusão .....	87
Figura 15 - Fotografia mostrando o detalhe dos furos na agulha do equipamento de infusão .....	87
Figura 16 - Réplica do equipamento para a infusão dos agrotóxicos .....	87
Figura 17 - Réplica do equipamento para a infusão dos agrotóxicos.....	88
Figura 18 - Procedimento realizado no tratamento endoterápico de infusão, utilizando o equipamento <i>Bite Infusion</i> .....	88
Figura 19 - Sequência do tratamento de infusão .....	89
Figura 20 - Procedimento padrão para coleta das amostras na altura 100 cm acima do ponto de aplicação dos agrotóxicos .....	89
Figura 21 – Esquema das alturas dos pontos de aplicação e de coletas das amostragens .....	96
Figura 22 – Tratamento endoterápico utilizando os métodos de injeção e infusão .....	99
Figura 23 – Aplicação de traçadores .....	100
Figura 24 – Raízes primárias imersas em bolsas contendo o traçador azul brilhante FCF .....	100
Figura 25 – Translocação dos feixes traçados .....	104
Figura 26 – Aplicação da Rodamina B nos 4 hemisférios do estipe e a visualização dos feixes traçados .....	104
Figura 27 – Exsudação de rodamina B .....	105
Figura 28 – Número de feixes traçados em diferentes alturas .....	106
Figura 29 – Número de feixes internos do estipe de coqueiros traçados.....	106
Figura 30 – Aproximações e visualização dos feixes traçados com o rodamina B .....	107
Figura 31 – A)B)C) e D) apresentam um secção longitudinal do feixe.....	108
Figura 32 – Aproximações do ponto em que foi introduzido o Rodamina B no estipe .....	108
Figura 33 – Número de feixes vasculares internos do estipe de plantas de coqueiros traçados ....	109
Figura 34 - Número de feixes traçados no estipe de coqueiros em diferentes alturas.....	110
Figura 35 - Número de feixes traçados no estipe de coqueiros. ....	111

Figura 36 - Translocação do traçador azul brilhante FCF .....	112
Figura 37 - Translocação do traçador Rodamina B pelos feixes condutores de seiva.....	114
Figura 38 - Feixes demonstrando a translocação de Rodamina B diluído até o pecíolo na zona central das folhas .....	114
Figura 39 - Fruto germinado.....	115
Figura 40 - Formação das raízes. ....	115
Figura 41 - A) e B) Perfil dos estipes partidos ao meio e visualização da formação das folhas .....	116
Figura 42 - Perfil do estipe .....	116
Figura 43 – Perfil da base do estipe de uma planta adulta .....	117
Figura 44 – Perfil do corte transversal do estipe do coqueiro.....	117
Figura 45 – Aproximação das fotos e sinalização com setas amarelas dos feixes que foram para as folhas .....	118
Figura 46 – Perfil dos feixes do estipe na altura entre a base e a copa .....	118
Figura 47 – Perfil da copa do coqueiro realizado com o auxílio de um motosserra .....	119
Figura 48 – Perfil do estipe próximo à copa realizado com o auxílio de um facão .....	119
Figura 49 – Perfil da copa para visualização do meristema apical .....	120
Figura 50 – Vista do topo do meristema apical.....	120
Figura 51 – Foto mostrando a distribuição e conexão das folhas ao estipe.....	121
Figura 52 – Fotografia mostrando a conexão dos feixes às folhas. ....	121
Figura 53 – Fotografia aproximada mostrando a conexão dos feixes com as folhas.....	122
Figura 54 – Perfil em outro ângulo dos feixes que conectam as folhas .....	122
Figura 55 - Procedimento para desfolhação e compreensão do meristema apical .....	123
Figura 56 - Desfolhação das folhas imaturas do coqueiro, originárias do meristema apical .....	123
Figura 57 - Desfolhação das folhas imaturas retiradas do meristema apical .....	124
Figura 58 - Inflorescência imatura, também conhecida como espata, alocada entre as folhas do coqueiro.....	124
Figura 59 - Fruto com o endosperma solidificado, e formação da maçã.....	124
Figura 60 - Espirais no coqueiro, formada a partir da sequência de Fibonacci .....	125
Figura 61 - Formação dos espirais no coqueiro, formada a partir da sequência de Fibonacci .....	125
Figura 62 - Sequência ordenada nos feixes das folhas e a espiralidade nos ramos que compõem o cacho .....	126
Figura 63 - Feixes que conectam a espata/inflorescência no estipe .....	126
Figura 64 - As imagens de tecidos de estipe com o corte transversal (A) e horizontal (B-F).....	127
Figura 65 – As imagens de tecidos das folhas com o corte horizontal.....	127
Figura 66 – As imagens de tecidos das folhas com o corte horizontal .....	127
Figura 67 – Cromatograma dos íons selecionados obtido por UHPLC-MS/MS a partir da solução analítica dos agrotóxicos em acetonitrila numa concentração de 20 µg L <sup>-1</sup> .....	133
Figura 68 – Etapas do pré-tratamento do estipe.....	134
Figura 69 – Representação esquemática do método QuEChERS .....	135
Figura 70 – Resultados da análise utilizando o método QuEChERS acetato modificado (Teste 2) .....	137
Figura 71 – Fotos dos extratos durante algumas etapas do procedimento de extração do QuEChERS .....	137
Figura 72 – Fluxograma sequencial de tratamento do albúmen sólido .....	139
Figura 73 – Representação esquemática do método QuEChERS .....	140

Figura 74 – Fotos dos extratos obtidas em algumas etapas do procedimento de extração do QuEChERS .....	141
Figura 75 – Eficiência de extração do método QuEChERS acetato modificado para o albúmen sólido fortificado na concentração de 50 µg kg <sup>-1</sup> e análise por UHPLC-MS/MS .....	143
Figura 76 – Representação esquemática do método QuEChERS acetato modificado .....	144
Figura 77 – Recuperação, R(%) e o desvio padrão relativo, RSD(%) para o método QuEChERS acetato modificado para a água-de-coco .....	145
Figura 78 - Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS a partir da solução analítica dos agrotóxicos em acetonitrila numa concentração de 20 µg L <sup>-1</sup> .....	147
Figura 79 – Identificação dos compostos.....	154
Figura 80 - Sequência fotográfica do primeiro teste de infusão.....	157
Figura 81 - Resultados da cicatrização com 11 meses após o teste de infusão .....	158
Figura 82 - Resultados da cicatrização dos orifícios ocasionados pela introdução da agulha do equipamento.....	158
Figura 83 - Resultados da cicatrização dos orifícios de outro coqueiro ocasionados pela introdução da agulha do equipamento .....	158
Figura 84 - Resultados da cicatrização do estipe através do método de injeção .....	160
Figura 85 – Concentração do tiametoxam após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	169
Figura 86 – Concentração do tiametoxam após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	170
Figura 87 – Sobreposição das concentrações encontradas para o tiametoxam .....	171
Figura 88 - Concentração do carbofurano após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	172
Figura 89 – Concentração do carbofurano após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	173
Figura 90 – Sobreposição das concentrações encontradas para o carbofurano .....	174
Figura 91 - Concentração do tiabendazol após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	175
Figura 92 – Concentração do tiabendazol após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	176
Figura 93 – Sobreposição das concentrações encontradas para o tiabendazol .....	177
Figura 94 - Concentração do imidacloprido após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	178
Figura 95 – Concentração do imidacloprido após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	179
Figura 96 – Sobreposição das concentrações encontradas para o imidacloprido .....	180
Figura 97 - Concentração do ciproconazol após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	181
Figura 98 – Concentração do ciproconazol após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	182
Figura 99 – Sobreposição das concentrações encontradas para o ciproconazol .....	183
Figura 100 - Concentração do difenoconazol após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	184
Figura 101 – Concentração do difenoconazol após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	185
Figura 102 – Sobreposição das concentrações encontradas para o difenoconazol .....	186
Figura 103 - Concentração do espirodiclofeno após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	187
Figura 104 – Concentração do espirodiclofeno após aplicação do <i>mix</i> de agrotóxicos .....	188
Figura 105 - Concentração do ciproconazol após aplicação deste agrotóxico empregando os métodos endoterápicos de infusão (i) e injeção (ii).....	191
Figura 106 - Sobreposição das concentrações encontradas para o ciproconazol após aplicação empregando os métodos endoterápicos de injeção (área hachurada) e infusão (área lisa).....	192

Figura S1 - Mapa de identificação dos experimentos realizados nos tratamentos endoterápicos ..	222
Figura S2 - Mapa de identificação dos experimentos refeitos e realizados nos tratamentos endoterápicos para os frutos.....	222
Figura S3 - Resultados de translocação do carbofurano referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas.....	229
Figura S4 - Resultados de translocação do tiabendazol referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas .....	230
Figura S5 - Resultados de translocação do imidacloprido referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas .....	231
Figura S6 – Resultados de translocação do ciproconazol referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas .....	232
Figura S7 – Resultados de translocação do difenoconazol referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas .....	233
Figura S8 – Resultados de translocação do espirodiclofeno referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas .....	234
Figura S9 – Resultados de translocação do ciproconazol referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas .....	235
Figura S10 – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS.....	236
Figura S11 – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS .....	237
Figura S12 – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS .....	238
Figura S13 – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS.....	239
Figura S14 – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS .....	240
Figura S15 – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS .....	241
Figura S16 – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS .....	242

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação de agrotóxicos no coqueiro (água-de-coco, albúmen sólido e estipe).....	63
Tabela 2 - Tabela de agrotóxicos monitorados pelo ANVISA e EU e com os respectivos LMR estabelecidos para a cultura do coqueiro .....	66
Tabela 3 - Sumário de etapas necessárias para análise de resíduos .....	68
Tabela 4 - Características gerais dos agrotóxicos selecionados para este estudo .....	76
Tabela 5 - Agrotóxicos abordados neste estudo e os registros no MAPA .....	77
Tabela 6 - Características e propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para este estudo.....	78
Tabela 7 - Gradiente linear da proporção de fase móvel.....	80
Tabela 8 - Tratamentos realizados com a injeção dos agrotóxicos e adjuvantes .....	91
Tabela 9 - Tratamentos realizados nos tratamentos endoterápicos .....	93
Tabela 10 - Concentração dos agrotóxicos avaliados ( <i>mix</i> ) .....	94
Tabela 11 - Concentração do ciproconazol .....	94
Tabela 12 - Agrotóxicos avaliados, conforme $t_R$ e massa molar e parâmetros MS/MS dos agrotóxicos .....	132
Tabela 13 - Resultados dos valores referentes aos agrotóxicos estudados nas matrizes (estipe, água-de-coco e albúmen sólido) .....	150
Tabela 14 - Resultados do tratamento endoterápico de infusão .....	157
Tabela 15 - Resultados do primeiro teste do tratamento endoterápico de injeção .....	159
Tabela 16 - Concentração dos agrotóxicos obtidas em diferentes alturas e tempos no estipe .....	161
Tabela S1 - Delineamento inteiramente casualizado das plantas selecionadas neste trabalho .....	223

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\mu\text{g kg}^{-1}$  – micrograma por quilograma

$\mu\text{g L}^{-1}$  – Micrograma por litro

‰ – Permilagem

AAG – Anão Amarelo de Gramame

AAM – Anão Amarelo da Malásia

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AVC – Anão Vermelho de Camarões

AVeBrJ – Anão Verde do Brasil de Jiqui

AVG – Anão Vermelho de Gramame

AVM – Anão Vermelho da Malásia

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

CV – Coeficiente de variação

d-6 – Linuron deuterado

DEET – N,N-dietil-meta-toluamida

DIA/DAS – Diretor do Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

DNA – Ácido desoxirribonucléico

d-SPE – Extração em fase sólida dispersiva, do inglês, *dispersive solid phase extraction*

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

DT<sub>50</sub> - Hidrólise aquosa ou tempo de degradação 50%

ESI – Ionização por *electrospray*

EU – União Europeia, do inglês, *European Union*

eV – Eletrón volt

FAO – *Food and Agriculture Organization*

GBrAV – Gigante do Brasil Avenida

GBrBA – Gigante do Brasil Barreirinhas

GBrBF – Gigante do Brasil Baía Formosa

GBrLC – Gigante do Brasil Luís Correia

GBrME – Gigante do Brasil Merepe

GBrOC – Gigante do Brasil Olho de Cravo

GBrPC – Gigante do Brasil de Pacatuba

GBrPF – Gigante do Brasil Praia do Forte

GBrSGA – Gigante do Brasil Senador Georgino Avelino  
GBrSJM – Gigante do Brasil São José Mipibu  
GBrSR – Gigante do Brasil Santa Rita  
GBrTR – Gigante do Brasil Terra do Rei  
GC – Cromatografia a gás  
GC-ECD – Cromatografia a gás com detector de captura de elétrons, do inglês, *Gas chromatography with an electron-capture detector*  
GC-EM – Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas, do inglês, *gas chromatography coupled mass spectrometry*  
GC-MS – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, do inglês, *Gas chromatography-mass spectrometry*  
GC-MS/SIM – Cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas com monitoramento seletivo de íons, do inglês, *Gas chromatograph-mass spectrometry with selected ion monitoring*  
GC-TSD – Cromatografia a gás com detector termoiônico sensível, do inglês, *Gas chromatography with thermionic sensitive detection*  
GML – Gigante da Malásia  
GO – Goiás  
GOA – Gigante Oeste Africano  
GPY – Gigante da Polinésia  
GRL – Gigante de Rennel  
GRT – Gigante de Rotuma  
GTG – Gigante de Tonga  
GVT – Gigante de Vanuatu  
HIV - *Human Immunodeficiency Virus*  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *High performance liquid chromatography*.  
HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo, do inglês, *High performance liquid chromatograph with photodiode array detection*  
HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta, do inglês, *High performance liquid chromatograph with an ultraviolet detector*  
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis  
ICP-MS – Plasma indutivamente acoplado ao espectrômetro de massas, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*  
IDA – Ingestão Diária Aceitável  
IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*  
LARP – Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas  
LC – Cromatografia líquida

LC-MS/MS – Cromatografia a líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês, *Liquid chromatography–mass spectrometry*

LLE – Extração líquido-líquido, do inglês, *Liquid Liquid Extraction*;

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LOD – Limite de detecção

LODi – Limite de detecção do instrumento

log  $K_{ow}$  – coeficiente de partição octan-1-ol/água

LOQ – Limite de quantificação

LOQi – Limite de quantificação do instrumento

LOQm – Limite de quantificação do método

m/v – Massa por volume

m/z – Razão massa/carga

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEKC – Cromatografia eletrocinética micelar, do inglês, *micellar electrokinetic chromatography*

*mix* – Mistura

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MS – Espectrometria de massas

MSMA – Metano-arseniato ácido monossódico

MSPD – Dispersão de matriz em fase sólida, do inglês, *Matrix Solid Phase Dispersion*

PARA – Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PB 121 – *Port Bouet*, resultante do cruzamento das variedades Anão-amarelo da Malásia e Gigante Oeste Africano

pH - Potencial hidrogeniônico

$pK_a$  – Logaritmo da constante de dissociação de ácida

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PSA – Amina primária secundária, do inglês, *primary and secondary amine*

QuEChERS – Rápido, fácil, econômico, robusto e seguro, do inglês, *Quick Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

R(%) – Recuperação

$r^2$  - Coeficiente de determinação

Rpm – Rotações por minutos

RSD - Desvio padrão relativo

s – Estimativa do desvio padrão absoluto

SANCO – *Directorate General for Health and Consumer Affairs*

SBSE – Extração em barra sortiva de agitação, do inglês, *Stir Bar Sorptive Extraction*

SDME – Microextração em única gota, do inglês, *Single Drop Microextraction*

SE – Sergipe

SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SINDCOCO - Sindicato Nacional dos Produtores de Coco do Brasil

SP – São Paulo

SPE – Extração em fase sólida, do inglês, *Solid Phase Extraction*

SRM - Monitoramento de reação selecionada

T - Tratamento

TPP – Trifenilfosfato

$t_R$ . Tempo de retenção

TSCF – fator de concentração de fluxo de transpiração

UHPLC-MS/MS – Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - Introdução</b> .....	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Objetivos</b> .....	<b>30</b>
2.1. Objetivo Geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
<b>CAPÍTULO 3 - Revisão bibliográfica</b> .....	<b>31</b>
3.1. Coqueiro .....	31
3.2. A importância do mercado e os benefícios dos produtos do coqueiro .....	32
3.3. Desenvolvimento, crescimento, morfologia e fisiologia do coqueiro .....	34
3.4. Sequência de Fibonacci-filotaxia em plantas .....	41
3.4.1. Sequência de Fibonacci no coqueiro .....	42
3.5. Traçadores .....	46
3.6. Translocação de agrotóxicos em plantas.....	48
3.7. Avanços e as novas tecnologias nos métodos na aplicação de agrotóxicos .....	54
3.7.1. Aplicação endoterápica em palmáceas .....	57
3.7.2. Adição de adjuvantes à calda de agrotóxicos para a aplicação em coqueiros .....	59
3.8. Determinação de agrotóxicos no coqueiro.....	61
3.9. Técnicas de extração e determinação de agrotóxicos.....	65
3.10. Validação.....	67
3.10.1. Linearidade (faixa linear) e Curva analítica .....	68
3.10.2. Limite de determinação (LOD) e Limite de quantificação (LOQ) .....	68
3.10.3. Seletividade .....	69
3.10.4. Efeito Matriz .....	69
3.10.5. Exatidão.....	71
3.10.6. Precisão .....	72
<b>CAPÍTULO 4 - Materiais e métodos</b> .....	<b>73</b>
4.1. Padrões Analíticos, reagentes e materiais.....	73
4.2. Seleção dos agrotóxicos .....	76
4.3. Instrumentação .....	78
4.4. Preparo das soluções analíticas .....	78
4.5. Equipamento de análise.....	79
4.6. Seleção do cultivar de coqueiro .....	80
4.7. Coleta e processamento das amostras .....	80
4.8. Preparo de amostras e otimização das condições de extração para o estipe, albúmen sólido e água-de-coco .....	81
4.8.1. Amostras comerciais de fruto para análise do albúmen sólido e água-de-coco .....	81
4.9. Validação do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Coqueiro (Estipe, Albúmen sólido e Água-de-coco) .....	82
4.9.1. Curva analítica e faixa linear .....	82
4.9.2. Limites de Quantificação (LOQ) e Limites de Detecção (LOD) .....	82
4.9.3. Seletividade .....	83
4.9.4. Efeito Matriz.....	83
4.9.5. Exatidão.....	83
4.9.6. Precisão intra-dias (repetitividade) e precisão Intermediária .....	84
4.10. Tratamentos endoterápicos .....	84
4.10.1. Tratamento endoterápico de injeção.....	84
4.10.2. Tratamento endoterápico de infusão.....	85
4.10.3. Testes iniciais dos tratamentos endoterápicos de infusão e injeção .....	88
4.10.4. Testes dos tratamentos endoterápicos de injeção com adjuvantes .....	89

4.10.5. Testes dos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão empregando a mistura de agrotóxicos + <i>Break-thru®</i> e somente ciproconazol + <i>Break-thru®</i> .....	91
4.10.6. Padronização para a aplicação e coleta das amostras nos tratamentos endoterápicos.....	94
4.11. Aplicação de traçadores rodamina B e azul brilhante FCF no estipe do coqueiro .....	97
4.11.1. Via tronco .....	98
4.11.2. Via raiz.....	99
4.12. Dissecção do coqueiro .....	100
4.12.1. Fotos para visualização de feixes das folhas, inflorescência e estipe.....	100
<b>CAPÍTULO 5 – Aplicações com contexto multidisciplinar: translocação utilizando traçadores, dissecção do coqueiro e sequência de Fibonacci.....</b>	<b>101</b>
5. Avaliação dos métodos endoterápicos (sistema de injeção via raiz e tronco) utilizando traçadores para subsidiar a aplicação de agrotóxicos no estudo dos efeitos da distribuição espaço-temporal.....	102
5.1. Rodamina B.....	102
5.1.1. Via tronco - Injeção de rodamina B no estipe do coqueiro utilizando equipo de soro (método 2).....	104
5.1.2. Avaliação do sistema vascular do estipe de coqueiro após a aplicação de rodamina B – via tronco e a aproximação dos feixes com o auxílio de uma lupa .....	106
5.2. Azul brilhante FCF .....	108
5.2.1. Via tronco – Injeção de traçador azul brilhante FCF no estipe utilizando uma seringa (método 1) .....	108
5.2.2. Via tronco – Injeção do traçador azul brilhante FCF no estipe utilizando equipo de soro (método 2) .....	109
5.2.3. Via raiz – Imersão de raízes primárias no traçador azul brilhante FCF (método 3) ..	110
5.3. Dissecção do coqueiro para compreensão de sua anatomia .....	113
5.3.1. Formação do estipe, folhas e raiz.....	114
5.3.2. Base do estipe, próximo às raízes.....	116
5.3.3. Altura intermediária do estipe.....	117
5.3.4. Estipe próximo as folhas .....	118
<b>CAPÍTULO 6 – Condições de análise dos agrotóxicos selecionados pela técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS); desenvolvimento de métodos analíticos de extração para o estipe, albúmen sólido e água-de-coco; Validação dos métodos analíticos .....</b>	<b>129</b>
6. Otimização do UHPLC-MS/MS para a determinação dos agrotóxicos selecionados em amostras de coqueiro .....	130
6.1. Desenvolvimento do método para a determinação de agrotóxicos .....	132
6.2. Validação do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Coqueiro (Estipe, Albúmen Sólido, Água-de-coco).....	144
6.2.1. Seletividade.....	145
6.2.1. Determinação dos valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do instrumento e do método .....	147
6.2.3. Curva analítica, faixa linear, efeito matriz, exatidão (ensaio de recuperação) e precisão (repetitividade) .....	147
6.3. Avaliação de resíduos de agrotóxicos na água-de-coco e albúmen sólido de amostras analisadas em Goianésia-GO, Neópolis-SE e Campinas.....	153
<b>CAPÍTULO 7 – Aplicação dos métodos de análise em amostras coletadas em estudo e campo da Sococo; comportamento dos agrotóxicos através de um estudo de translocação dos mesmos aplicados em estipe de coqueiro (<i>Cocos nucifera</i> Linn.) e análise de progresso espacial e temporal com variáveis ambientais da região em estudo .....</b>	<b>155</b>
7. Testes iniciais do tratamento endoterápico utilizando o <i>mix</i> .....	156

7.1. Tratamento endoterápico de infusão.....	156
7.2. Tratamentos endoterápicos de injeção.....	158
7.3. Tratamento endoterápico de injeção com adjuvantes .....	160
7.3.1. Translocação nos pontos mais próximos de aplicação .....	161
7.3.2. Translocação no ponto mais próximo da copa do coqueiro .....	162
7.3.3. Análise da água-de-coco após o tratamento endoterápico de injeção .....	164
7.4. Considerações durante a realização dos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão .....	164
7.4.1. Resultados de translocação para o tiametoxam .....	168
7.4.2. Resultados de translocação para o carbofurano .....	172
7.4.3. Resultados de translocação para o tiabendazol .....	174
7.4.4. Resultados de translocação para o imidacloprido .....	177
7.4.5. Resultados de translocação para o ciproconazol .....	180
7.4.6. Resultados de translocação para o difenoconazol .....	183
7.4.7. Resultados de translocação para o espirodiclofeno .....	183
7.5. Discussão dos resultados obtidos nos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão utilizando a mistura de agrotóxicos ( <i>mix</i> ) + <i>Break-thru®</i> .....	187
7.5.1. Infusão.....	187
7.5.2. Injeção.....	188
7.6. Translocação de agrotóxicos utilizando os tratamentos endoterápicos de injeção e infusão empregando o ciproconazol + <i>Break-thru®</i> .....	189
7.7. Análises dos frutos (água-de-coco e albúmen sólido) do cacho 19 e cacho de coco seco após as aplicações endoterápicas com intervalos de 45 a 120 dias .....	192
7.8. Discussões gerais dos resultados obtidos nos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão .....	194
<b>CAPÍTULO 8. Conclusões gerais e perspectivas .....</b>	<b>198</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>204</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>220</b>

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

Para milhões de pessoas que vivem em regiões litorâneas tropicais e subtropicais, o coqueiro (*Cocos nucifera* Linn.) tem uma grande importância econômica, social e ambiental<sup>1</sup> por ser uma cultura que abastece quase todas as necessidades básicas de subsistência da vida, tais como: alimentação, vestuário, moradia e transporte, a partir de produtos como óleo, fibra, palha, madeira, combustível e utensílios domésticos. Além disso, com a demanda do mercado cada vez maior, o consumo do fruto é apreciado, especialmente, a água-de-coco, açúcar, leite e óleo-de-coco, que vem conquistando a culinária pelo sabor, suas qualidades nutricionais e baixo índice glicêmico<sup>2</sup>. Por estas razões, o coqueiro é classificado como uma das plantas oleaginosas mais importantes do mundo<sup>3</sup> e uma das principais frutíferas mundialmente cultivadas<sup>4</sup>. Por isso, é intitulada como: “*Tree of Life*”, “*Tree of Heaven*” ou “Árvore da Vida”<sup>1,5</sup>.

Apesar de um mercado em ascensão, até mesmo com a exportação desses produtos supracitados, a produção do coqueiro é seriamente afetada com a ocorrência de doenças e pragas, causando perdas na produção e afetando a qualidade de seus produtos<sup>6</sup>. É cada vez maior o número de doenças e pragas em coqueiros no mundo. Vários relatos de sintomas nas raízes, estipe (caule) e folhas vêm causando consequências com infestações graves na plantação, como a redução da produção e a má formação de frutos. Isto de fato representa uma grande ameaça para a indústria do coco<sup>7,8</sup>.

A aplicação de agrotóxicos é uma das alternativas mais comuns no controle e prevenção de doenças e pragas no mundo, sobretudo, utilizando a pulverização, que é o método de tratamento convencional, o qual utiliza um *spray* com a nebulização de agrotóxicos<sup>9</sup>. Apesar do modelo agrícola brasileiro se basear no emprego da pulverização para ampliar sua produtividade, este método demanda em um alto volume de agrotóxicos sendo usado. Contudo, parte desta aplicação pode não atingir o alvo, e isto impacta negativamente o meio ambiente, o operador, a qualidade do alimento e a saúde do

consumidor. Além disso, com a deficiência na fiscalização fitossanitária associada ao comércio clandestino e a aplicação indiscriminada de produtos não autorizados na lavoura, o consumidor pode não ter conhecimento da qualidade do alimento que está comprando. De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2016)<sup>10</sup>, o Brasil é o país com maior consumo mundial de agrotóxicos.

Combater as doenças/pragas na cocoicultura têm sido um desafio para os produtores que investem na compra de agrotóxicos e métodos de aplicação convencionais. A pulverização, com a aplicação de agrotóxicos em partes superficiais e externas do coqueiro, não protege o tratamento do sol e/ou chuva. Os produtores permanecem relutantes em mudar o uso de agrotóxicos e sua substituição por outras técnicas menos agressivas parece estar longe de ocorrer é ainda um quadro teórico e difícil de ser substituído<sup>11,12</sup>. Além disso, muitos agrotóxicos possuem modos de ação únicos, ou seja, se bem aplicados atingem imediatamente no alvo. Todavia, é necessário o desenvolvimento de métodos de aplicação de agrotóxicos que ofereçam vantagens como: (a) reduzir a contaminação ambiental e exposição do produtor; (b) atingir o alvo com menos perdas, devido à altura da planta do coqueiro que ultrapassa os 10 metros; (c) ser usado na presença de ataques letais e persistentes das pragas/microorganismos; (d) melhorar a eficiência quando o tratamento foliar ou no solo não são efetivos ou são difíceis. Diante disso, a endoterapia vem ganhando destaque por ser um método rápido, relativamente simples, durável e consistentemente ativo quando é aplicada uma quantidade conhecida do produto químico na planta<sup>9,13</sup>.

A endoterapia é uma modalidade alternativa de aplicação de agrotóxicos que vem sendo pesquisada através do sistema de injeção ou infusão de agrotóxicos. A diferença destas duas modalidades de aplicação endoterápica está no modo de execução: (a) na injeção, o estipe é perfurado com o auxílio de uma furadeira num ângulo de aproximadamente 45°, e neste orifício é aplicada a dosagem de agrotóxico com uma seringa de polietileno; (b) na infusão, o próprio equipamento é encarregado de perfurar o estipe e introduzir os agrotóxicos. Outra diferença destas aplicações é que na infusão só é retirado o equipamento quando se tem a garantia de que todo o agrotóxico foi aplicado/adsorvido. Este

sistema é baseado em conceitos físicos como no princípio de Bernoulli e Efeito Venturi<sup>9</sup>. Já na injeção, a própria planta é encarregada de absorver os agrotóxicos aplicados dentro do orifício.

Os métodos endoterápicos se baseiam na aplicação dos agrotóxicos diretamente no interior do estipe, através da translocação xilemática e a impulsão com a evapotranspiração da seiva durante o ciclo fotossintético nas folhas. Diante disso, em monocotiledôneas, a endoterapia tem se mostrado um método promissor para os agrotóxicos sistêmicos juntamente com os adjuvantes, ao proporcionar a translocação desses produtos em plantas de grande porte, como o coqueiro. O estipe do coqueiro é robusto com incontáveis vasos lenhosos condutores de seivas que se comunicam em toda a sua extensão e suportam várias perfurações sem prejudicar o crescimento da planta e da gema apical (ponto de crescimento) que se encontra na copa, sem ser atingida. Assim, com uma anatomia que favorece este tipo de aplicação há a necessidade de maiores estudos quanto à sua eficiência referente a aplicação endoterápica, a cinética de translocação dos agrotóxicos, a duração do tratamento e a distribuição destes produtos dentro dos tecidos da planta<sup>3,14</sup>.

Ainda não existem informações sobre o critério de seleção do agrotóxico para métodos endoterápicos quanto ao número de tratamentos, à dosagem, ao tipo adequado de equipamento de aplicação e às características da possível distribuição espaço-temporal desencadeada pelos agrotóxicos nas plantas<sup>14</sup>. Essa limitação de dados leva à dificuldade de compreensão dos mecanismos de ação dos agrotóxicos nas diferentes espécies-alvo (doenças e pragas), e por isso, a interdisciplinaridade de áreas é fundamental, como a agronomia, física, química e botânica, pois envolvem estudos aplicados aos agrotóxicos e à ciência das plantas<sup>15</sup>. É importante avaliar a translocação dos agrotóxicos no coqueiro e em plantas de um modo geral para estimar os riscos de contaminação dos alimentos, causando riscos à saúde humana e ao meio ambiente<sup>16</sup>. A presença de resíduos de agrotóxicos no fruto contrasta com os benefícios nutricionais à saúde dos consumidores dos produtos do coqueiro e podem trazer riscos em razão da toxicidade dos agrotóxicos, seja em sua forma química original ou muitas vezes sob a forma de produtos degradados<sup>17</sup>. Aplicação

endoterápica dos agrotóxicos como um método alternativo para prevenir ou controlar as doenças e pragas é pobremente compreendida, devido à falta de métodos analíticos que avaliam a eficiência deste tipo de tratamento<sup>15,18</sup>.

Neste contexto, foi necessário o desenvolvimento de novos métodos para a determinação de agrotóxicos no estipe do coqueiro para avaliar a translocação em amostras coletadas acima do ponto de injeção e nos frutos [água-de-coco e albúmen sólido (polpa)] que apresentassem rapidez e alta eficiência. Em 2003, Anastassiades *et al.*<sup>19</sup>, desenvolveram um método rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro, do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*, cujo acrônimo é QuEChERS. Nos últimos anos, QuEChERS sofreu várias modificações e tornou-se um método de extração bem estabelecido para análise de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos e amostras agrícolas<sup>20</sup> com três versões principais: a) original, b) citrato e c) acetato. A eficiência do método QuEChERS somada ao elevado grau de seletividade e detectabilidade da cromatografia líquida e gasosa (LC e GC) acopladas à espectrometria de massas (MS) consiste em muitas vantagens para a detecção de agrotóxicos<sup>21</sup>.

Logo, este estudo se tornou importante, pois permitiu compreender alguns fenômenos que ocorrem no movimento/translocação dos agrotóxicos no estipe do coqueiro e cujo mote, ainda não fora explorado na literatura científica. Adicionalmente, este trabalho propôs o desenvolvimento e a aplicação de métodos analíticos para avaliarem a translocação de agrotóxicos aplicados no estipe do coqueiro (método A) e a possibilidade de contaminação no fruto, como o albúmen sólido (método B) e a água-de-coco (método C) que foram analisados separadamente, levando em consideração os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para a cocoicultura utilizando métodos, como QuEChERS acetato modificado e a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS).

## Capítulo 2

# OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo Geral

Avaliar a translocação dos agrotóxicos aplicados por endoterapia no estipe de coqueiro (*Cocos Nucifera* L.) e a possibilidade de contaminação no fruto (água-de- coco e albúmen sólido).

### 2.2 – Objetivos Específicos

- ✿ Selecionar os agrotóxicos utilizados no controle de pragas de *Cocos Nucifera* L;
- ✿ Obter as condições de análise dos agrotóxicos pela técnica de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS);
- ✿ Desenvolver um método analítico para determinação de agrotóxicos no estipe;
- ✿ Desenvolver um método analítico para determinação de agrotóxicos no albúmen sólido;
- ✿ Desenvolver um método analítico para determinação de agrotóxicos na água-de-coco;
- ✿ Validação dos métodos de análise;
- ✿ Aplicar os métodos de análise em amostras comerciais;
- ✿ Avaliar a translocação de traçadores Rodamina B e azul brilhante FCF no estipe de coqueiro através dos vasos condutores de seiva para subsidiar o desenvolvimento de tecnologias de aplicação de agrotóxicos nesta cultura, monitorando-o até os frutos, compreendendo o sistema vascular responsável pelo transporte/movimento de seiva na planta;
- ✿ Monitorar o comportamento dos agrotóxicos através de um estudo da translocação dos mesmos aplicados em estipe do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) e análise de progresso espacial e temporal com variáveis ambientais da região em estudo.

## Capítulo 3

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 – Coqueiro

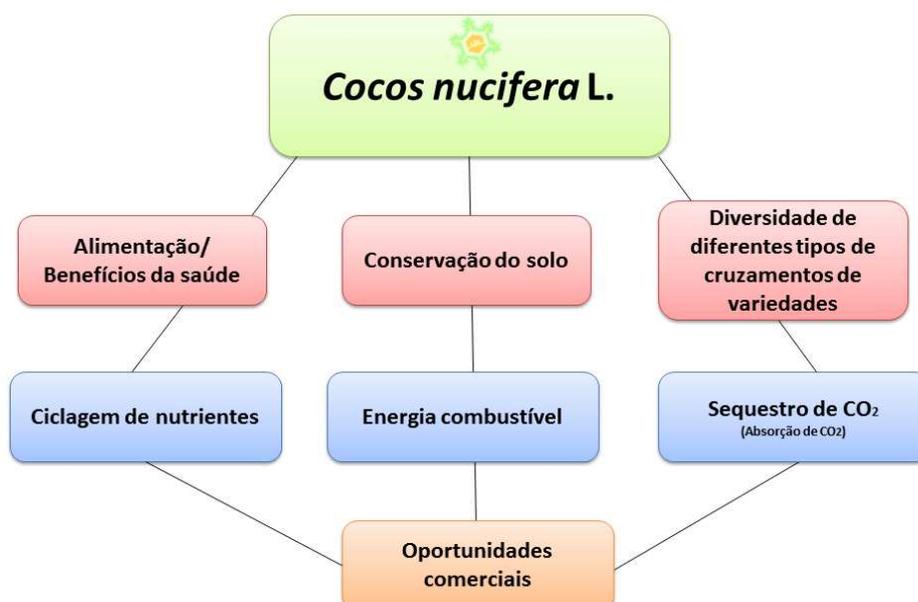
O coqueiro é uma planta da divisão Espermatófita, classe Angiosperma, sub-classe Monocotiledônea, de ordem Principes (Arecales), família Palmae, tribo Cocoidae, gênero *Cocos* e espécie *Cocos nucifera* Linn.<sup>22</sup>. É uma planta arbórea com copa densa e elegante. A planta é monóica (órgãos masculinos e femininos na mesma planta). Com um tufo de folhas pinuladas, entre 30-35, sendo que, cada pínula apresenta um tamanho entre 60-90 cm de comprimento, bem verdes na extremidade. A folha é constituída de pecíolo curto e por vários pseudo-folíolos, com 1-2 anos de vida e 6 m de comprimento. O caule é indiviso chamado estipe, estirpe ou espique e raiz fasciculada. A inflorescência axilar é em forma de cacho com flores femininas globosas. O fruto também é conhecido como noz-semente ou semente, sedo que na sua parte interna é encontrada a água-de-coco e o albúmen sólido. As variedades de coqueiro são: anão – representado por tipos com frutos verdes, vermelhos e amarelos, tem autofecundação e frutos destinados ao consumo de água-de-coco com inflorescência surgindo entre 2 anos depois do plantio e uma vida de produção entre 30-40 anos; gigante – também chamado de típico, com uma coloração que varia do verde ao amarronzado e frutos destinados à industrialização com inflorescência surgindo entre 6-10 anos depois do plantio e uma vida de produção entre 60-70 anos; e o híbrido – proveniente do cruzamento natural ou artificial entre gigante e anão com características intermediárias<sup>22-28</sup>.

O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros mantém a variabilidade genética por meio da conservação de 35 acessos de coqueiro Anão e Gigante, como: Anão Verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ), Anão Vermelho de Camarões (AVC), Anão Vermelho da Malásia (AVM), Anão Vermelho de Gramame (AVG), Anão Amarelo de Gramame (AAG) e Anão Amarelo da Malásia (AAM), Gigante Oeste Africano

(GOA), Gigante da Malásia (GML), Gigante da Polinésia (GPY), Gigante de Rennel (GRL), Gigante de Rotuma (GRT), Gigante de Tonga (GTG), Gigante de Vanuatu (GVT), Gigante do Brasil Santa Rita (GBrSR), Gigante do Brasil Merepe (GBrME), Gigante do Brasil São José Mipibu (GBrSJM), Gigante do Brasil Baía Formosa (GBrBF), Gigante do Brasil Praia do Forte (GBrPF), Gigante do Brasil de Pacatuba (GBrPC), Gigante do Brasil Olho de Cravo (GBrOC), Gigante do Brasil Barreirinhas (GBrBA), Gigante do Brasil Luís Correia (GBrLC), Gigante do Brasil Senador Georgino Avelino (GBrSGA), Gigante do Brasil Terra do Rei (GBrTR), Gigante do Brasil Avenida (GBrAV)<sup>29</sup>.

### 3.2 – O mercado e os benefícios dos produtos do coqueiro

O coqueiro é uma fonte de óleo, fibra, alimento e madeira contribuindo de forma significativa à alimentação, à melhoria da nutrição e às gerações de emprego e de renda<sup>30</sup>. Todas as partes do coqueiro podem ser aproveitadas desde as raízes, folhas, estipe, inflorescência, copra, seiva extraída das espátulas (*toddy*), palmito e principalmente, o fruto, sendo todos eles, produtos comercializáveis<sup>31</sup>. A Figura 1 apresenta os principais benefícios do enquadramento ecossistêmico do coqueiro, no aspecto de diversidade de utilidades, proteção ambiental e na identificação de grandes oportunidades comerciais<sup>28</sup>.



**Figura 1** - Principais benefícios do enquadramento ecossistêmicos do coqueiro  
**Fonte adaptada:** GARCIA *et al.*, 2009<sup>28</sup>.

O produto do coqueiro com maior possibilidade de mercado é o fruto, na forma de: a) água-de-coco; b) albúmen sólido, do qual são produzidos o óleo-de-coco, leite-de-coco, creme-de-coco, coco ralado desidratado<sup>5</sup>, com as opções de consumo que podem ser de forma *in natura* (frescos ou resfriados) e industrializada, como enlatados ou empacotados<sup>32,33</sup>; e c) casca do fruto em que são comercializadas as fibras e o substrato da fibra de coco.

O mercado do coco seco é reconhecido pelos aspectos positivos do óleo-de-coco, principalmente pelas propriedades dos: (1) ácidos graxos saturados, (2) ácidos graxos de cadeia média, (3) propriedades antimicrobianas e (4) antioxidantes. Essas propriedades conferem benefícios à saúde humana que vão desde a prevenção, alívio ao desconforto até a cura de doenças, como: cuidados dentários, úlceras pépticas, hiperplasia prostática benigna, herpes genital, hepatite C, bem como, HIV/AIDS. Além disso, há um futuro promissor para a produção do óleo como fonte de combustível<sup>8,34,35</sup>.

A água-de-coco é altamente consumida e seu sabor pode ser diferenciado pela idade do fruto. Por isso, para o consumo específico de água-de-coco, em termos de características de apreciação do sabor, a melhor idade de colheita do fruto verde é entre o 6º e 7º mês após a inflorescência. A água-de-coco é caracterizada por ser uma solução estéril, levemente ácida, pouco turva, não viscosa, com mais de 90% de água. É rica em nutrientes, contendo sais minerais, proteínas, gorduras neutras, açúcares, vitaminas, aminoácidos, alguns fosfolipídios com atividade antioxidante, fatores de promoção de crescimento com alta capacidade microbiana. Além disso, contêm propriedades medicinais e nutracêuticas, destacando principalmente as funções que podem auxiliar no desenvolvimento de novos produtos. Assim como a água-de-coco, a concentração das propriedades físico-químicas do albúmen sólido dependerá do estágio de maturação do fruto, sendo o melhor estágio ao 12º mês. A água-de-coco é envolvida pelo albúmen sólido, que é composto essencialmente por: lipídios, minerais, carboidratos (açúcares e polissacarídeos), fibras, ácidos graxos, proteínas, carboidratos, vitaminas e ácidos orgânicos<sup>36-43</sup>.

A seiva do coqueiro também tem um mercado abrangente em produtos pouco conhecidos no comércio e pouco comercializados, destacando-se, principalmente, na forma de bebidas alcólicas e na produção de açúcar. Ela é extraída a partir das inflorescências fechadas, também chamada de espata, que são incisadas e, posteriormente, recolhido o líquido. Os coqueiros híbridos, como o PB 121 (resultante do cruzamento das variedades Anão-amarelo da Malásia e Gigante Oeste Africano), são os mais recomendados para esta produção. Um importante estudo apontou os parâmetros para a produção de fluxo de seiva a partir da inflorescência e, concluíram que entre sete a nove, há oito inflorescências que produzem maiores volumes de seiva<sup>44</sup>.

Também, partes do coqueiro com seu tronco e folhas são materiais empregados na construção civil e na síntese de plástico e artigos domésticos. Além do mais, nos últimos anos, a madeira vem sendo aproveitada na fabricação de móveis de alta qualidade com expectativa de comercialização no mercado local e, inclusive, internacional<sup>8</sup>.

A produção de cocos no Brasil é liderada pela Bahia, seguida pelo Ceará e Sergipe. Em 2015, Sergipe teve uma área de 37.834 hectares plantados com a cultura de coqueiro, com uma produção de mais de 248.000 frutos, resultando assim, numa produtividade de 6,56 mil frutos/hectares neste ano<sup>45</sup>. Nos últimos anos, devido ao aumento do valor agregado dos derivados do coqueiro, expandiram-se as áreas de produção de coco no país, provocando, por conseguinte, deslocamento do cultivo para outras áreas não muito tradicionais e em plantios comerciais tecnificados, principalmente na região Nordeste, bem como nos estados da região Sudeste do Brasil. Logo, esta expansão do cultivo, aliada ao monocultivo com a variedade anão verde, tem favorecido a incidência de novas doenças ou uma severidade daquelas que anteriormente não tinham importância econômica<sup>32</sup>.

### **3.3 – Desenvolvimento, crescimento, morfologia e fisiologia do coqueiro**

O coqueiro é uma palmácea, com estipe apresentando densidade de feixes vasculares relativamente uniforme e desenvolvimento de um sistema ar-espaco intercelular limitado. De todas as partes do coqueiro, o estipe é o que menos tem recebido a atenção dos

pesquisadores, por não ser comercializado. Ele transporta alimentos para as raízes, folhas e espatas, além de suportar todo o peso da copa com suas folhas e frutos. O estipe de coqueiro não-ramificado, relativamente resistente e bem desenvolvido, compreende em seu ápice, um tufo com aproximadamente 25 a 30 folhas, que protege a sua única gema terminal, sendo a inflorescência sua única ramificação. As novas folhas são formadas na parte terminal do estipe, situando o seu único ponto de crescimento (meristema apical), conhecido popularmente como palmito. Sabe-se, portanto, que o coqueiro morre caso o meristema apical, de algum modo, for atingido<sup>46-49</sup>, o que corrobora sua importância. Como característica desta palmácea, com a ausência de raiz principal e contínuo crescimento da gema apical, o desenvolvimento da base do estipe é lento, possibilitando ao tronco uma alta rigidez, ereta, cilíndrica e sucessivas produções de folhas e inflorescências. A inflorescência, por sua vez, é ramificada dentro de um invólucro conhecido como espata, as quais são distribuídas e formadas entre as folhas<sup>46-48</sup>. Além disso, o coqueiro produz unidades de inflorescências axilares, em ordem acropetal na axila de cada unidade de uma folhagem. Desta forma, ao atingir a idade reprodutiva, mantém-se a capacidade de floração durante o ciclo de vida, com o crescimento e produção sincronizados<sup>50</sup>.

O interior do estipe, existe uma quantidade significativa de feixes vasculares responsáveis pela translocação de seivas (bruta e elaborada). O processo de translocação inicia-se pelas raízes, percorre todo o estipe e finaliza nas folhas, local onde ocorre o processo da fotossíntese, da transpiração (processo fisiológico) e da evaporação (processo físico) e, conseqüente, perda de água. Os feixes vasculares no centro do tronco são mais espaçados do que aqueles em direção à periferia. Como característica das monocotiledôneas, cada feixe vascular contém o xilema e o floema. O xilema é responsável pelo transporte de água e sais minerais (seiva bruta) e o floema responde pelo transporte dos fotoassimilados contendo compostos orgânicos, como os açúcares (seiva elaborada), por exemplo<sup>51</sup>. A formação dos primeiros feixes, para Menon e Paidalai<sup>47</sup>, surge a partir da área do meristema apical. Normalmente, aparecem de três a nove feixes jovens, distribuindo-se para as folhas em forma de V, tomando por base a direção do centro da

bainha fibrosa. Outra característica importante do estipe é o parênquima (tecido de preenchimento) localizado próximo ao xilema e ao floema que, mesmo estando velho, não tem o perímetro de sua espessura alterado. Às vezes, é comum dois feixes, por estarem tão próximos, unirem-se em um único pacote de feixes.

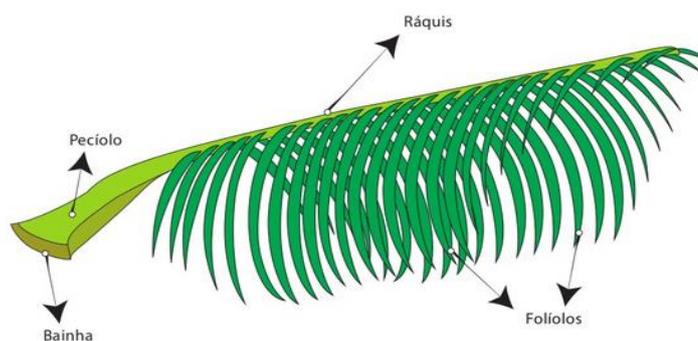
A Figura 2 apresenta o perfil com corte horizontal do estipe do coqueiro.



**Figura 2** – Perfil do estipe com corte horizontal. As figuras (A) e (B) mostram que a parte extrema possui mais feixes que o centro.

**Fonte:** Acervo pessoal da autora

As folhas do coqueiro são formadas no meristema apical do estipe da planta. São do tipo penada, constituída por um pecíolo ou ráque central que chega a atingir seis metros de comprimento da sua extremidade à bainha que é a porção mais larga que se prende ao estipe e por 200 a 300 folíolos de 90 a 130 cm de comprimento que se prendem à ráque. As folhas são arranjadas na coroa em espiral, para a esquerda ou para a direita, possui espessura cuticular embainhadas na base, firmemente presa ao estipe. Anualmente, a emissão foliar das plantas adultas pode variar de 12 folhas no coqueiro gigante até 18 folhas no coqueiro anão. Essas folhas permanecem vivas entre três e três anos e meio<sup>47</sup>. Evidentemente, sob condições ambientais desfavoráveis, como uma estiagem prolongada, por exemplo, pode haver uma diminuição na velocidade do número de folhas nessas variedades<sup>47,48</sup>. A Figura 3 apresenta a estrutura foliar do coqueiro.

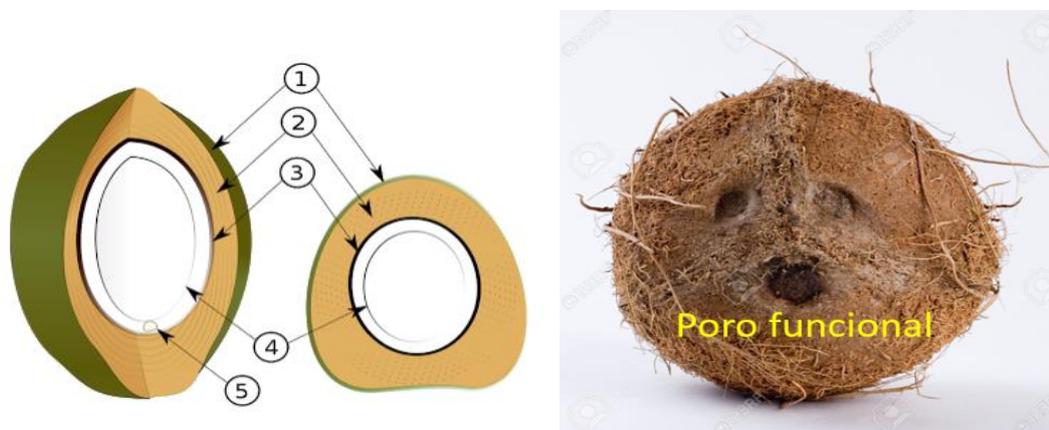


**Figura 3** – Estrutura foliar do coqueiro  
**Fonte:** Oliveira, 2015<sup>51</sup>.

A copa das folhas é a fonte de assimilação de carbono para o coqueiro, cujo tamanho permanece mais ou menos inalterada até seu 10<sup>o</sup> ano<sup>46</sup>. A atividade fotossintética é estimulada com o intercâmbio gasoso com o ambiente e a transpiração ocorrido através dos estômatos, localizados na face inferior dos folíolos do coqueiro. Por sua vez, os estômatos abertos possibilitam uma melhor transpiração, maior absorção de água e sais minerais, além de permitir uma significativa melhora na entrada de gás carbônico. Por isso, o coqueiro é uma planta altamente exigente com relação à luminosidade e ventos, elementos essencialmente estimulantes na transpiração<sup>47</sup>.

O coco é um fruto, cujo formato é ovoide ou elíptico, que possui uma estratégia de proteção ecofisiológica da espécie, pois em sua parte interna é formada a água-de-coco e a amêndoa para nutrir o embrião durante a germinação da semente<sup>5</sup>. O fruto do coqueiro é considerado botanicamente como uma drupa (fruto carnoso com apenas uma semente), apesar de que se desenvolve por intermédio de um ovário tricarpelar com três óvulos, sendo estes, originalmente, dois dos quais se degeneram, e, não obstante apenas um deles é fecundado e se evolui, empurrando e comprimindo os outros dois lóculos para o lado. A composição do fruto consiste basicamente em: a) camada mais externa conhecida como exocarpo, b) casca fibrosa, o mesocarpo, c) casca marrom resistente, o endocarpo<sup>52,53</sup>. O poro funcional que aloca o embrião é estreito. O tegumento interno (casca que protege a semente), por seu turno, contém células taníferas que são incorporadas ao endosperma. Assim sendo, após a fecundação, a semente é nutrida por um único feixe, que se ramificará

em vários outros feixes no ovário irrigando a semente. Posteriormente, a cavidade ou saco embrionário se enche de endosperma líquido, nutre o embrião e aumenta em volume à medida que o fruto cresce. O tamanho máximo, portanto, é atingindo cerca de seis meses após a fecundação, momento este em que cessa a formação de água-de-coco. Logo, nesta fase, o núcleo (endosperma sólido) começa a se formar na extremidade oposta da haste e gradualmente, se estende ao redor à volta do interior. Inicialmente, o albúmen sólido é fino e gelatinoso e, posteriormente, torna-se mais espesso e sólido. Após, o desenvolvimento celular, o endosperma se espalha com a deposição intracelular de material gorduroso, ou conhecido óleo-de-coco<sup>54-56</sup>. A Figura 4 apresenta a composição do fruto.



**Figura 4** – Fruto do coco. A - (1) exocarpo ou epicarpo; (2) mesocarpo; (3) endocarpo; (4) endosperma; (5) embrião; B – Três poros do fruto, destacando-o o poro funcional.

**Fonte adaptada:** <http://e-rastrillo.blogspot.com.br/2012/08/aceite-de-coco-una-maravilla-de-la.html><sup>57</sup>

Ao colher um fruto de coqueiro e retirar todo seu exocarpo, é possível perceber com nitidez três nervuras e três poros. Dois destes poros são ligados e apenas um deles, caracterizado por ter um diâmetro maior em relação aos outros dois é ativo, sendo este o único funcional que permite o desenvolvimento e crescimento do embrião<sup>57</sup>. O pericarpo (parede de um ovário maduro) mostra a subdivisão conhecida em um exocarpo (parte externa ou epiderme dos frutos) de uma única camada lisa com paredes radiais cutinizadas grossas, e, um mesocarpo parenquimático densamente penetrado e embalado por feixes vasculares dispersos, além de, um endocarpo esclerenquimático, lignificada e duro que protege a semente única, juntamente com o seu endosperma. Ainda, o pericarpo de frutos de palmeiras é altamente diferenciado e, muitas vezes, exhibe uma estrutura lenhosa, com

base na formação abundante de esclerênquima, quer sob a forma de fibras ou esclereides<sup>54</sup>. Na parede interna do endocarpo encontram-se feixes vasculares ramificados, responsáveis pela condução da seiva elaborada, através do pedúnculo, que alimentam o albúmen e mantêm a umidade durante a germinação da semente<sup>53</sup>.

O endosperma é composto por albúmen: (a) líquido, a água-de-coco e (b) sólido, a polpa-de-coco, que surge à medida que o fruto amadurece. Ambos são tecidos que compõem a parte do endosperma do tipo nuclear, nos quais os embriões se desenvolvem com a estrutura de pós-fertilização. Por causa da notoriedade que o endosperma é tecido, justifica-se a quantidade de fitormônios descobertos no fruto. As auxinas e as citocininas, portanto, são os grupos majoritários de fitormônios responsáveis por importantes funções como as divisões de células, formação de clorofila, estimulação para diferenciação dos tecidos da planta, efeitos de antienvhecimento em plantas e, também utilizados como fatores promotores de crescimento na cultura de tecidos de plantas<sup>58-61</sup>. A água-de-coco começa a se acumular no fruto 30 dias após a fecundação e atinge um volume máximo aos 180 dias<sup>62</sup>.

A estrutura do coco é tão robusta e elaborada, que além de amortecer a queda do fruto e ter resistência à água, o fruto pode ter flutuabilidade por até 4 meses em água salgada e ainda germinar em terra seca<sup>58</sup>. O fruto do coqueiro atinge a maturidade completa quando atinge uma idade de 11 a 12 meses. A menos que seja colhido precocemente para o consumo de água-de-coco, por exemplo, o fruto completa seu ciclo natural, amadurece e eventualmente, cai da árvore. Por causa de sua casca dura, o coco totalmente maduro não quebra facilmente, e mesmo caindo de grandes alturas, o conteúdo do fruto permanece protegido. Ao cair do pé, o coco seco, como é conhecido, é um fruto de coloração marrom com aspecto de fruto morto, e pode permanecer debaixo da árvore por meses até que um broto verde empurra seu caminho para fora, iniciando-se, então, uma nova vida<sup>27</sup>. Deste modo, para um manejo agrônomico de coqueiros eficaz e, como também, para uma relativa garantia de alta produtividade ininterrupta de frutas, as palmáceas precisam ser fertilizadas de forma adequada e regularmente. Nesse sentido, o declínio da produção de frutos começa

com a idade de cerca de 50 anos, para a variedade gigante ou cerca de 35 anos para o coqueiro anão. Outrossim, o desenvolvimento e desempenho da copa são influenciados por fatores como variedade, idade e distância de plantio, condições de luz/sombra, bem como, precipitação, disponibilidade de umidade, textura do solo e composição genética do coqueiro<sup>46</sup>. Após a formação e o amadurecimento do fruto, em condições ideais de cultivo, inicia-se o processo germinativo, originando-se uma nova planta e formação da muda<sup>58</sup>.

A Figura 5 apresenta duas fotos ilustrativas da estrutura do fruto maduro e germinado e da formação do embrião, através do poro de germinação ou ativo.



**Figura 5** – Fotos ilustrativas da estrutura e germinação do coco. A) embrião com formato cilíndrico; B) albúmen sólido; C) endocarpo; D) embrião germinado saindo do exocarpo e E) perfil do embrião através do poro de germinação.

**Fontes adaptadas:** HODGE, W.H., 1956<sup>63</sup>; ARMSTRONG, W. P., 2000<sup>64</sup>; KATZER, G., 2011<sup>65</sup>.

Quando o estipe surge, ainda no fruto, ele incha em uma massa carnuda, denominada "pró-estipe", a partir do qual, as folhas e raízes principais fazem o seu aparecimento. Inicialmente, o estipe cresce com um formato de cone invertido e amplia-se à medida que cresce para cima. Assim, a atividade meristemática da ponta de crescimento da muda aumenta com a idade, de modo que, mais células e feixes vasculares são produzidos resultando em uma haste mais espessa como a plântula (embrião vegetal já desenvolvido, mas ainda ligado à semente) em desenvolvimento. Quando o estipe atinge o estágio completo de seu crescimento, uma haste de perímetro bastante uniforme é formada e o mesmo se torna visível<sup>46</sup>. A Figura 6 apresenta um fruto germinado, sendo nítida a formação do estipe, das primeiras folhas e a formação da raiz, a partir da germinação do embrião.



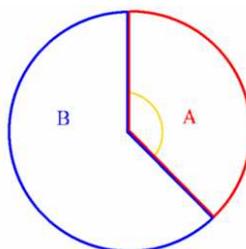
**Figura 6** – Fruto germinado sem o exocarpo para melhorar a visualização das raízes e a muda de coqueiro.  
**Fonte:** Acervo pessoal da autora

### 3.4 – Sequência de Fibonacci-filotaxia em plantas

A sequência de Fibonacci é um *design* natural, fácil de reconhecer devido à simetria, com consequências naturais, criado a partir de um padrão de espirais. É possível ver os espirais frequentemente, como no furacão, no DNA, no sistema solar, nas pétalas de girassol ou na concha de caracol. Não obstante, nas plantas, a filotaxia é o arranjo das folhas em torno do estipe. Em suma, Fibonacci-filotaxia representa um fenômeno matemático que confere a expansão de uma planta por meio de seus espaçamentos adequados, referentes ao posicionamento das novas folhas. Isto significa que esta distribuição visa a estabilidade de forma ótima para o melhor acesso à luz solar<sup>66</sup>. Basicamente, existem dois tipos de filotaxia predominantes no reino vegetal: (i) padrão cruzado, onde um par de folhas de lados opostos do caule em cada nível e seus pares sucessivos estão em ângulos retos, (ii) padrão espiral, que corresponde uma única folha em cada nível do caule e sucessivas folhas formam um ângulo constante, chamada de genética espiral<sup>67,68</sup>.

A percepção de simetria em plantas é essencial para explorar um conceito matemático. As observações de espaços regulares em folhas em um frequente arranjo espiral descrevem sofisticadas e específicas propriedades de espaçamento, observado e relatada por Fibonacci e Leonardo da Vinci. Schimper introduziu o conceito de ângulos entre folhas consecutivas em um espiral e seu ciclo de folhas como divergência, o conceito do número de voltas ao redor do estipe dividido pelo número de intervalos entre as folhas em seu ciclo,

expresso como uma fração em uma volta, ou seja, o ângulo entre as folhas numeradas consecutivamente é constante para planta. O numerador e o denominador desta fração confirmaram a sequência de Fibonacci. Em 1837, os irmãos Bravais questionaram este conceito de divergência, propondo um “ângulo ideal”, que seria  $(360^\circ)/((golden\ section)^2) \equiv (360^\circ)/((\sqrt{5} + 1) / 2)^2 \approx 137,5^\circ$ , também é conhecido como ângulo de ouro, pois se C é a área de todo círculo,  $A/B=B/C$ <sup>69,70</sup>. A Figura 7 mostra esse ângulo.



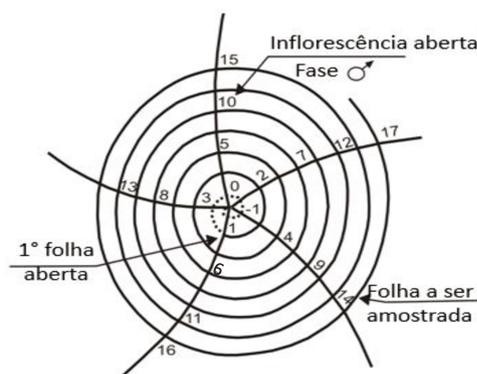
**Figura 7** – Demonstração do “ângulo de ouro” com  $137,5^\circ$ .  
**Fonte:** (Rehmeier, 2007)<sup>68</sup>

Atualmente, não existe uma teoria que explique a universalidade dos variados recursos de formação de padrões de plantas e filotaxias, pois são difíceis de provar experimentalmente. O que existem são modelos matemáticos baseados em observações que reproduzem esses padrões de espirais. Muitas dúvidas ainda cercam os pesquisadores e o princípio Fibonacci-filotaxia persiste sem respostas comprobatórias. Considera-se que, esse padrão de encurvatura, visto nas configurações de deformações na superfície das plantas, pode ser uma estratégia de minimização de energia de uma concha comprimida sobre uma base elástica em tríades quase periódicas<sup>69,71</sup>.

### 3.4.1 – Sequência de Fibonacci no coqueiro

A família *Aracaceae* são um grupo de palmáceas com diferentes formas, cores e tamanhos de folhas e inflorescências e em sua grande maioria os espirais de folhas e flores são claramente discerníveis e, nesta lista, está o coqueiro. As publicações com referência a sequência de Fibonacci em coqueiros foram extensivamente estudadas e publicadas pelo grupo do professor indiano T. A. Davis, associado à vários colaboradores<sup>45,72,73</sup>.

O coqueiro baseia-se num arranjo de cinco espirais de folhas na coroa e estabelece uma relação com a sequência de Fibonacci. No ápice da coroa, saem as folhas primordiais ao longo de um espiral exponencial e o seu crescimento é quase cônico. Assim, folhas sucessivas saem em intervalos uniformes e fixos, sem sobressair uma sobre a outra. Cada folha é colocada em uma deflexão angular de  $137,5^\circ$  da folha precedente. Esses espirais podem girar no sentido horário em uma planta e anti-horário em outra, projetado sobre um plano, resultando em um padrão de espirais<sup>47,72-80</sup>. As folhas do ápice são determinadas pela posição das folhas mais velhas. A Figura 8 apresenta uma projeção do perfil de Fibonacci-filotaxia do coqueiro com uma numeração das folhas e a formação de cinco espirais. Já a Figura 9 apresenta o perfil do estipe mostrando a direção dos espirais foliares no coqueiro.



**Figura 8** - Perfil da filotaxia do coqueiro com vista do topo

**Fonte adaptada:** Sobral *et al.*,<sup>80</sup>



**Figura 9** – A não-herança da direção de espirais foliares do coqueiro.

**Fonte:** Davis *et al.*,<sup>45</sup>.

Davis & Davis em 1987<sup>78</sup> concluíram em um estudo hipotético que as disposições das folhagens alternadas no coqueiro não eram herdadas ou determinada geneticamente. Em dados coletados em 42 lugares ao redor do mundo e de 70.000 coqueiros, notou-se que

a proporção de espirais horário e anti-horário em coqueiros mostrava diferenças hemisféricas. Por exemplo, os coqueiros com folhagens no sentido horário (canhoto) estão na maioria no hemisfério sul e os coqueiros anti-horário (destro) estão em maior proporção no hemisfério norte. Este estudo ainda revelou que o quociente de inclinação está melhor correlacionado com a latitude magnética do que a latitude geomagnética ou geográfica. Minorsky & Bronstein, em 2006<sup>79</sup> se opuseram a esta ideia e afirmaram que a hipótese de latitudes geomagnéticas não deve ser descartada, mas ser considerado um fator que tem uma grande influência nas variações espaço-temporais em coqueiros. Como é impossível provar por experimentos naturais essas variações geomagnéticas, existem várias hipóteses físicas e químicas que influenciariam as reações bioquímicas do coqueiro, tais como: (1) pulsações de potenciais elétricos das plantas induzidas por variações magnéticas da Terra gera oscilações no potencial elétrico; (2) tempestades e correntes magnéticas; (3) polarização, difusão e migração eletroforéticas de proteínas de auxinas dentro da membrana da célula; (3) solos salinos; (4) bactérias magnetotáticas e vários animais como insetos e aves migratórias. Mais uma vez, as dúvidas e incertezas sobre Fibonacci-filotaxia permanecem e nenhuma conclusão foi possível ser evidenciada para o coqueiro, intrigando os pesquisadores que buscam uma resposta convincente para este fenômeno natural.

Em suma, a sequência de Fibonacci em coqueiros mostra a estratégia das folhas desta palmácea quanto ao ângulo formado e ao crescimento em espiral em torno do estipe, fazendo com que estas folhas não se sobreponham. Desta forma, as folhas expõem melhor superfície para atividade fotossintética, conseqüentemente, maior exposição solar, bombeamento/sucção dos sais minerais dissolvidos no solo, equilibrando a translocação e transpiração de seivas, uma vez que o coqueiro necessita de muita energia para sobreviver, gerando todo o ciclo de translocação de nutrientes do coqueiro<sup>45,47,48</sup>.

A transpiração é o movimento da água a partir do solo, que aciona o fluido pelos tecidos vasculares por um mecanismo de absorção por capilaridade, descrita pela teoria coesão-tensão. Isto significa que a perda de água por evaporação reduz a pressão da água no interior da folha em relação à pressão atmosférica. Essa pressão reduzida puxa a água

para fora do solo, depois para o xilema com o intuito de manter a hidratação da planta<sup>48</sup>. Nos estômatos das folhas, a seiva/água é evaporada, como tal característica é criada uma sucção que puxa o xilema para cima, no sentido acrópeto. Assim, as folhas funcionam como bombas de sucção em ascensão das seivas e sua força motriz é a energia solar<sup>81</sup>. Além disso, a transpiração das plantas é um processo invisível, porque a evaporação da água é realizada na superfície das folhas. O volume de água, as taxas de transpiração e o fluxo de seivas variam geograficamente e ao longo do tempo, dependendo de alguns fatores que os estimulem, como: temperatura, umidade relativa, alterações de pressão de vapor, vento e movimento do vento. Além disso, as plantas adaptam a minimização de transpiração e, ainda perdem água para a atmosfera durante a troca gasosa necessária para a fotossíntese. Ademais, o coqueiro é bastante exigente em luz suficiente para realizar fotossíntese, com alta demanda nas taxas de transpiração, implicando no cultivo em áreas chuvosas e/ou com abstração de águas subterrâneas, bem como, as variações espaço-temporais (evapotranspiração) alteram de acordo com a idade e estrutura da planta<sup>82-84</sup>.

Como a translocação está diretamente ligada a transpiração, só haverá translocação de água e sais minerais pelo xilema e açúcares pelo floema na planta, com a transpiração foliar. As raízes do coqueiro geram gradientes de pressão negativa, no entanto, a quantidade de água transportada é somente uma pequena fração desta demanda resultante da evapotranspiração oriundas das folhas<sup>74</sup>. É possível modelar o fluxo de seiva nas árvores envolvendo as variações do diâmetro do estipe, além do armazenamento de água no estipe nos tecidos, impulsionados pela transpiração foliar e pelo crescimento celular irreversível. Estes estudos de modelagem permitem melhor compreensão do estado-da-arte e dos parâmetros do ciclo hídrico em plantas como o coqueiro<sup>51</sup>. As atividades de translocação-transpiração envolvem um equilíbrio complexo no balanceamento de potenciais químicos entre as fases internas e externas ( $\mu_{\text{água,solo}} = \mu_{\text{água,raiz}}$  e  $\mu_{\text{água,folha}} = \mu_{\text{água,ar}}$ )<sup>83</sup>. Assim, conhecer os principais processos fisiológicos, anatômicos e morfológicos da planta permite aprimorar o cultivo da espécie, direcionando às boas práticas da cocoicultura no que tange a

produção/produtividade, principalmente de frutos. A Figura 10 faz uma referência esquemática ao equilíbrio entre a transpiração e a translocação.



**Figura 10** – Foto representando o equilíbrio entre a translocação e transpiração.

**Fonte:** Acervo pessoal da autora

### 3.5 – Traçadores

Traçadores são substâncias capazes de marcar/traçar/esclarecer informações extrínsecas de processos estudados, refletindo o comportamento de um sistema. São utilizados em estudos para o conhecimento do mapeamento quantitativo e/ou qualitativo, direção, comportamento e o monitoramento em várias áreas de pesquisa como subsídios de informações em processos biológicos, industriais e ambientais<sup>85,86</sup>, como: (a) radioisótopos<sup>87</sup>, (b) agrotóxicos marcados<sup>88,89</sup>; (c) substâncias fluorescentes, (d) corantes de alimentos<sup>90</sup>, (e) compostos químicos<sup>91-93</sup>; (f) compostos biológicos<sup>94-95</sup>, (g) compostos ativáveis<sup>96</sup>. Por isso, os traçadores devem apresentar características como: ser bastante solúvel e ter boa dispersão; não reagir com a água ou alterar suas propriedades físicas e químicas; não se dissociar em água; ser estável, não sofrendo degradação física, química ou biológica; não interagir com a matriz (ser livre dos fenômenos de adsorção, absorção e troca iônica); poder ser utilizado em baixas concentrações por questões de toxicidade, custo

e transporte; ser de fácil detecção e mensuração a baixas concentrações, de forma quantitativa por qualquer método<sup>97</sup>.

Corantes de alimentos empregados como traçadores, como o azul brilhante FCF, foram utilizados em: (a) aplicação de chorume no solo e estudo sobre percurso de fluxo contaminado para investigação dos padrões de infiltração<sup>98</sup>; (b) estudos no Canadá com informações qualitativas utilizando águas rasas com a ausência de sistemas de injeção/deposição<sup>99,100</sup>; (c) estudos para investigação do fluxo de água através do solo<sup>101</sup>; e (d) avaliação qualitativa e quantitativa, com o uso de substâncias traçadoras nos estudos de deposição em pulverização<sup>102</sup>.

Grande parte dos trabalhos que utiliza traçadores externos faz avaliações quantitativas usando técnicas analíticas, como: espectrofluorímetro, plasma indutivamente acoplado ao espectrômetro de massas – (ICP-MS), do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*, cromatografia à gás acoplada ao espectrômetro de massas – (GC-MS), do inglês, *gas chromatography coupled mass spectrometry*, cromatografia eletrocinética micelar - (MEKC), do inglês, *micellar electrokinetic chromatography* e cromatografia líquida de alta eficiência – (HPLC), do inglês, *high performance liquid chromatography*. Contudo, os traçadores também podem ser utilizados em abordagens qualitativas quando há a necessidade de informações sobre o procedimento envolvido<sup>87</sup>.

Traçadores fluorescentes como Rodamina B foram usados, como: 1) traçador de calda em estudos de avaliação de bicos de pulverização de agrotóxicos na cultura do algodão<sup>103</sup>; 2) desenvolvimento de método rápido e de baixo custo para avaliar a eficiência de deposição durante a pulverização de agrotóxico na cultura do milho<sup>104</sup>; 3) determinação de resíduos agrotóxicos organofosforados em amostras de vários vegetais<sup>105</sup>; 4) método qualitativo que detecta a presença de lipase extracelular produzida por microrganismo lipolítico<sup>106</sup>; 5) estudos ambientais na avaliação do transporte de colóides em meio porosos, na contaminação de águas subterrâneas e solo, e em estudos de rochas costeiras e erosões<sup>87</sup>.

### 3.6 – Translocação de agrotóxicos em plantas

As plantas terrestres enfrentam o desafio e a necessidade de adquirir e reter água, por isso, em resposta às pressões ambientais, as plantas desenvolveram raízes e folhas. As raízes são responsáveis por ancorar a planta e absorver água e nutrientes, enquanto que as folhas absorvem a luz e as taxas de gases. O xilema transporta a água e os minerais do sistema radicular às partes aéreas da planta, enquanto que, no caso do floema cabe ao tecido translocar os produtos da fotossíntese das folhas maduras redistribuindo água e outros compostos em todo o corpo da planta. Assim sendo, uma forma de avaliar as velocidades do transporte do xilema e floema, relacionadas com a taxa de difusão é a utilização de traçadores<sup>104</sup>.

Nos últimos anos, com a perspectiva de ferramentas alternativas, e devido à necessidade de compreensão dos mecanismos de ação de substâncias dentro da planta, realizaram-se alguns estudos sobre a translocação de agrotóxicos, adotados no controle químico em diferentes partes das plantas (raízes, folhas e/ou caule) em diferentes culturas, tais como: milho<sup>107</sup>; cevada<sup>108</sup>; soja<sup>109</sup>; mucuna<sup>110</sup>; planta oleaginosa (*Leptospermum scoparium*)<sup>111</sup>; batata, tomate e uva<sup>112</sup>; feijão<sup>113</sup>, soja<sup>114</sup>, gramado para golfe<sup>115</sup>; alface espinhoso<sup>116</sup>; videiras<sup>117</sup>; algodão<sup>118</sup>; aleloquímico (*leptospermone*) em plantas<sup>119</sup>; coqueiro<sup>38</sup>; espécies de plantas de zonas úmidas<sup>120</sup>; plantas aquáticas<sup>121</sup>; amarantus de altura (*Amaranthus tuberculatus*)<sup>122</sup>; café (*Coffea arabica*)<sup>123</sup> e plantas variadas<sup>124</sup>.

Nestas pesquisas, as motivações destes estudos foram a translocação de agrotóxicos, devido a isso, foram investigadas em diferentes abordagens com aspectos de absorção, metabolismo e debromação utilizando agrotóxicos radiomarcados ou traçadores nas plantas. Esses estudos compreenderam contextos, tais como: a) resistência de patógenos; b) resistência no tempo de ativação, persistências no efeito e proteção; c) tipos de bicos de pulverizadores; d) tamanho e queda da gota pulverizada; e) pulverização com interações sinérgicas; f) adição na mistura de um ou mais agrotóxicos à calda de pulverização; g) formação de brotos adventícia; h) quantias adicionais de água; i) aumento da concentração de princípio ativo; j) clareamento de plantas tratadas e redução de crescimento; l)

intensidade de luz; m) absorção, acumulação, translocação acropetal (para cima, xilemática) ou basipetal (para baixo, floemática); n) fitorremediação; o) estimativa de meia-vida de agrotóxicos.

Nos processos que envolvem os equilíbrios dentro da planta, o metabolismo é transportado pelas membranas e pelo sistema vascular, seguindo os princípios de leis físico-químicas que regem as transformações químicas e energéticas. No entanto, no que diz respeito ao transporte de produtos químicos, como os agrotóxicos, por exemplo, as plantas desenvolveram um sistema peculiar em seu metabolismo. Com isso, desperta na sociedade científica um interesse pelo estudo de métodos sobre absorção de agrotóxico e seu destino dentro das plantas, pois são assuntos de interesses de natureza econômica e ecológica. A permeabilidade de produtos químicos pelas membranas e o desenvolvimento de métodos que os identifiquem e quantifiquem são necessários para indicar as concentrações e degradações desses compostos. É um desafio obter informação sobre a translocação de agrotóxicos, informação de suma importância para indicar o acesso que é desencadeado dentro da planta; se a concentração aplicada atinge o alvo, seja ele uma praga e/ou doença; ou se a concentração aplicada contamina o fruto. Logo, questionamentos, como: quais são os íons responsáveis pelo transporte de agrotóxicos dentro do simplasto, do vacúolo, do floema e xilema? Quais são as constantes de balanço de massas envolvidas no processo de translocação? Estes questionamentos podem ser respondidos através de muitos estudos que ainda não foram compreendidos<sup>125</sup>.

O que se tem em estudos sobre translocação de agrotóxicos são resultados baseados em observações visuais, ou análises biológicas, como a seleção do tecido das palmáceas doentes para a detecção da infecção na primeira fase de desenvolvimento da doença. Estes estudos terão implicações importantes na adoção de estratégias de manejo contra doenças na cocoicultura, relacionadas à mortalidade de pragas ou retrocesso da doença<sup>126-130</sup>. Adicionalmente, estudos têm sido direcionados embasando-se em modelagens matemáticas que permitem estimar o comportamento do agrotóxico dentro da planta<sup>131</sup>.

Em monocotiledôneas, os vasos condutores de seiva estão localizados dentro dos feixes vasculares. À medida que envelhecem e ficam mais alta, as palmas não adicionam outros vasos no sistema vascular. Portanto, a natureza dos vasos pré-definidos associada ao funcionamento hidráulico e mecânico de diferentes células proporcionam ao coqueiro, um sistema hidráulico simples. Deste modo, sua arquitetura hidráulica é mais pré-determinada do que as das dicotiledôneas, e por isso, torna-se altamente eficiente<sup>132</sup>.

Em tratamento de coqueiros utilizando agrotóxicos, a translocação sugere cálculos do balanço de massas, através do transporte do xilema (tronco, folhas e casca do fruto) e pelo floema [palma, espátula, albúmen sólido e fluído (água-de-coco)]<sup>133</sup>. A introdução e movimento de agrotóxicos dependem da vasculatura da planta, o que, possivelmente, leva a variar o tamanho, o padrão e a distribuição dos vasos. Nas angiospermas, como o coqueiro, os vasos estão associados às taxas de fluxo relativamente altas para mover a água. Anatomicamente, as árvores são sistemas conectados e suas raízes absorvem a água e solutos (ou seja, minerais na forma dissolvida) através da rizosfera (raiz-solo). O movimento hidráulico para cima, em direção ao vértice, é transportado pelo xilema, dependente de transpiração dos estômatos e impulsionado pela umidade perdida (evaporação) a partir da superfície da folha para a atmosfera<sup>134</sup>.

Embora o movimento de seiva bruta no caule seja acropetal (para cima), existe uma variação considerável no caminho de circulação de água entre as espécies. A ascensão de água nas árvores segue dois padrões básicos que são o espiral e o de subidas verticais. Produtos químicos sistêmicos que se movem para cima dependem do trajeto de suas subidas, sendo que a distribuição de água mais completa é por subida em espiral, que ocorre em um número de espécies, incluindo o xilema das coníferas, como nos coqueiros<sup>134</sup>. O padrão de melhor absorção/captação de água é provavelmente produzido pela manhã e no final da tarde quando a tensão (transpiração) cai, com o equilíbrio de turgescência restaurado, com menores temperaturas e iluminação solar<sup>73</sup>, evitando a perda de muita água ou a desidratação da planta.

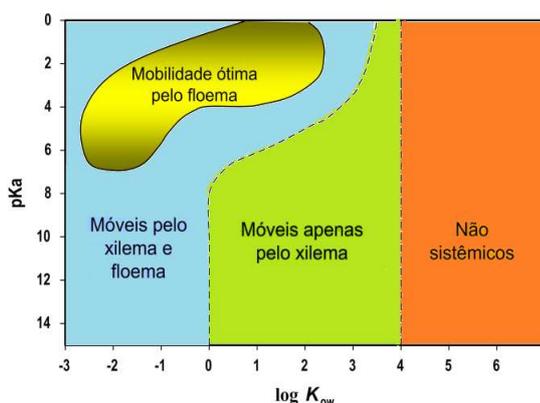
Não obstante, a translocação ascendente dos agrotóxicos depende das propriedades físico-químicas que governam o comportamento dos agrotóxicos, assim como são dependentes também do volume de seiva das árvores. Os estudos sobre translocação exigem conhecimento de duas propriedades principais dos agrotóxicos, como: A) coeficiente de dissociação de ácida ( $pK_a$ ), uma vez que certos agrotóxicos estão sensivelmente ionizados em valores de pH encontrados nas plantas, e isso dificulta a interpretação e previsão do seu comportamento. B)  $\log K_{ow}$ , que avalia a hidrofobicidade do agrotóxico. Quanto maior os valores de  $K_{ow}$ , maior é a lipofilicidade e, conseqüentemente, maior a afinidade de uma molécula dentro de um ambiente lipofílico ou por solventes apolares. Um composto orgânico com afinidade pelo octanol é um indicativo do grau de lipofilicidade (afinidade à gordura), como também é indicativo de extensão à sorção e do potencial de bioacumulação em organismos pela cadeia alimentar<sup>135-138</sup>.

No xilema, a translocação é realizada das raízes para a parte aérea e a predominância de substâncias hidrofílicas move-se com o fluxo de água e sais minerais dissolvidos. A afinidade de qualquer substância é expressada pela solubilidade em água, diferença da pressão hidrostática e direção do menor potencial de água, a partir da sucção de água pelo parênquima foliar causado pela transpiração, podendo ocorrer a translocação de agrotóxicos via xilema. Agrotóxicos polares, translocados via xilema, pelo movimento transpiratório são favorecidos pela alta temperatura, irradiação solar, baixa umidade e potencial de água no solo estabelecendo um gradiente de concentração entre a parte externa da raiz e a parte interna da planta<sup>139</sup>.

Já no floema, importante para a atividade de muitos agrotóxicos, predominam substâncias com caráter lipofílico e o deslocamento dependerá da afinidade química por um dos sistemas de transporte. Por isso, no floema, o comportamento de sua distribuição num sistema bifásico líquido-líquido é estimado pelo  $K_{ow}$ . O  $pK_a$ , a partir de um determinado pH, indicará a dissociação do agrotóxico, como exemplo, os ácidos fracos. Dependendo do  $pK_a$  do grupo ionizável, haverá um equilíbrio entre a forma ionizada (mais solúvel em água) e a forma protonada (mais lipossolúvel), em cada lado da membrana. Na parte externa das

células, predomina a parte aquosa, que tem um pH mais baixo que no lado interno, onde a forma protonada é mais abundante. Esta diferença de pH é criada pela ação da bomba de íons de  $H^+$ /ATPase<sup>140</sup>.

A Figura 11 apresenta a relação entre o coeficiente de dissociação ácida ( $pK_a$ ), o coeficiente de partição octan-1-ol/água ( $K_{ow}$ ) e a mobilidade do floema e xilema. Relaciona também as propriedades físico-químicas exigidas para os compostos ácidos fracos e não ionizados com aqueles que apresentam o comportamento sistêmico.



**Figura 11** - Relação entre o coeficiente de dissociação ácida ( $pK_a$ ), coeficiente de partição octan-1-ol/água ( $K_{ow}$ ) e a mobilidade do floema e xilema. Propriedades físico-químicas requisitadas de compostos ácidos fracos e não ionizados em vários tipos de comportamento sistêmicos.

**Fontes adaptadas:** Bromilow *et al.*, (1990)<sup>141</sup> e Collins *et al.*, (2006)<sup>50</sup>.

Os agrotóxicos não ionizados apresentam um  $\log K_{ow} > 4$ , e são sistêmicos em plantas, com ótima absorção pelas raízes. Logo, as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos desempenham um papel importante na translocação de produtos associado à absorção, a lipofilicidade e a força de dissociação do ácido<sup>137,138</sup>. Adicionalmente, para Oliveira Júnior *et al.*<sup>139</sup>, o equilíbrio entre a ionização e a lipofilicidade corrobora para maior mobilidade e translocação pelos vasos condutores de seiva. Os agrotóxicos com maior facilidade para penetração na membrana celular são compostos não ionizáveis, apresentando  $\log K_{ow}$  de 0 a 3, e movem-se principalmente pelo xilema. Compostos com maior lipofilicidade não são translocados devido à forte partição sofrida no tecido vegetal. Já os agrotóxicos com maior capacidade de translocar pelo floema são, normalmente, os ácidos fracos que se movimentam pelo xilema. De maneira complementar, segundo Chamberlain *et al.*<sup>108</sup>, a faixa

de agrotóxicos não ionizáveis é mais estendida para os valores de  $\log K_{ow} > 5$  que não são translocados. Ainda, a absorção e translocação são processos de equilíbrio mantidos com o tempo. Assim, o pH da solução de agrotóxicos, bem como o pH da seiva, exercem influência na absorção e transporte para as partes aéreas das plantas.

Levando-se em consideração a polaridade ( $\log K_{ow}$ ) e a ionização ( $pK_a$ ) dos agrotóxicos, o equilíbrio entre a translocação pelo floema e xilema determina o padrão de distribuição dos agrotóxicos. As variações específicas da translocação de agrotóxicos podem ser atribuídas às diferentes espécies e/ou variedades de plantas, assim como aos fatores relacionados às diferenças no metabolismo, na anatomia, na fisiologia da planta e nas propriedades físico-químicas dos agrotóxicos. Por estas razões, os padrões de translocação variam quando são aplicados no solo, caule e folhas<sup>139</sup>.

Sicbaldi *et al.*<sup>138</sup> avaliaram a absorção pelas raízes da soja e translocação via xilema de alguns agrotóxicos com diferentes empregos como, fungicidas, herbicidas e inseticidas, tais como o carbendazim. Para isso foi empregada a técnica de pressão de câmara que é utilizada para estudar as propriedades hidráulicas e osmóticas de sistemas radiculares. Assim, frações de xilema e floema foram coletadas e quantificadas por HPLC. A eficiência da translocação foi assegurada pelo fator de concentração de fluxo de transpiração (TSCF), calculada pela relação não linear entre TSCF e o  $\log K_{ow}$ . Os resultados mostraram que as translocações de agrotóxicos na soja foram obtidas por compostos que apresentavam lipofilicidade intermediária e que diferentes agrotóxicos estavam em diferentes extensões na planta.

Em outro estudo mais recente sobre a absorção e translocação de organofosforados e outros contaminantes emergentes, encontraram-se compostos polares e semipolares de alimentos em culturas de forragens oriundas de águas residuais e lamas de depuração em solos agrícolas. O inseticida estudado foi o N,N-dietil-meta-toluamida (DEET) em pH 5,5. O estudo foi avaliado utilizando-se as técnicas de extração QuEChERS acetato e técnica de análise GC-MS. O resultado mostrou a bioconcentração do inseticida em raízes e folhas de cevada, no pasto e na cenoura. Esse estudo mostrou a carência de conhecimento das

propriedades químicas das plantas, os mecanismos de absorção e a análise da composição química das mesmas, avaliando os riscos de exposição de compostos nocivos que podem ser transferidos diretamente para o ciclo da cadeia alimentar. Essa informação se torna importante, pois assim, é possível evitar o cultivo de certas culturas em áreas contaminadas<sup>140</sup>.

### **3.7 – Os avanços e as novas tecnologias na aplicação de agrotóxicos**

A utilização de agrotóxicos na atividade agrícola tem preocupado os pesquisadores de várias áreas. Embora a aplicação desses produtos possa trazer benefícios, como o aumento da produção/produktividade, por exemplo, há também o risco de impacto negativo ao meio ambiente, inclusive o de originar produtos de transformação mais nocivos do que o produto original. Apesar da grande quantidade de dados sobre a degradação dos agrotóxicos, é difícil prever a extensão e as vias de degradação. Assim, manifestam-se questionamentos importantes, como: Quais os métodos estão disponíveis para avaliar e prever a degradação dos agrotóxicos na natureza? Existem estratégias disponíveis para identificar a transformação dos agrotóxicos, seja no desaparecimento do composto original e/ou, a detecção de produtos de transformações no ambiente? Atualmente, as técnicas disponíveis são limitadas e aplicáveis à uma escala ínfima do universo. Técnicas cromatográficas associadas à espectrometria de massas (GC-MS e LC-MS/MS) não distinguem, no aspecto de previsão, processos de transformação com relação à metabolização dos agrotóxicos como a diluição e a sorção combinada com o rigoroso balanço de massas do sistema ambiental. Contudo, graças aos avanços em espectrometria de massas, quadros mais completos dos produtos de transformações surgirão nos próximos anos. Em contrapartida, será possível confrontar a sociedade sobre os efeitos à forma de saúde humana e ao ambiente em relação a aplicação desordenada e irresponsável de agrotóxicos. Ao passo que, alguns consideram os LMR aceitáveis e sem risco à saúde, outros pesquisadores os consideram como um desvio fundamental ao princípio de cuidado e precaução<sup>137</sup>. O que foi compreendido é que os produtos químicos acumulados nas plantas podem ser

metabolizados e reduzidos em sua concentração nos tecidos da planta. Entretanto, o conhecimento dos processos e das taxas metabólicas são específicos para determinados produtos químicos, bem como, para algumas espécies de plantas<sup>50</sup>.

Nas duas últimas décadas, o emprego de agrotóxicos em grande escala buscou a redução de pragas e o controle de doenças em coqueiro e os esforços para erradicar ou minimizar os danos na agricultura têm sido dispendiosos. Entretanto, os agricultores continuam a sofrer com as perdas na produção/produktividade. Sendo assim, centros de pesquisas em coqueiro têm direcionado os estudos na identificação de variedades resistentes, bem como, em agentes de controles biológicos<sup>8</sup>. Paralelamente, técnicas de aplicação de agrotóxicos estão sendo estudadas com o intuito de substituir a pulverização, tais como: os métodos endoterápicos (injeção e infusão de tronco), “pasta de tronco” e armadilhas para insetos<sup>142</sup>. Os métodos de pulverizações são caros e com as desvantagens de não atingir o alvo, incluindo o desvio para locais não desejados, o que não ameniza as perdas de produção/produktividade dos agricultores, além da potencialidade de causar resistências em pragas e doenças<sup>143</sup>.

As estratégias com diferentes tecnologias de aplicações endoterápicas têm crescido muito nos últimos anos e foram descritas pela primeira vez por Leonardo Da Vinci no século XV, aplicando-se uma dose de injeção de arsênio através de furos realizados com uma broca em troncos de macieiras, obtendo-se resultados de translocação. Hoje, os métodos endoterápicos, são ferramentas alternativas de aplicação não destrutiva de produtos químicos com definidas vantagens: (1) utilização de produtos químicos sem a contaminação do agricultor, (2) redução do potencial de exposição ambiental, e (3) útil quando as aplicações de solo e foliares são ineficazes ou de difícil aplicação (árvores altas). A injeção em árvore é usada quando correm o risco de ataque de pragas destrutivas ou persistentes<sup>134</sup>.

9.

Os métodos endoterápicos conhecidos como injeção sistêmica ou xilemática podem ser divididos ao fornecer ou não uma pressão externa ao sistema de aplicação de agrotóxicos, diferenciando os métodos de infusão e injeção do tronco, respectivamente. Esta

também é a condição que pode limitar a dinâmica para que o agrotóxico atinja o alvo. Já existem equipamentos comerciais com tecnologias capazes de infundir ou injetar agrotóxicos, como: *Bite Infusion* (Vitzani str, Itália), *TREE I.V. micro-infusion system*, *Air/Hydraulic micro-injector* (Arborjet, Inc. Woburn, EUA) e *Eco-ject® Microinjection System* (Bioforest Technologies, Canadá), *ArboCap®* e *ArboProf®* (Tecnoverd, S.L. Espanha). Muitos estudos são realizados para aperfeiçoar técnicas já existentes. Atualmente, estas tecnologias têm sido utilizadas, com sucesso, em espécies como maçã, pera, cereja, abacate, dendezeiro, uva e na arboricultura. A capacidade das árvores de absorverem os agrotóxicos através do sistema vascular depende das espécies, da pressão externa exercida, do clima (verão, e dias de sol), assim como, do conhecimento da espécie e da técnica instrumental empregada. Todavia, o fator limitante destes métodos são os tamanhos dos furos ou buracos obtidos na perfuração para a aplicação dos agrotóxicos que não podem ser alargados, pois podem surtir efeitos secundários referentes à cicatrização, infecções parasitárias e exsudação de seivas<sup>9,143,144</sup>.

Para aplicação de agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas, utilizando os métodos endoterápicos como sistema de controle em plantas, é necessário compreender: (i) o método de aplicação, (ii) a química aplicada, e (iii) o estado das árvores, além do conhecimento de uma série de variáveis intrínsecas e extrínsecas, tais como as espécies de árvores, saúde da árvore e o método de tratamento. Estes incluem a idade da planta, as condições do solo (textura, estrutura, umidade, pH, minerais e drenagem), e a exposição (sol, sombra)<sup>134,9</sup>. Alguns estudos que utilizaram os métodos endoterápicos basearam-se em: (a) aplicação de inseticidas<sup>134</sup>; (b) método de injeção para o coqueiro<sup>145</sup>; (c) injeção do herbicida metano-arseniato ácido monossódico (MSMA) em coqueiros com resinosidade<sup>146</sup>; (d) injeção de inseticidas no estipe de dendezeiros<sup>147</sup>; (e) injeção de inseticidas em plantas<sup>148</sup>; (f) método de injeção utilizando o equipo de soro para introdução de agrotóxicos em palmeiras<sup>149</sup>.

### 3.7.1 – Estudos de aplicação endoterápica em palmáceas

A expansão das técnicas de injeção veio com o surgimento dos primeiros agrotóxicos sistêmicos em meados da década de 1970 e, aliados a isso, veio a preocupação com as consequências das lesões causadas com a introdução da furadeira. O fato é que as plantas não cicatrizam ou regeneram os tecidos lesionados, ainda no caso das palmáceas não é formado calos e nem reconstituição dos tecidos. Assim, é criada uma barreira estreita de vedação, isolando a área saudável da área injuriada. A vedação é a melhor forma de prevenir a introdução de microorganismos, assegurando e protegendo essas áreas lesionadas. O tecido das palmáceas são diferentes das demais árvores e, quando os tecidos celulares são feridos há o surgimento de necrose e ressecamento da ferida junto as células vizinhas, além da produção significativa de fenóis através de células do parênquima e, às vezes, de suberina e tiloses, produzindo a impermeabilização da zona de vasos por gomas. Por isso, lesões profundas e extensas que poderiam ser mortais para árvores, não têm consequências graves para as palmáceas, pois não impedem a continuação do crescimento da planta, desde que não lesione o meristema. Em suma, as palmas não selam as feridas, mas são muito menos frágeis que as árvores. Desta forma, a preocupação prevalente com relação a endoterapia é sobre a sua eficiência e custo. O método endoterápico deve ser aplicado o mais baixo possível no tronco para permitir que o agrotóxico transloque acropetalmente no estipe pelo xilema e basipetalmente pelo floema<sup>85</sup>.

Ferry & Gomez (2013)<sup>85</sup> afirmaram que o método da endoterapia é de longe o mais interessante por sua eficiência e inocuidade, e ao observarem as perfurações anos após o tratamento verificaram que não houve nenhuma consequência nas árvores. Além de manter a sua estabilidade mecânica, quando bem aplicada, esta técnica apresenta grande potencial. Contudo, nenhuma técnica, por si só, se não for aplicada dentro de uma estratégia de erradicação integrada, será eficaz. Em 40 anos de prática, para algumas palmáceas, a injeção já é uma prática padrão com eficácia para fins preventivos e curativos, além disso, nenhum artigo menciona problemas causados ao utilizar o tratamento endoterápico de injeção. Por isso, ao defender o método endoterápico de injeção como uma opção real e

como componente em programas de erradicação foram realizadas as seguintes observações: (i) Os orifícios ocasionados pela injeção afetam um número muito pequeno de feixes vasculares, mostrando que a palmácea pode suportar maiores lesões. (ii) A aplicação em uma área infestada só pode ser efetuada se o custo e a frequência forem baixos o suficiente, se for de fácil aplicação e apresentar uma elevada eficácia durante um longo período de tempo. Evidentemente, que não devem ser empregados agrotóxicos de curta duração, bem como, este método não deve ser um tratamento rotineiro que tenha que ser repetido frequentemente, até porque um orifício não pode ser reutilizado, porque o ferimento no qual o produto é injetado selará rapidamente. (iii) A utilização de técnicas de injeção tem a vantagem de reduzir, de forma significativa, os riscos ambientais e de saúde, em comparação com os tratamentos de pulverização. A aplicabilidade desta prática só terá sucesso com o conhecimento anatômico da planta. (iv) Em palmeiras para produção de frutos é necessário garantir e estar atento ao calendário do tratamento e/ou escolhendo o agrotóxico em que o resíduo não estará presente no fruto na época da colheita. Os poucos resultados disponíveis em diversas palmeiras demonstraram a ausência de resíduos ou seus produtos de degradação. (v) Existe um preconceito com este método de aplicação, devido aos ferimentos causados nas plantas, a natureza da solução injetada e a adição de adjuvante como os ácidos, principalmente na França, onde a prática ainda é proibida. Contudo, as formulações e os métodos de injeção evoluíram e muitos pesquisadores têm se rendido a esta prática. Entretanto, os resultados obtidos com os inseticidas não são muito conclusivos e mais estudos são necessários, considerando o agrotóxico injetado, o método da injeção e o tempo de injeção antes da colheita. (vi) Os estudos avaliando as eficiências desta prática foram: (1) Análise de folhas de palmeira para avaliar o teor de resíduos de inseticida. (2) A observação da mortalidade larval por dissecação das palmeiras tratadas. (3) Comparação do estado de saúde entre palmeiras tratados e não tratadas, em parcelas de terreno.

Alguns estudos sobre a aplicação de agrotóxicos utilizando o método endoterápico de injeção no estipe do coqueiro foram publicados utilizando os seguintes princípios ativos:

monocrotofós<sup>150-153</sup>, dimetoato, fosfamidom, formotiom, monocrotofós e demetona-metil<sup>150</sup>, MSMA<sup>147</sup>, tiabendazol<sup>154</sup>, fosfito<sup>155</sup>. As abordagens foram diversificadas como: (a) aplicação de agrotóxicos com e sem diluição, (b) resultados analisados por observações que provaram ser mais eficazes contra pragas e menos prejudicial do que a pulverização, (c) dosagens que combateram as pragas, (d) dosagens que provocaram a mortandade das folhas, (e) avaliação de resíduos no fruto utilizando métodos de extrações complexos, sem validação e sem especificação das condições do método utilizadas no cromatógrafo, (f) bioensaios, (g) método utilizando cromatografia de íons.

A injeção de agrotóxicos em coqueiros não é uma técnica nova e está sendo explorada desde a década de 1970 com diferentes abordagens. O que se nota é a ausência de métodos analíticos eficientes e reprodutíveis capazes de detectar/quantificar a translocação seja no estipe, folhas e/ou frutos. Atualmente, existe um mercado promissor investindo em tecnologias alternativas de aplicação endoterápica, que fogem dos métodos convencionais, como as furadeiras, por exemplo, prometendo minimizar o impacto da área de aplicação. Contudo, existe uma lacuna relacionada ao estudo de translocação acropetal ou efetividade de translocação em plantas coníferas como o coqueiro com resultados mais prolongados<sup>133</sup>.

### **3.7.2 – Adição de adjuvantes à calda de agrotóxicos para a aplicação em coqueiros**

Os adjuvantes são substâncias cuja composição atuam como agentes permeabilizantes ou penetrantes que, ao serem adicionadas à calda de pulverização ou injeção, têm como característica, aumentar absorção e translocação, melhorando a eficácia do princípio ativo na área aplicada. Esses agentes de permeabilização abrangem os agentes quelantes, materiais catiônicos ou aniônicos e materiais *zwiteriônicos*. As composições dos agrotóxicos e dos adjuvantes podem ser misturadas conforme a necessidade de tratamento da planta, para o uso eficaz pretendido<sup>156</sup>. Pesquisas relacionadas à absorção de agrotóxicos e aplicação de adjuvantes podem ser divididas em três distintos períodos, como: 1° - 1950 até meados de 1980 com testes de surfactantes, óleos e sais de amônio e umectantes. 2° - entre 1980 a 1990 com importantes descobertas nas estruturas dos

surfactantes quanto às propriedades físico-químicas dos ingredientes ativos, com a introdução e compreensão dos modos de ação dos surfactantes organossiliconados. 3° - 1990 até os dias atuais, com novas abordagens e descobertas que continuamente surgem neste campo de estudo. As dificuldades para compreensão dos mecanismos de ação dos surfactantes devem-se à duas razões: abordagem complexa que envolve diversos mecanismos, e (b) poucos pesquisadores com domínio em ciência de plantas com aplicação de agrotóxicos<sup>15</sup>. Existem vários métodos de adição de adjuvantes em caldas de pulverização ou injeção no coqueiro, que não estão descritos na literatura, mas encontram-se no dia-a-dia do campo e merecem ser destacados, como: (a) bio-óleos, especialmente óleos de origem vegetal das sementes, como o óleo da semente de algodão, (b) detergente neutro, (c) acidificação com ácido cítrico, (d) utilização de sais, como cloreto de potássio e cloreto de sódio e (e) alternativas híbridas, com a mistura de adjuvantes. O único adjuvante bastante relatado na literatura é um organossilicone, *Break-thru®* e será relatado.

Os surfactantes organossiliconados, quando adicionados à calda de agrotóxicos, têm efeito significativo na qualidade do *spray* e, subsequentemente, na retenção, absorção ou distribuição dos agrotóxicos nos organismos alvos. Como característica, têm o espalhamento homogêneo, melhorando o atrito, a degradação de agrotóxicos, não têm efeito fitotóxico, minimizando os níveis de resíduos e reduzindo o tempo de segurança. Os surfactantes organossiliconados tiveram um crescente aumento das formulações com a utilização em grande escala. Isso foi possível devido à melhor compreensão de suas propriedades e habilidades de incorporar às formulações. Novos derivados têm sido desenvolvidos aumentando a tolerância aos pH baixos e altos, podendo acrescentar a formulação com água ou óleo. Originalmente, os organossiliconados foram desenvolvidos para serem usados com capacidades de infiltração estomatal e superespalhante, mas eles podem melhorar a absorção cuticular e isso dependerá das interações do surfactante, bem como das condições ambientais. A absorção e distribuição envolve absorção estomatal bem como, a concentração do surfactante, volume do *spray* e estrutura do surfactante<sup>157</sup>.

### 3.8 – Determinação de agrotóxicos no coqueiro

Os agrotóxicos são compostos ativos e em concentrações recomendadas combatem as espécies-alvo. O emprego dos agrotóxicos inclui: inseticidas, fungicidas, rodenticidas, conservantes de madeira e herbicidas. É comum a exposição humana em níveis elevados de agrotóxicos desde a produção, nos ambientes profissionais (agricultores) até o consumo devido à presença desses resíduos nos alimentos. Essa exposição pode resultar efeitos preocupantes, como: doença de Parkinson, leucemia, linfomas e câncer no estômago, sarcomas de tecidos moles e do cérebro<sup>158,159</sup>.

Para o domínio e/ou controle da exposição dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos, a agência cujo programa estabelece os Limites Máximos de Resíduos (LMR) no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que é responsável pelo Programa Nacional de Monitoramento de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)<sup>160-161</sup>. Conforme o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) (2010), para que um defensivo seja utilizado pelo agricultor é necessário que seja registrado. É um rigoroso processo, envolvendo a aprovação pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), da Saúde (ANVISA) e do Meio Ambiente (IBAMA). Os LMR são valores exigidos para cada cultura levando em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA), em miligrama por quilograma ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), que corresponde à quantidade máxima que ingerida diariamente durante toda a vida pode não oferecer risco à saúde<sup>162</sup>.

Segundo Ramos (2012)<sup>163</sup>, Diretor do Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas – DIA/DAS do Sindicato Nacional dos Produtores de Coco do Brasil (SINDCOCO), os programas responsáveis por projetos agrícolas e órgãos de pesquisa brasileiros que trabalham com a cultura do coqueiro, afirmam que os agrotóxicos podem ser aplicados de forma racional e sob orientação técnica. Contudo, existe uma insuficiência de agrotóxicos registrados no MAPA para o combate de pragas na cocoicultura. No Brasil, as regiões produtoras de coco catalogaram pelo menos 20 espécies de insetos-pragas e mais de seis espécies de ácaros e vários fitopatógenos (fungos, fitoplasmas, nematoides, protozoários). Apenas dez agrotóxicos são registrados para a cocoicultura, sendo dois fungicidas (enxofre

e difenoconazol) para doenças foliares, seis inseticidas/acaricidas (abamectina, azadiractina, *bacillus thuringiensis*, carbossulfano, espiroclorfenol e fenpiroxinato) para as doenças foliares e ácaro de necrose e dois herbicidas (dicloreto de paraquate e glifosato) ambos aplicados pós-emergência em plantas infestantes. Ainda, o coqueiro se enquadra na cultura representativa do grupo dos frutos de casca não comestíveis, em que, o citrus é a cultura representativa ampliando os estudos para definição dos LMR. Devido à sua classificação como cultura representativa, o suporte fitossanitário é dificultado, além de diminuir a recomendação de outros agrotóxicos.

À medida que aumentaram a produção/produtividade, devido ao consumo e à valorização de produtos derivados do coqueiro, houve a necessidade do desenvolvimento de métodos de extração, de determinação de agrotóxicos para garantir a saúde dos consumidores e preservar o meio ambiente. É notório o crescente número de publicações com a utilização de diferentes tipos de técnicas de extração que vão desde os clássicos, como a extração líquido-líquido até os miniaturizados, como a microextração em única gota. Do mesmo modo, variaram os tipos de agrotóxicos entre os voláteis, semi-voláteis e não voláteis que direcionaram os tipos de técnicas cromatográficas empregadas com diferentes detectores.

A Tabela 1 apresenta a relação dos trabalhos desenvolvidos empregando diferentes técnicas de extração e instrumental na determinação de agrotóxicos em estipe, água e polpa de coco, levando em consideração os LMR que a legislação da União Europeia (EU) estabelece para o consumo de coco.

**Tabela 1.** Determinação de agrotóxicos no coqueiro (água-de-coco, albúmen sólido e estipe)

Técnica de Extração	Técnica Instrumental	Matriz	Fase Sólida/ Extração	Fase Sólida/ Separação	Agrotóxico	LMR <sup>13</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	Referência
MSPD <sup>1</sup>	HPLC-UV <sup>6</sup>	-	C18	Sílica gel esférica com C18	Captana	0,02	Brito <i>et al.</i> , (2002) <sup>164</sup>
					Clorotalonil	0,01	
					Carbendazim	0,1	
					Lufenurum	0,02	
					Diafentiurom	-	
LLE <sup>2</sup>	GC – TSD <sup>7</sup> GC-ECD <sup>8</sup>	Água-de-coco	-	ZB-1701 (14% cianopropil-fenil 86% dimetilpolisiloxano)  DB-5 (5% fenil 95% dimetilpolisiloxano)	Endossulfam	0,01	Ogawa <i>et al.</i> , (2006) <sup>165</sup>
					Captana	0,02	
					Tetradifona	0,02	
					Triclorfon	0,02	
					Malationa	0,02	
					Paratiom metílico	0,02	
					Monocrotofós	0,02	
					Carbofurano	0,02	
SPE <sup>3</sup>	HPLC-UV <sup>6</sup>	Água-de-coco	C18	C18	3-Hidroxicarbofurano	Expresso em carbofurano	Silva <i>et al.</i> , (2008) <sup>166</sup>
					Dimetoato	0,05	
MSPD <sup>1</sup>	GC-MS,SIM <sup>9</sup>	Polpa de coco (Albumen sólido)	C18 e Florisil <sup>®</sup> como coluna auxiliar	DB-5ms (5%fenil:95% polidimetilsiloxano)	Lufenurum	0,02	Santos <i>et al.</i> , (2012) <sup>167</sup>
					Carbofurano	0,02	
					3-Hidroxicarbofurano	Expresso em carbofurano	
					Tiabendazol	0,1	
					Difenoconazol	0,05	
MSPD <sup>1</sup>	HPLC-UV <sup>6</sup>	Água-de-coco liofilizada	C18	C18 com um grupo fenila	Triclorfom	0,02	Deme <i>et al.</i> , (2013) <sup>168</sup>
					Lufenurum	0,02	
					Bifentrina	0,05	
					Teflubenzurom	0,05	
					Acefato	0,02	
					Monocrotofós	0,02	
					Dimetoato	0,05	
					Malaoxom	-	
					Diclorvós	0,01	
					Malationa	0,02	
SPE <sup>3</sup>	LC-MS/MS <sup>10</sup>	Água-de-coco	Strata-X	Polimérica	Fentoato	-	Anjos e Andrade (2014) <sup>169</sup>
					Parationa etila	-	
					Clorfenvinfós	0,05	
					Quinalfós	0,05	
					Diazinom	0,02	
					Fosalona	0,02	
					Profenofós	0,02	
					Etiona	0,02	
					Clorpirifós	0,05	
					Carbofurano	0,02	
					Molinato	0,05	
					Sulfotep	-	
					Dimetoato	-	
Demeton-o	-						
SDME <sup>4</sup>	GC-MS <sup>11</sup>	Água-de-coco	-	Restek Rtx®-1MS	Diazinom	0,02	-
					Dissulfotom	0,02	
					Parationa metila	0,02	
					Fenitrotona	0,02	
					Malationa	0,02	
					Fentiona	0,02	
					Dursban	-	
					Parationa	0,05	
					Endosulfano	0,1	
					Etiona	0,02	
					Bifentrina	0,05	
					Permetrina i	Soma dos isômeros	
					Permetrina ii		
					Azoxistrobina	0,1	



**Tabela 2** – Tabela de agrotóxicos monitorados pelo ANVISA e EU e com os respectivos LMR estabelecidos para a cultura do coqueiro

Princípio Ativo	Limites máximos de resíduos (LMR) mg kg <sup>-1</sup>	
	ANVISA <sup>a</sup>	EU <sup>b</sup>
<b>3-Hidrocarbofurano</b>	-.a*	Expresso em carbofurano
<b>Carbendazim</b>	-	0,1 <sup>*b</sup>
<b>Carbofurano</b>	-.a*	0,02 <sup>*b</sup>
<b>Carbosulfano</b>	0,01	0,02 <sup>*b</sup>
<b>Ciproconazol</b>	-	0,05 <sup>*b</sup>
<b>Difenoconazol</b>	0,1	0,05 <sup>*b</sup>
<b>Espirodiclofeno</b>	0,05	0,05
<b>Imidacloprido</b>	-	0,05 <sup>*b</sup>
<b>Tiabendazol</b>	0,2	0,1 <sup>*b</sup>
<b>Tiametoxam</b>	-	0,05 <sup>*b</sup>
<b>Tiofanato-metílico</b>	-	0,2 <sup>*b</sup>

a – ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

a\* Os LMR referem-se à soma de carbofurano e de 3-hidroxi-carbofurano, e expressos como carbofurano.

OBS1: Para fins de monitoramento de resíduos, devem ser considerados os LMR estabelecidos nas monografias de carbendazim e tiofanato-metílico, cujos resíduos são expressos como carbendazim.

OBS2: para o cálculo do impacto na Ingestão Diária Aceitável (IDA) serão considerados os LMR estabelecidos para todas as culturas elencadas nas monografias dos ingredientes ativos Tiofanato-metílico e Carbendazim, bem como a IDA deste último.

b - *European Union* - União Europeia

b\* Limite inferior da determinação analítica.

Fonte: ANVISA e EU (2014)<sup>173</sup>.

É notório a diferença dos LMR entre a agência brasileira e a União Europeia que estabelecem os parâmetros de monitoramento dos agrotóxicos na cococultura. Para a maioria dos agrotóxicos, o Brasil ainda não estabeleceu os LMR. Desta forma, neste trabalho foram adotados os LMR da União Europeia para aqueles agrotóxicos que ainda não possuem LMR determinados pelas agências brasileiras responsáveis.

### 3.9 – Técnicas de extração e determinação de agrotóxicos

Dentre as técnicas cromatográficas, a cromatografia líquida é a mais empregada nas análises de plantas nas quais se deseja determinar analitos não voláteis. A LC-MS é uma ferramenta empregada na identificação dos compostos de interesse e fornece informações valiosas sobre a confirmação da presença dos resíduos de agrotóxicos nas partes estudadas do coqueiro e também na possível ocorrência de metabolização das moléculas<sup>174</sup>.

Dentre as técnicas de cromatografia líquida, a UHPLC apresenta algumas vantagens em relação ao sistema HPLC convencional, com o emprego de colunas cromatográficas de dimensões reduzidas e leitos cromatográficos constituídos de partículas  $\leq 2 \mu\text{m}$ , que

asseguram alta eficiência e análises rápidas devido a possibilidade de altas velocidades de fase móvel. Essas vantagens conduzem melhores resultados e estão associados à: (a) redução do volume de amostra utilizado; (b) aumento na detectabilidade e eficiência de separação, além do aumento na resolução; (c) possibilidade de um número maior de análise de amostras por unidade de tempo; d) diminuição do tempo de análise e; e) variedade de colunas e detectores comerciais<sup>174</sup>.

A UHPLC-MS/MS é uma técnica eficaz em termos de detectabilidade, seletividade e aquisição de dados para determinação rápida de analitos em baixas concentrações em matrizes complexas. As exigências para o desenvolvimento de método estão vinculadas ao aumento do número de amostras que necessitam de análise quantitativa rápida e ao decréscimo dos níveis de quantificação dos analitos e metabólitos. Isso tem sido possível graças ao desempenho das técnicas de LC e a detecção por espectrometria de massas sequencial (MS/MS), utilizando como ferramenta o monitoramento de reação selecionada (SRM)<sup>175</sup>.

O método QuEChERS é atualmente a técnica de extração mais utilizada para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, abrangendo a extração em uma única etapa de maneira simples, rápida, robusta e de baixo custo, e foi tornou-se o método oficial pela Norma Europeia EN 15662 para a determinação de resíduos de agrotóxicos em frutas e legumes. O método QuEChERS tem substituído outros métodos analíticos tradicionais que empregam grandes quantidades de solvente, reagentes, e que possuem tempo de análise e custo altos, pois permite alterações do procedimento original, dependendo da composição da matriz, propiciando análises com boas recuperações. Para algumas matrizes, as alterações no procedimento são necessárias, entretanto, a versão original também tem proporcionado excelentes resultados para muitos tipos de amostras<sup>176</sup>.

Desde o surgimento do método QuEChERS, que foi desenvolvido por Anastassiades *et al.* (2003), a técnica tem se inovado e evoluído no desenvolvimento de metodologias para análise de amostras complexas contendo diferentes analitos, em diversas aplicações analíticas, tais como: a) determinação de acrilamida<sup>177,178</sup>, b) análises clínicas<sup>179</sup>, c) resíduos

de drogas veterinárias<sup>180</sup>, d) qualidade dos alimentos<sup>181</sup>, e) teste de suplemento<sup>182</sup>, f) ambiental<sup>183</sup>.

Após a seleção das técnicas para extração e determinação de resíduos de agrotóxicos, várias etapas são necessárias para a obtenção dos resultados. A Tabela 3 apresenta um sumário dos estágios necessários que incluem etapas de amostragem, preparo de amostra e a determinação de resíduos de agrotóxicos.

**Tabela 3** - Sumário de etapas necessárias para análise de resíduos

Estágio	Etapas	Comentário
Amostragem	Coleta	Evitar a contaminação cruzada é tão importante como assegurar que uma amostra seja representativa de um dado.
	Armazenamento	Nenhuma alteração física ou química deve ocorrer na amostra durante o armazenamento.
Preparação de amostra	Extração	Todos os analitos <b>devem</b> ser extraídos.
	Concentração	Etapa necessária em amostras com baixas concentrações.
	Isolamento	Substâncias interferentes devem ser removidas.
Determinação	Identificação	A identificação dos resíduos deve ser determinada, sendo necessários os métodos cromatográficos associados aos métodos de espectrometria de massas.
	Quantificação	A quantidade ou a concentração das substâncias podem ser determinadas pelos métodos cromatográficos associado a espectrometria de massa.

Fonte adaptada: Stenersen<sup>184</sup>.

### 3.10 - Validação

Segundo a SANTE<sup>185</sup>, o conceito de validação e validação de método, respectivamente, são descritos abaixo:

“A validação é realizada após a conclusão do desenvolvimento de métodos, ou antes de um método que não tenha sido utilizada previamente para ser introduzido na análise de rotina. Podemos distinguir entre validação inicial de um método de análise quantitativa para ser aplicado no laboratório pela primeira vez, a extensão do dia e o escopo de um método validado existente por novos analitos e matrizes.”

“O processo de desempenho esperado de um método em termos do seu âmbito de aplicação é a especificidade, a sensibilidade, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade no laboratório. Algumas informações sobre todas as características, exceto dentro de reprodutibilidade do laboratório, deve ser estabelecido antes da análise de amostras, enquanto que os dados sobre a reprodutibilidade e extensões do escopo podem ser produzidos a partir do Controle de Qualidade Analítica (CQA), durante a análise das amostras. Sempre que possível, a avaliação da precisão deve envolver a análise de materiais de referência certificados, participação em ensaios de proficiência, ou outras comparações interlaboratoriais.”

Os parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos avaliados foram: linearidade (faixa linear) e curva analítica, limite de detecção e de quantificação, seletividade, efeito matriz, exatidão e precisão.

### 3.10.1 – Linearidade (faixa linear) e Curva analítica

A linearidade avalia a capacidade de um método analítico em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração, chamada de curva analítica. Na prática, a linearidade é determinada pelas curvas analíticas através de gráficos de calibração, mostrando a resposta do equipamento em função de diferentes concentrações do analito<sup>186,187</sup>.

Para as agências regulamentadoras, como a ANVISA, o coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,999 é considerado um ajuste ideal para a linha de regressão<sup>186</sup>. Já o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) são satisfatórios a partir de 0,99. Observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental pela variável dependente ( $y$ ) e a concentração do analito pela variável independente ( $x$ ), produzindo a equação de regressão linear, gerando os coeficientes de inclinação da curva ( $a$ ) e ( $b$ ) de interseção da curva com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ . A linearidade do método é representada na Equação 1<sup>160</sup>:

$$y = ax + b \quad \text{(Equação 1)}$$

que correspondem:

$y$  = área do pico (resposta avaliada);

$x$  = concentração;

$a$  = coeficiente angular = sensibilidade – inclinação da curva analítica;

$b$  = coeficiente linear = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ .

A faixa linear de um método é o intervalo entre níveis de concentração (faixa de concentração) do analito em que é possível determinar com precisão, linearidade e exatidão as condições do método analítico desenvolvido<sup>188</sup>.

### 3.10.2 – Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) constitui a menor concentração do analito que pode ser detectada. Já o limite de quantificação (LOQ) significa a menor concentração ou de massa do analito que pode ser quantificada e validada com uma precisão aceitável aplicando o

método. LOQ é o menor nível de fortificação do desempenho do método com veracidade e precisão<sup>185</sup>. Existem três métodos de calcular o LOD e LOQ: (1) relação sinal-ruído; (2) visual e (3) através dos parâmetros da curva analítica. Segundo a abordagem da EURACHEM, o LOQ pode ser definido como a quantidade de analito em que o desvio padrão relativo (RSD) e recuperações das análises atingem um nível pré-estabelecido<sup>189</sup>.

### 3.10.3 – Seletividade

A seletividade é a garantia do método analítico avaliar que o pico de resposta do analito em uma mistura complexa seja unicamente do composto de interesse, sem quaisquer interferências. Se essa etapa não for assegurada, todos os outros parâmetros serão afetados, como a exatidão, faixa linear e precisão<sup>187</sup>.

Ainda, pode ser definida como o critério de desempenho da capacidade de extração, da derivatização, da limpeza, do sistema de separação, em especial, de alguns detectores de discriminarem entre o analito e outros compostos. Os espectrômetros de massas de alta resolução como os MS e MS<sup>n</sup>, pode ser tanto altamente seletivo, como altamente específico<sup>185</sup>. Em MS/MS, a aquisição e o estudo dos espectros dos íons produtos e precursores de razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons selecionados, abrangem vários modos de operação, dentre eles o SRM que é frequentemente usado em análises de agrotóxicos. Assim, em SRM, o íon precursor é selecionado e, posteriormente, é fragmentado e os sinais de um ou mais produtos são medidos<sup>190</sup>.

### 3.10.4 – Efeito Matriz

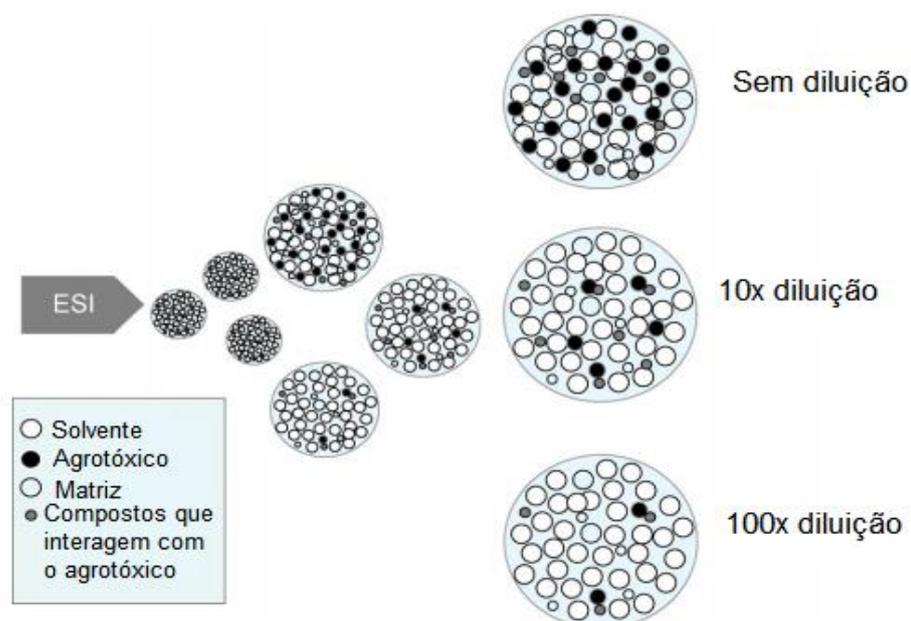
Nos últimos anos, o efeito matriz em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) tem se tornado uma das preocupações em análises. Isso é ocasionado devido ao fenômeno de supressão ou aumento de íons que podem conduzir a erros na quantificação dos analitos, bem como, podem afetar a capacidade de detecção, exatidão, precisão do método<sup>191</sup>.

O efeito matriz é o efeito combinando de todos os componentes da amostra, exceto o analito, na medição durante à quantificação podendo comprometer o resultado analítico com

o aumento ou diminuição da resposta detectada do analito no extrato da matriz em relação ao analito em solvente orgânico. Essas influências podem apresentar: (a) alteração da eficiência de ionização na presença de outros compostos; (b) distorção da forma do pico do analito através da interferência de um composto, que pode ser detectada por algum método quimiométrico; (c) dependendo das condições do equipamento pode variar com o tempo requerendo ser continuamente avaliado; (d) os picos cromatográficos podem ser simétricos ou alargados. Para contornar os erros associados com o aumento ou supressão induzida por efeitos matriz, tanto em GC como em LC, uma alternativa comum é a confecção da curva analítica adicionando soluções padrões na matriz<sup>192</sup>, denominada de curva analítica com sobreposição da matriz.

Em LC-MS/MS a ocorrência de efeitos induzidos pela matriz depende ou não dos compostos nos extratos que podem influenciar a quantidade de moléculas de analito ionizadas no caminho MS/MS. Desta forma, pode gerar uma competição entre o analito e um componente de coeluição com carga disponível. Na maior parte, resultam na supressão do sinal ou na liberação de íons a partir das gotículas do *electrospray* para a fase gasosa devido a influência de um componente da matriz. Em qualquer caso, as reações que são colocadas na fonte de íons, a coeluição do analito com o interferente da matriz é uma pré-condição<sup>193</sup>.

A Figura 12 ilustra uma simulação do comportamento das gotas na fonte de *electrospray*, em diferentes níveis de diluição, e a importância em LC-MS/MS da estratégia de diluição da amostra para minimizar os efeitos matriz, quando interferentes interagem com o agrotóxico.



**Figura 12 adaptada** - Simulação do comportamento das gotas na fonte de *eletrospray* em diferentes níveis de diluição. **Fonte:** Ferrer *et al.*,<sup>191</sup>.

Em alguns casos, na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras que apresentam problemas relacionados ao efeito matriz, a diluição reduz significativamente a supressão e/ou aumento de sinal. Contudo, muitas vezes é impossível diluir a amostra suficientemente ao ponto que todo o efeito matriz seja completamente solucionado, uma vez que a concentração do analito pode ficar abaixo do LOQ<sup>190</sup>. Em QuEChERS, as diferentes etapas de limpeza [partição entre acetonitrila e água, congelamento de gorduras, eliminação de ácidos por d-SPE com PSA (amina primária secundária)] não reduzem expressivamente a maioria dos efeitos de matriz observados. Assim, qualquer esforço para modificar a composição das condições de solvente de eluição dos compostos retidos, a fim de diminuir o efeito matriz não são apropriados para os métodos multirresíduos<sup>194,195</sup>. Por isso, as estratégias utilizadas nestes casos são empregar padrão interno ou a curva analítica feita na matriz<sup>190</sup>.

### 3.10.5 - Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância e a existência de erros sistemáticos entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de

referência. Podem ser avaliados pelos procedimentos: comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição padrão e materiais de referência<sup>187</sup>.

Devido à insuficiência de materiais de referência certificados, a exatidão é avaliada pelos métodos de recuperação. Porém, a deficiência que a exatidão apresenta é subestimar a adição do analito que nem sempre é encontrado na mesma forma que em uma amostra real, e isto pode causar análises otimistas de recuperação. Os valores aceitáveis de recuperação para análise em nível traço variam entre 60 a 140% com precisão de até  $\pm 20\%$ <sup>185</sup>.

### **3.10.6 – Precisão**

A precisão avalia a proximidade dos resultados, ou seja, se eles assemelharem entre si, através da reprodutibilidade das medidas, da repetibilidade e da precisão intermediária. Em validações de métodos é calculada a estimativa do desvio padrão relativo ( $s_r$ ), que é expressa em termos de coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD)<sup>190</sup>.

A repetitividade (precisão) é o grau de concordância entre sucessivas medições sob as mesmas condições de um método, como: observador, procedimento, local, instrumento, repetições. A precisão intermediária verifica sobre a mesma amostra ao utilizar o mesmo laboratório ao variar o método em alguma das condições, analistas, tempo, equipamentos referem-se aos mesmos resultados<sup>186, 188</sup>. Já a reprodutibilidade corresponde ao grau de concordância dos resultados de uma mesma amostra variando condições, como: operador, equipamentos, laboratórios (interlaboratorial). Dependendo da complexidade da amostra, os valores de desvio padrão relativo aceito são até 20%<sup>187</sup>.

## Capítulo 4

# MATERIAIS E MÉTODOS

As análises deste trabalho foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas e no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. Já a parte experimental de campo foi realizado no campo experimental da Embrapa – Tabuleiros Costeiros em Itaporanga-SE, Betume em Neópolis-SE e na Fazenda Sococo em Mojú-PA, todos em áreas experimentais de coqueiro híbrido PB-121.

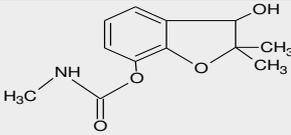
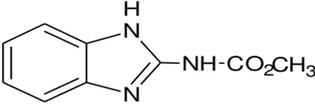
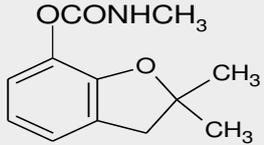
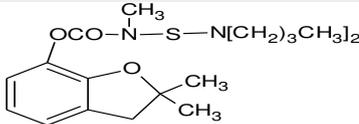
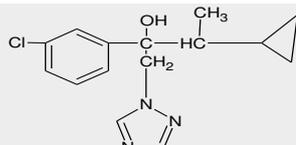
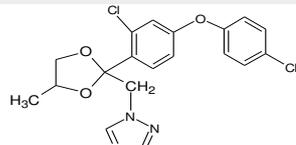
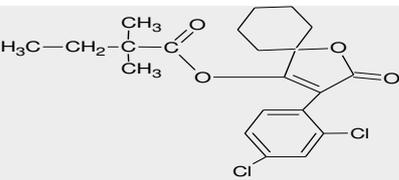
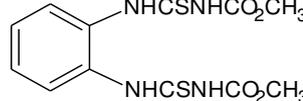
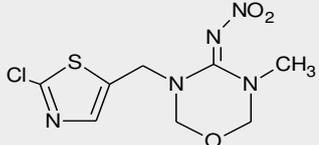
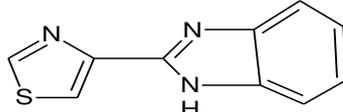
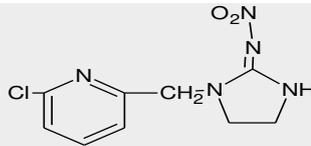
### 4.1– Padrões Analíticos, Reagentes Químicos e Materiais

- ✿ Acetonitrila e metanol, grau HPLC (Mallinckrodt – EUA);
- ✿ Ácido acético glacial, grau HPLC (J.T. Baker – EUA);
- ✿ Amina primária secundária (PSA) e octadecilsilano (C18) ambos com tamanho de partículas de 40 µm - Bondesil (Agilent Technologies – EUA);
- ✿ Acetato de amônio (Merck – Germany),
- ✿ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker – Japão);
- ✿ Acetato de sódio anidro (J.T. Baker – México);
- ✿ Padrões Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e Dr. Ehrenstorfer (Alemanha) (Tabela 4).
- ✿ Água ultrapura obtida por sistema de purificação e filtração Direct-Q UV3® de resistividade 18 Ω cm<sup>-1</sup> (Millipore – EUA);
- ✿ Cloreto de sódio (J.T. Baker – EUA);
- ✿ Gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✿ Trifenilfosfato e linuron d-6 (Dr. Ehrenstorfer – Alemanha);
- ✿ Equipo de soro macrogotas simples de pressão venosa central (Descarpack – Brasil);
- ✿ Frasco para alimentação enteral 300 mL (Compojet – Brasil);
- ✿ Seringa de 20 mL;
- ✿ Azul brilhante FCF (Duas rodas – Brasil);
- ✿ Rodamina B (Internacional cores – China);
- ✿ Silwet-77® (Momentive – EUA);
- ✿ *Break-thru*® (Evonik – EUA).
- ✿ Fita analisadora para determinação de pH (Hexis);

- \* Tubos de polipropileno de fundo cônico, com tampas de rosquear com capacidade de 50 e 15 mL;
- \* Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- \* Filtro de *nylon* para seringa (13 mm de diâmetro e 0,2 µm de porosidade);
- \* Machado;
- \* Escova de aço;
  - \* Agrotóxicos comerciais e suas respectivas concentrações do ingrediente ativo:
    - \* Desoral 500 SC - Carbendazim (50 % m/v) e ingrediente inertes (68 % m/v);
    - \* Auto 100 - Ciproconazol (10% m/v) e ingrediente inertes (102% m/v);
    - \* Carbofurano – Carborano
    - \* Provado 200 SC - Imidacloprido (20% m/v) e ingrediente inertes (90 % m/v);
    - \* Envidor - Espirodiclofeno 24% m/v e ingrediente inertes (84,1% m/v);
    - \* Cercobin - Tiofanato-metílico (50% m/v) e outros ingredientes (71% m/v);
    - \* Tecto SC - Tiabendazol (48,5 % m/v) e ingrediente inertes (51,5 % m/v);
    - \* Marshal 400 SC Carbosulfano 40,0% m/v e ingrediente inertes 64,3% m/v);
  - \* Engeo Pleno - Tiametoxan – (14,1% m/v) + lambda-cialotrina (10,6% m/v) e outros ingredientes (87% m/v);
  - \* Score - difenoconazol (25% m/v) e ingrediente inertes (75% m/v);
  - \* Connect - beta-ciflutrina (1,25% m/v) + imidacloprido (10% m/v) e (96,75% m/v) de ingrediente inertes.
- \* Agrotóxicos certificados utilizados neste trabalho: **3-hidrocarbofurano, carbendazim, carbofurano, carbosulfano, ciproconazol, difenoconazol, espirodiclofeno, imidacloprido, tiabendazol, tiametoxan e tiofanato-metílico**, todos adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) com purezas acima de 98,0%.

A Tabela 4 relaciona os agrotóxicos selecionados para este estudo apresentando a classificação de acordo com a massa molar, fórmula química, estrutura química e a pureza do padrão sólido.

**Tabela 4.** Características gerais dos agrotóxicos selecionados para este estudo

Agrotóxicos	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Fórmula Química	Estrutura Química	Pureza do padrão (%)
3-OH Carbofurano	237,25	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>		98,0
Carbendazim	191,21	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>		99,0
Carbofurano	221,26	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>		98,5
Carbossulfano	380,5	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S		99,4
Ciproconazol	291,78	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O		99,0
Difenoconazol	406,26	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		99,0
Espirodiclofeno	411,22	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		99,3
Tiofanato metílico	342,39	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>		99,0
Tiametoxan	291,71	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S		99,6
Tiabendazol	201,25	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S		99,8
Imidacloprido	255,66	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>		99,9

Fonte: IUPAC (2012)<sup>196</sup>.

## 4.2 – Seleção dos agrotóxicos

A escolha dos principais agrotóxicos utilizados no coqueiro e selecionados para este trabalho foi feita em concordância com os pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, selecionando os agrotóxicos, que segundo pesquisas internas eram os mais utilizados na cocoicultura.

A Tabela 5 apresenta os agrotóxicos abordados neste estudo e as suas respectivas modalidades de emprego, os intervalos de segurança, e o registro desses agrotóxicos para a cocoicultura, disponibilizado pelo MAPA através do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)<sup>197</sup>.

**Tabela 5 – Agrotóxicos abordados neste estudo e os registros no MAPA**

Agrotóxicos	Modalidade de emprego	Intervalo de segurança
3-OH-carbofurano <sup>1</sup>	-	-
Carbendazim	N.A. <sup>2</sup>	-
Carbofurano	N.A. <sup>2</sup>	-
Carbosulfano	Aplicação foliar	-
Ciproconazol	N.A. <sup>2</sup>	-
Difenoconazol	Aplicação foliar	(1) Intervalo de Segurança não determinado devido à modalidade de emprego. (2) LMR e Intervalo de Segurança não determinados devido à modalidade de emprego
Espirodiclofeno	Aplicação foliar	-
Imidacloprido	N.A. <sup>2</sup>	-
Tiabendazol	Aplicação foliar	(1) Intervalo de segurança não determinado devido à modalidade de emprego.
Tiametoxan	N.R. <sup>3</sup>	-
Tiofanato-metílico	N.A. <sup>2</sup>	-

1 – A soma de carbofurano e de 3-hidroxi-carbofurano, expressos como carbofurano, porém, este agrotóxico não está registrado para a cocoicultura.

2 – N.A.= Não é autorizado para a cocoicultura;

3 – N.R = Produto não registrado no AGROFIT.

Fonte: AGROFIT (2016)<sup>197</sup>.

As características gerais das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, de acordo com o emprego, grupo químico, metabólitos e substâncias relacionadas, a solubilidade em solvente orgânico, a constante de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) e o coeficiente de dissociação ácida ( $pK_a$ ) para a cultura do coqueiro são apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6.** Características e propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para este estudo

Agrotóxicos	Emprego	Grupo Químico	Metabólitos	Solubilidade em solvente orgânico 20°C (mg L <sup>-1</sup> )	*Kow	**pKa
3-OH-Carbofurano	-	-	-	-	1,45	-
Carbendazim	Fungicida	Benzimidazol	2-aminobenzimidazol	Etanol:300 Acetato de Etila:135	1,48	4,2
Carbofurano ( <i>Carbofuran</i> )	Inseticida, Nematicida, Acaricida, Cupinicida	Metilcarbamato de benzofuranila	3-hidroxicarbofurano, 3-cetocarbofurano e 2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol	Metanol:71700	1,8	Não dissocia
Carbosulfano ( <i>Carbosulfan</i> )	Acaricida, Inseticida, Nematicida	Metilcarbamato de benzofuranila	carbofurano, 3-cetocarbofurano e dibutilamina	Metanol:250000 Acetato de Etila: 250000	7,42	Não dissocia
Ciproconazol ( <i>Cyproconazole</i> )	Fungicida	Triazol	1,2,4-triazol e 1H-1,2,4-triazol-1-ácido ilacético	Metanol: 410000 Acetato de etila: 240000	3,09	Não dissocia
Difenoconazol ( <i>Difenoconazole</i> )	Fungicida	Triazol	1-[2-[2-cloro-4-(4-cloro-fenoxi)-fenil]-2-1H-[1,2,4]triazol-il]-etanol e 1,2,4-triazol	Acetona: 610000 Etanol:330000	4,36	1,07
Espirodiclofeno ( <i>Spirodiclofen</i> )	Acaricida, Inseticida	Cetoenol	3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-ona, 3-(2,4-diclorofenil)-3-hidroxi-1-oxaspiro[4.5]decano-2,4-diona, 3-(2,4-diclorofenil)-3,4-diidroxi-1-oxaspiro[4.5]decan-2-ona e ácido 2,4-diclorobenzóico	Diclorometano: 250000 Acetato de Etila: 250000	5,83	-
Tiofanato metílico ( <i>Thiophanate-methyl</i> )	Fungicida	Benzimidazol (precursor de)	Carbendazim e alofanato	Metanol: 7800 Acetato de Etila: 8400	1,45	7,28
Tiametoxam ( <i>Thiamethoxam</i> )	Inseticida	Neonicotinóide	Clotianidina	Acetato de Etila: 7000 Acetona: 48000	-0,13	Não dissocia
Tiabendazol ( <i>Thiabendazole</i> )	Fungicida	Benzimidazol	-	Metanol: 8230 Acetona: 2430	2,39	4,73 pKa (2) 12,00
Imidacloprido ( <i>Imidacloprid</i> )	Inseticida, Tratamento veterinário	Neonicotinóide	1-[(6-cloro-3-piridinil)metil]N-nitro-1H-imidazol-2-amina e ácido 6-cloronicotínico	Diclorometano: 67000 2-propano: 2300	0,57	Não dissocia

\*Log Kow: Logaritmo do coeficiente de partição octanol:água, pH 7 e 20°C (< 2,7 = Baixa bioacumulação; 2,7 – 3 = Moderada; > 3,0 = Alta)

\*\* pKa a 25°C

Fonte: IUPAC (2012)<sup>196</sup>; AGROFIT (2016)<sup>197</sup>.

### 4.3 – Equipamentos

- ✿ Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas sequencial UPLC-MS/MS Acquity - TQ Quattro Micro API (Waters, EUA);
- ✿ Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas sequencial UPLC-MS/MS Acquity – Xevo TQ-MS (Waters, Reino Unido);
- ✿ Sistema de aquisição de dados através do *software* Masslynx 4.1 (Waters, EUA).
- ✿ Coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm x 50 mm x 1,7 µm);
- ✿ Balança analítica (Sartorius, CP 225 – Alemanha);
- ✿ Balança analítica (AND, SV-200 – Japão);
- ✿ Banho de limpeza Ultrassom – (Q335D – Brasil);
- ✿ Ultrapurificador de Água para Sistemas (*Direct-Q 3* – França);
- ✿ Agitador de tubos tipo vórtex (*Biomixer QL-901* – Brasil);
- ✿ Centrífuga analítica (Rotofix 46 – Alemanha);
- ✿ Centrífuga refrigerada (Nova Técnica, NT 825 – Brasil);
- ✿ Centrífuga refrigerada (SOLAB, SL 703 – Brasil);
- ✿ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Eppendorf – Canadá);
- ✿ Processador *VariMix* (Targo – Espanha);
- ✿ Ultraturrax PT 3100 (Polytron – Suíça);
- ✿ Moinho Analítico IKA A 11 (BASIC – Inglaterra);
- ✿ Motosserra MS 250 (Stihl – EUA);
- ✿ Lupa estereoscópica binocular SMZ-445 (Nikon – Japão)
- ✿ Máquina fotográfica – Coolpix L810 – (Nikon, Japão)
- ✿ Equipamento de infusão (Bite Infusion, Itália)
- ✿ Confocal LSM 780-NLO Zeiss no microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha).

### 4.4 – Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque dos agrotóxicos foram preparadas individualmente na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>, corrigidas de acordo com a pureza dos padrões sólidos certificados pelo fabricante. Para solubilização do padrão, todas as soluções foram preparadas em acetonitrila, grau HPLC, com exceções do carbendazim que foi solubilizado em acetonitrila com 8% de HCl e do espiroclorofeno, que foi solubilizado em acetato de etila. A partir das soluções estoque individuais foi preparada uma mistura na concentração de 10,0

mg L<sup>-1</sup>. O padrão interno trifenilfosfato (TPP) e o padrão de controle linuron d-6 foram preparados na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>.

As soluções de padrões estoque, bem como as soluções diluídas, foram armazenadas em frasco âmbar e colocadas no *freezer* à temperatura de -4°C. As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução contendo todos os agrotóxicos na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.5 – Instrumentação de análise

As determinações de agrotóxicos foram realizadas em um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (UPLC) acoplado ao espectrômetro de massas sequencial, do tipo triploquadrupolo (QqQ), modelo TQ Quattro Micro API da Waters (Milford, MA, EUA) usando uma fonte de ionização por *electrospray*, operada no modo positivo (ESI+) e analisador de massas no modo de monitoramento seletivo de reações (SRM). O sistema de aquisição de dados foi através do *software* Masslynx versão 4.1 da Waters (Milford, MA, EUA). A separação dos agrotóxicos foi realizada em uma coluna cromatográfica analítica ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm x 50 mm x 1,7 µm de diâmetro de partícula).

##### Escolha da Fase Móvel

As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas do método proposto por Kolberg *et al.*,<sup>176</sup>. O volume de injeção foi de 10 µL e tempo de corrida cromatográfica de 10 minutos. A fase móvel foi composta por: Eluente **A**: Solução aquosa 98% de água e 2% metanol, contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio; Eluente **B**: Metanol com 0,1% de ácido fórmico e 5 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio. Foi empregada eluição por gradiente, linear – curve 6, com vazão de 0,225 mL min<sup>-1</sup>, e programação mostrada na Tabela 7.

**Tabela 7** - Gradiente linear da proporção de fase móvel:

Tempo (min)	% (A)	% (B)
Início	95	5
0,25	95	5
7,75	0	100
8,50	0	100
8,51	95	5
10,00	95	5

### Condições de Detecção do Sistema MS/MS

As condições empregadas para o espectrômetro de massas foram: (a) tempo de residência (*dwel time*): 0,01 s; (b) vazão do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>): 600 L h<sup>-1</sup>; (c) vazão de gás do cone: 200 L h<sup>-1</sup> e vazão de gás de dessolvatação: 1050 L h<sup>-1</sup> (ambos os gases foram o nitrogênio); (d) temperatura de dessolvatação: 450 °C; (e) voltagem do capilar: 2,0 kV; (f) vazão de gás no cone: 200 L h<sup>-1</sup>; (g) vazão gás colisão (argônio): 0,15 mL min<sup>-1</sup>; (h) temperatura da fonte: 140 °C; (i) tensão capilar: 3,5 kV, exaustor tensão: 3 V; (j) dissociação induzida por colisão (CID) foi realizada usando argônio a uma pressão de 4x10<sup>-3</sup> mbar.

#### **4.6 – Seleção da cultivar de coqueiro**

A cultivar selecionada para este projeto foi o híbrido PB (*Port Bouet*) 121 (Anão-amarelo da Malásia x Gigante Oeste Africano).

#### **4.7– Coleta e processamento das amostras**

As amostras utilizadas no processo de validação (estipe, água-de-coco e albúmen sólido) sem sintomas de pragas/doenças e isentas de agrotóxicos, foram usadas como matrizes no desenvolvimento dos métodos de extração dos agrotóxicos e também no estudo de traçadores. Estas amostras foram adquiridas no Campo Experimental de Itaporanga, Embrapa-Tabuleiros Costeiros, situado no município de Itaporanga d'Ajuda, SE. As amostras de estipe, albúmen sólido e água-de-coco usadas para o estudo de translocação foram obtidas numa área experimental da Fazenda Sococo situado em Mojú-Pará, cedidas exclusivamente para este estudo, uma vez que, a Sococo só emprega os agrotóxicos registrados/autorizados para a cocoicultura.

No estipe, foram coletadas amostras a partir de uma perfuração feita com o auxílio de uma furadeira automática. Após a abertura do estipe, o orifício foi vedado com alcatrão vegetal para não atrair pragas. Em seguida, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e refrigeradas imediatamente numa caixa térmica contendo gelo em gel, com o intuito de minimizar a oxidação do estipe. Para coletar a água-de-coco, realizou-se a

abertura de um orifício no fruto e o líquido foi recolhido em um béquer e transferido para frascos de polietileno. Já a coleta de albúmen sólido foi realizada com o auxílio de uma espátula e as amostras foram recolhidas em sacos plásticos estéreis. Para as análises de agrotóxicos em amostras comerciais, tanto na água-de-coco como no albúmen sólido, foram coletados três frutos de um mesmo cacho e realizada a homogeneização das amostras em béqueres. Após este tratamento, as amostras foram armazenadas no freezer, a uma temperatura de -17°C, interrompendo o processo de oxidação e descongeladas para o procedimento de extração.

#### **4.8 – Preparo de amostras e otimização das condições de extração para o estipe, albúmen sólido e água-de-coco**

O processamento das amostras que antecede a extração foi realizado de acordo com a necessidade de cada matriz: a) Estipe: foi realizado um tratamento em gelo seco, posteriormente, levado à temperatura de 45°C e triturado em moinho analítico; b) Albúmen sólido: foi realizado um tratamento em gelo seco e processado com auxílio de um liquidificador/processador; c) Água-de-coco: não foi necessário nenhum tipo de pré-tratamento. Para o estipe foi necessária uma etapa de pré tratamento da amostra (hidratação), com a adição de água formando uma lama (*slurry*) na proporção de 1:3 (estipe e água deionizada, m/m).

O método de preparação de amostra para a água-de-coco, o albúmen sólido e o estipe foram otimizados utilizando o método QuEChERS acetato modificado com alterações propostas por Prestes *et al.*<sup>198</sup>.

##### **4.8.1 – Amostras comerciais de fruto para análise do albúmen sólido e água-de-coco**

As amostras comerciais de água-de-coco e albúmen sólido para avaliar os métodos de extração e de determinação desenvolvidos foram adquiridas em 3 regiões do Brasil: região centro-oeste em Goianésia-Goiás, região Nordeste em Neópolis-Sergipe, ambas obtidas diretamente do produtor e na região Sudeste, Campinas-São Paulo compradas em um comércio local. As amostras foram analisadas em triplicata, totalizando 36 amostras de água-de-coco, avaliadas com intervalos de 2 dias e 30 dias após a injeção de agrotóxicos.

#### **4.9 – Validação do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Coqueiro (Estipe, Albúmen sólido e Água-de-coco)**

A validação do método analítico para a determinação de resíduos de agrotóxicos na água-de-coco foi realizada de acordo com a SANTE nº12571/2013<sup>185</sup>. Para isto, foram avaliados as figuras de mérito analítico como curva analítica e faixa linear, seletividade, efeito matriz, limites de quantificação e detecção, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação).

##### **4.9.1 - Curva analítica e faixa linear**

As curvas analíticas foram obtidas a partir das soluções padrão em solvente e no extrato da matriz, em triplicada. Foram obtidos oito pontos na curva que corresponderam às concentrações 2,5; 5,0; 25,0; 30,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 250,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a água-de-coco e albúmen sólido e 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o estipe. Deste modo, em todas as matrizes, ao final das extrações, as soluções foram diluídas na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura para a injeção no sistema cromatográfico, resultando em concentrações finais de: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Por fim, o fator de diluição do estipe foi de 20 vezes, enquanto que o fator de diluição da água-de-coco e albúmen sólido foi de 5 vezes. Esses fatores foram considerados nos cálculos das concentrações.

A faixa linear e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foram obtidos através do *software* do equipamento MassLynx v. 4.1.

##### **4.9.2 - Limites de Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção (LOD)**

O LOD do instrumento (LODi) e o LOQ do instrumento (LOQi) para cada composto foram obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas em acetonitrila, seguida de diluição 1:1 (v/v) destas soluções em fase móvel (solução aquosa de formiato de amônio 4  $\text{mmol L}^{-1}$  e metanol). O LODi e o LOQi foram estimados a partir da relação sinal/ruído, calculada pelo *software* do equipamento, considerando no mínimo 3 e

10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente e foram expressos em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

O limite de quantificação do método (LOQm) foi considerado como o nível mais baixo de fortificação em  $\mu\text{g kg}^{-1}$  que apresentou resultados entre 70 a 120%, com RSD% menor ou igual a 20%<sup>187</sup>.

#### 4.9.3 – Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando os cromatogramas dos extratos das amostras ausentes de analitos, ou também nomeada de “amostra branco”, com as amostras fortificadas em uma concentração conhecida.

#### 4.9.4 - Efeito Matriz

A avaliação do efeito matriz foi realizada comparando as áreas obtidas em duas curvas analíticas nos mesmos pontos, uma no extrato da “amostra branco” e outra no solvente. O efeito matriz foi calculado conforme a Equação 2<sup>190</sup>:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left( \left( \frac{\text{Área do pico (extrato fortificado)}}{\text{Área do pico (padrão no solvente)}} \right) - 1 \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

	Supressão de sinal	Aumento de sinal
Leve	- 20 a 0%	0 a +20%
Médio	-50 a -20%	+20 a +50%
Forte	-50 a 100%	+50 a 100%

Os valores negativos indicam a supressão de sinais da matriz, enquanto que os resultados positivos mostram o aumento do sinal devido ao efeito matriz.

#### 4.9.5 - Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelos ensaios de recuperação, através da fortificação das amostras “branco” em três níveis de concentração (40, 80 e 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o estipe e 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o albúmen sólido e a água-de-coco). Assim, para cada nível de fortificação foram realizadas a extração e análise em 5 replicatas. O cálculo de recuperação foi realizado conforme a Equação 3:

$$R(\%) = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad (\text{Equação 3}).$$

em que:

C1 = Concentração medida na amostra fortificada;

C2 = Concentração medida na amostra não fortificada;

C3 = Concentração utilizada na fortificação.

O procedimento de eficiência de extração foi avaliado através do cálculo empregando as áreas dos picos antes e depois da extração, conforme a Equação 4<sup>197</sup>:

$$\text{Eficiência de extração}(\%) = \frac{\text{Área antes da fortificação}}{\text{Área do padrão}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

#### 4.9.6 - Precisão intra-dias (repetitividade) e precisão intermediária

A precisão do método foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD) conforme a Equação 5:

$$\text{RSD}(\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

em que,

s = estimativa de desvio padrão absoluto =  $\{\sum(x_i - x_m)^2 / n-1\}^{1/2}$

$x_i$  = valores individuais

$\bar{X}$  = média das medidas em replicatas

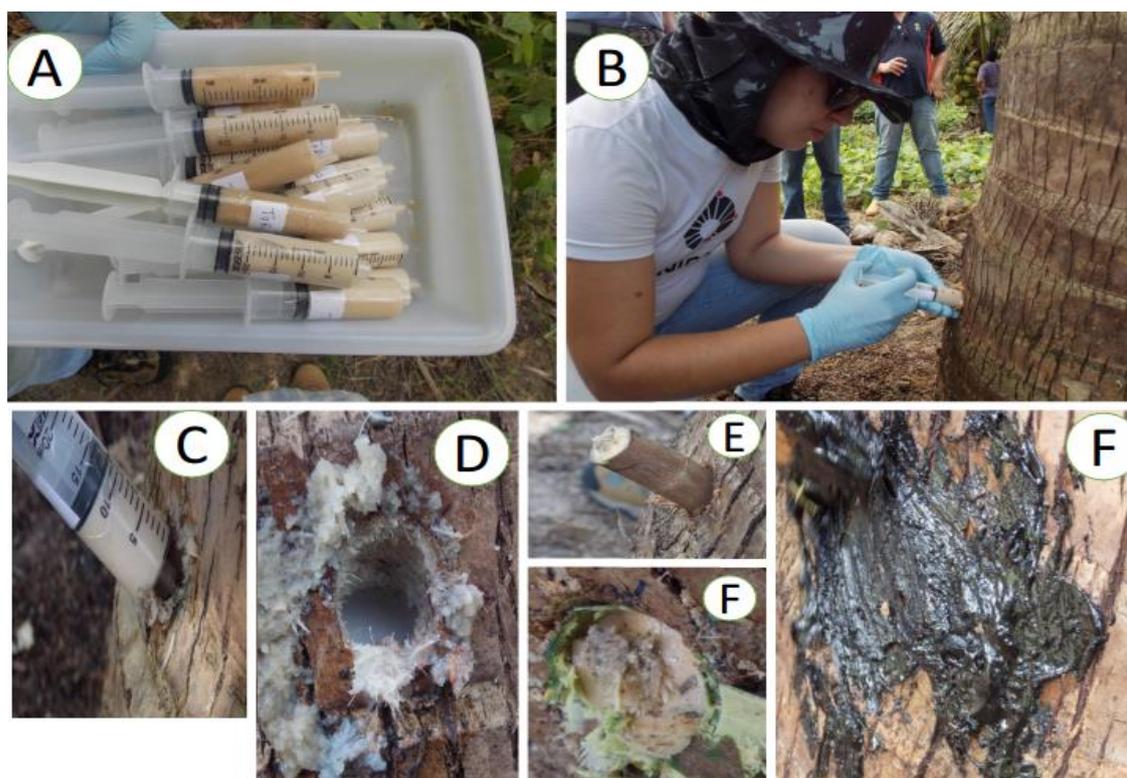
n = número de medidas

Foi avaliada a precisão intra-dia através da replicata da extração e análise das amostras fortificadas. Para cada nível de concentração foram realizadas 5 replicatas e os resultados foram avaliados por uma única injeção no equipamento. Já a precisão intermediária foi avaliada pela extração das amostras “branco” fortificadas no nível intermediário (80  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o estipe e 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o albúmen sólido) em diferentes dias, sendo também injetadas as soluções da curva analítica.

### 4.10– Tratamentos endoterápicos

#### 4.10.1 - Tratamento endoterápico de injeção

A abertura do estipe foi realizada com o auxílio de uma pua manual ou furadeira automática e a injeção dos agrotóxicos foi feita na altura de 70 cm a partir do solo. A Figura 13 apresenta as etapas realizadas no tratamento endoterápico de injeção.



**Figura 13** – Tratamento endoterápico de injeção. (A) seringas contendo os seis tratamentos realizados, (B) e (C) injeção das soluções no estipe, (D) solução dentro do orifício do estipe, (E) e (F) utilização de tarugo de madeira verde no local de aplicação de agrotóxicos, e (F) aplicação de alcatrão vegetal no local.

Após a coleta das amostras, para evitar que os orifícios ficassem abertos, estes foram vedados com tarugos de madeira verde e sobre os locais aplicou-se alcatrão vegetal em todos orifícios abertos, tanto para a injeção dos agrotóxicos, como para a coleta das amostras. Este procedimento evitou a infestação de doenças e pragas.

#### 4.10.2 – Tratamento endoterápico de infusão

Foi desenvolvida uma réplica do equipamento de infusão na oficina de mecânica fina do IQ-Unicamp e utilizados os aços inox 304 e 420 para a confecção do mesmo. As dimensões do equipamento foram definidas observando as fotos de equipamentos comerciais e em conjunto com o chefe de oficina da Unicamp, uma vez que, evidentemente, esses valores dimensionais não são divulgados no site dos fabricantes.

As Figuras 14 e 15 mostram a réplica do equipamento de infusão, indicando a funcionalidade de cada parte da peça e suas respectivas dimensões.





**Figura 17** – Réplica do equipamento para a infusão dos agrotóxicos. A) e B) Perfil do equipamento de infusão no estipe do coqueiro em diferentes outros ângulos.

Após a utilização da réplica nos testes iniciais, foi comprado o equipamento de infusão *Bite Infusion*<sup>®</sup>. As Figuras 18 e 19 mostram fotos utilizando este equipamento. Enquanto a Figura 20 apresenta o procedimento realizado durante as coletas de amostras



**Figura 18** – Procedimento realizado no tratamento endotérmico de infusão, utilizando o equipamento *Bite Infusion*.



**Figura 19** – Sequência do tratamento de infusão. (A) e (C) teste para adaptação do equipamento *Bite Infusion*; (B) o furo efetivo utilizando o equipamento realizado em cruz para introdução do líquido; (C) tentativa frustrada com um único furo, e (D) o líquido escorrendo.



**Figura 20** – Procedimento padrão para coleta das amostras na altura 100 cm acima do ponto de aplicação dos agrotóxicos.

#### 4.10.3 – Testes iniciais dos tratamentos endoterápicos de infusão e injeção

**Método de preparação da calda de agrotóxico:** A mistura dos agrotóxicos foi realizada com o auxílio de seringas, em que, uma alíquota de 10 mL foi retirada dos produtos comerciais e adicionada em um béquer e homogeneizada com um bastão de vidro. O único

agrotóxico sólido pesado foi o tiofanato-metílico, que foi misturado com água numa proporção 1:1 (m/v) e 10 mL desta solução foram adicionados à calda de tratamento.

No primeiro teste do método endoterápico de injeção, foi realizado o furo no estipe com o auxílio de uma pua manual, enquanto em outro teste foi utilizada a réplica do equipamento de infusão. Foram utilizados 2 coqueiros (um para cada teste) e injetados 10 mL da solução contendo os agrotóxicos e, posteriormente, vedados com algodão. Foram coletadas amostras sete dias após a introdução dos agrotóxicos, 15 cm acima do ponto de aplicação.

Estes primeiros tratamentos endoterápicos de infusão e injeção foram realizados no campo experimental de Betume (Embrapa-Tabuleiros Costeiros) em Neópolis-SE no mês de fevereiro de 2014. Grande parte dos estipes dos coqueiros apresentavam sinais de insetos-broca, sem adubação, sem produção de frutos e as folhas caídas devido ao forte período de estiagem. Porém, por encontrar-se próximo a uma área do rio São Francisco, os estipes ainda estavam umedecidos. Os agrotóxicos misturados neste primeiro teste continham os seguintes princípios ativos: difenoconazol, tiofanato-metílico, tiametoxam, beta-ciflutrina, imidacloprido, tiabendazol, carbendazim e carbofurano.

#### **4.10.4 - Testes dos tratamentos endoterápicos de injeção com adjuvantes**

O segundo tratamento endoterápico de injeção foi realizado em área experimental, na Fazenda Sococo, em Mojú-PA, no mês de julho de 2014. Apesar de ser uma temporada com bastante incidência de chuvas, os dias se mantiveram ensolarados. Por ser uma propriedade particular, em todas as áreas, os coqueiros estavam saudáveis e em plena produção, os estipes estavam úmidos, facilitando o estado de translocação da seiva. Aparentemente, os estipes não apresentavam sinais de insetos-broca. Foi avaliado neste estudo, uma solução composta pelos produtos comerciais que continham os seguintes princípios ativos: carbendazim, carbofurano, carbosulfano, ciproconazol, difenoconazol, espiroclorfenol, imidacloprido, tiabendazol, tiametoxam, beta-ciflutrina e tiofanato-metílico.

Foram utilizados em cada tratamento, dois coqueiros escolhidos randomicamente e aplicados em todas as plantas no mesmo dia. Cada planta recebeu 2 furos opostos, a 40 cm

do solo para a introdução dos agrotóxicos com um declínio de um ângulo de 45°, com o auxílio de furadeira motorizada, utilizando brocas de aproximadamente 20 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro.

Foram realizados seis diferentes tratamentos, sendo que em três desses utilizaram diferentes tipos de adjuvantes, alguns descritos na literatura, como os organossiliconados (T5, *Break-thru*® e T6, *Silwet-L77*®) e nos outros três tratamentos (T2 a T4) foram empregados sais fertilizantes e ácido cítrico. Para a injeção dos agrotóxicos em cada tratamento (*mix*), foram utilizados 10 mL da solução e, em seguida, a seringa foi lavada com 20 mL de água, em cada orifício, para garantir que todo o volume do *mix* foi aplicado.

As amostras foram coletadas em três alturas (15 cm, 45 cm e próximo à copa) acima do ponto de injeção e, quando possível, devido à altura da palmácea, o quarto furo foi feito próximo às folhas. Para evitar possíveis contaminações de uma amostra para outra, ou seja, a cada altura, como medida preventiva, a broca foi limpa utilizando-se como solventes água e formol.

A Tabela 8 apresenta os tratamentos testados. Totalizaram-se neste primeiro teste, 12 coqueiros, sendo dois coqueiros por tratamentos. As primeiras amostras de cada tratamento foram coletadas com 2 dias, e as segundas, 30 dias após as injeções dos agrotóxicos.

**Tabela 8 –** Tratamentos realizados com a injeção dos agrotóxicos e adjuvantes

Tratamentos	Volume do tratamento
<b>T 01 = somente agrotóxicos (<i>mix</i>)*</b>	20 mL <i>mix</i>
<b>T 02 = <i>mix</i> + sais</b>	10 mL da solução de sais e 10 mL <i>mix</i>
<b>T 03 = <i>mix</i> + ácido cítrico pH 3,0</b>	15 mL <i>mix</i> + 5 mL do ácido
<b>T 04 = <i>mix</i> + ácido cítrico + sais</b>	10 mL <i>mix</i> + 5 mL de sais + 5 mL de ácido
<b>T 05 = <i>mix</i> + break-thru</b>	10 mL <i>mix</i> + 10 mL break-thru
<b>T 06 = <i>mix</i> + Silwet-77</b>	10 mL <i>mix</i> + 10 mL silwet-77

\**mix* = carbendazim, carbofurano, carbosulfano, ciproconazol, difenoconazol, espirodiclofeno, imidacloprido, tiabendazol, tiametoxan e tiofanato-metílico.

A solução de ácido cítrico utilizada nos tratamentos 3 e 4 foi feita pesando-se 31 mg de ácido cítrico e dissolvendo em 1 litro de água destilada, obtendo assim uma solução com pH de 3,0. Já a solução de sais empregada nos tratamentos 2 e 4 foi obtida utilizando-se 5 g de ureia, 2 g de cloreto de potássio e 2 g de cloreto de sódio dissolvidos em 1 litro de água

destilada. Os tratamentos usando os organossilicones (T5 e T6) não tiveram nenhuma diluição e as alíquotas foram coletadas e adicionadas ao *mix*.

Para a avaliação dos frutos após o tratamento endoterápico, as amostras de frutos foram colhidas em intervalos de 2 dias e 30 dias após a aplicação dos agrotóxicos no cacho, nos quais o estágio de maturidade se encontrava em plena fase de formação do endosperma (cacho 17). Foram selecionados e colhidos 3 frutos do cacho 17 por planta e preparada uma amostra composta para cada tratamento e intervalo de amostras.

#### **4.10.5 - Testes dos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão empregando a mistura de agrotóxicos + *Break-thru®* e somente ciproconazol + *Break-thru®***

O terceiro tratamento endoterápico de injeção e infusão foi realizado em área experimental na Fazenda Sococo, em Mojú-PA, no mês de setembro de 2015 e finalizada em fevereiro de 2016. Este período apresentou condições climáticas favoráveis, com maior estiagem das chuvas na região para a realização dos experimentos. O projeto foi expandido de 2 (Teste 2) para 3 plantas em intervalos de coletas determinados. Foram definidos os prazos de carência de aplicação e os tratamentos, e ampliados para 60 plantas, sendo estes divididos em duas etapas: (a) estipe, 01 de setembro de 2015 com o término no dia 15 de outubro de 2015, sendo 48 plantas para avaliação da translocação xilemática, com aplicação a 80 cm acima do solo e coletas de amostras em dois pontos do estipe (50 e 100 cm acima do ponto de aplicação, correspondendo a 130 e 180 cm, respectivamente), com intervalos de coletas de 2 dias, 15 dias, 30 dias e 45 dias; (b) fruto, 09 de outubro com o término em 10 de fevereiro de 2016, sendo 12 plantas para a avaliação de resíduo de agrotóxicos no fruto, avaliando-se a água-de-coco e o albúmen sólido nos intervalos de 45 dias, 90 dias e 120 dias após as aplicações.

A estratégia da aplicação dos agrotóxicos empregando o tratamento endoterápico foi dividido em dois procedimentos: a) injeção com seringa de polietileno, o procedimento consistiu em usar uma furadeira seguida da aplicação dos agrotóxicos com a seringa; b) utilização do equipamento *Bite Infusion* versão *Di Palma*. Além disso, os tratamentos foram subdivididos em: (i) *mix* - Ciproconazol, imidacloprido, espiroclorfenol, tiabendazol,

carbosulfano, tiametoxam, difenoconazol + *Break-thru®*; (ii) Ciproconazol + *Break-thru®*. Foram 30 plantas para o *mix* e 30 plantas para o tratamento utilizando o ciproconazol.

A Tabela 9 apresenta o modo de preparo das soluções de agrotóxicos empregados nos respectivos tratamentos:

**Tabela 9** – Modos de preparo das soluções empregadas nos tratamentos endoterápicos por injeção e por infusão

Injeção		Infusão	
Ciproconazol	Mix*	Ciproconazol	Mix*
20 mL em cada planta, sendo 10 mL em dois pontos de injeção opostos	20 mL em cada planta, sendo 10 mL em dois pontos de injeção opostos	10 mL em um único ponto de aplicação	10 mL em um único ponto de aplicação
Diluição		Diluição	
1:1 (v/v) do ciproconazol em <i>Break-thru®</i>	1:1 (v/v) do <i>mix</i> em <i>Break-thru®</i>	1:1 (v/v) ciproconazol em <i>Break-thru®</i>	1:1:2 (v/v) <i>mix</i> em <i>Break-thru®</i> diluído em água destilada

\* *Mix* – Ciproconazol, imidacloprido, espirodiclofeno, tiabendazol, carbosulfano, tiametoxam, difenoconazol.

É importante salientar que durante a preparação das caldas não houve nenhuma diluição dos agrotóxicos ou preparação do *Break-thru®* como adjuvante. Contudo, a solução de *mix* dos agrotóxicos para o tratamento endoterápico de infusão teve que ser diluída em água destilada, porque a solução estava muito viscosa e impossível de infundir. Por esta razão, a solução teve que ser diluída para torná-la menos viscosa e passível de aplicação.

Os fabricantes dos agrotóxicos comerciais definem uma concentração de princípio ativo diferente. Desta forma, foi possível estimar a concentração de cada agrotóxico aplicado no estipe do coqueiro nos tratamentos de infusão e injeção. A Tabela 10 indica a concentração do princípio ativo dos agrotóxicos comerciais estudados no Teste 3 e a respectiva concentração dos mesmos nas caldas dos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão aplicados no estipe de cada coqueiro.

**Tabela 10** – Concentração dos agrotóxicos avaliados (*mix*)

Agrotóxicos  <i>Mix</i>	Concentração do princípio ativo no produto comercial (% m/v)	Infusão	Injeção
		µg em 10 mL	µg em 20 mL
Tiametoxam	14,1	719.400	2.877.700
Carbossulfano	40	2.040.850	8.163.687
Tiabendazol	48,5	2.474.531	9.898.471
Imidacloprido	20	1.020.425	4.081.844
Ciproconazol	10	510.213	2.040.922
Difenoconazol	25	1.275.531	5.102.304
Espirodiclofeno	24	1.224.510	4.898.212
<b>Total de agrotóxicos adicionados em cada planta</b>	-	<b>9.265.461</b>	<b>37.063.139</b>

A Tabela 11 apresenta a concentração do princípio ativo do agrotóxico comercial (ciproconazol) e as respectivas concentrações nas caldas de injeção e infusão nos tratamentos endoterápicos preparados e aplicados no estipe de coqueiro.

**Tabela 11** – Concentração do ciproconazol e concentração nas caldas de injeção e infusão.

Agrotóxico	Concentração do princípio ativo no produto comercial (% m/v)	Infusão	Injeção
		µg em 10 mL	µg em 20 mL
Ciproconazol	10	50.000.000	100.000.000

A partir desses valores foram possíveis calcular:

(a) Paridade de translocação: Expressa em porcentagem, a paridade entre as concentrações nos pontos de amostragem (50 e 100 cm acima do ponto de aplicação). O objetivo foi verificar a semelhança dos valores nos intervalos de coleta entre 2 a 45 dias próximo à copa do coqueiro (100 cm), visto que, na maioria dos casos a concentração em 50 cm (ponto mais próximo do ponto de aplicação) pode apresentar maiores concentrações. O cálculo de paridade de translocação foi realizado conforme a Equação 6:

$$\text{Paridade de translocação (\%)} = \frac{[ ]_{100} \times 100}{[ ]_{50}} \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:

[ ]<sub>100</sub> = concentração encontrada no ponto de amostragem de 100 cm;

[ ]<sub>50</sub> = concentração encontrada no ponto de amostragem de 50 cm.

Quanto mais próximo os resultados estiverem de 100%, mais proporcionais serão as concentrações entre 50 (altura intermediária do estipe) e 100 cm (próximo à copa do coqueiro). Esta informação torna-se importante para comprovar se em algum momento, entre os intervalos de coletas, a translocação foi efetiva até à copa.

(b) Eficiência de translocação: Indica a concentração expressa em permilagem, num determinado espaço-tempo, mediante a padronização dos intervalos de amostragem (2 a 45 dias), localizada nos pontos de coletas (50 a 100 cm acima do ponto de aplicação), tendo como ponto de partida a concentração do princípio ativo aplicado. A eficiência de translocação foi calculada levando em consideração à Equação 7:

$$\text{Eficiência de translocação (\%)} = \frac{[ ]_{\text{quantificada}} \times 1000}{[ ]_{\text{princípio ativo aplicado}}} \quad (\text{Equação 7})$$

Em que:

[ ]<sub>quantificada</sub> = concentração encontrada em 50 e/ou 100 cm nos intervalos de 2 a 45 dias;

[ ]<sub>princípio ativo aplicado</sub> = concentração em m/v do princípio ativo aplicado nos tratamentos endoterápicos, de acordo com as Tabelas 10 e 11.

#### **4.10.6 – Padronização para a aplicação e coleta das amostras nos tratamentos endoterápicos**

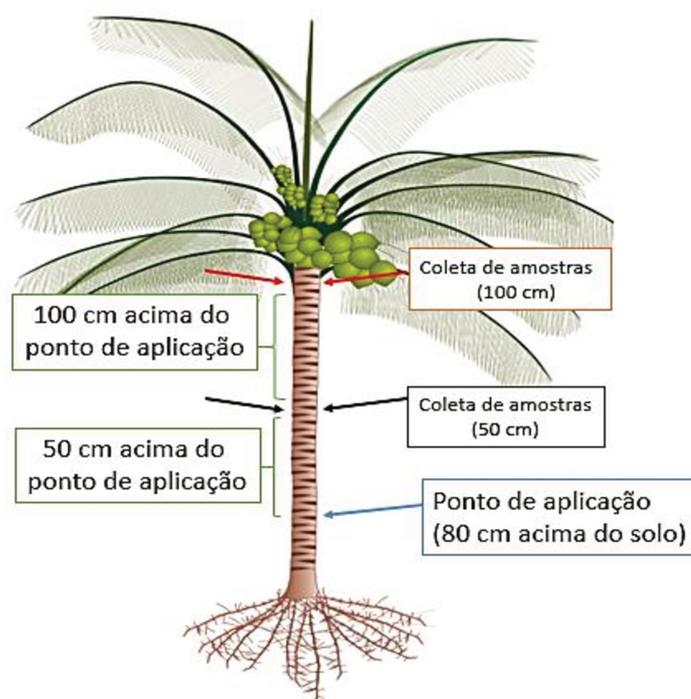
Todas as plantas selecionadas para este estudo tinham alturas entre 1,80 e 2,31 m. A profundidade dos furos de injeção tinha entre 10-15 cm, utilizando uma broca de 8 mm.

A altura para a aplicação e coleta ficaram padronizadas da seguinte forma:

a) Ponto de aplicação: 80 cm acima do solo para que as aplicações dos agrotóxicos nesta altura contemplassem um maior número de feixes, uma vez que, nessa altura existe a formação de bulbo, além de possibilitar maior conforto para o operário.

b) Alturas selecionadas para a coleta das amostras de estipe: dois pontos 50 e 100 cm.

A Figura 21 mostra as alturas dos pontos de aplicação e coletas de amostras realizadas em campo.



**Figura 21** – Esquema das alturas dos pontos de aplicação e de coletas das amostragens.

O tratamento de infusão foi feito com o equipamento comercial *Bite Infusion*, pois a réplica do equipamento confeccionado na Unicamp se mostrou ineficiente para esta atividade. Os tratamentos de infusão e injeção foram selecionados aleatoriamente ou randomicamente, mostradas o delineamento inteiramente casualizado (DIC) e mapeados na área demonstrada nas Figuras S1 e S2, em Anexo, para facilitar a localização durante as coletas. No mapa, cada coqueiro teve sua identificação intermediada por linha (horizontal) e coluna (vertical) especificadas e apresentadas nas Figuras supracitadas. Desta maneira, os coqueiros foram organizados de acordo com cada tratamento apresentados na Tabela S1, que se encontra nos Anexos. Para facilitar a compreensão, as amostras de estipe foram coletadas nos intervalos de:

#### **Estipe**

- 1- **2 dias** – representado pela letra **A**
- 2- **15 dias** – representado pela letra **B**
- 3- **30 dias** – representado pela letra **C**
- 4- **45 dias** – representado pela letra **D**

Total de 48 plantas

Em cada intervalo foram coletadas amostras em suas respectivas alturas, 50 e 100 cm acima do ponto de aplicação, em três plantas diferentes.

Os tratamentos para o estipe foram identificados da seguinte forma:

- T1** – Infusão utilizando a solução *mix* + *Break-thru*®
- T2** – Injeção utilizando a solução *mix* + *Break-thru*®
- T5** – Infusão utilizando o ciproconazol + *Break-thru*®
- T6** – Injeção utilizando o ciproconazol + *Break-thru*®

Para a coleta dos frutos para a análise de água-de-coco e albúmen sólido, foram também selecionadas três plantas diferentes, nos seguintes intervalos após as aplicações:

### **Frutos – água-de-coco e albúmen sólido**

- 1- **45 dias** – representado pela letra **A**
- 2- **90 dias** – representado pela letra **B**
- 3- **120 dias** – representado pela letra **C**

Em cada planta foram coletados 3 frutos de 2 cachos diferentes: o cacho 19 que normalmente é empregado no consumo de água-de-coco e o outro de coco seco (consumo de água-de-coco e albúmen sólido).

Cacho 19 é o estágio de maturidade cujo os frutos interrompem a entrada/formação de água-de-coco, iniciando as reações enzimáticas para a formação do albúmen sólido.

Os tratamentos para verificação de resíduos no fruto foram identificados da seguinte forma:

- T3** – Infusão utilizando a solução *mix* + *Break-thru*®
- T4** – Injeção utilizando a solução *mix* + *Break-thru*®
- T7** – Infusão utilizando a solução ciproconazol + *Break-thru*®
- T8** – Injeção utilizando a solução ciproconazol + *Break-thru*®

Este tratamento foi suspenso, pois devido à seca severa durante o experimento as plantas abortaram os frutos.

O tratamento teve que ser refeito e está apresentado separadamente no mapa na Figura S2 nos Anexos.

- T9** - Infusão utilizando a solução *mix* + *Break-thru*®
- T10** - Injeção utilizando a solução *mix* + *Break-thru*®
- T11** - Infusão utilizando a solução ciproconazol + *Break-thru*®
- T12** - Injeção utilizando a solução ciproconazol + *Break-thru*®

Total de 12 plantas

O mapa e o detalhamento das plantas selecionadas para este trabalho encontram-se em anexo nas Figuras S1 e S2.

Para assegurar os resultados e obter amostras mais representativas e suficientes para as análises em triplicatas, sem a necessidade de eliminar a planta, após a medição das alturas, realizaram-se entre quatro e cinco furos paralelos com auxílio de uma furadeira ou pua manual, proporcionais aos dois pontos opostos de aplicação/injeção dos agrotóxicos, para evitar que mais feixes fossem lesionados.

Após a coleta, as amostras de estipe foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis previamente identificados e guardados em caixas de isopor contendo gelo em gel até que, ao final da coleta, todo material fosse levado à geladeira, congelados, e assim, despachados ao laboratório do IQ-Unicamp.

As amostras de água-de-coco foram recolhidas em um béquer e homogeneizadas utilizando três ou mais frutos. Dependendo da maturidade do cacho, após a abertura do fruto e captada a água-de-coco, coletou-se o albúmen sólido com o auxílio de uma espátula. As análises foram realizadas em triplicatas.

#### **4.11 – Métodos e procedimentos utilizados na aplicação de traçadores rodamina B e azul brilhante FCF no estipe do coqueiro**

Para cada coqueiro utilizado no experimento foi descampada uma área de raio de 1 metro e meio e irrigados com aproximadamente 50 litros de água. Foram avaliadas em três plantas aleatórias, sendo:

- a) Uma planta com uma única abertura no estipe ou corte na raiz;
- b) Uma planta com duas aberturas no estipe ou cortes nas raízes opostas;
- c) Uma planta com abertura no estipe ou cortes nas raízes nos quatros hemisférios.

A abertura do estipe foi realizada com o auxílio de uma pua manual e a injeção dos traçadores foi feita na altura de 70 cm a partir do solo. Nos procedimentos utilizando a seringa, em cada orifício foram injetados 25 mL do traçador na concentração 20 mg L<sup>-1</sup>. Já no procedimento utilizando o equipo de soro, para cada orifício/ponto de aplicação foram aplicados 300 mL da solução de traçadores na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>. Após 72 horas desse procedimento, as plantas foram cortadas transversalmente com o auxílio de um motosserra, em diferentes alturas, para facilitar a contabilidade dos feixes traçados.

Também, foram avaliados 3 diferentes métodos de aplicação para o monitoramento da translocação dos traçadores:

#### 4.11.1 – Via tronco

**1º Método** – A perfuração foi realizada com o auxílio de uma furadeira manual de arco de pua numa altura de 1 metro no estipe. A abertura do estipe foi atingida com a profundidade de aproximadamente 15 cm e o diâmetro do furo de 8 mm. Deste modo, foi introduzido o traçador azul brilhante FCF dentro de cada orifício com o auxílio de uma seringa 25 mL.

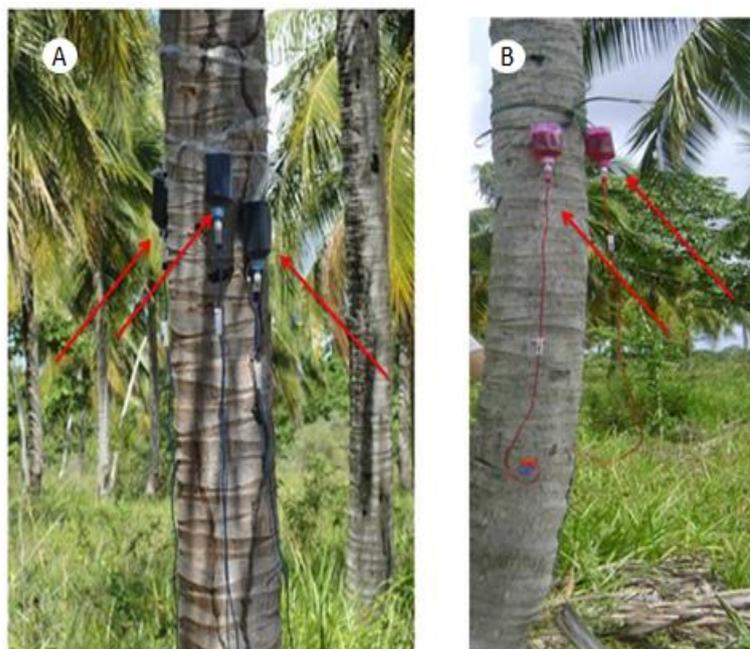
A Figura 22 mostra os procedimentos da abertura do furo no estipe por meio de uma furadeira arco de pua manual e a aplicação do traçador azul brilhante FCF na cavidade perfurada no estipe.



**Figura 22** – Tratamento endoterápico utilizando os métodos de injeção e infusão. A) Abertura do estipe com o auxílio de uma furadeira arco de pua manual e B) aplicação do traçador azul brilhante FCF através de uma seringa de polietileno.

**2º Método** – A perfuração no estipe foi do mesmo modo do 1º método. Contudo, a introdução do traçador azul brilhante FCF e Rodamina B foi feito sob gotejamento contínuo com um equipo de soro com macrogotas simples, com o controle de aproximadamente 10 gotas por minuto.

A Figura 23 mostra o procedimento para aplicação de traçadores azul brilhante FCF e rodamina B por equipo de soro, sinalizados com as setas vermelhas.



**Figura 23** – Aplicação de traçadores. A) Aplicação de traçador azul brilhante FCF, e B) Aplicação de traçador Rodamina B. Em ambos procedimentos foram utilizados o equipo de soro com um volume de 300 mL para cada recipiente.

#### 4.11.2 – Via raiz

**3º Método** – Foi realizado um corte tipo bisel em raízes de sustentação primária e as raízes foram inseridas no saco plástico contendo aproximadamente 100 mL do traçador azul brilhante FCF. A Figura 24 mostra raízes emergidas em bolsas contendo solução de traçador azul brilhante FCF.



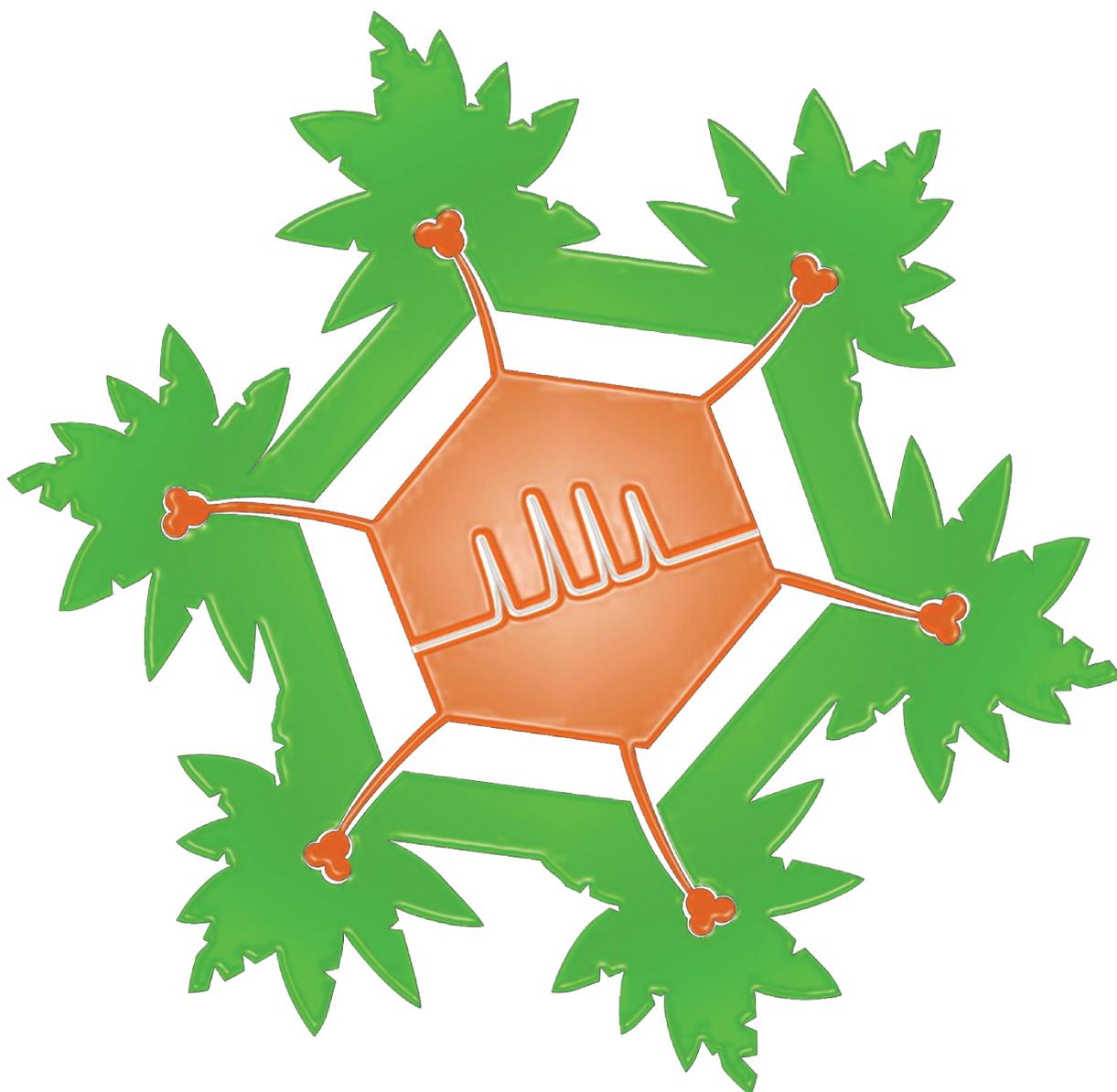
**Figura 24** – Raízes primárias imersas em bolsas contendo o traçador azul brilhante FCF

#### **4.12 – Dissecação do coqueiro**

Nesta atividade, foram derrubados dois coqueiros, com aproximadamente 30 anos, em uma área de coqueiros híbridos PB-121, descuidada e sem nenhum experimento e por isso, foram permitidos esses tipos de estudos/avaliação. Também, foram abertos frutos germinados, para compreensão de toda estrutura de formação do coqueiro, como raiz, estipe e folhas. Estes experimentos foram realizados com o auxílio de motosserras, facões e registrado em fotos.

##### **4.12.1 – Visualização de feixes das folhas, inflorescência e estipe**

Amostras de copa do coqueiro (estipe, folhas e inflorescência) foram encaminhadas para o laboratório de qualidade da madeira e bioenergia da Universidade Federal de Goiás para a realização de cortes citológicos com o intuito de compreender os feixes responsáveis pela translocação de seivas. A partir desses cortes citológicos, as amostras foram examinadas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas, usando confocal LSM 780-NLO Zeiss no microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha), usando objetiva EC Plan-Neufluar 10x/0.30 M27. As imagens foram coletadas usando lasers 458 (35%) nm para excitação e filtros de emissão 463-690 nm para os fluoróforos, com pinhole (máquina fotográfica sem lente) ajustado para 1 *airy unit* em cada canal, formato da imagem de 1024×1024 e zoom óptico ajustável a cada imagem.



## Capítulo 5

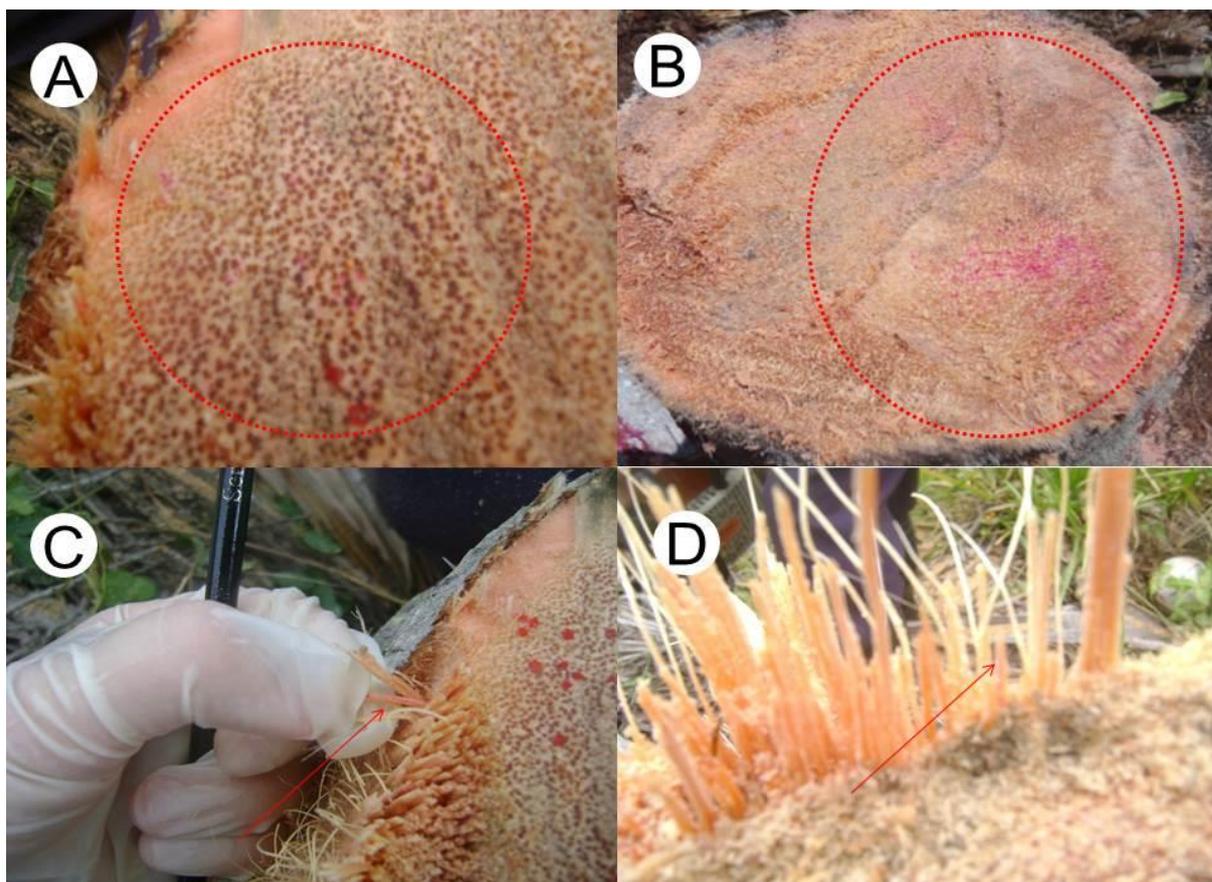
Translocação utilizando traçadores, dissecação do coqueiro e sequência de Fibonacci.

## **5 - Avaliação dos métodos endoterápicos (sistema de injeção via raiz e tronco) utilizando traçadores para subsidiar a aplicação de agrotóxicos no estudo dos efeitos da distribuição espaço-temporal**

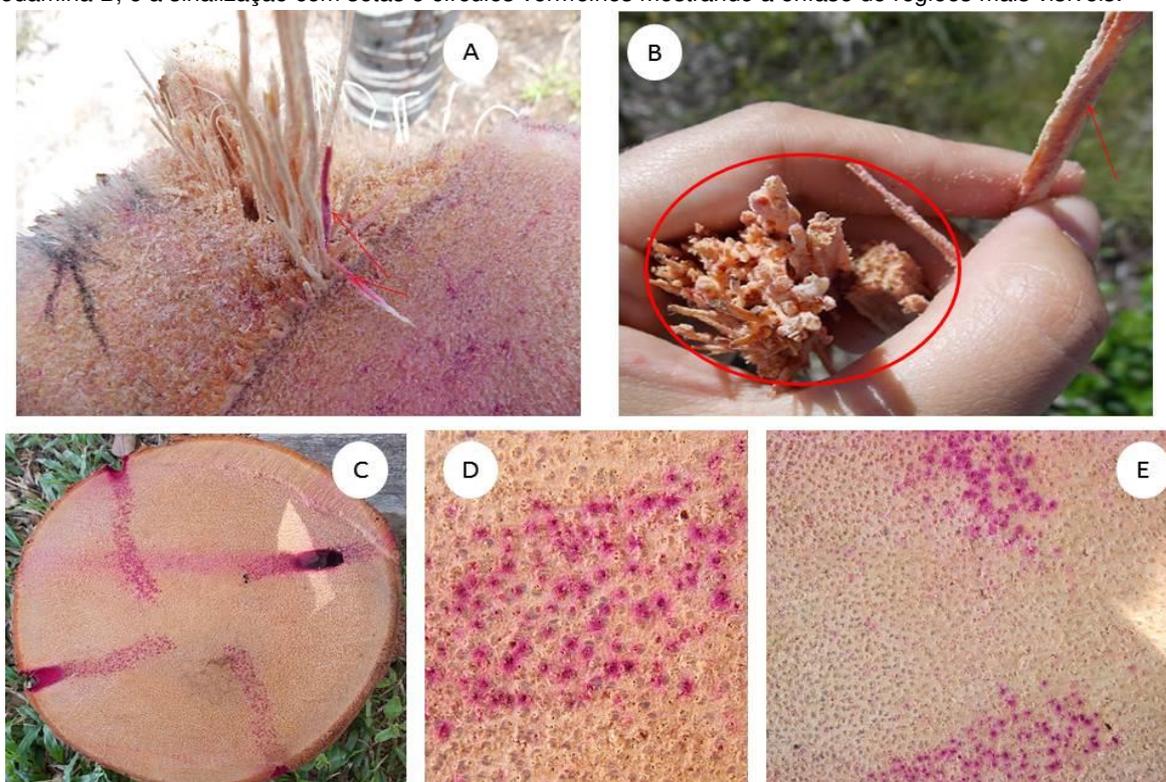
O objetivo deste estudo foi avaliar a translocação de traçadores no estipe do coqueiro através dos vasos condutores de seiva para subsidiar o desenvolvimento de tecnologias de aplicação de agrotóxicos nesta cultura e posterior monitoramento de resíduos destes produtos na água-de-coco. O emprego do traçador teve como objetivo conhecer o mecanismo de translocação da seiva e analisar o sistema vascular responsável pelo transporte/movimento da seiva na planta.

### **5.1. Rodamina B**

Após a abertura do estipe e aplicação dos traçadores pelos métodos 1 e 2, via tronco, com o auxílio de uma seringa e equipo de soro, observou-se que a medida que a seiva translocou, os traçadores também translocaram. A avaliação dos resultados da translocação foi realizada com o corte horizontal conseguido com o auxílio de motosserra. Logo após o corte, notou-se que a seiva e os traçadores exsudaram. Com este método fez-se uma avaliação qualitativa na qual se contabilizaram os pontos corados nos feixes seccionados. As Figuras 25 e 26 mostram as fotos dos feixes após a aplicação dos traçadores e como foi realizada a contagem dos feixes contendo a rodamina B.



**Figura 25** – Translocação acropetal dos feixes traçados. A) B) C) e D) Apresentam os feixes contendo traçador rodamina B, e a sinalização com setas e círculos vermelhos mostrando a ênfase de regiões mais visíveis.



**Figura 26** – Aplicação da Rodamina B nos 4 hemisférios do estipe e visualização dos feixes traçados. A) Feixes traçados ainda no estipe; B) A seta e círculo vermelho sinalizam a presença dos feixes com Rodamina B; C) Corte transversal do estipe apontando os feixes traçados; D) e E) aproximação dos feixes traçados.

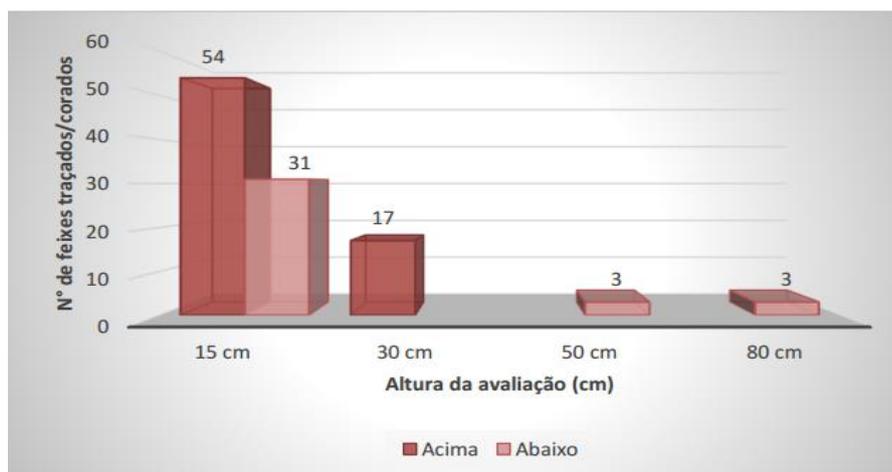
O surgimento da coloração de alguns feixes pode não ser imediato, e eles apareceram à medida que o líquido exsudou da seiva, logo após o corte das amostras. Notou-se que alguns dias após os cortes os traçadores continuaram a exsudar e, com isso, a contagem dos feixes contendo os traçadores foi limitada. A exsudação contínua da rodamina B é mostrada na Figura 27.



**Figura 27** – Exsudação de rodamina B, dias após o corte e a contagem dos pontos traçados.

#### **5.1.1. Via tronco - Injeção de rodamina B no estipe do coqueiro utilizando equipo de soro (método 2)**

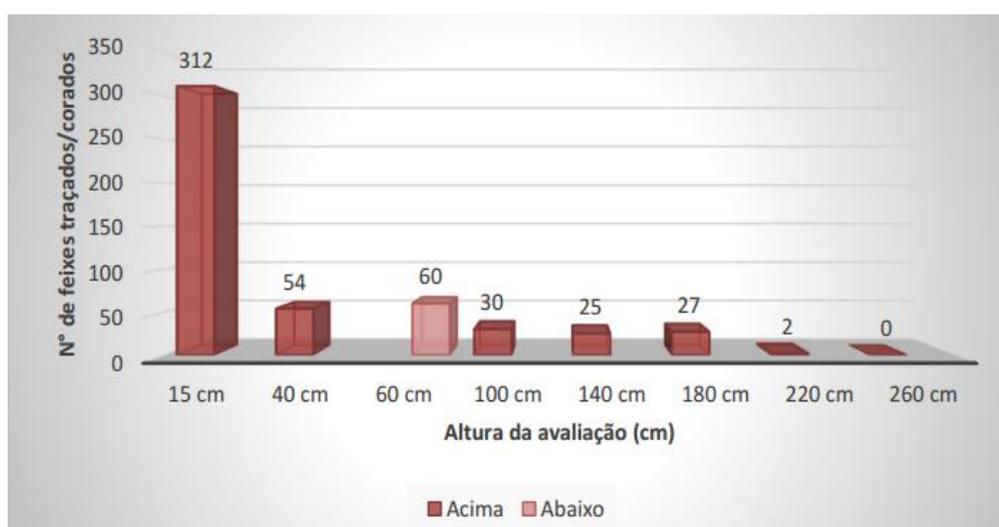
Em uma única planta foram aplicados 300 mL de rodamina B em uma única abertura, utilizando a aplicação contínua de traçador, com o auxílio do equipo de soro por 72 horas. A Figura 28 ilustra o número de feixes traçados com a aplicação de rodamina B em uma única abertura utilizando o equipo de soro.



**Figura 28.** Número de feixes traçados em diferentes alturas acima e abaixo do local de aplicação do rodamina B, com um único ponto de aplicação por equipo de soro.

Foram observados 54 feixes traçados em 15 cm acima do ponto de aplicação, 17 feixes traçados a 30 cm e nenhum feixe traçado na altura de 50 cm com 72 horas. Ainda na mesma planta, abaixo do único ponto de aplicação, a 15 cm foram verificados 31 feixes traçados e 3 feixes colorados em 50 e 80 cm, o mesmo número de feixes.

Já em plantas com quatro pontos de aplicação de rodamina B foram observados a 15 cm acima dos pontos de aplicação, 312 feixes traçados. Na altura de 40 cm ocorreu a diminuição para 54 vasos traçados, sendo que, a partir dessa altura houve a redução no número de feixes traçados. Até a altura de 220 cm foi observada a presença de dois vasos corados como pode ser visualizado na Figura 29.

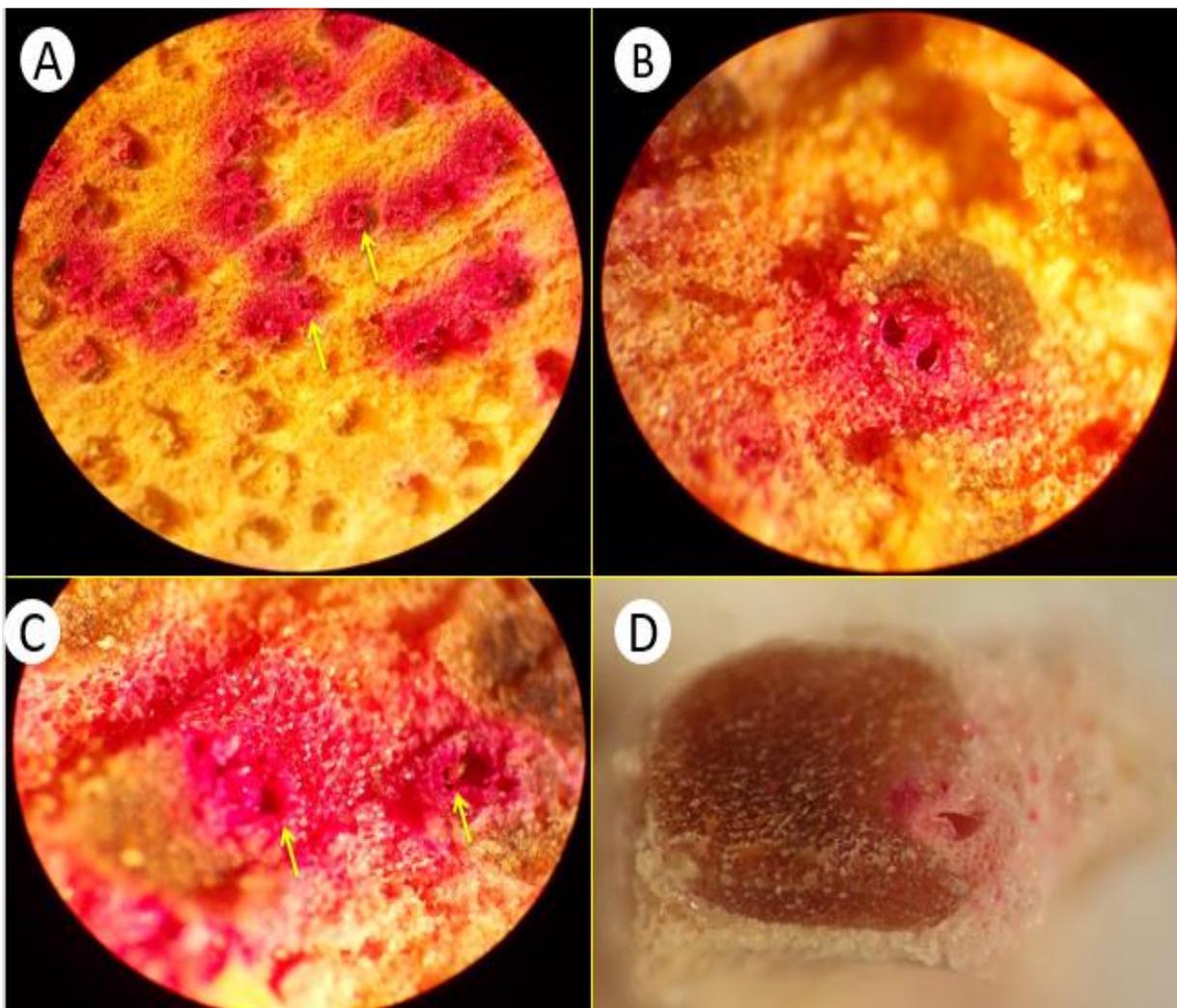


**Figura 29.** Número de feixes internos do estipe de coqueiros traçados em diferentes alturas, acima e abaixo, após aplicação de rodamina B com equipo-soro em quatro pontos de aplicação.

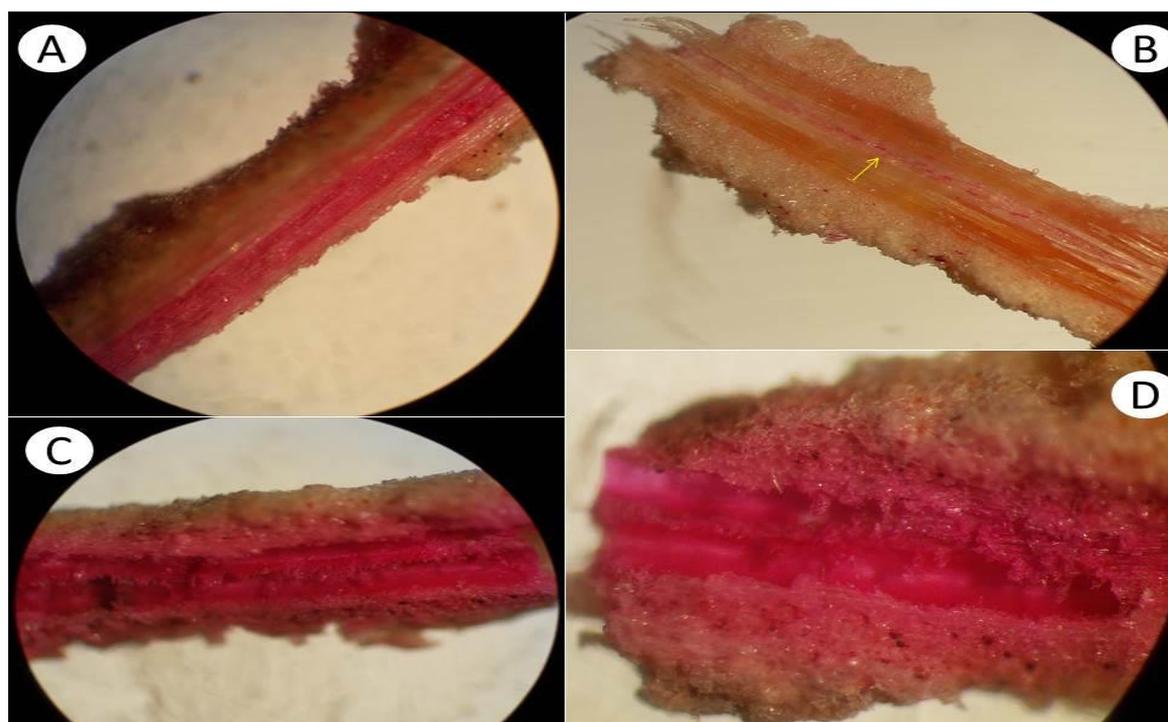
Neste mesmo experimento, contendo os quatro furos com aplicação de rodamina B, abaixo do ponto de aplicação foram observados 23 feixes traçados a 60 cm.

### 5.1.2 – Avaliação do sistema vascular do estipe de coqueiro após a aplicação de rodamina B – via tronco e a aproximação dos feixes com o auxílio de uma lupa

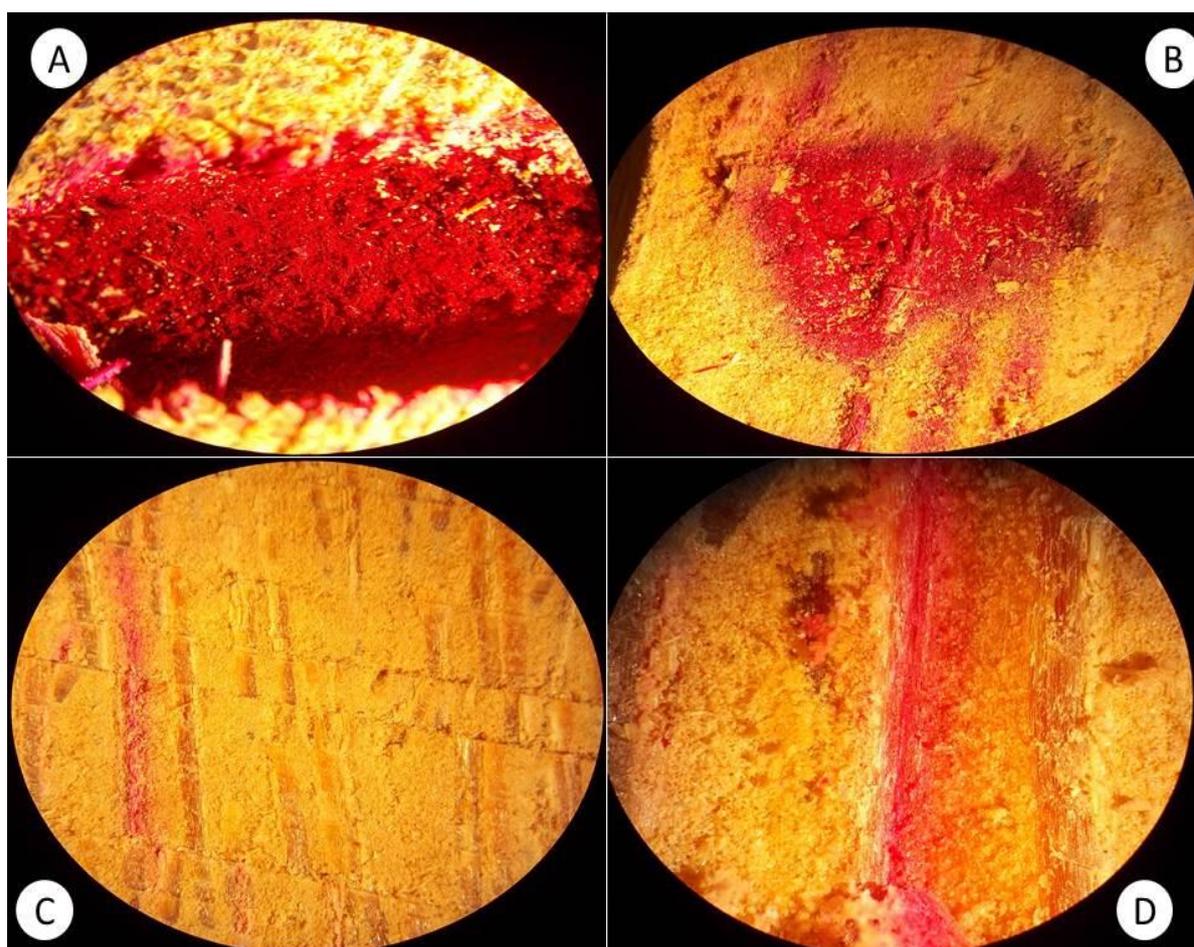
As Figuras 30 a 32 mostram os resultados obtidos pela injeção de traçador rodamina B.



**Figura 30** - Aproximação e visualização dos feixes traçados com o rodamina B. A)B)C) Secção transversal do estipe e visualização dos vasos condutores de seiva e D) Secção transversal de um único feixe.



**Figura 31** – A)B)C) e D) apresentam um secção longitudinal do feixe e uma sequência de aproximação do xilema que conduziu o rodamina B.



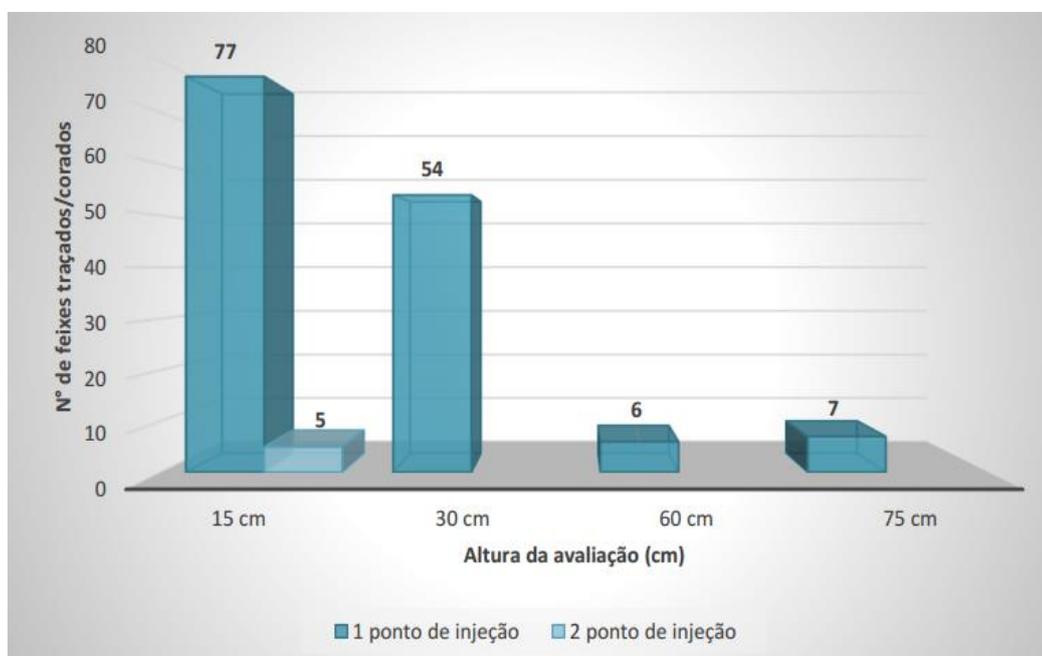
**Figura 32** – Aproximações do ponto em que foi introduzido o Rodamina B no estipe. A) A abertura aproximada do estipe para a introdução do equipo de soro contendo o rodamina B; B) Sinaliza o ponto de injeção por um corte longitudinal, seguido dos feixes que foram traçados após o contato do traçador; C) e D) apresentam uma aproximação de um corte longitudinal mostrando os feixes traçados no estipe.

Com o auxílio de uma lupa foi possível registrar uma aproximação dos feixes vasculares responsáveis pela translocação do traçador Rodamina B. Esses resultados forneceram informações importantes sob diferentes ângulos: longitudinal e transversal dos feixes, além da compreensão de como é realizada a distribuição do traçador dentro dos feixes e o que poderia ocorrer com os agrotóxicos ao serem injetados no coqueiro.

## 5.2 – Azul brilhante FCF

### 5.2.1. Via tronco – Injeção de traçador azul brilhante FCF no estipe utilizando uma seringa (método 1)

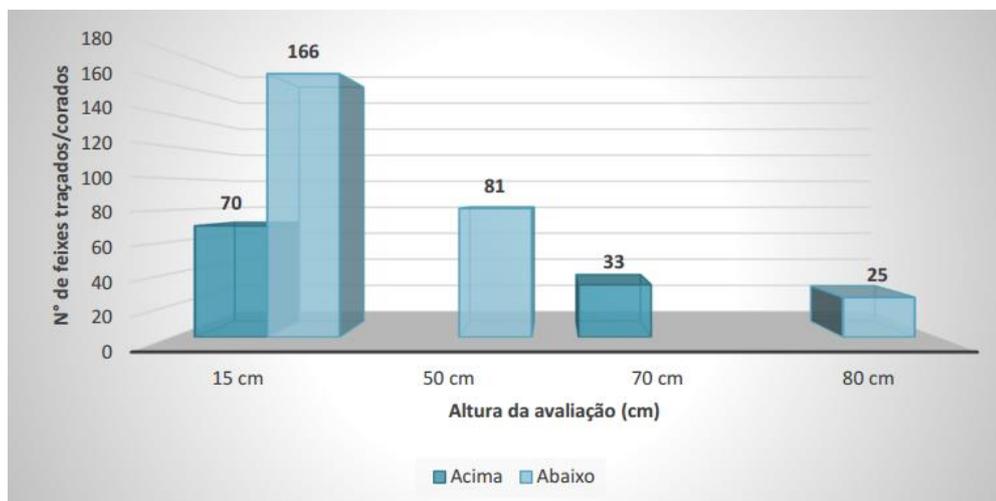
Observou-se que na altura de 15 cm, 77 feixes vasculares ficaram traçados, enquanto que à medida que aumentou a distância do ponto de injeção do traçador, houve uma diminuição de feixes traçados. Já com a injeção do traçador em dois pontos opostos no estipe, verificou-se a presença de cinco vasos com coloração azul 15 cm acima do ponto de inoculação, conforme ilustrado na Figura 33.



**Figura 33.** Número de feixes vasculares internos do estipe de plantas de coqueiros traçados em diferentes alturas após injeção contendo um e dois pontos do traçador azul brilhante FCF.

### 5.2.2. Via tronco – Injeção do traçador azul brilhante FCF no estipe utilizando equipo de soro (método 2)

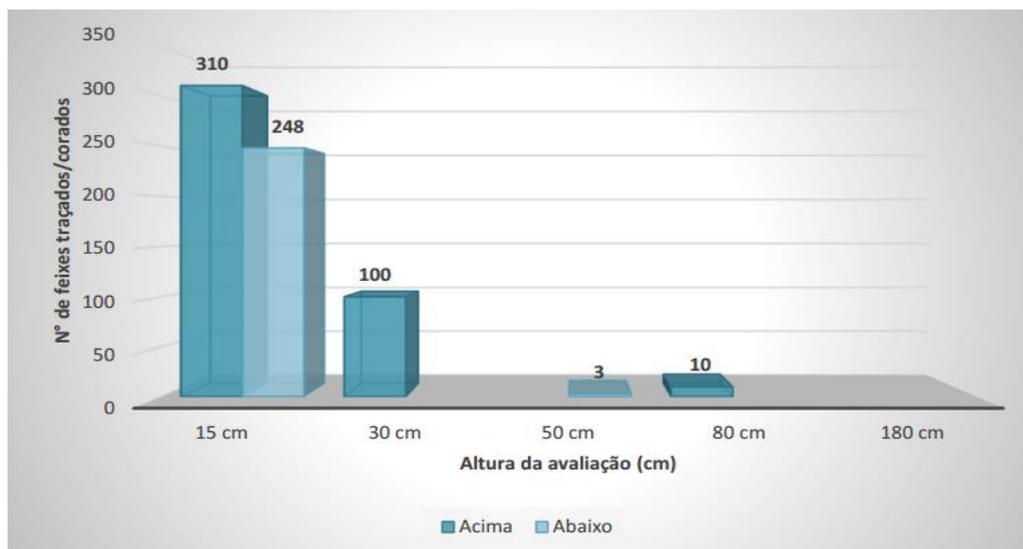
A solução do traçador foi continuamente aplicada no estipe, em duas aberturas, durante 72 horas. A Figura 34 ilustra o número de feixes traçados no estipe acima e abaixo do ponto de aplicação utilizando o equipo de soro.



**Figura 34.** Número de feixes traçados no estipe de coqueiros em diferentes alturas, acima e abaixo do ponto de aplicação de duas aberturas e a aplicação de 300 mL do traçador azul brilhante FCF em cada orifício pelo equipo de soro.

Observou-se a presença de feixes tanto acima quanto abaixo do ponto de aplicação de traçador. Acima do ponto de aplicação foi verificado 70 e 33 feixes traçados a 15 e 70 cm, respectivamente. Ainda nestas mesmas plantas, com as duas aberturas, foram avaliados os feixes corados abaixo do ponto de aplicação do traçador e as contagens dos feixes foram de 166, 81 e 25 feixes traçados, em 15, 50 e 80 cm de altura abaixo da aplicação, respectivamente.

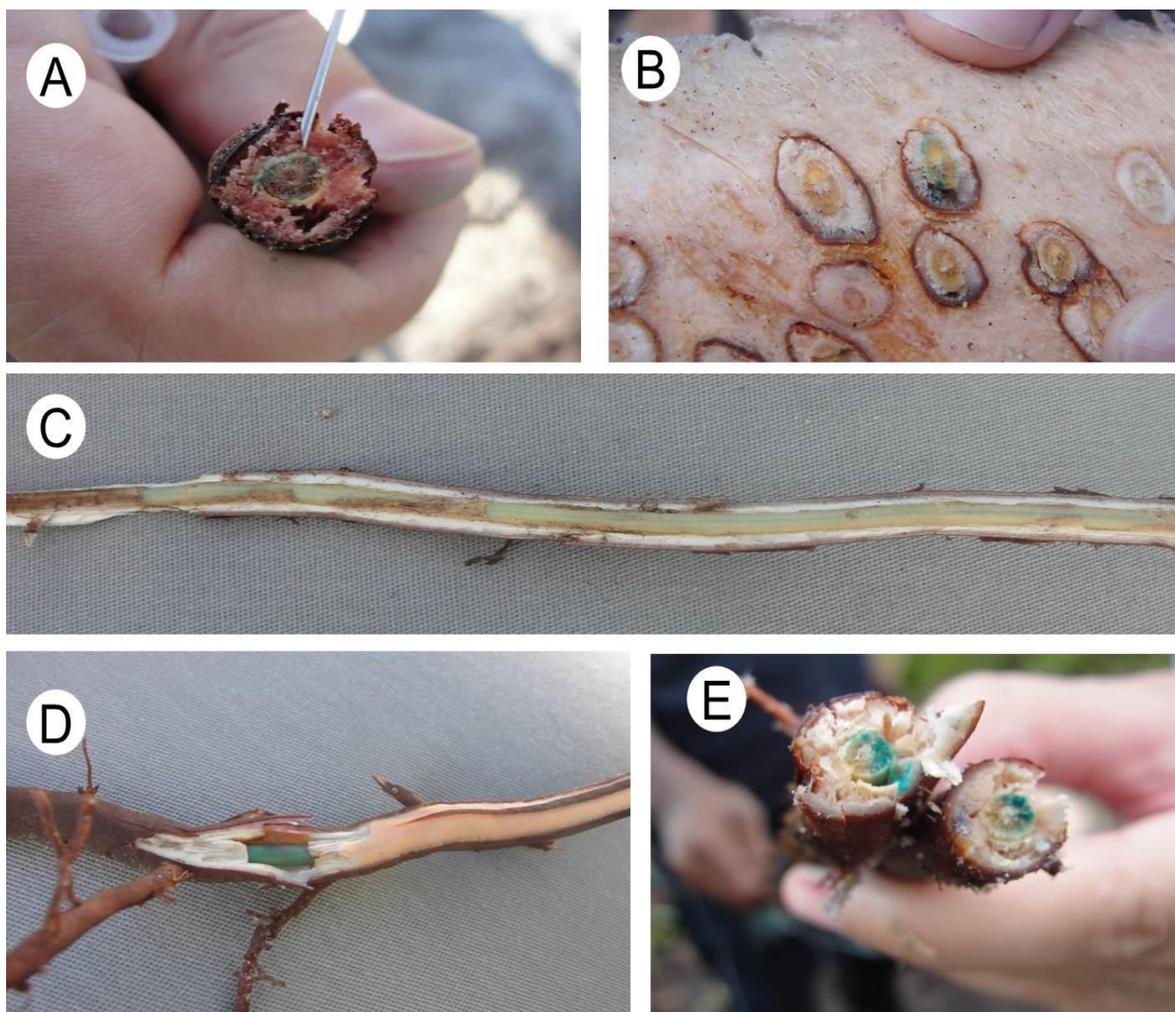
Quando se fez quatro aberturas para aplicação do traçador azul brilhante FCF foram observados 310 feixes traçados na altura de 15 cm, 100 feixes em 30 cm, decrescendo para 10 feixes em 80 cm, até não serem mais observados feixes aos 180 cm. Nesta mesma planta, foram avaliados os feixes traçados em 15 cm abaixo das 4 aberturas de injeção do traçador e observados 248 feixes traçados, com decréscimo considerável na altura a 50 cm, com somente 3 feixes, e nenhum feixe traçado a 80 cm, como mostrada na Figura 35.



**Figura 35.** Número de feixes traçados no estipe de coqueiros acima e abaixo do ponto referência após a aplicação de 300 mL do traçador azul brilhante FCF em cada abertura nos quatro pontos de aplicação utilizando o equipo de soro.

### 5.2.3. Via raiz – Imersão de raízes primárias no traçador azul brilhante FCF (método 3)

Foram selecionados três coqueiros e escolhidas as raízes primárias destas plantas, sendo que no coqueiro 1 - secção de uma raiz, coqueiro 2 - secção de duas raízes opostas e coqueiro 3 - secção de quatro raízes nos 4 hemisférios. Em todos esses experimentos, foi observado a absorção de até 80% do traçador azul brilhante FCF contido nas bolsas plásticas. A translocação ocorreu na parte interna da raiz colorindo os feixes do xilema e floema. Em todos os testes realizados, o tempo de contato da raiz com os traçadores variaram entre 6 a 72 horas e a translocação alcançou até a base da planta, não ocorrendo a coloração dos vasos internos do estipe. A Figura 36 mostra a translocação do traçador azul brilhante FCF pelos feixes de vasos condutores de seiva.



**Figura 36** - Translocação do traçador azul brilhante FCF pelos feixes de vasos condutores de seiva na raiz. A), C), D) e E) apresentam os vestígios do traçador e o caminho traçado na raiz. B) Corte transversal apresentando o contato do traçador entre a raiz e a base da planta.

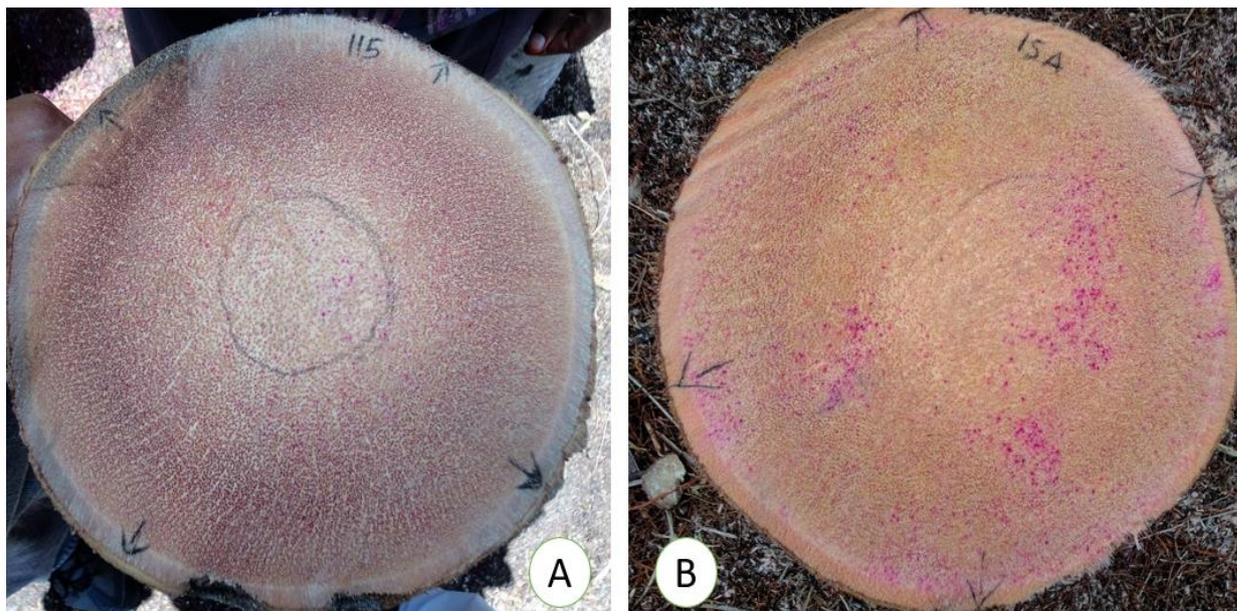
Em todos os métodos 1 e 2 (via tronco) e método 3 (via raiz) foram notadas dificuldades nas avaliações em plantas sob as condições de estresse e sem a devida adubação e irrigação. Estes fatores podem limitar o processo de translocação de seiva da planta e, conseqüentemente, dos traçadores. É importante verificar o estágio vital da planta no momento do corte ou furo, observando se o estipe está úmido, pois é um indício que a planta está em condições de translocar substâncias como os agrotóxicos. Além disso, é importante examinar o estado externo do estipe, o qual pode indicar a presença de insetos, como no surgimento de brocas, apodrecimento do estipe e/ou infestação de outras pragas, porém esta observação não é uma regra. Em outras situações, observou-se que é possível que o estipe esteja intacto e por dentro esteja com infestação de pragas. Outra questão que

também pode favorecer a translocação é verificar o estágio de inflorescência e frutos, pois isso caracteriza que o coqueiro está em plenas condições vitais.

Tratando-se de uma análise qualitativa, os resultados que utilizaram o rodamina B, por ser um traçador fluorescente, foram mais visíveis que o azul brilhante FCF. Como foi notado nos resultados apresentados nos gráficos das Figuras 30 a 32, o rodamina B permitiu melhores translocações e tornou-se a visualização mais prática para a contabilidade do número de feixes traçados/corados. Esses estudos iniciais utilizando os traçadores possibilitaram a compreensão dos mecanismos de translocação ao utilizar os métodos endoterápicos (sistema de injeção via raiz ou tronco). Embora as características físico-químicas dos traçadores sejam diferentes das dos agrotóxicos, o intuito foi subsidiar a aplicação de agrotóxicos no estudo dos efeitos da distribuição espaço-temporal no coqueiro.

Contudo, as informações qualitativas mais importantes obtidas neste experimento foram as seguintes hipóteses: (a) substâncias aplicadas no interior do estipe, seja por injeção ou por infusão, são impulsionados/arrastados juntamente com a seiva; (b) os feixes podem se comunicar e até mesmo se fundir com outros feixes; (d) a translocação pode ser tanto basipetal (abaixo do ponto de aplicação), acropetal (acima do ponto de aplicação), bem como, pode haver uma translocação na horizontal, e que também pode corroborar com a comunicação do líquido aplicado no estipe entre os feixes.

As Figuras 37 e 38 mostram a translocação de rodamina B no estipe e pecíolo foliar.



**Figura 37** – Translocação do traçador Rodamina B pelos feixes condutores de seiva. (A) e (B) as setas na extremidade do estipe indicam os locais de aplicação do traçador e a altura de 115 cm (A) e 15 cm acima do ponto de aplicação (B).



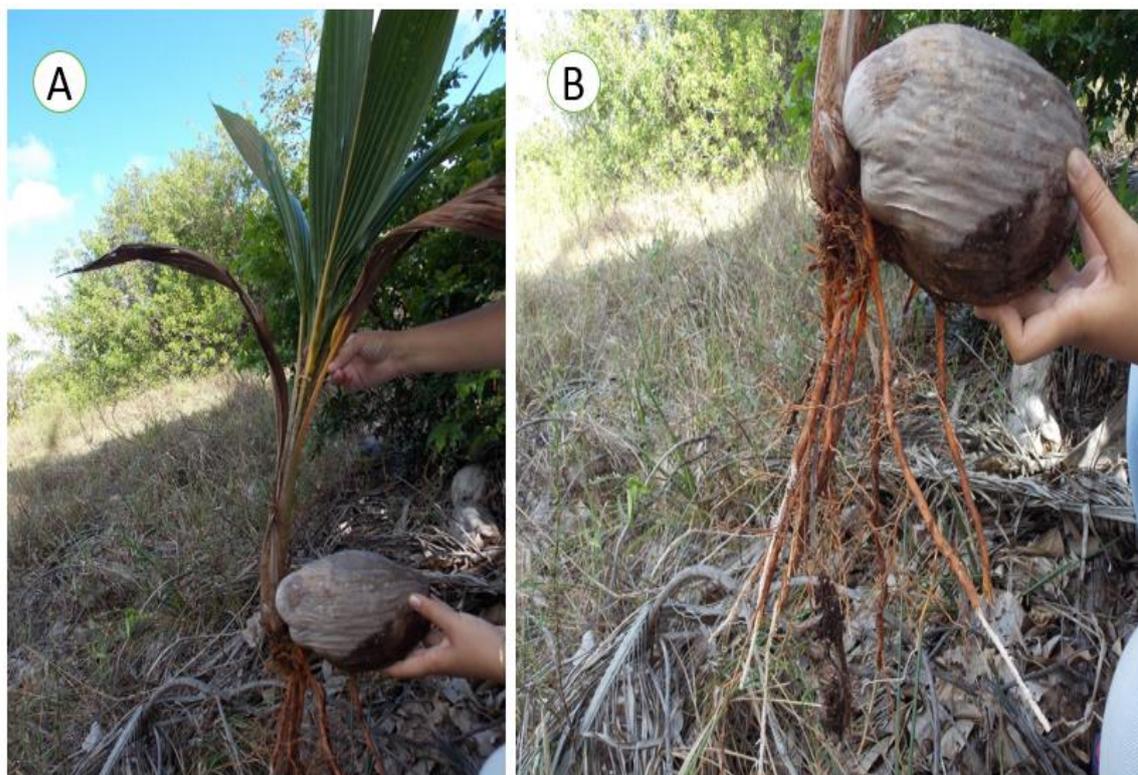
**Figura 38** – Feixes mostrando a translocação de Rodamina B diluído até o pecíolo na zona central das folhas

### 5.3 – Dissecção do coqueiro para compreensão de sua anatomia

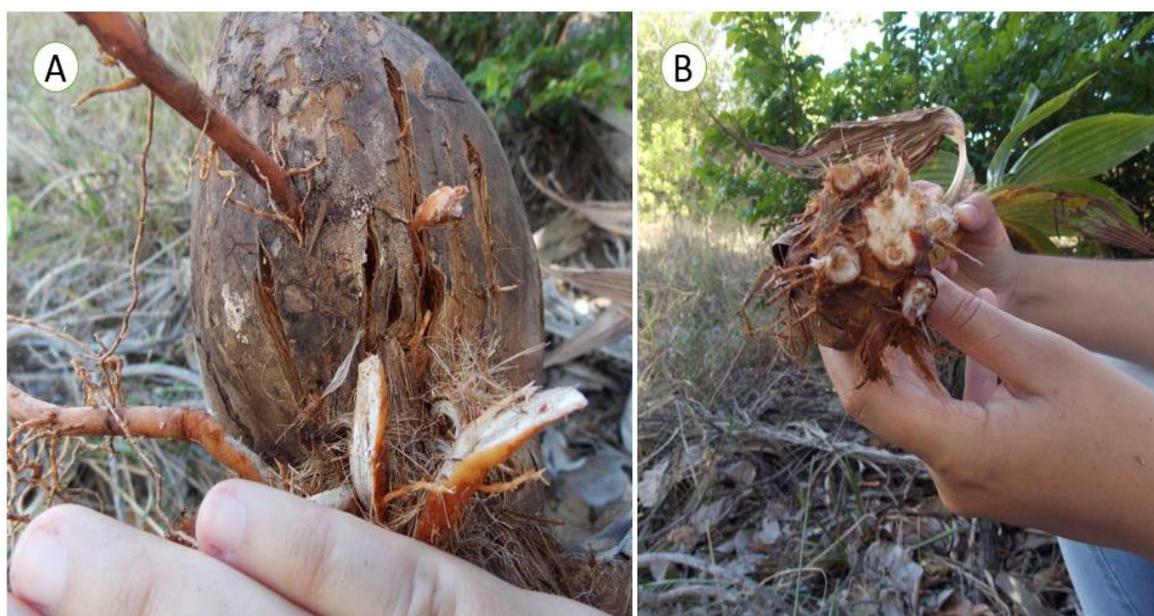
O objetivo de dissecar o coqueiro foi a necessidade de entender a distribuição dos feixes vasculares compreendidos no estipe e suas sucessivas distribuições para as folhas. Dado que os feixes são responsáveis pela distribuição das seivas (bruta pelo xilema e

elaborada através do floema), é importante compreender, desde a formação do estipe e raiz, até mesmo conhecer a formação dos feixes próximos à copa e ao meristema apical. Esses registros foram mostrados nas Figuras 39 a 59.

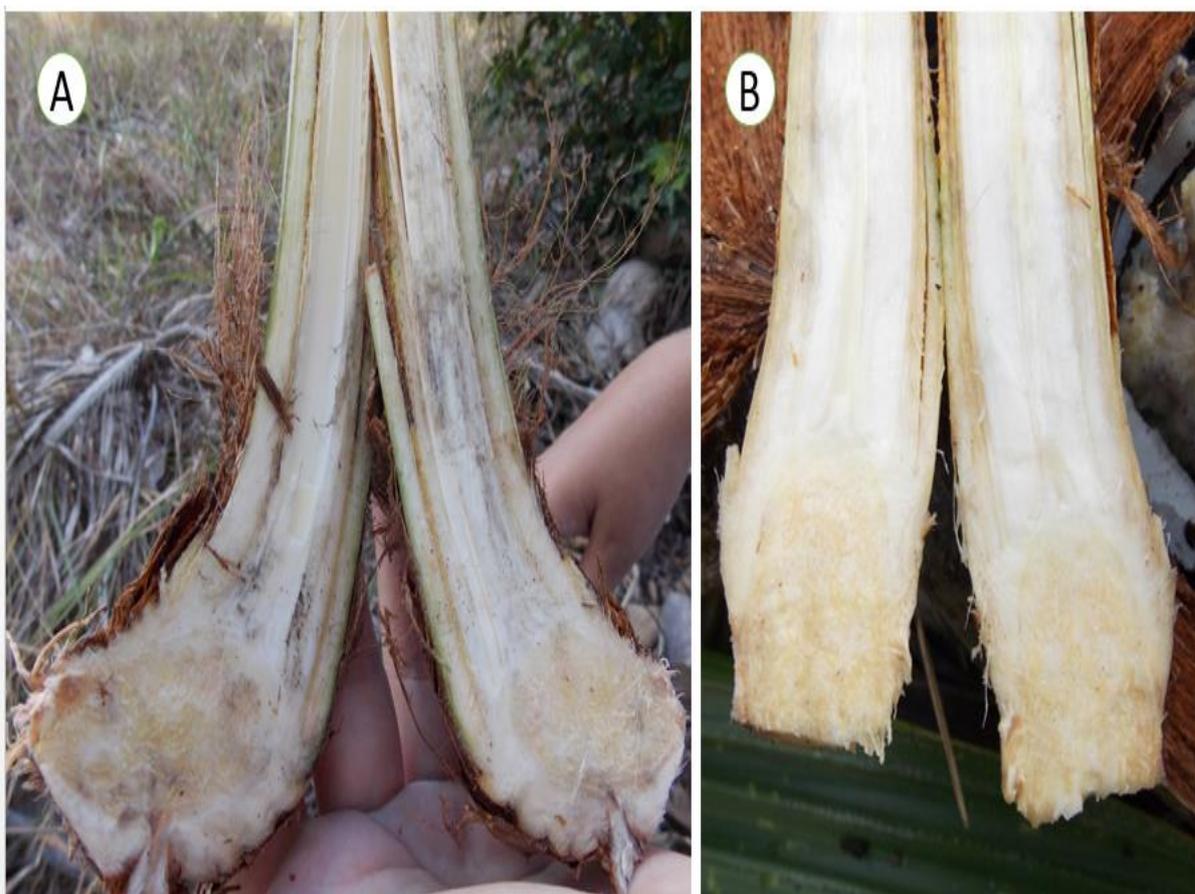
### 5.3.1- Formação do estipe, folhas e raiz



**Figura 39** – Fruto germinado. A) formação das folhas e raiz, B) foto aproximando as raízes



**Figura 40** – Formação das raízes. A) dentro do fruto, e B) raízes presas ao estipe.

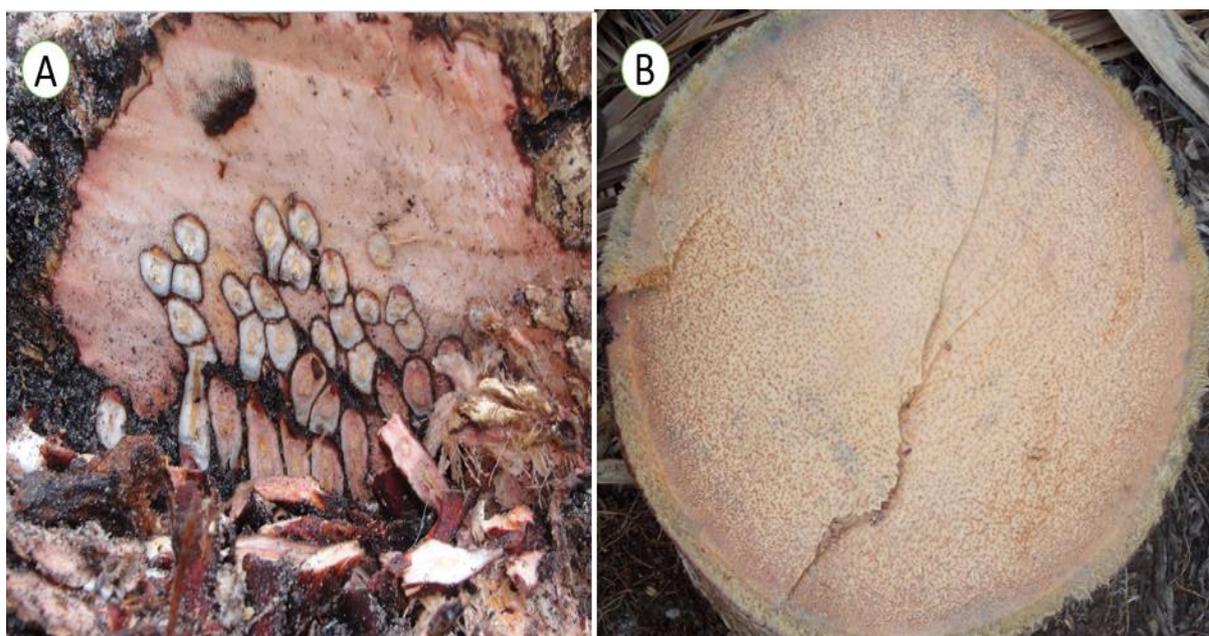


**Figura 41** – A) e B) Perfil dos estipes de planta jovem partidos ao meio e visualização da formação das folhas.



**Figura 42** – Perfil do estipe. A) Estipe de planta jovem partido com o auxílio de um facão e B) compreensão da fusão entre o estipe e as raízes.

### 5.3.2 - Base do estipe, próximo às raízes

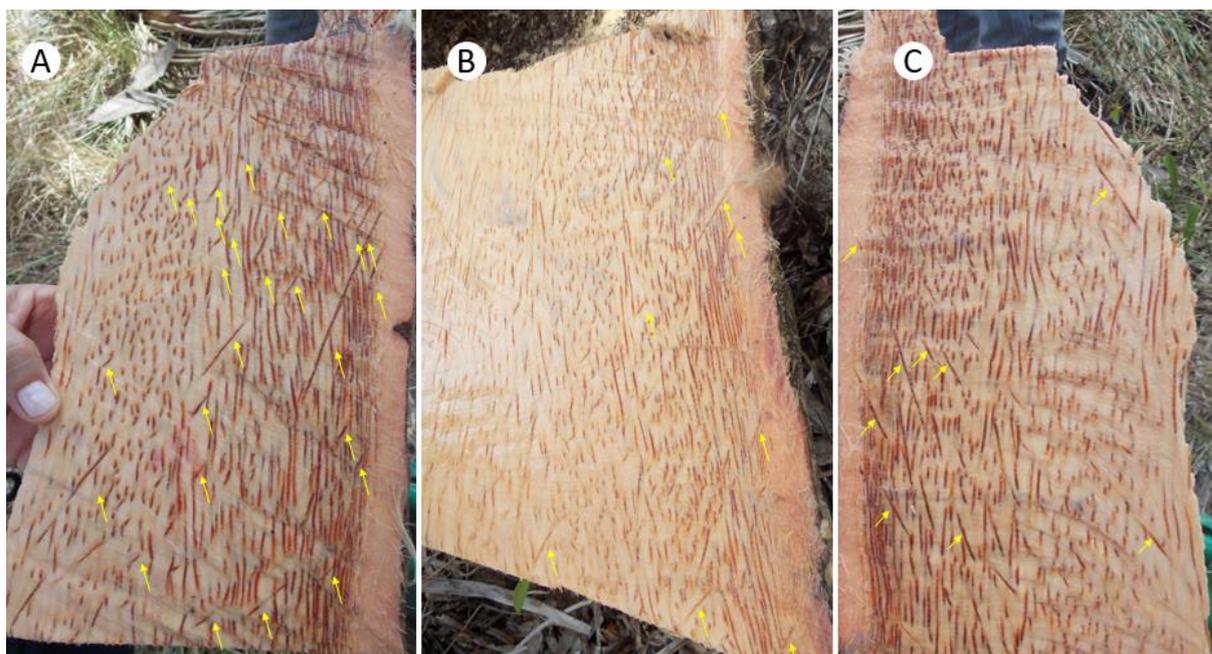


**Figura 43** – Perfil da base do estipe de uma planta adulta. A) conexão entre raízes e estipe, B) distribuição dos feixes.



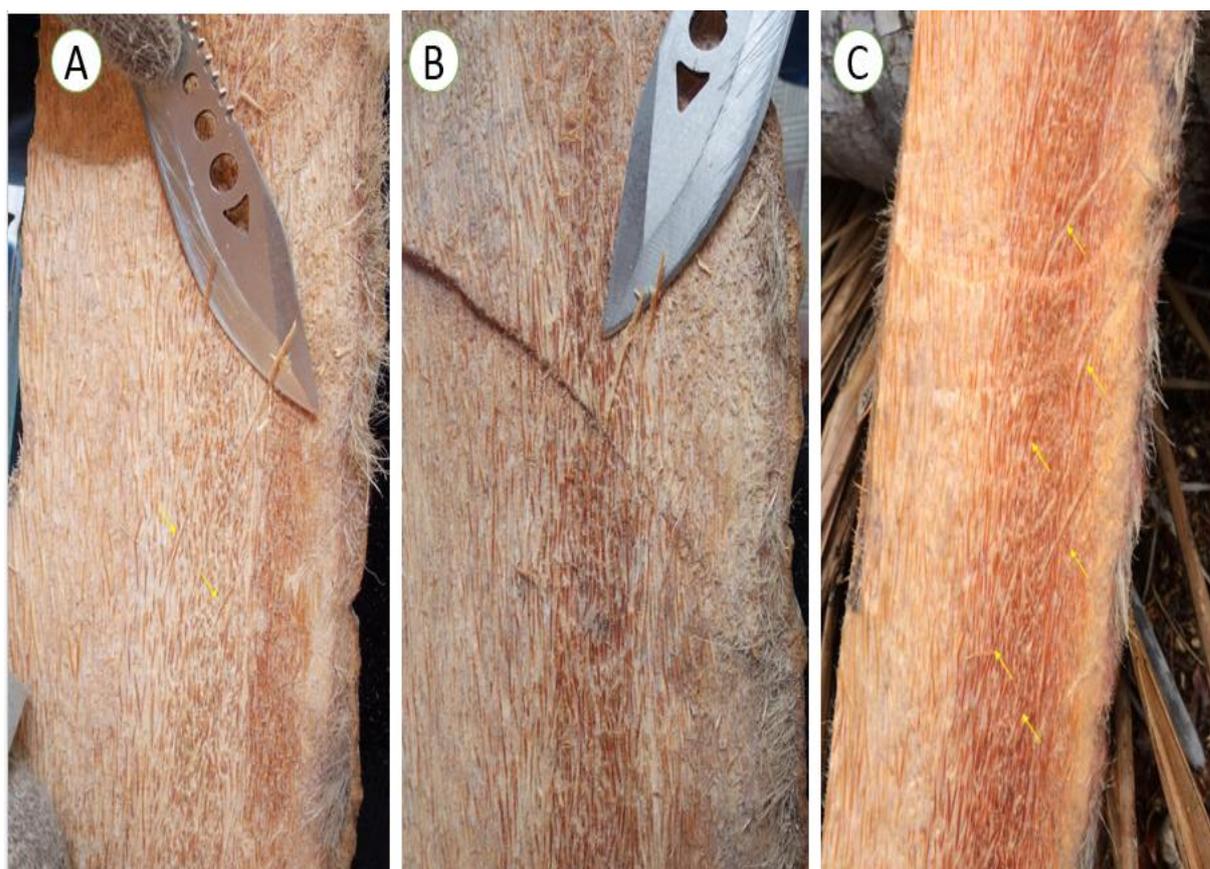
**Figura 44**– Perfil do corte transversal do estipe do coqueiro.

Nota-se claramente que o centro do estipe detém menor quantidade de feixes que as extremidades, além de ser notório que alguns feixes têm formato V em direção às folhas que ali existiram.



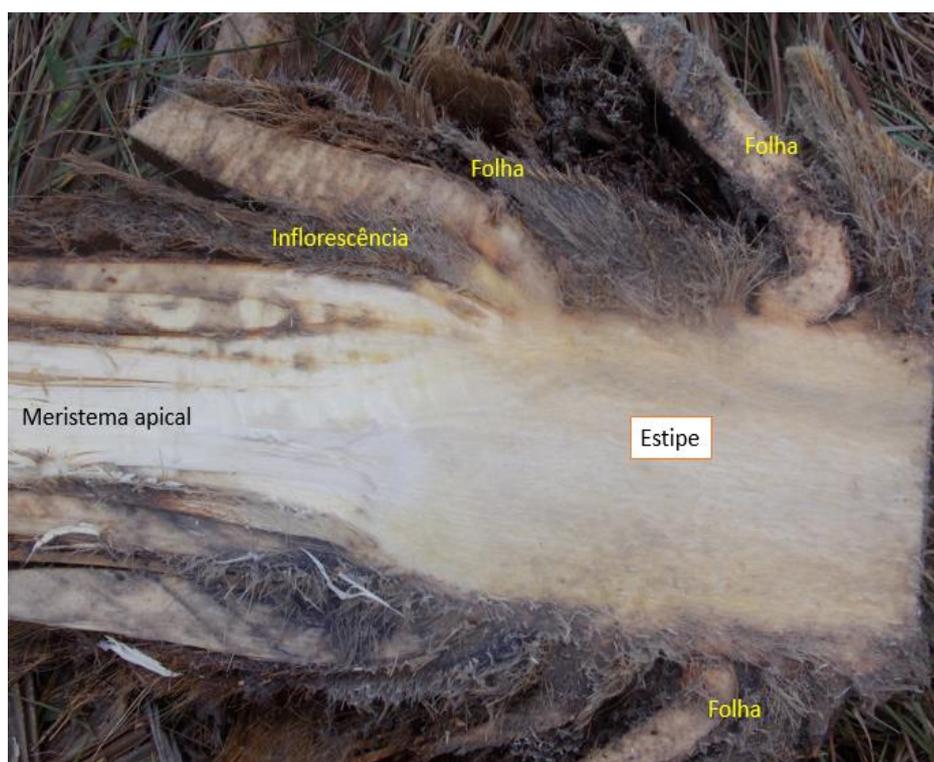
**Figura 45** – Aproximação das fotos e sinalização com setas amarelas dos feixes que foram para as folhas.

### 5.3.3 - Altura intermediária do estipe

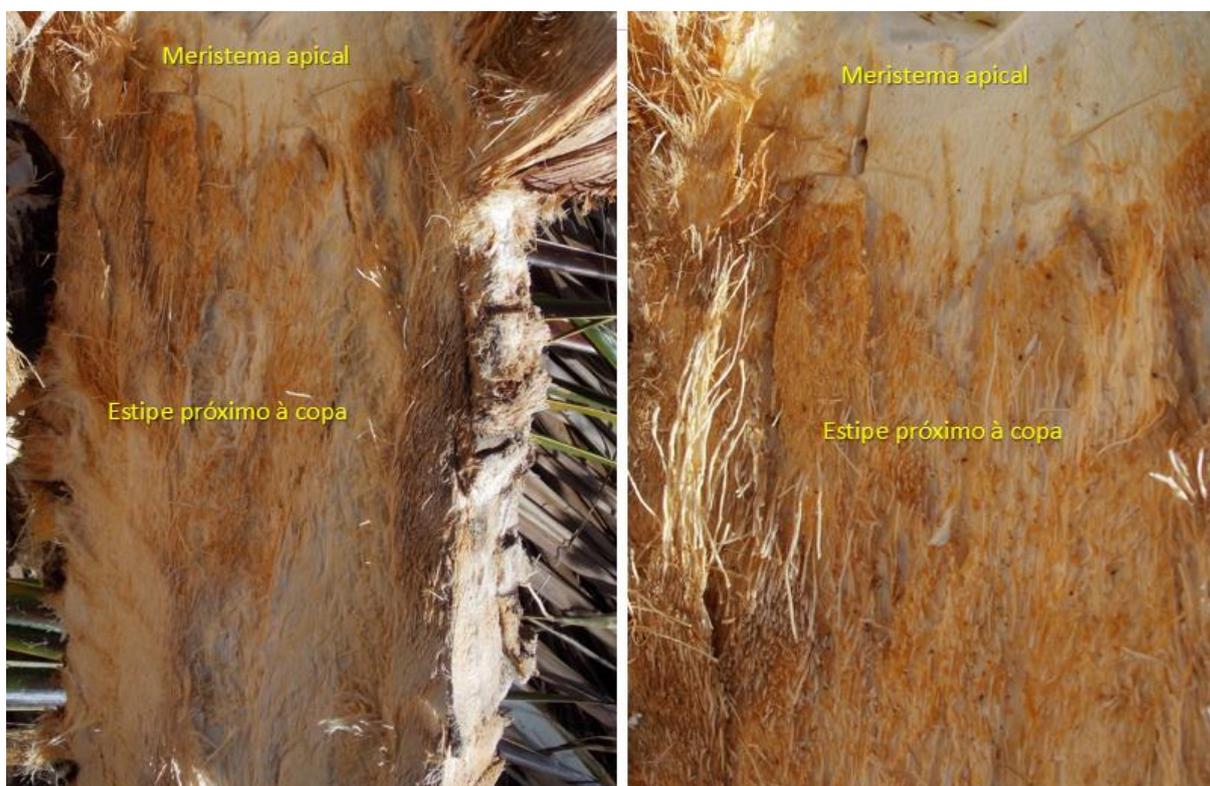


**Figura 46** – Perfil dos feixes do estipe na altura entre a base e a copa. A) B) e C) sinalização dos feixes

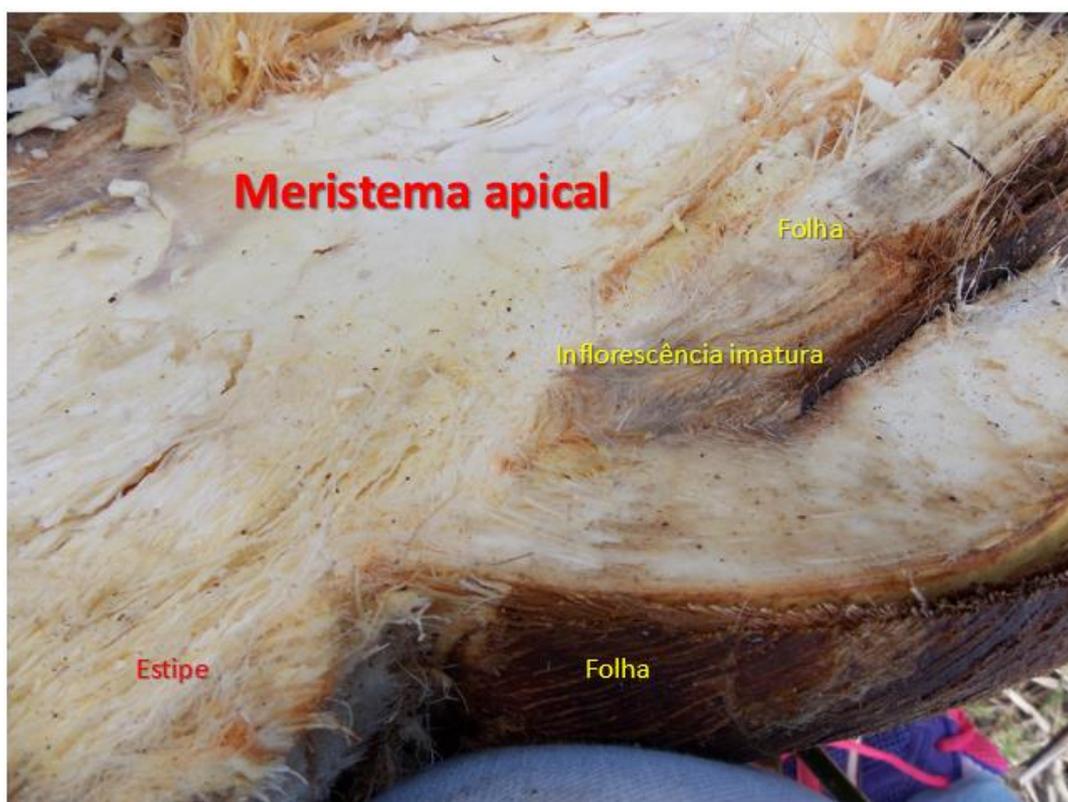
### 5.3.4 - Estipe próximo as folhas



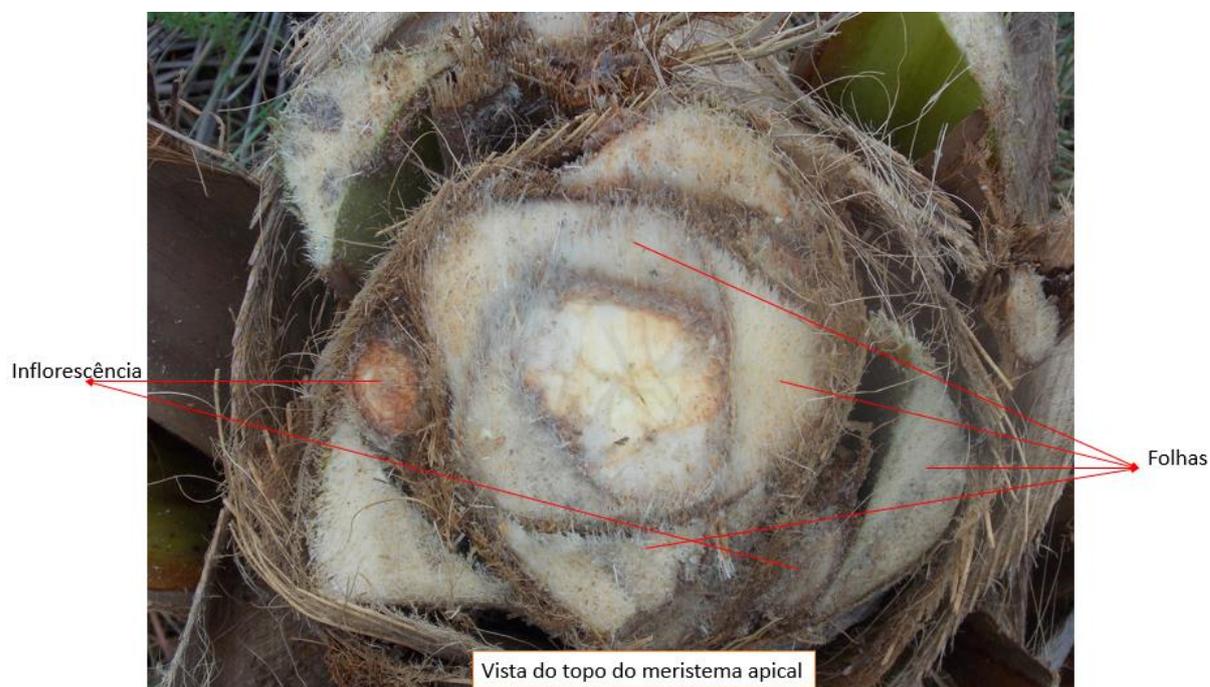
**Figura 47** – Perfil da copa do coqueiro com corte realizado com o auxílio de uma motosserra.



**Figura 48** – Perfil do estipe próximo à copa com corte feito com auxílio de um facão, e após a oxidação dos feixes e parênquima (que envolve o estipe), tendo-se uma melhor visualização da distribuição dos feixes.

**a) Copa/coroa**

**Figura 49** – Perfil da copa para visualização do meristema apical

**b) Meristema apical**

**Figura 50** – Vista do topo do meristema apical. Corte vertical retirando o excesso de folhas para visualização do meristema apical

## A) Folhas

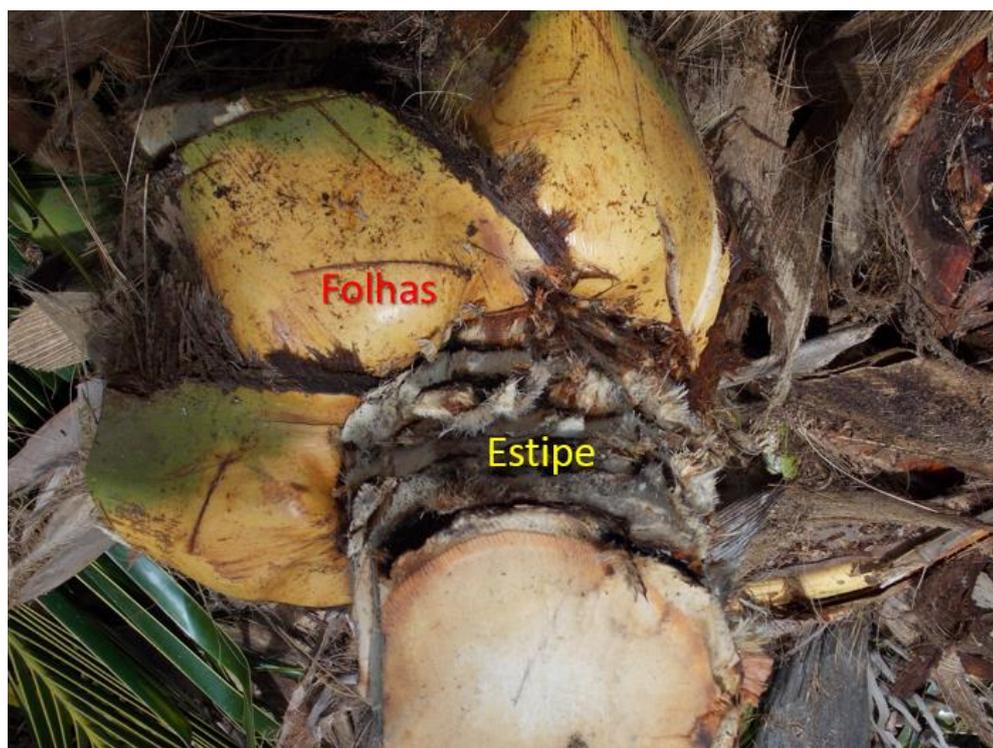


Figura 51 – Foto mostrando a distribuição e conexão das folhas ao estipe

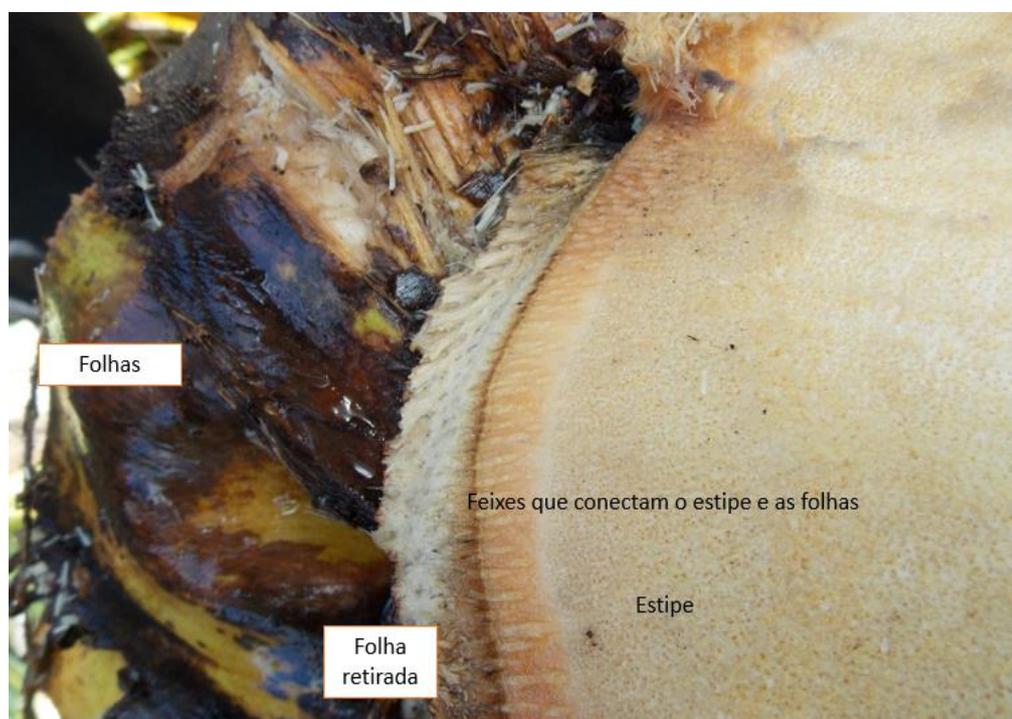


Figura 52 – Fotografia mostrando a conexão dos feixes às folhas.

Nota-se que os feixes que vão para as folhas têm um diâmetro maior que os feixes do estipe próximo ao meristema, sendo bem mais finos. Pelas observações feitas acredita-se que esses feixes, que vão para as folhas, vêm do centro do estipe.



**Figura 53** – Fotografia aproximada mostrando a conexão dos feixes com as folhas.



**Figura 54** – Perfil em outro ângulo dos feixes que conectam as folhas. A) diâmetro dos feixes que vão para as folhas são mais espessos e B) perfil dos feixes entre os nós.



**Figura 55** – Procedimento para desfolhação e compreensão do meristema apical



**Figura 56** – Desfolhação das folhas imaturas do coqueiro, originárias do meristema apical.



**Figura 57** – Desfolhação das folhas imaturas retiradas do meristema apical.

### B) Inflorescência



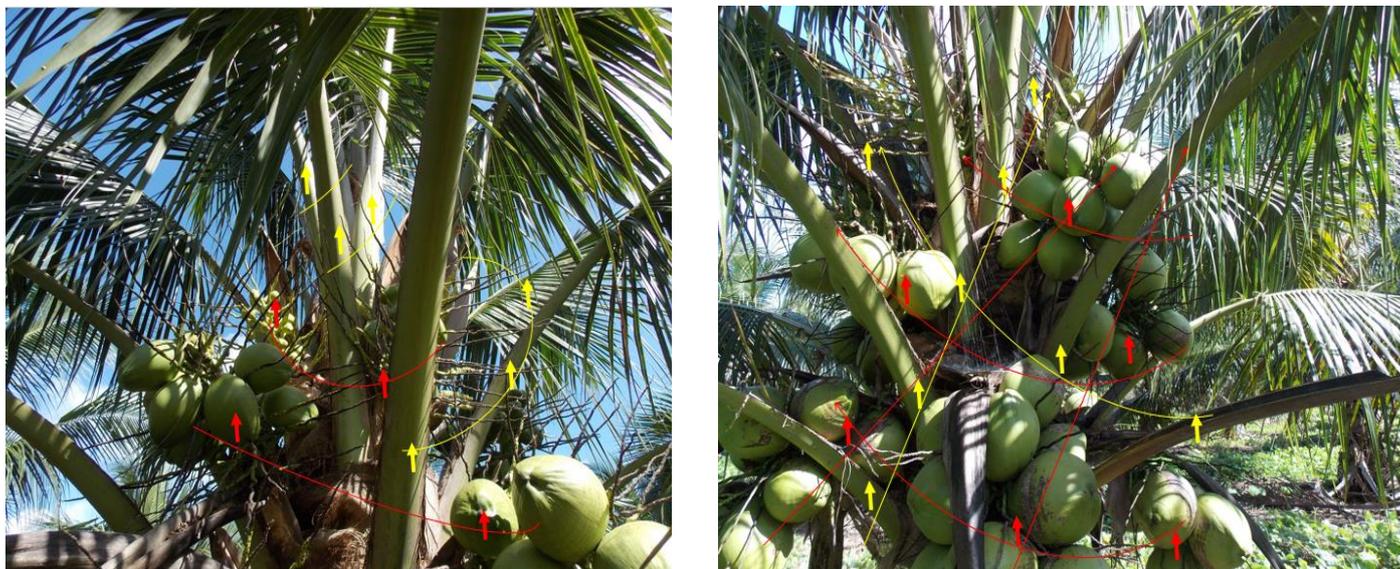
**Figura 58** – Inflorescência imatura, também conhecida como espata, alocada entre as folhas do coqueiro.

### C) Fruto

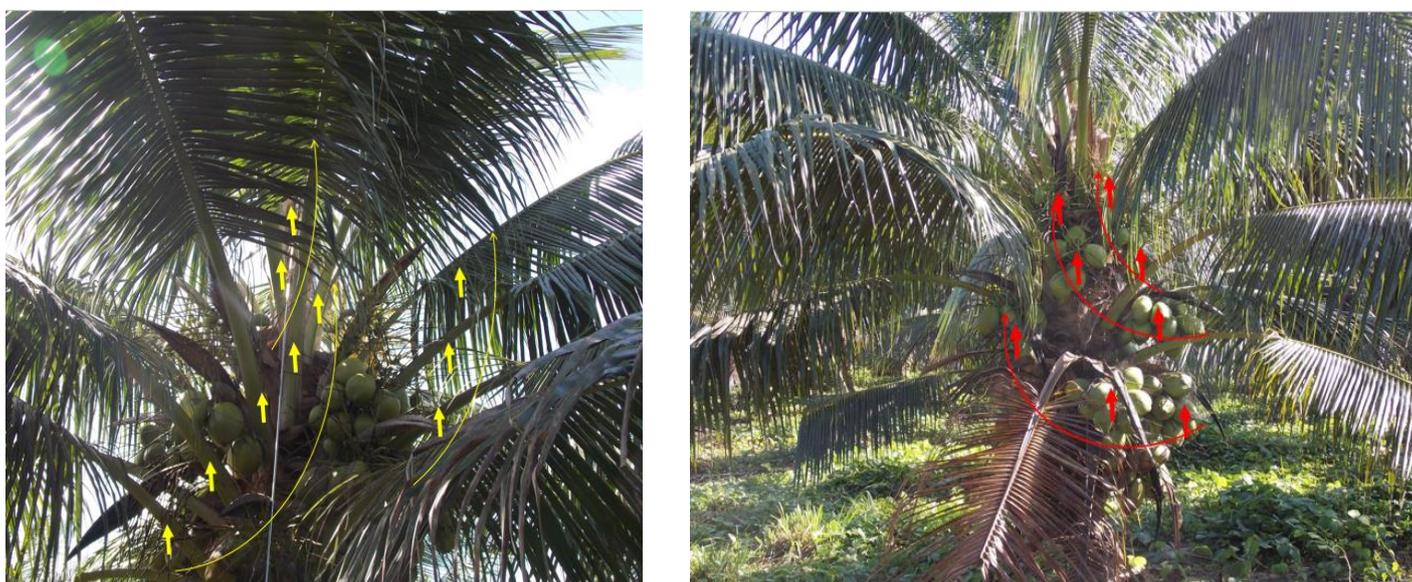


**Figura 59** – Fruto com o endosperma solidificado, e formação da maçã.

As Figuras 60 a 62 mostram que é possível também observar diferentes formas de seqüências geométricas no coqueiro, como nos feixes entre a folha e o estipe, a distribuição dos feixes visto em um corte horizontal e a espiralidade nos ramos dos cachos, respectivamente.



**Figura 60** - Espirais no coqueiro, formada a partir da seqüência de Fibonacci. Setas vermelhas, espirais estruturados nos frutos. Setas amarelas espirais notórios nas folhas.



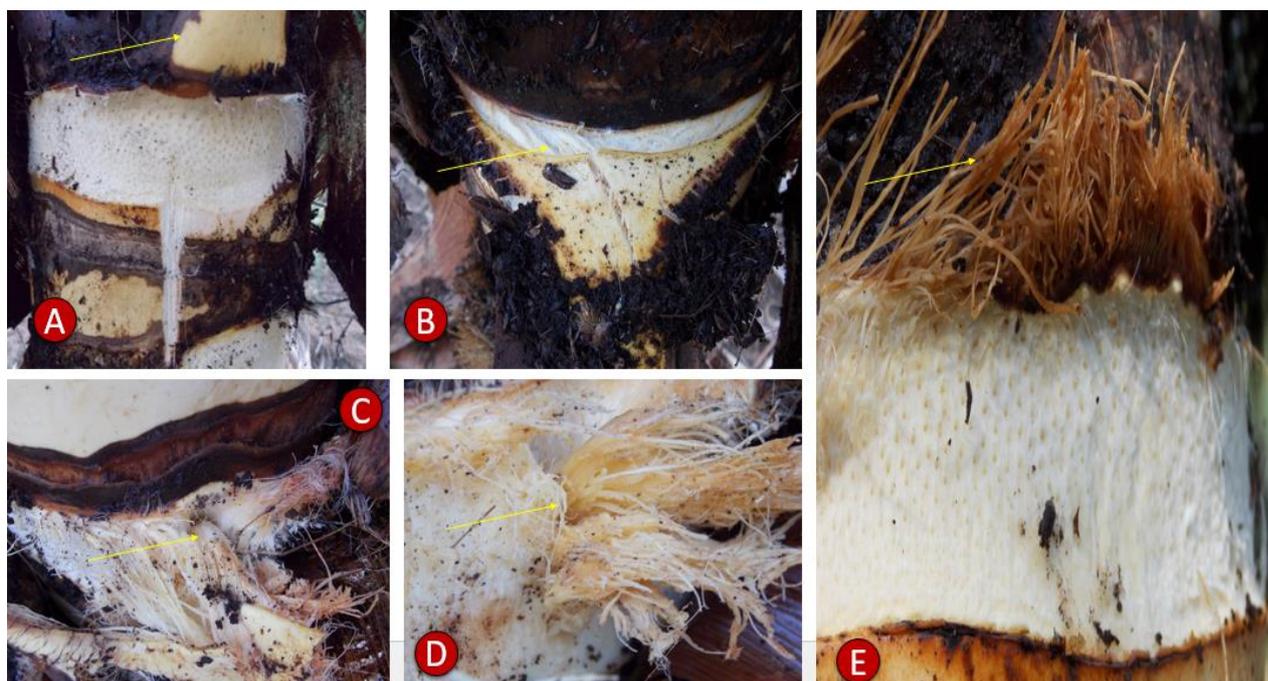
**Figura 61** - Formação dos espirais no coqueiro, formada a partir da seqüência de Fibonacci. Setas vermelhas, espirais estruturados nos frutos. Setas amarelas espirais notórios nas folhas.



**Figura 62** – Sequência ordenada nos feixes das folhas e a espiralidade nos ramos que compõem o cacho.

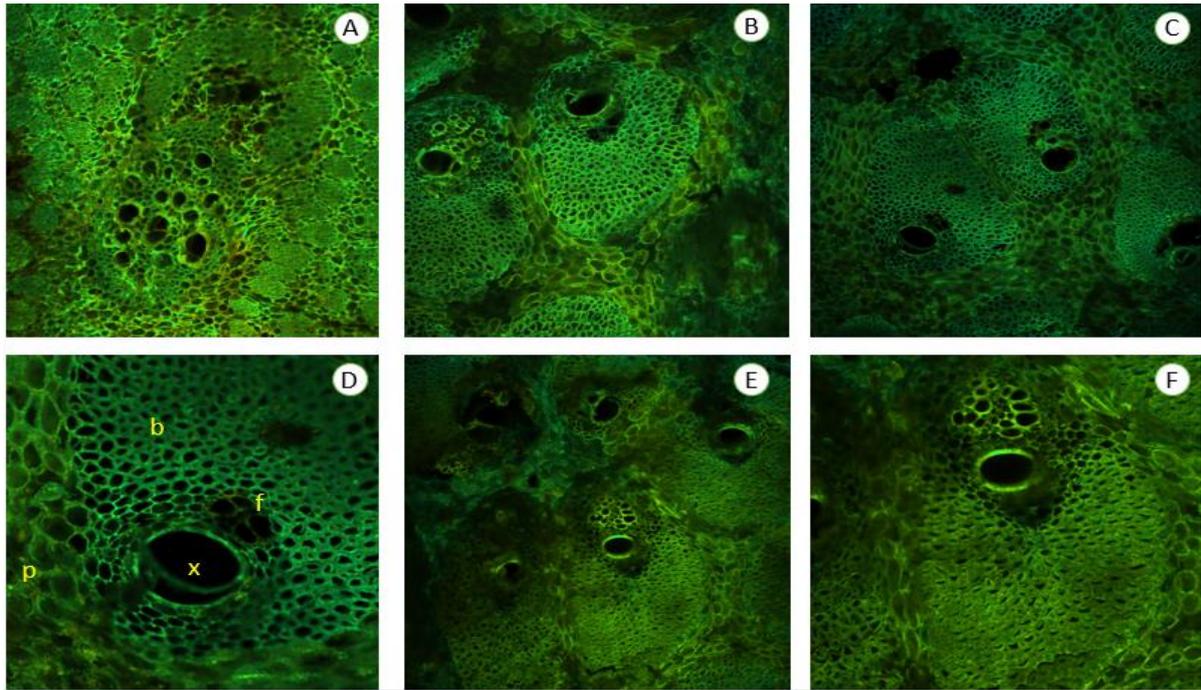
Os galhos que formam a inflorescência e os frutos não se sobrepõem, justificando a melhor estabilidade dos frutos no cacho.

Notou-se também que os feixes que compõem a espata/inflorescência parecem não ter a mesma organização e distribuição como nas folhas. A Figura 63 ilustra esta informação.

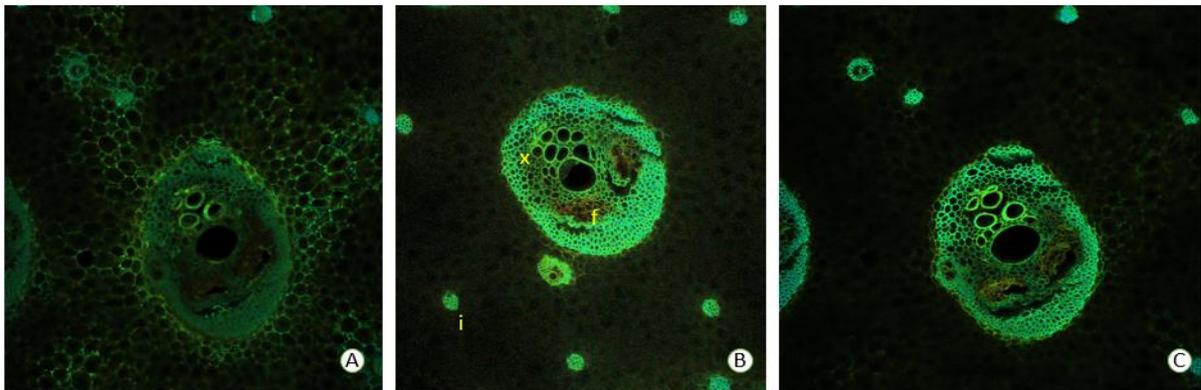


**Figura 63** – Feixes que conectam a espata/inflorescência no estipe. A seta amarela reforça essa região.

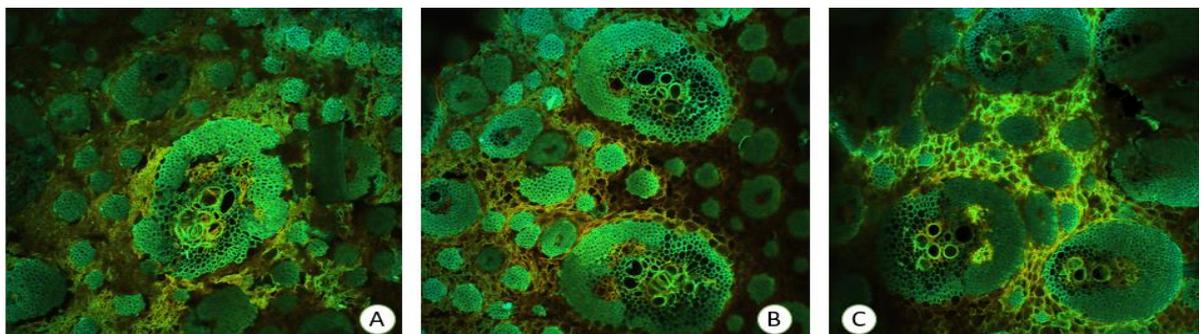
As Figuras 64 a 66 apresentam imagens a partir de cortes citológicos do estipe, folhas e inflorescências para compreensão dos feixes vasculares.



**Figura 64** – As imagens de tecidos de estipe com o corte transversal (A) e horizontal (B-F) foram coletadas usando uma objetiva EC Plan-Neufluar 10x/0.30 M27 e lasers 458 (35%) nm para excitação e filtros de emissão 463-690 nm, com pinhole ajustado para 1 *airy unit* em cada canal, formato da imagem de 1024x1024 e zoom óptico (A), (B), (C) e (E) de 0,6x; (D) de 2,6x e (F) 1,1x. Legenda: x = xilema, f = floema, p = parênquima, b = revestimento fibroso.



**Figura 65** – As imagens de tecidos das folhas com o corte horizontal foram coletadas usando uma objetiva EC Plan-Neufluar 10x/0.30 M27 e lasers 458 (35%) nm para excitação e filtros de emissão 463-690 nm, com pinhole ajustado para 1 *airy unit* em cada canal, formato da imagem de 1024x1024 e zoom óptico 0,6x. Legenda, x = Xilema, f = floema, i = grupos isolados de fibras



**Figura 66** – As imagens de tecidos da inflorescência com o corte horizontal foram coletadas usando uma objetiva EC Plan-Neufluar 10x/0.30 M27 e lasers 458 nm (35%) nm para excitação e filtros de emissão 463-690 nm para os fluoróforos, com pinhole ajustado para 1 *airy unit* em cada canal, formato da imagem de 1024x1024 e zoom óptico 0,6x.

A dissecação do coqueiro tornou-se uma atividade imprescindível para este trabalho, posto que foi necessário compreender: (a) a distribuição e formação dos feixes no estipe, folhas, meristema apical e inflorescências, para prosseguir com o estudo de translocação de agrotóxicos. Informações sobre a anatomia do coqueiro são extremamente ausentes na literatura, pouco discutidas e insuficientemente ilustradas; (b) instruir-se quanto à coleta das amostras para as análises no estipe.

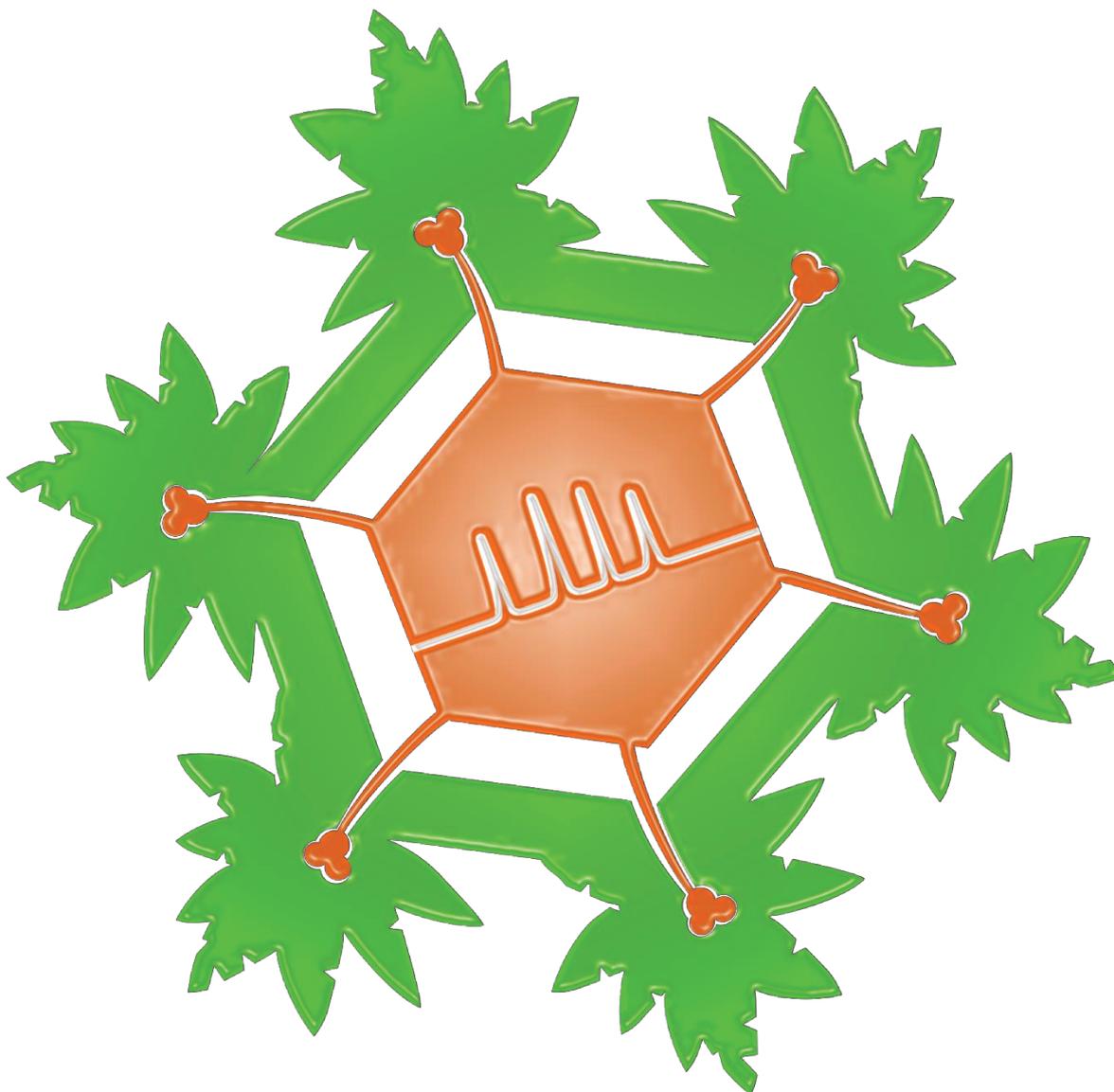
Esses resultados mostraram o quão complexo é a interação dos feixes próxima à copa (meristema apical), principalmente no acesso dos feixes para as folhas e inflorescências. Contudo, percebeu-se que os feixes que vão para as folhas são diferenciados, sua origem pode ter surgimento no centro do estipe, uma vez que, esses feixes, desde sua gênese, não sofrem tantos cruzamentos como os feixes das extremidades. Ainda, nota-se uma grande diferença na espessura dos feixes próximos à base do estipe e o meristema apical. Isso enfatiza a necessidade de aplicação dos agrotóxicos no estipe, em uma área que não esteja tão próxima do solo, para melhor captação de área para a introdução da solução de agrotóxicos, e assim, uma melhor eficiência de translocação, sobretudo nos coqueiros híbridos em que apresentam estipe delgado.

De acordo com Tomlison (1991)<sup>54</sup>, a respeito da anatomia vascular das palmáceas, a distribuição dos feixes pode seguir um modelo/diagrama, porém, não são específicos para o coqueiro. Entretanto, o modelo mais próximo e propício que se considera para o coqueiro foi proposto por Desfontaines (1798), redesenhado por Monoyer (1925), que afirmaram que as fibras vão do centro para circunferência, num sentido oposto, e que os feixes centrais são anexados às folhas mais jovens do centro da gema, deslocando-se gradualmente para a periferia do caule, e os novos feixes tem origem interna ou endógena. Esta afirmação torna-se importante porque muitos destes feixes se dirigem para as folhas. É importante que a introdução da calda de agrotóxicos, infundada ou injetada, através de orifícios criados por estas técnicas, atinjam o centro do estipe.

O meristema apical, também conhecido como palmito, é também uma fonte de alimento e o coração da palmeira, sendo o único ponto de crescimento do coqueiro. Nesta área

congregam-se uma infinidade de folhas e inflorescências imaturas entrelaçadas, que gradativamente, desprende-se em espiral, apontando-se como flecha (ainda fechada) no topo do coqueiro. Com o tempo, o pecíolo cresce, os folíolos se abrem, a folha cria peso/massa e, em seguida, concebe o melhor ângulo para captação da luz solar, estimulando-se a transpiração/evaporação da água.

A contextualização multidisciplinar deste trabalho propôs romper a carência de informações literárias abordando as partes estruturais do coqueiro, a fim de otimizar o tratamento endoterápico cuja translocação dos agrotóxicos não parta apenas de um único de ponto vista, seja ele, químico, botânico ou agrônomo. Objetivou-se também assimilar os principais conceitos anatômicos da planta para propor um tratamento eficiente ao utilizar os agrotóxicos. Além disso, observou-se o equilíbrio existente entre a translocação-transpiração, bem como pode ser facilmente percebido, a sequência de Fibonacci nas folhas, frutos, como em várias outras partes do coqueiro. Por conseguinte, se constatou que o coqueiro contém uma arquitetura com uma estabilidade perfeitamente robusta e elaborada, além de uma comunicação fibrosa interligada.



## Capítulo 6

Condições de análise dos agrotóxicos selecionados pela técnica de cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS); desenvolvimento de métodos analíticos de extração para o estipe, albúmen sólido e água-de-coco; validação dos métodos de análise.

O método escolhido para a extração dos agrotóxicos foi o método QuEChERS com modificações do procedimento original descritos na literatura<sup>19</sup> e como técnica de análise a UHPLC-MS/MS. Não há o registro na literatura o emprego do método QuEChERS para a determinação de agrotóxicos em partes peculiares da planta, como o estipe e a divisão do fruto em duas matrizes, água-de-coco e albúmen sólido, que foram analisados separadamente.

## **6 – Otimização das condições do UHPLC-MS/MS para a determinação dos agrotóxicos selecionados em amostras de coqueiro**

A cromatografia líquida foi a técnica de análise escolhida, porque apresenta vantagens para quantificações quando se trabalha com agrotóxicos polares e não voláteis e, ao ser acoplada ao detector MS/MS do tipo triplo quadrupolo, oferece alta seletividade com a ferramenta SRM, além de selecionar uma reação de fragmentação para a identificação/quantificação dos agrotóxicos e dos seus produtos de transformação<sup>190,199</sup>.

Foram realizadas injeções diretas, também chamadas de infusão direta no espectrômetro de massas de soluções analíticas padrão de 0,5 mg L<sup>-1</sup>, para todos os compostos estudados. Deste modo, foi possível selecionar e otimizar o modo de ionização, no caso ESI positivo para todos os compostos, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e íons produtos, bem como, a voltagem do capilar. Foram avaliadas as transições, no modo de SRM para a quantificação e confirmação dos compostos avaliados.

As escolhas por dois aditivos na fase móvel geraram melhores intensidades e respostas reprodutíveis. Para os analitos em estudo, com a utilização de ácido fórmico no modo de ionização positivo há formação de íons  $[M + H]^+$  e, no caso do formiato de amônio, ocorre a formação de adutos de amônio  $[M + NH_4]^+$ , os quais impedem a formação de adutos de sódio com os agrotóxicos, que podem ser formados espontaneamente, com alguns analitos quando se utiliza a ionização por ESI<sup>200</sup>.

A Tabela 12 contém os parâmetros de cada padrão analítico dos agrotóxicos selecionados utilizando o espectrômetro de massas, avaliados mediante a realização de infusão direta, como tempo de retenção ( $t_R$ ), massa molar, íon precursor, íon produto, voltagem do cone,

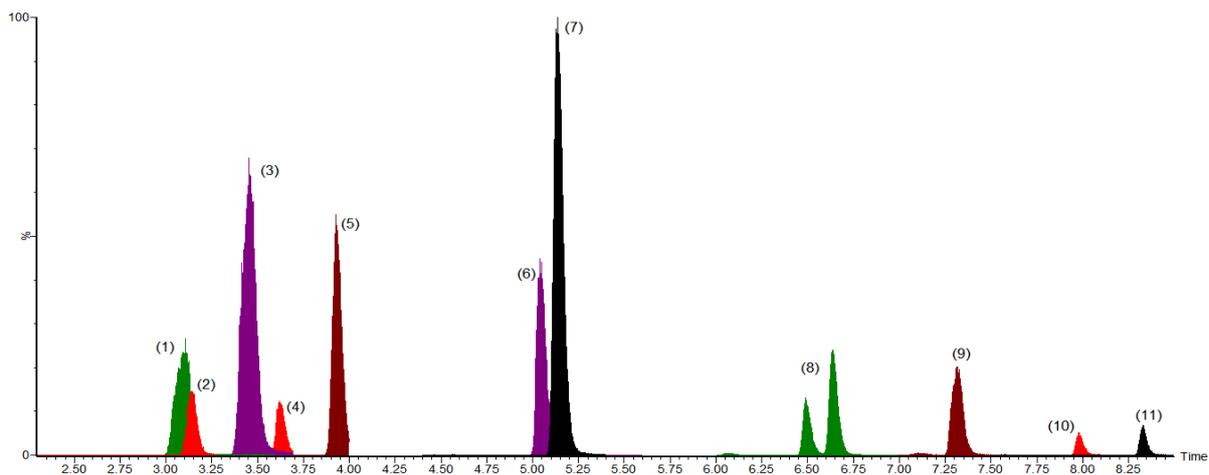
energia de colisão (eV) no modo ESI positivo, mediante o modo de aquisição SRM para a quantificação e confirmação de cada analito estudado.

**Tabela 12** – Agrotóxicos avaliados,  $t_R$  e massa molar e parâmetros do MS/MS para análise dos agrotóxicos.

Agrotóxicos	$t_R$ <sup>b</sup> (min)	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Transição de quantificação (m/z)	Voltagem do cone (V)	Transição de confirmação (m/z)
3-OH-carbofurano	3,94	237,2	238,0 > 163,0 (16)	25	238,0 > 181,0 (10)
Carbendazim	3,11	191,2	192,1 > 132,1(28)	24	192,1 > 160,1(18)
Carbofuran	5,14	221,3	222,1 > 123,0 (16)	25	222,1 > 165,1 (16)
Carbosulfano	8,33	380,5	381,3 > 118,0 (22)	31	381,3 > 76,0 (34)
Ciproconazol <sup>a</sup>	6,49 6,64	291,8	292,2 > 70,2 (18)	27	292,2 > 125,1 (24)
Difenoconazol	7,31	406,3	407,0 > 111,1 (60)	37	407,0 > 251,1 (25)
Imidacloprido	3,62	255,7	256,1 > 175,1 (20)	23	256,1 > 209,1 (15)
Tiabendazol	3,45	201,2	202,0 > 175,2 (25)	42	202,0 > 209,1 (30)
Tiametoxam	3,14	291,7	292,2 > 132,0 (22)	19	292,2 > 211,2 (12)
Tiofanato-metilico	5,04	342,4	343,2 > 151,0 (21)	23	343,2 > 311,1 (11)
Espirodiclofeno	7,98	411,2	412,2 > 71,2 (13)	22	411,2 > 313,0 (13)

<sup>a</sup>Ciproconazol – Isômeros; Energia de colisão (eV) é dado em parênteses; <sup>b</sup>  $t_R$  - Tempo de retenção; m/z – razão massa-carga

A Figura 67 apresenta o cromatograma obtido a partir dos íons selecionados no modo de aquisição SRM para as soluções analíticas preparadas em acetonitrila (A), na concentração de 20 µg L<sup>-1</sup>.



**Figura 67** – Cromatograma dos íons selecionados obtido por UHPLC-MS/MS a partir da solução analítica dos agrotóxicos em acetonitrila numa concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . Identificação dos compostos: (1) Carbendazim, (2) Tiametoxan, (3) Tiabendazol, (4) Imidacloprido, (5) 3-OH-carbofurano, (6) Tiofanato-metílico, (7) Carbofurano, (8) Ciproconazol (isômero), (9) Difenconazol, (10) Espirodiclofeno, (11) Carbosulfano.

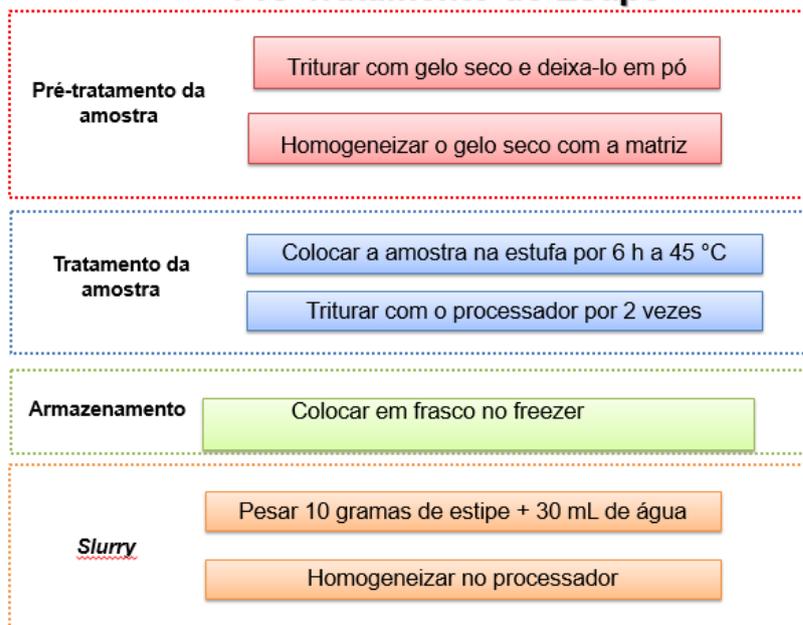
## 6.1 – Desenvolvimento do método para a determinação de agrotóxicos

### Método A:

**Estipe** – Devido à heterogeneidade do estipe com partes secas, leves e densas, foi necessário a introdução de água ao meio para a formação de uma lama (*slurry*) na proporção de 1:3 (estipe e água deionizada ultrapura, m/m), como exemplo, 10 g de estipe para 30 g de água deionizada ultrapura, respectivamente. O objetivo deste preparo foi homogeneizar a amostra e facilitar a penetração da acetonitrila na etapa de extração. Uma característica do estipe é o tamanho das fibras, por isso é adequado um processo de trituração para aumento da área superficial. Este procedimento expõe ainda mais a fibra durante a extração dos agrotóxicos já que, os fluxos de nutrientes e agrotóxicos encontram-se nos interstícios dos feixes vasculares fibrosos que compõem toda a estrutura do estipe. A trituração foi realizada através de um processador moinho analítico após a secagem da fibra, tornando-a quebradiça. A estrutura da fibra é compacta e é difícil triturá-la sem que esteja completamente seca. Além disso, a secagem do estipe, homogeneizada juntamente com o gelo seco pode prevenir a oxidação. A sequência das etapas do pré-tratamento do estipe está descrita no fluxograma apresentado na Figura 68.

(I)

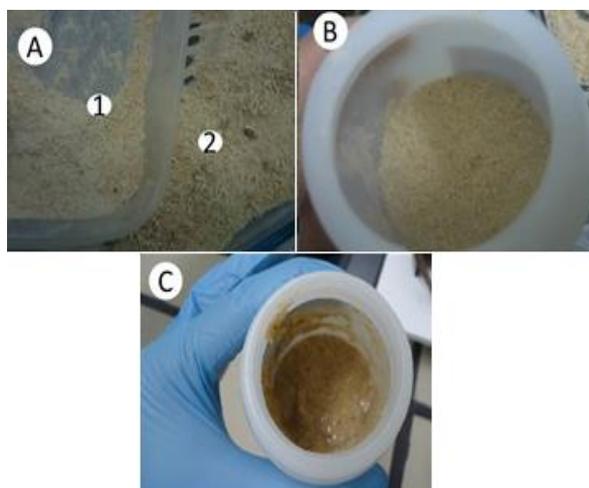
## Pré-Tratamento do Estipe



(II)

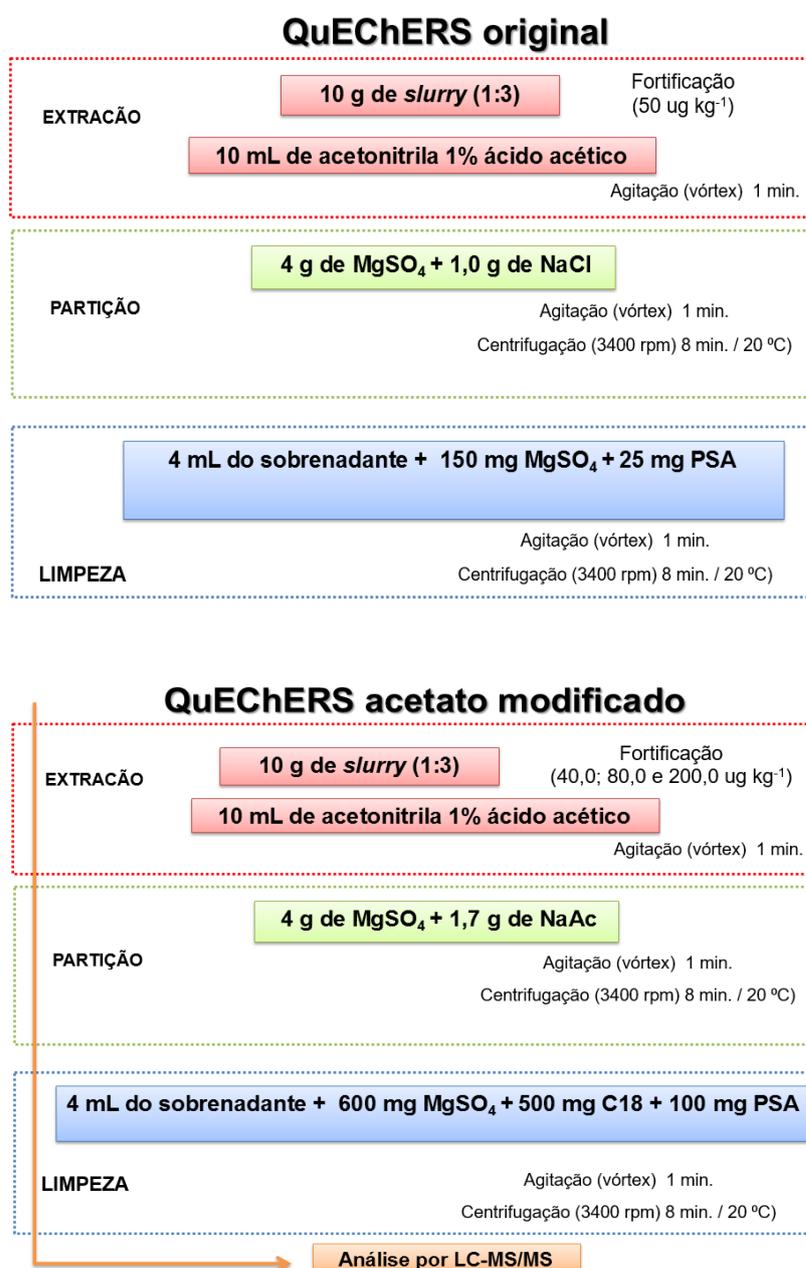


(III)



**Figura 68-** Etapas do pré-tratamento do estipe. (I) Etapa realizada no procedimento de pré-tratamento do estipe, que antecede a extração dos agrotóxicos. (II) Fotografias mostrando o pré-tratamento do estipe: (A) amostras identificadas na estufa após a adição de gelo seco; (B) aspecto do estipe após a secagem; (C) amostras acondicionadas e identificadas em sacos plásticos estéreis. (III) Fotografias mostrando o tratamento do estipe: A) 1- Estipe após a trituração com o moinho analítico; 2- Estipe após o tratamento com o gelo seco e estufa. B) Estipe antes da hidratação. C) Estipe após a hidratação (*slurry*).

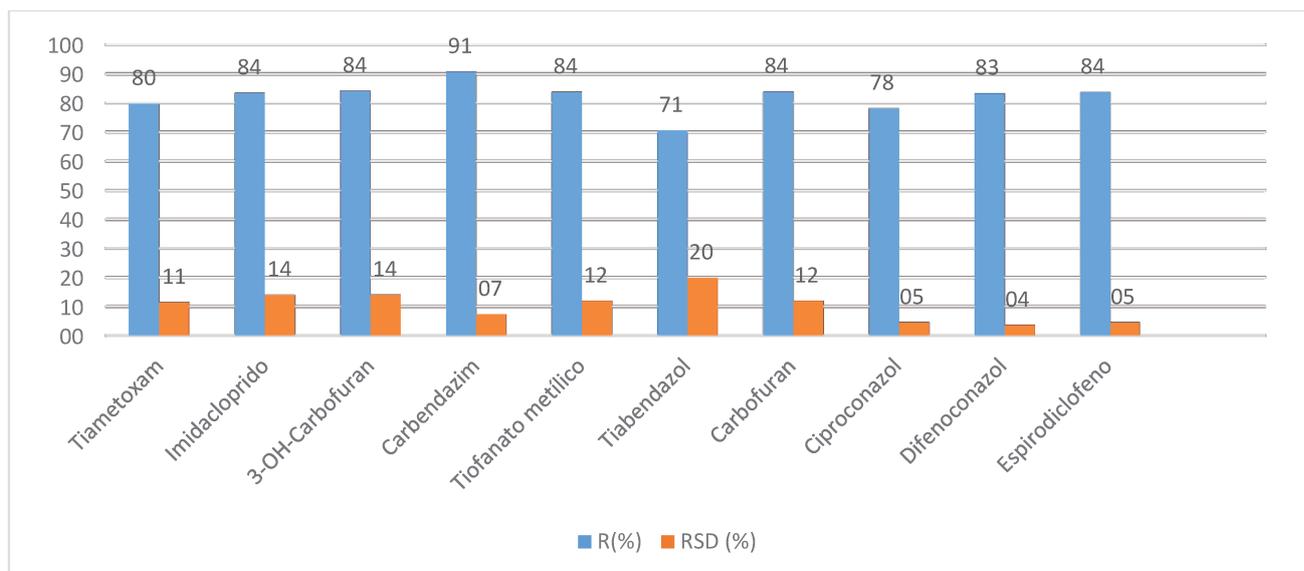
Este pré-tratamento foi fundamental para obter: a) uma amostra homogeneizada e padronizada; b) facilitar a pesagem, c) minimizar o risco de oxidação do estipe, já que este processo foi interrompido com o gelo seco, e d) preservar os analitos. Após o método de pré-tratamento do estipe foram realizados os testes de extração 1 e 2, sendo o teste 1 o método QuEChERS original<sup>19</sup> e o teste 2, o QuEChERS-acetato modificado<sup>198</sup>. Quando o estipe foi aquecido na estufa, notou-se que o parênquima foi reduzido, e o feixe vascular ficou mais exposto. A Figura 69 apresenta o esquema dos métodos QuEChERS testados.



**Figura 69** – Representação esquemática do método QuEChERS original e QuEChERS acetato modificado utilizados na extração dos agrotóxicos em amostras de estipe.

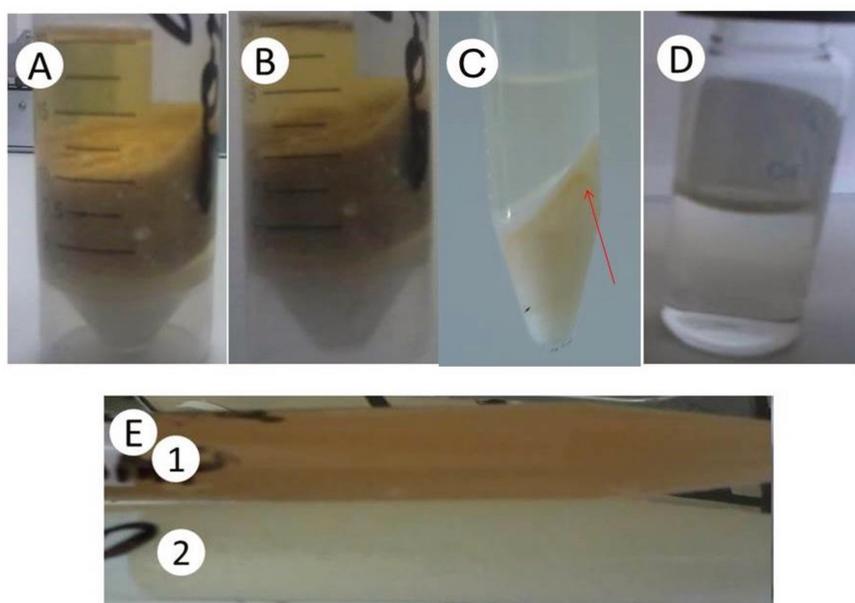
As extrações dos dois métodos foram realizadas no estipe “branco” e avaliadas em função da quantidade de resíduo gerado nas etapas de extração. Ambos os extratos finais foram filtrados em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  e secos sob fluxo de nitrogênio. Nesta etapa, observou-se a coloração e pesaram-se os frascos (*vials*) para verificar a formação dos resíduos por gravimetria. Estes testes preliminares foram fundamentais, pois se evitou que resíduos processados durante a extração saturassem o sistema cromatográfico, reduzindo os danos e preservando a vida útil dos selos, da coluna, o entupimento de tubulações e dos filtros do equipamento. Concluiu-se que o QuEChERS original formou um volume pronunciado de resíduos, tanto na coloração como em massa, sendo descartado como método de extração para o estipe. Por outro lado, o QuEChERS acetato diminuiu a extração de co-extrativos. Notou-se que, uma maior quantidade de sais empregados na etapa de limpeza do QuEChERS acetato em comparação com o QuEChERS original foi eficiente para a redução residual, além do clareamento do extrato.

Para os testes iniciais de eficiência de extração (recuperação) no estipe, foi realizada uma curva analítica com 6 concentrações em acetonitrila e no extrato da matriz (estipe) que corresponderam à: 25,0; 50,0; 100,0; 125,0; 500,0 e 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo realizada uma triplicata no nível de fortificação de 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $n=3$ ) na matriz. As soluções foram diluídas na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura para a injeção no sistema cromatográfico, resultando em concentrações finais de: 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados dos níveis de recuperações (R%) e desvio padrão relativo (RSD%) do método de extração QuEChERS acetato modificado e análise por UHPLC-MS/MS são ilustrados na Figura 70:



**Figura 70** – Resultados das análises utilizando o método QuEChERS acetato modificado (Teste 2) e determinação por UHPLC-MS/MS e extração do método QuEChERS modificado do estipe fortificado na concentração de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Os resultados mostraram que a extração, partição e limpeza usando o método QuEChERS acetato modificado e análise por UHPLC-MS/MS forneceram resultados satisfatórios, com médias entre 70 e 120% e RSD inferiores ou iguais a 20%. A Figura 71 apresenta os extratos obtidos durante algumas etapas do procedimento de extração do método.



**Figura 71** - Fotos dos extratos durante algumas etapas do procedimento de extração do QuEChERS acetato modificado. A e B) Etapa de extração/partição C) Etapa de limpeza (*clean up*), a seta indica uma camada lipídica. D) Extrato filtrado. E) Tubos de ensaios utilizados na etapa de limpeza, após a extração em contato com água na limpeza. 1 - indicando a oxidação do procedimento de extração QuEChERS original; 2 - indicando o procedimento de extração QuEChERS acetato modificado sem a oxidação do estipe.

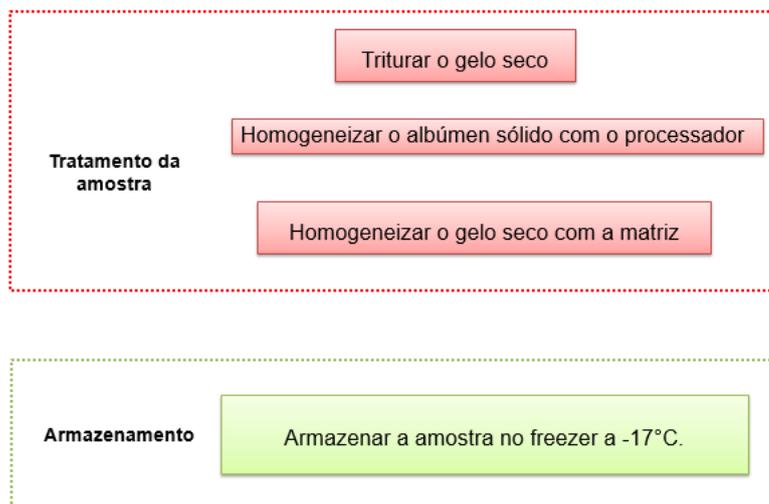
A Figura 71 mostra o clareamento do extrato obtido pelo QuEChERS acetato durante a execução da extração. É importante destacar que, neste mesmo teste houve a formação do tampão (pH 4,5-5,0) prevenindo o risco de oxidação do estipe durante a extração no meio tamponado. A partir do momento que a amostra é extraída, caso não seja bem refrigerada ou ficar muito tempo fora da geladeira para descongelar, ela pode escurecer e ficar com uma tonalidade marrom escuro. O estipe próximo à copa possui um diâmetro/espessura mais fina que o estipe na zona próximo ao solo e numa altura intermédia e, muitas vezes, na extração pode apresentar uma coloração esverdeada, o que sugere clorofila.

A utilização de acetato de sódio influenciou, principalmente, na recuperação de compostos polares. Já a acetonitrila permitiu a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades, além de extrair uma menor quantidade de compostos lipofílicos da matriz, como pigmentos, ceras, gorduras<sup>19,198</sup>. O PSA juntamente com o C18 tem a capacidade de remover açúcares, alguns pigmentos, ácidos graxos, entre outros coextrativos da matriz que encontram-se ligados por ligações de hidrogênio<sup>178</sup>.

### **Método B:**

**Albúmen sólido** - Assim como no estipe, não há registro na literatura de utilização do método QuEChERS para extração e da determinação por UHPLC-MS/MS para o albúmen sólido. Ao abrir o fruto e retirar a água-de-coco, o albúmen sólido ao ser exposto ao ambiente, passou a ter uma coloração roseada, que antes era branca, indicando um processo de oxidação. Não se sabe se esse processo oxidativo degrada o agrotóxico. Para evitar essa ocorrência, optou-se por um tratamento que está descrito no fluxograma da Figura 72.

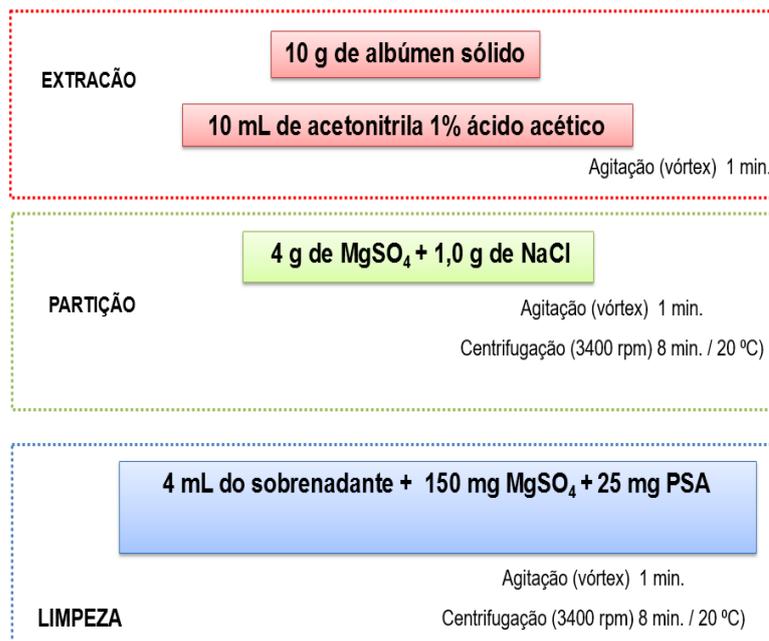
## Tratamento Albúmen sólido



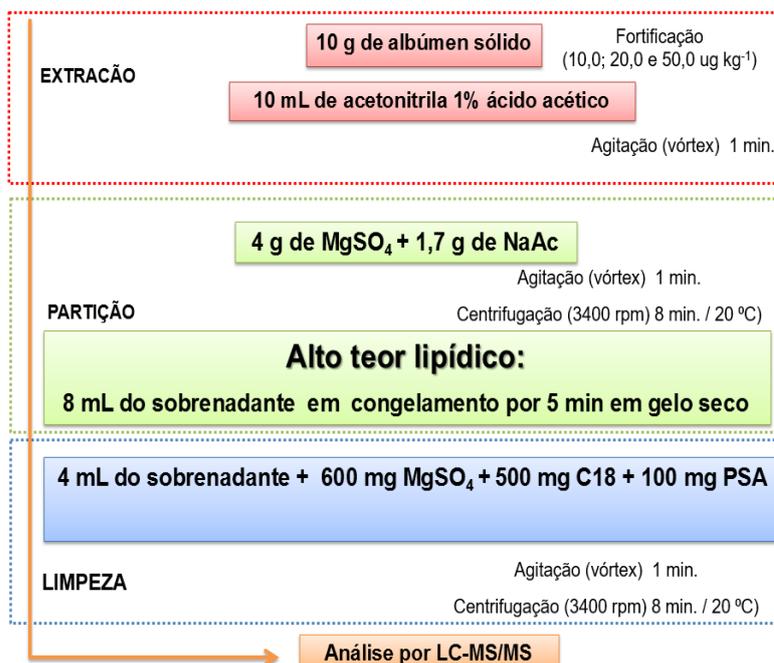
**Figura 72** – Fluxograma sequencial de tratamento do albúmen sólido

Após o tratamento do albúmen, as amostras foram colocadas em frascos de polietileno e armazenadas no freezer a uma temperatura de  $-17^{\circ}\text{C}$ . Com este procedimento, foi possível verificar a interrupção oxidativa do albúmen. Antes de serem submetidas ao processo de extração, as amostras foram descongeladas. Após a otimização no tratamento do albúmen, as amostras foram submetidas a dois métodos de extração, assim como no procedimento do estípe: QuEChERS original e QuEChERS acetato modificado com o objetivo de avaliar o resíduo gerado nas etapas de extração, conforme mostra os fluxogramas da Figura 73.

## Albúmen sólido - QuEChERS original



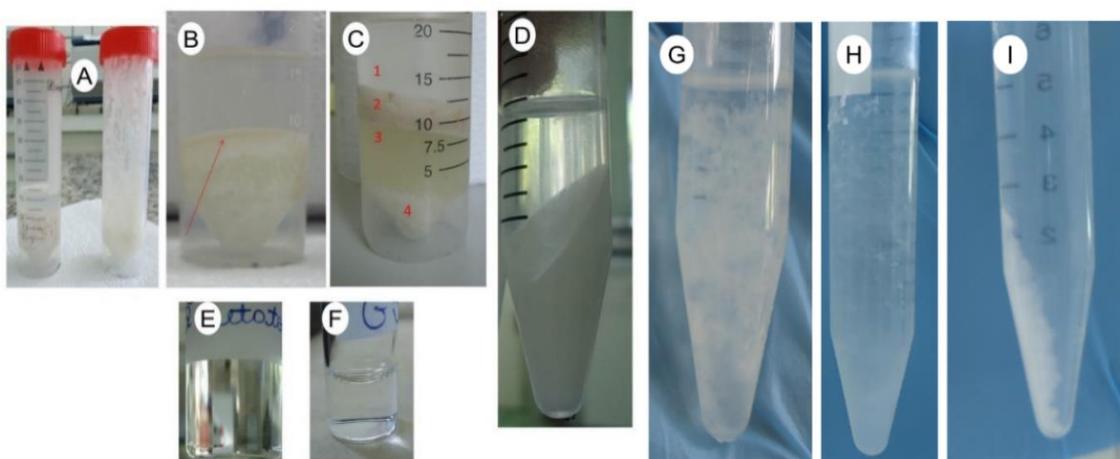
## Albúmen Sólido – QuEChERS modificado



**Figura 73** – Representação esquemática do método QuEChERS original e QuEChERS acetato modificado utilizados na extração dos agrotóxicos em amostras de albúmen sólido.

Assim como foi realizado no estípe, os extratos foram submetidos à observação da coloração e testes por gravimetria. Após a sequência dos procedimentos, ambos os extratos finais foram filtrados em filtros de 0,22 µm e 1 mL das amostras foi recolhido e seco em fluxo de nitrogênio. Os resultados confirmaram que em termos de coloração e massa, ambos os extratos

não formaram resíduos expressivos nos *vials*. Por isso, optou-se em avaliar o QuEChERS acetato, sendo o método similar testado para o estipe, com a adição de uma etapa de particionamento (*freezing-out*), que é o congelamento do extrato em uma caixa térmica contendo gelo seco por 5 min, seguido de uma prévia centrifugação de 1 minuto para a decantação e precipitação lipídica. O albúmen sólido contém alto teor de gordura e à medida que o fruto amadurece, a porcentagem lipídica aumenta e, conseqüentemente, a dificuldade de extração dos agrotóxicos. A Figura 74 apresenta algumas etapas deste procedimento de extração do Teste 2.



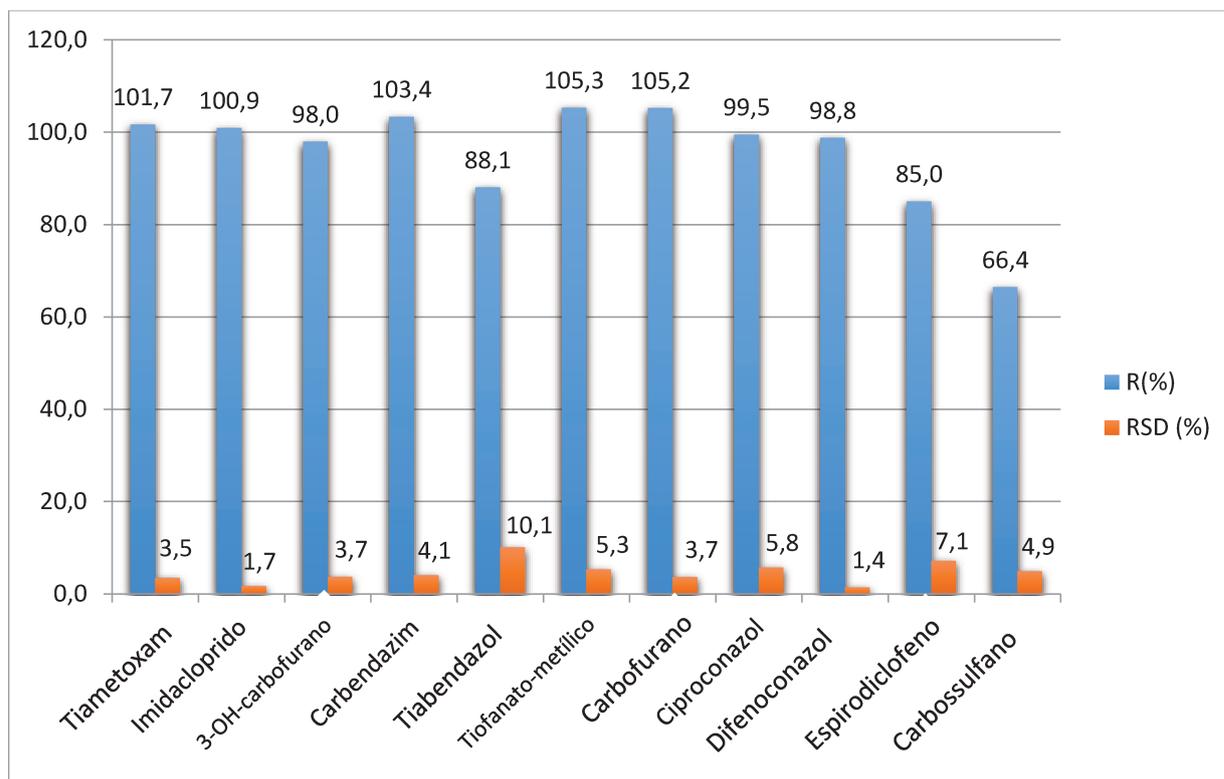
**Figura 74** – Fotos dos extratos obtidas em algumas etapas do procedimento de extração do QuEChERS – acetato modificado. A) Etapa de extração/partição; B) Etapa de partição: a seta indica a formação de uma camada lipídica; C) A formação de fases na etapa de partição após a centrifugação: 1 - Fase orgânica, 2 - Albúmen sólido, 3 - Fase Aquosa e 4 - Sais utilizados na etapa de extração/partição; D) O extrato após a etapa de (*clean-up*) limpeza; E) e F) Os extratos previamente filtrados e prontos para serem analisados, a diferença entre os dois foi a utilização de gelo seco no procedimento de extração dos testes; G) e H) Fotos após o congelamento horizontal dos extratos em gelo seco por 5 min; e I) Extrato após o congelamento e centrifugação por 40 s.

Em casos de amostras com alto teor lipídico, a solubilidade utilizando uma camada de acetonitrila é limitada. O excesso lipídico na amostra forma uma camada adicional em que os analitos podem particionar e se perderem. Assim, a extensão das perdas depende da quantidade de lipídios na amostra, bem como da polaridade dos analitos, sendo que os mais apolares mostram maiores perdas. Por isso, a importância da utilização de um padrão interno que evidencie os problemas na extração. As gorduras e ceras podem ser separadas a partir de um grande volume de extrato, que é congelado por um tempo otimizado. O congelamento (*freezing-out*) remove lipídeos, graxas, açúcares e outros coextrativos com baixa solubilidade em acetonitrila.

Sobhazadeh *et al.*,<sup>201</sup> utilizaram o mecanismo de limpeza por congelamento em amostras de óleo de dendezeiro (*Elaeis guineenses*) e deixaram os extratos estocados horizontalmente no *freezer* em -20°C por 2 horas. A fase orgânica contendo o solvente orgânico e os compostos extraídos se mantiveram líquido e subiram ao topo, enquanto que os lipídios foram congelados e precipitados no fundo dos tubos. Assim, a precipitação à baixa temperatura seguida pelo procedimento de limpeza d-SPE foi efetiva para remover os interferentes da amostra oriundo da palmácea, pela separação com a precipitação, decantação e filtração dos lipídeos.

Lee *et al.*<sup>202</sup> descreveram um método QuEChERS citrato para extração de agrotóxicos em páprica através do particionamento com gelo seco em substituição ao tampão para extrair e particionar agrotóxicos na primeira etapa da extração. Esta estratégia pode ser uma alternativa para a análise de multirresíduos de agrotóxicos de ampla polaridade em diversas matrizes.

Nos testes realizados no albúmen sólido, as soluções foram preparadas nas seguintes concentrações para a confecção da curva analítica contendo 7 pontos para cada matriz: a) acetonitrila e; b) no extrato do albúmen sólido: 2,5; 5,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 250,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que para cada matriz, foram fortificadas três amostras (n=3) no nível de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Deste modo, todas as soluções foram diluídas na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura para a injeção no sistema cromatográfico, resultando em concentrações finais de: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os resultados das análises estão na Figura 75:



**Figura 75** – Eficiência de extração do método QuEChERS acetato modificado para o albúmen sólido fortificado na concentração de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  e análise por UHPLC-MS/MS.

Os resultados da eficiência de extração dos agrotóxicos variaram de 105,3 a 66,4 % com o desvio padrão relativo variando entre 1,7 a 10,1%. Os resultados foram satisfatórios, exceto o carbossulfano que apresentou recuperação abaixo do intervalo de 70-120% de recuperação esperada.

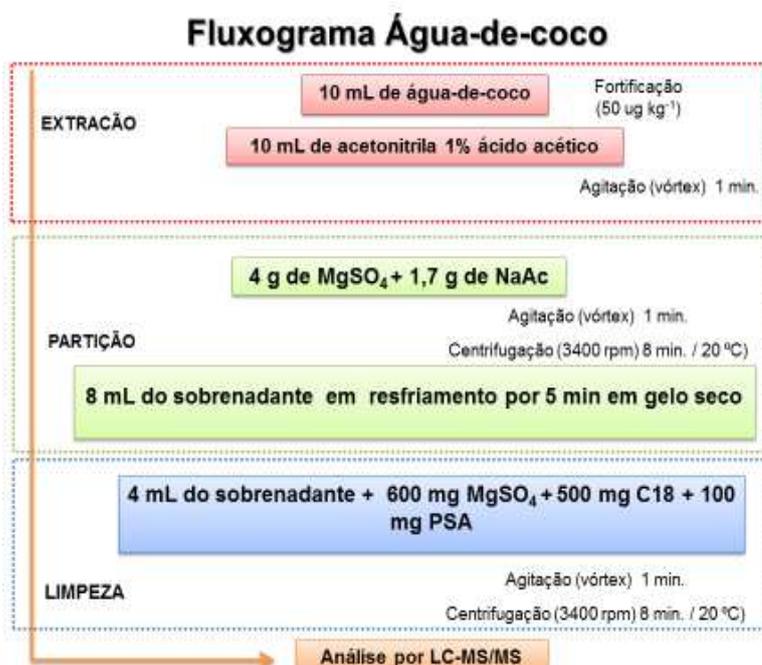
### **Método C:**

**Água-de-coco** – Assim como para o albúmen sólido e o estipe, não existem relatos na literatura utilizando os métodos QuEChERS e o UHPLC-MS/MS para a água-de-coco. O procedimento de extração e homogeneização da água-de-coco está descrito no item 3.2.2.

Como os resultados do albúmen sólido foram satisfatórios, optou-se em avaliar o mesmo método de extração para a água-de-coco. Além disso, ao empregar o mesmo método, seria possível observar interações dos agrotóxicos nas diferentes matrizes, dado que estas têm origem no mesmo fruto, porém com propriedades diferentes, como teor de água, gordura, proteína e açúcares. É importante mencionar que, tanto para a água-de-coco como para o albúmen, à

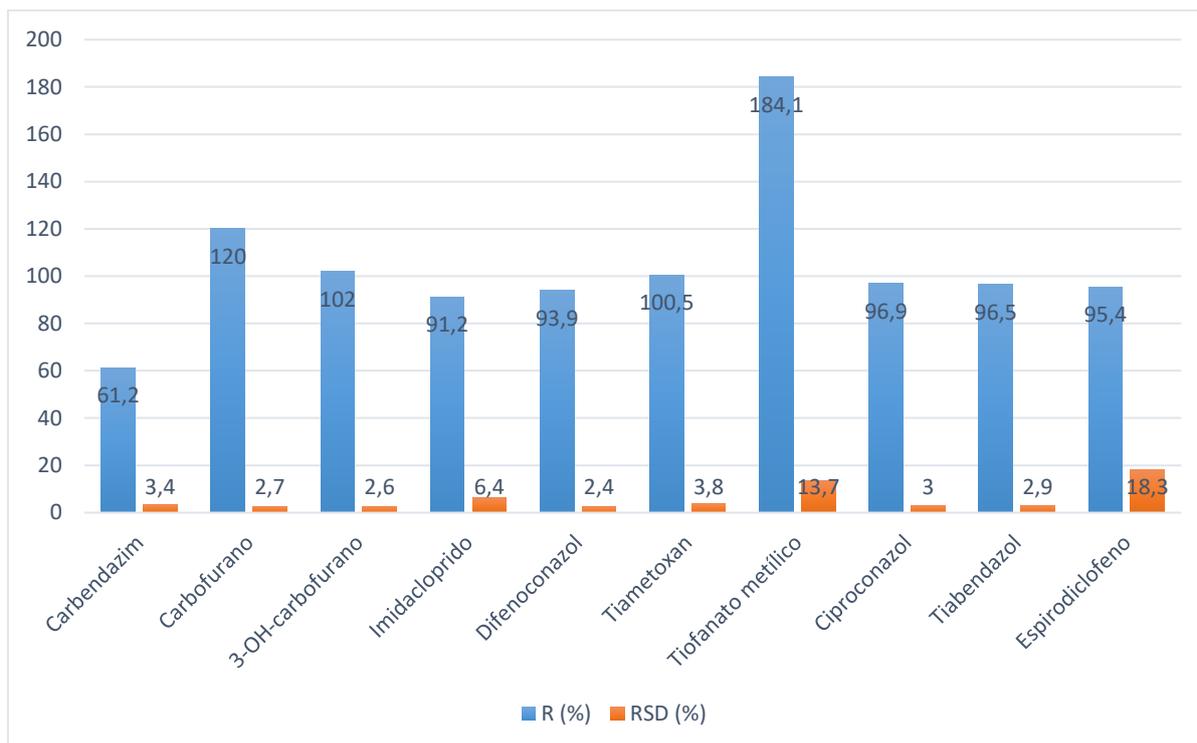
medida que o fruto amadurece, aumenta-se a dificuldade de extração dos agrotóxicos, em virtude do desenvolvimento dos tecidos endospermáticos. Por isso, a estratégia de congelamento se faz importante, para que haja a remoção desses coextrativos com baixa solubilidade em acetonitrila, através da decantação e precipitação desses interferentes.

As amostras foram submetidas à extração do método QuEChERS acetato modificado, conforme apresenta o fluxograma da Figura 76.



**Figura 76** – Representação esquemática do método QuEChERS acetato modificado utilizado na extração dos agrotóxicos em amostras de água-de-coco.

Nos testes realizados na água-de-coco, as soluções foram preparadas nas seguintes concentrações para a confecção da curva analítica contendo 7 pontos para cada matriz: a) acetonitrila e; b) no extrato da água-de-coco: 2,5; 5,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 250,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo que para cada matriz, foram fortificadas três amostras ( $n=3$ ) no nível de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Deste modo, todas as soluções foram diluídas na proporção 1:4 (v/v) em água ultrapura para a injeção no sistema cromatográfico, resultando em concentrações finais de: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , além do branco da amostra e três amostras fortificadas ( $n=3$ ) no nível de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os resultados estão mostrados na Figura 77.



**Figura 77** – Recuperação, R(%) e o desvio padrão relativo, RSD(%) para o método QuEChERS acetato modificado para a água-de-coco fortificado na concentração de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e análise por UHPLC-MS/MS.

Os resultados de recuperação foram satisfatórios para a maioria dos agrotóxicos e variaram de 91,2 a 120,0%, com desvio padrão relativo entre 2,4% a 18,3%, exceto o tiofanato-metílico e o carbendazim que extrapolaram o intervalo de recuperação esperado, num intervalo de 70-120%. Contudo, para matrizes complexas, como a água-de-coco, alguns guias de validação para resíduos de agrotóxicos como a ANVISA<sup>160</sup>, *Official Methods of Analysis of AOAC International* e *Food and Agriculture Organization (FAO)*<sup>203</sup>, expandem essa faixa de recuperação assegurando que, esses limites podem ser aceitáveis de 50%-150% com RSD  $\leq$  20%.

## 6.2 – Validação do Método QuEChERS Modificado para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Coqueiro (Estipe, Albúmen Sólido, Água-de-coco)

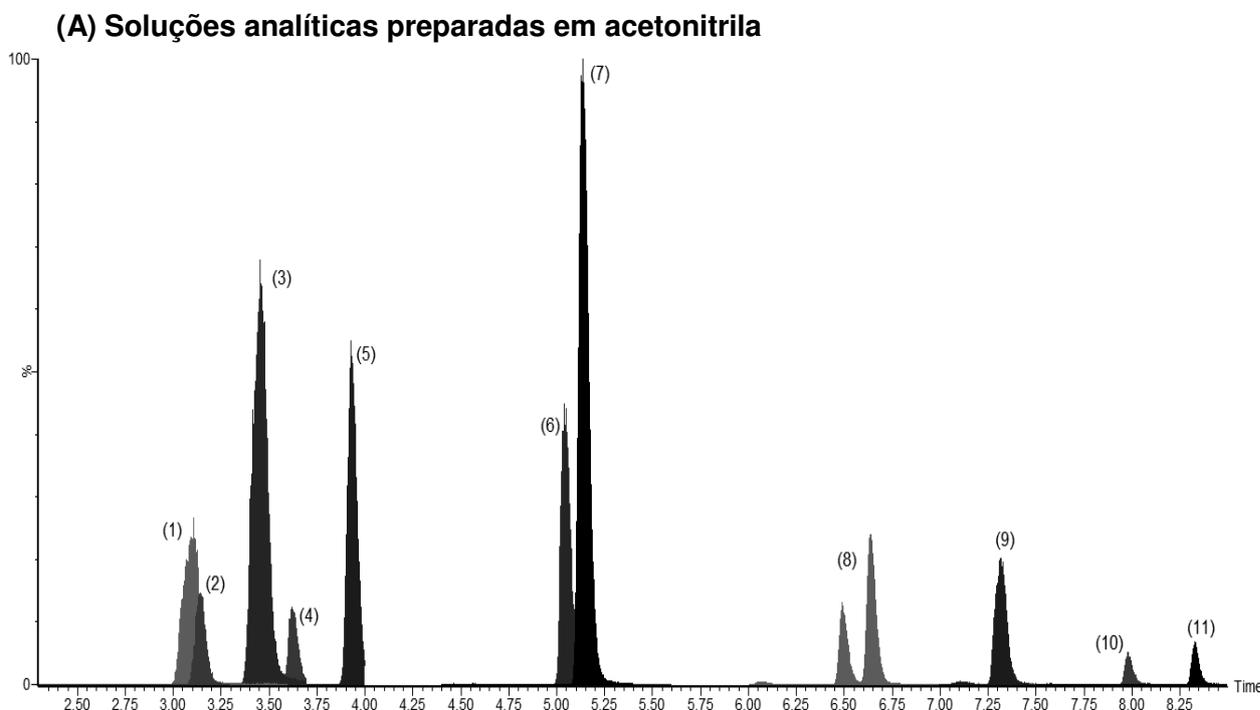
A validação do método analítico para a determinação de resíduos de agrotóxicos em estipe, água-de-coco e albúmen sólido foi realizada de acordo com a SANCO (2013)<sup>185</sup>. Para isto foram avaliados os parâmetros analíticos, como: curva analítica e faixa linear, seletividade, efeito matriz, limites de quantificação e detecção, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação).

A validação para o estipe, água-de-coco e albúmen utilizaram os seguintes métodos: a) o QuEChERS acetato modificado, como técnica de extração e b) UHPLC-MS/MS, como técnica de análise, mediante as condições dos fluxogramas descritos nas Figuras 68, 69, 72, 73 e 76 e na Tabela 12 referente aos íons.

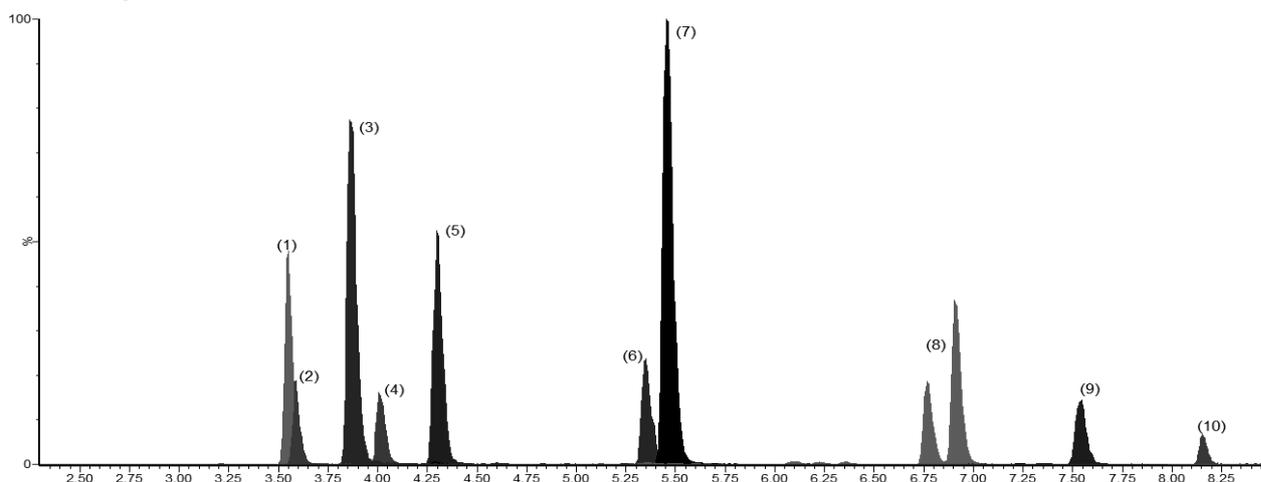
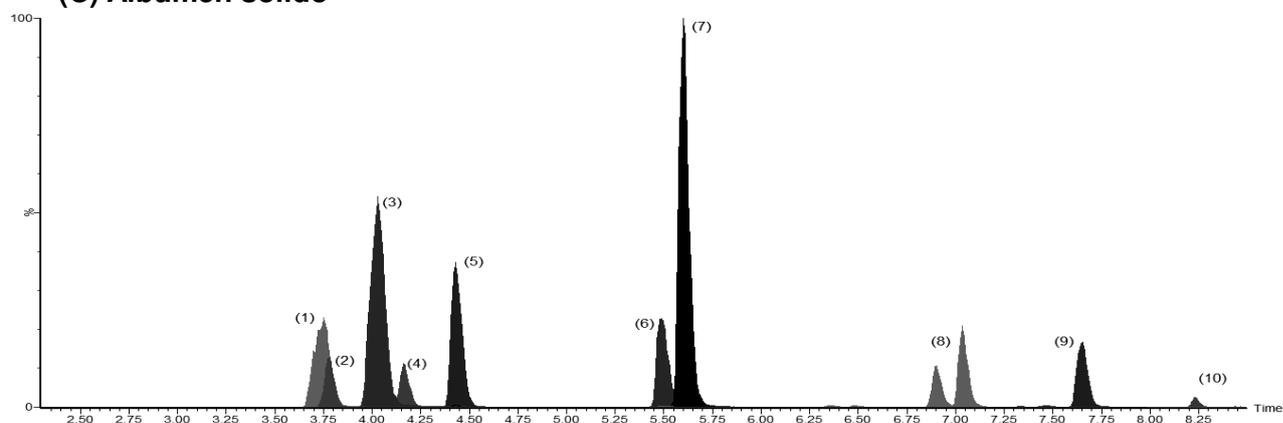
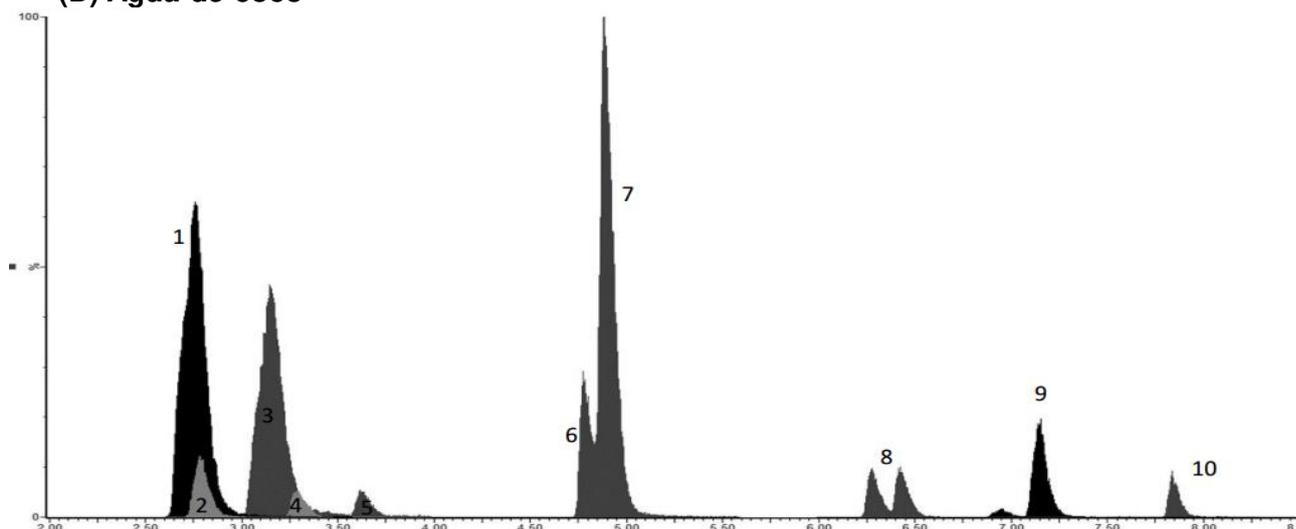
### 6.2.1 - Seletividade

A seletividade foi avaliada comparando os cromatogramas das amostras ausentes de analitos, também nomeada de “amostra branco”, com as amostras fortificadas em uma concentração conhecida.

A Figura 78 apresenta os cromatogramas obtidos a partir dos íons selecionados no modo de aquisição SRM para as soluções analíticas preparadas em acetonitrila (A), extrato do estipe (B), extrato do albúmen sólido (C) e extrato da água-de-coco (D), respectivamente, na concentração de 20 µg L<sup>-1</sup>.



Continuação

**(B) Estipe****(C) Albúmen sólido****(D) Água-de-coco**

**Figura 78** – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS a partir da solução analítica dos agrotóxicos em acetonitrila numa concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . Identificação dos compostos: (1) Carbenzazim, (2) Tiametoxan, (3) Tiabendazol, (4) Imidacloprido, (5) 3-OH-carbofurano, (6) Tiofanato-metílico, (7) Carbofurano, (8) Ciproconazol (isômero), (9) Difenconazol, (10) Espirodiclofeno, (11) Carbosulfano. (A) Cromatograma da solução analítica preparada em acetonitrila; (B) Cromatograma do extrato do estipe; (C) Cromatograma do extrato do albúmen sólido, (D) Cromatograma do extrato da água-de-coco, respectivamente, na concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Observa-se nos cromatogramas referentes ao estipe, albúmen sólido e água-de-coco a ausência do carbosulfano devido à degradação, identificado no cromatograma (A) com o número 11. Estes testes mostraram que não foi possível analisar/validar carbosulfano em amostras de estipe e fruto de coqueiro. Acredita-se que este composto sofra um processo degradativo durante a extração, sendo retirado de agrotóxicos selecionados, já que não foi possível quantificá-lo. Alguns estudos sugerem que este composto é facilmente hidrolisado a carbofurano e 3-OH-carbofurano sob condições ácidas. Segundo Soler *et al.*,<sup>204</sup>, a determinação de carbosulfano em frutas cítricas e vegetais é pouco estudada. Além disso, existe uma necessidade para a identificação em análises rotineiras, pois seus produtos de degradação como o carbofurano, 3-OH-carbofurano e 3-ceto-carbofurano são mais persistentes e muito mais tóxicos que o composto original, sendo o carbofurano, o metabólito mais tóxico.

### **6.2.2 – Determinação dos valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do instrumento e do método**

Os LOD e LOQ instrumentais foram de 0,75 e 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, para todos os agrotóxicos, enquanto que o LOQ do método foi de 10,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para a água-de-coco e albúmen sólido e 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o estipe, calculados pela curva analítica. Os agrotóxicos foram fortificados no branco da matriz na concentração de 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para todos os agrotóxicos na água-de-coco e albúmen sólido e 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o estipe, e tiveram valores de recuperação entre 50-120% e RSD abaixo de 20%. Os valores de LOQ para a maioria dos agrotóxicos, estava bem abaixo do LMR adotados pelas agências regulamentadoras como a ANVISA e a EU.

### **6.2.3 - Curva analítica, faixa linear, efeito matriz, exatidão (ensaio de recuperação) e precisão (repetitividade)**

Foram construídas três curvas analíticas a partir da solução padrão em acetonitrila e no extrato das matrizes “branco” (estipe, albúmen e água-de-coco), sendo cada matriz fortificada em oito níveis de concentração que corresponderam às concentrações 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 250,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para o albúmen sólido e água-de-coco, e para o estipe as seguintes concentrações: 10,0; 20,0; 40,0; 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

O estudo de linearidade do método foi realizado através dos gráficos de calibração mostrando a resposta do equipamento em função de diferentes concentrações do analito, baseando-se nos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) satisfatórios a partir de 0,99.

A exatidão do método foi realizada com a fortificação das amostras, antes da extração, em quintuplicata ( $n=5$ ) para cada um dos 3 níveis de concentração, avaliada pelos ensaios de recuperação. Os valores das médias percentuais de recuperação foram realizados em quintuplicata ( $n=5$ ) e o RSD em três níveis de concentração de 40,0; 80,0 e 200,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o estipe e 10, 20 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o albúmen e água-de-coco. A precisão intra-dia foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD), mediante a replicata das extrações e análise das amostras fortificadas. Já a precisão intermediária foi avaliada pela extração das amostras “branco” fortificadas em dias diferentes, sendo injetadas as soluções da curva analítica em uma única injeção. A precisão intermediária RSDpi (%) foi avaliada em dias diferentes em quintuplicata ( $n=5$ ) na concentração intermediária de 80  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o estipe e 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o albúmen e a água-de-coco.

A Tabela 13 apresenta os resultados referentes aos valores da faixa linear de cada agrotóxico, os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) para as equações das curvas analíticas em acetonitrila e nos extratos das matrizes (estipe, albúmen e água-de-coco), seguidos pela equação da curva analítica. A avaliação do efeito matriz foi realizada comparando as áreas obtidas em duas curvas analíticas nos mesmos pontos, uma no extrato da “amostra branco” para cada matriz individualmente e outra em acetonitrila. O efeito matriz para os agrotóxicos foi avaliado com base nas inclinações da reta do extrato da matriz e do solvente.

**Tabela 13** - Coeficientes de determinação ( $r^2$ ) das curvas analíticas em solvente e no extrato das matrizes, a descrição da equação do modelo matemático da curva analítica, a recuperação R(%) e o desvio padrão relativo RSD (%) em diferentes níveis de concentrações dos agrotóxicos estudados (n=5), a precisão intermediária RSD(%) avaliada pela recuperação (n=5) no nível de fortificação de 80  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , efeito matriz dos agrotóxicos a partir de soluções preparadas em acetonitrila e nas matrizes.

Agrotóxicos	Faixa linear $\mu\text{g L}^{-1}$	Matriz	Nível de fortificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )							EM <sup>b</sup>		Equação		
			R(%) (RSD(%))							(%)	$r^2$			
			10	20	40	50	80	200	20 <sup>a</sup>		80 <sup>a</sup>		solvente	matriz
3-OH-carbofurano	10-1000	Estipe			80(3)		91(3)	90(3)		104(6)	-26	0,9937	0,9984	12424,9x + 418,393
	2,5-250	A.S.**	94(11)	98(4)		101(2)		108(4)			+2	0,9937	0,9961	17116,3x+2712,63
	2,5-250	Água*	98(3)	103(3)		104(2)		100(4)			+4	0,9990	0,9989	35116,5x +871,44
Carbendazim	10-1000	Estipe			73(7)		85(6)	80(7)		87(6)	-55	0,9934	0,9979	10891x + 677,346
	2,5-250	A.S.**	84(8)	87(2)		90(3)		86(2)			-13	0,9934	0,9992	21048,1x+1994,83
	2,5-250	Água*	<b>59(3)</b>	<b>62(3)</b>		<b>66(2)</b>		<b>65(4)</b>			+6	0,9990	0,9934	43408,4x+599499
Carbofurano	10-1000	Estipe			72(4)		81(5)	77(6)		92(4)	-22	0,9934	0,9982	26973,6x - 1481,15
	2,5-250	A.S.**	78(10)	82(4)		89(5)		91(2)			+32	0,9934	0,9950	45516,5x+5539,65
	2,5-250	Água*	115(3)	120(3)		120(2)		117(4)			+3	1,000	0,9995	55492,6x - 2015,05
Ciproconazol	10-1000	Estipe			85(3)		87(5)	88(2)		96(3)	-7	0,9965	0,9990	12927,7x + 560,555
	2,5-250	A.S.**	80(11)	84(7)		89(5)		91(2)			-5	0,9965	0,9983	13084,4x + 949,544
	2,5-250	Água*	92(3)	96(2)		97(1)		94(4)			-1	1,000	0,9992	22566,9x - 247,524
Difenoconazol	10-1000	Estipe			91(2)		90(5)	89(4)		91(6)	+25	0,9917	0,9976	12976,1x + 2016,34
	2,5-250	A.S.**	74(14)	75(11)		84(9)		87(7)			+18	0,9917	0,9986	12211,2x + 643,526
	2,5-250	Água*	91(2)	89(4)		94(4)		91(7)			+3	0,9960	0,9971	9631,95x - 722,551
Imidacloprido	10-1000	Estipe			79(1)		91(4)	88(4)		102(5)	-5	0,9978	0,9989	3367,69x - 71,2287
	2,5-250	A.S.**	87(15)	90(6)		93(6)		97(5)			0	0,9978	0,9990	3563,9x + 16,0023
	2,5-250	Água*	97(6)	95(2)		99(3)		95(4)			+3	0,9990	0,9996	7221,52x - 533,905
Tiabendazol	10-1000	Estipe			70(6)		75(3)	73(6)		87(4)	-53	0,9950	0,9972	16979,2x + 4129,62
	2,5-250	A.S.**	84(7)	88(4)		92(4)		96(1)			-7	0,9950	0,9984	33817,1x + 6026,21
	2,5-250	Água*	94(3)	97(2)		100(3)		95(4)			+5	0,9990	0,9996	47039,6x - 2760,32
Tiametoxam	10-1000	Estipe			76(2)		92(7)	90(9)		102(4)	-50	0,9953	0,9987	3232,65x - 182,052
	2,5-250	A.S.**	96(7)	94(6)		104(1)		115(3)			-11	0,9953	0,9972	5699,25x + 817,233
	2,5-250	Água*	100(4)	104(4)		107(3)		105(4)			+6	0,9980	0,9977	9838,83x + 463,367
Tiofanato-metílico	10-1000	Estipe			82(7)		90(9)	84(10)		113(4)	-47	0,9957	0,9989	78,92531x <sup>2</sup> + 7313,94x
	2,5-250	A.S.**	83(15)	83(9)		93(7)		88(8)			+7	0,9957	0,9971	-54,8388x <sup>2</sup> + 14824,5x
	-	Água*	-	-		-		-			-	-	-	-
Espiroadicloro	10-1000	Estipe			91(9)		93(5)	89(5)		86(5)	+36	0,9924	0,9920	2661,42x + 224,469
	-	A.S.**	-	-		-		-		-	-	-	-	-
	2,5-250	Água*	91(16)	93(4)		93(3)		90 ±8			+35	0,9960	0,9908	1822,96x - 151,09

\*Água = Água-de-coco; \*\* A.S = Albúmen Sólido; (a) Precisão intermediária; (b) Efeito matriz; ( $r^2$ ) Coeficiente de determinação

Concluiu-se que as curvas analíticas nas matrizes se mostraram lineares, e ficaram de acordo com as recomendações da ANVISA, pois todos os compostos analisados apresentaram faixa linear nas concentrações entre 10,0 e 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o estipe e 2,5-250,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a água-de-coco e albúmen, sendo os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) superiores a 0,99 avaliadas através das curvas analíticas preparadas em acetonitrila e nos extratos das matrizes.

Para o estipe, todos os compostos apresentaram valores de recuperação entre 70,0 a 120,0% e RSD  $\leq$  20% para os três níveis de concentração. Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação variaram de 86-113% e RSD inferiores a 6%, ficando dentro da faixa de valores recomendados. Portanto, o método desenvolvido para o estipe é satisfatório para a quantificação dos agrotóxicos avaliados neste estudo.

Para a água-de-coco, os valores de recuperação variaram entre 50,0% a 120,0% e RSD  $\leq$ 20%, sendo satisfatório para os agrotóxicos selecionados, com exceção do tiofanato-metílico, que apresentou resultados de recuperação fora dos valores aceitos, por conseguinte, não foi possível validá-lo. A avaliação da precisão intermediária apresentou valores de recuperação que variaram de 65-117% e RSD inferior a 8%. Ainda para a água-de-coco, os resultados de recuperação para o carbendazim, nos níveis de 10,0; 20,0 e 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , foram de 59-66% e RSD  $<$ 4%, concordando com alguns guias de validação, como FAO<sup>203</sup> e AOAC *Internacional*<sup>205</sup> que consideram o intervalo de faixa aceitável para a recuperação de 50-150% e RSD  $\leq$  20%. Portanto, os valores encontrados de precisão e exatidão podem ser considerados seguros para análise de carbendazim em água-de-coco. Já para o albúmen sólido os compostos apresentaram valores de precisão e exatidão satisfatórios, com recuperação entre 70,0-120,0% e RSD  $\leq$  20% para os analitos estudados, com exceção do espiroclorfenol. Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação variaram de 86,4-114,7% e o RSD inferiores a 8,4%, ficando dentro dos valores recomendados.

A determinação desses resíduos de agrotóxicos nas matrizes água-de-coco e albúmen, mostraram diferenças significativas no comportamento do tiofanato-metílico, carbendazim e espiroclorfenol. Isto pode ocorrer porque a eficiência de extração depende de características físico-químicas, tais como a viscosidade, e diferentes concentrações de eletrólito, bem como o pH das matrizes e a dissociação ácida (pKa) dos agrotóxicos. A recuperação do tiofanato-metílico na água de coco ficou acima de 120%, e o carbendazim teve uma recuperação inferior a 70% nos níveis de fortificação em 10,0; 20,0 e 50,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , mas apresentou o RSD  $<$ 4%. O tiofanato-metílico e o seu metabólito, o carbendazim, apresentam diferentes propriedades físico-químicas. Por exemplo: as solubilidades do carbendazim e tiofanato-metílico em água são de 8  $\text{mg L}^{-1}$  e 20

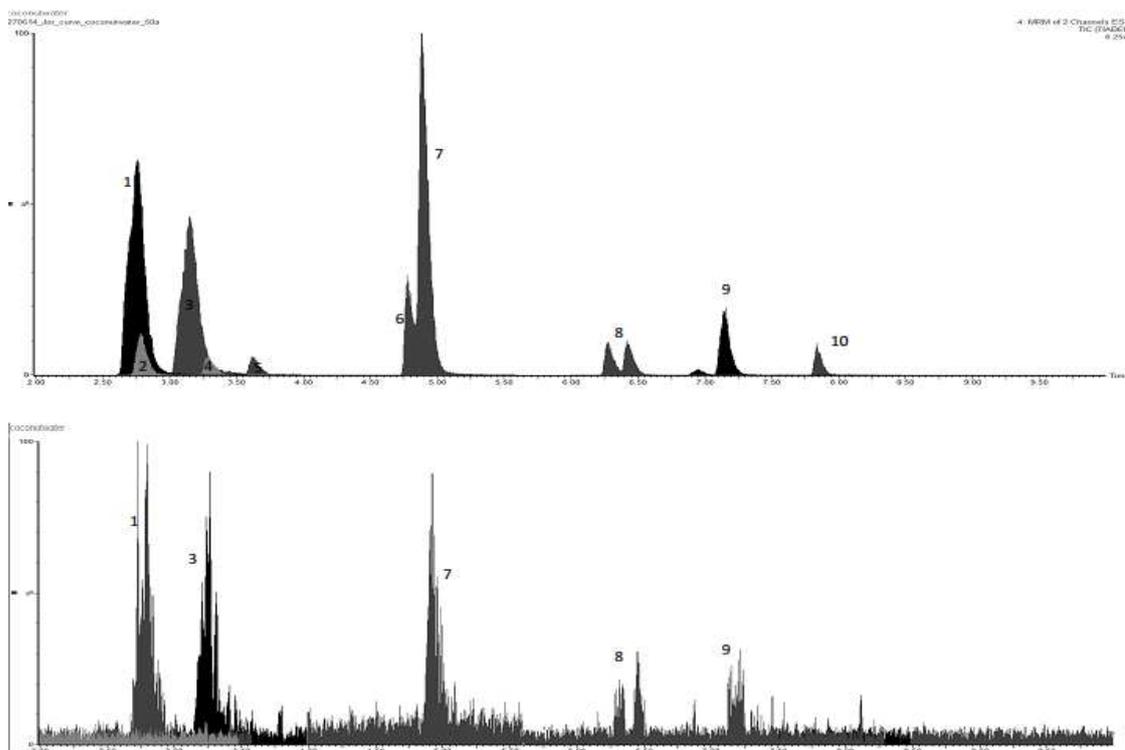
mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O valor de pKa para tiofanato-metílico é de cerca de 7,3, enquanto para o carbendazim é 4,2. Além disso, ambos os agrotóxicos não são significativamente ionizados em solução. O pH formado no tampão de acetato no método QuEChERS pode ter influenciado a estabilidade e ionização dos analitos, bem como o tipo de matriz, porque na água-de-coco, o tiofanato-metílico e carbendazim tiveram resultados extremos de recuperação para estes dois agrotóxicos, o que não ocorreu no albúmen<sup>21,196,204-206</sup>. Já para o espiroclorfenol, não foi possível extraí-lo do albúmen. Apesar de alguns estudos sugerirem a solubilidade para o espiroclorfenol com log K<sub>ow</sub> 5,83 em matrizes de gorduras<sup>191,207</sup>, indicando bioacumulação, não foi possível recuperá-lo. Por outro lado, este analito mostrou bons resultados para a água-de-coco e para o estipe, como mostrada na Tabela 13. De acordo com Lehotay *et al.*<sup>205</sup>, o método QuEChERS não é adequado para ser aplicada na extração de agrotóxicos lipofílicos (log K<sub>ow</sub> > 3.0) em amostras com alto teor de gordura. Isto pode justificar a dificuldade em extrair espiroclorfenol no albúmen que é altamente gorduroso e as boas recuperações obtidas na água-de-coco e no estipe, em que os teores de gordura são menores.

O efeito matriz foi calculado pelas inclinações das curvas analíticas que indicaram a supressão e o aumento de sinal com diferentes resultados para todos os analitos nas matrizes<sup>19</sup> abordadas neste estudo. Para o estipe, os resultados variaram de -55% (supressão de sinal forte) a +36% (aumento de sinal médio). Para a maioria dos compostos houve a supressão de sinal, o que é comum para matrizes complexas, como o estipe. Os resultados mostraram que é recomendável a construção da curva analítica no estipe, pois os valores sofreram variação acima de ±20%. Para o albúmen, os resultados variaram entre -13% (supressão de sinal leve) a +32% (aumento de sinal médio), que foi atenuado com a diluição associada também ao processo de *clean-up*, sendo também necessário o preparo de soluções analíticas no extrato do albúmen sólido para os agrotóxicos estudados. Por fim, detectou-se na água-de-coco uma supressão de sinal leve para o ciproconazol e aumento de sinal médio para o espiroclorfenol. Apesar do efeito matriz ser considerado baixo para a maioria dos agrotóxicos, com exceção do espiroclorfenol, é necessário o preparo de soluções analíticas no extrato da água-de-coco.

### 6.3 - Avaliação de resíduos de agrotóxicos na água-de-coco e albúmen sólido de amostras analisadas em Goianésia-GO, Neópolis-SE e Campinas-SP

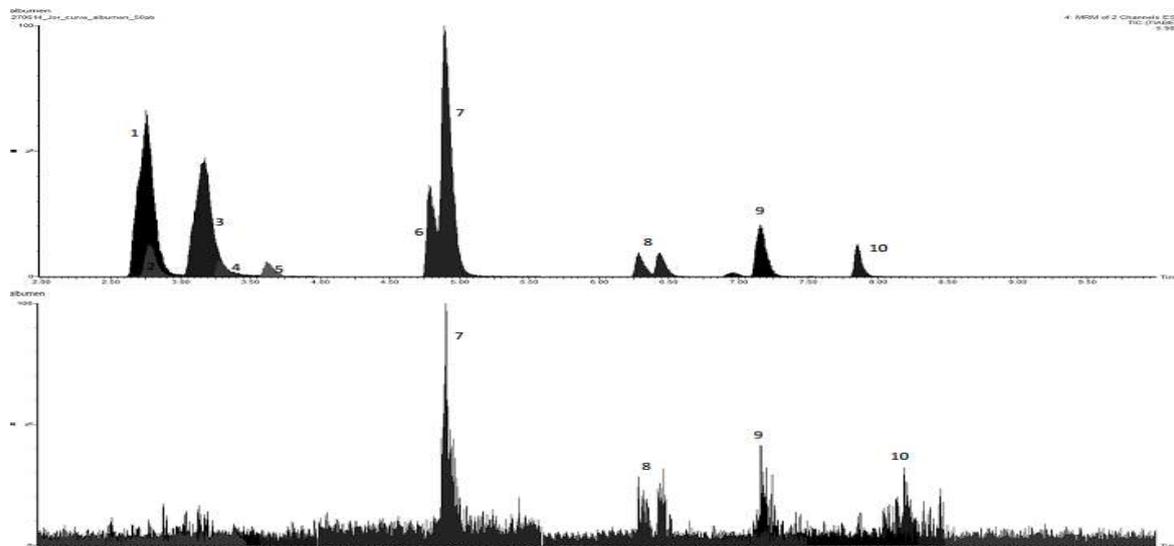
A fim de demonstrar a aplicabilidade dos métodos analíticos validados visando análises rotineiras, avaliaram-se resíduos dos agrotóxicos estudados em 36 amostras de coco, sendo 18 de água de coco e 18 de albúmen de diferentes regiões do Brasil: Goianésia-GO, Neópolis-SE e Campinas-SP. A Figura 79 apresenta os cromatogramas para: (A) o extrato de água-de-coco fortificado com  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  da solução padrão dos agrotóxicos e o cromatograma de uma amostra real de água-de-coco de Neópolis-SE; (B) extrato de albúmen sólido fortificados com a solução padrão dos agrotóxicos numa concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguidos do cromatograma da amostra real de albúmen sólido originária também de Neópolis-SE, sendo do mesmo fruto do cromatograma (A).

A)



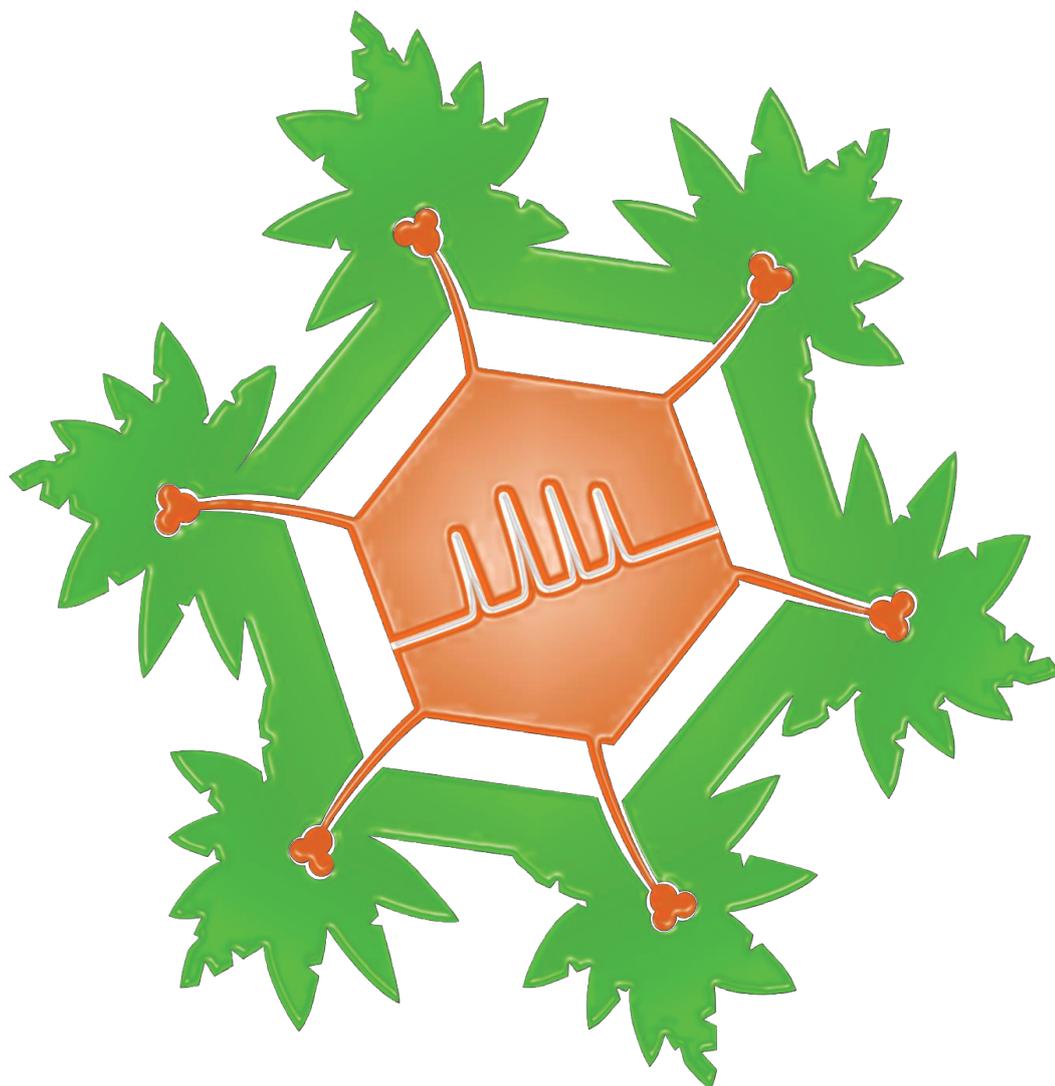
Continuação

B)



**Figura 79.** Identificação dos compostos: (1) Carbendazim. (2) Tiametoxam. (3) Tiabendazol. (4) Imidacloprido. (5) 3-OH-carbofurano. (6) Tiofanato-metílico. (7) Carbofurano. (8) Ciproconazol (isômero). (9) Difenconazol. (10) Espirodiclofeno. (A) cromatogramas obtidos por extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS para a água-de-coco. (B) cromatogramas obtidos por extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS referentes ao albumen sólido.

Nas análises das amostras oriundas de Neópolis-SE, um dos maiores produtores do Nordeste, foram detectados agrotóxicos como: carbendazim, tiabendazol, carbofurano, ciproconazol e difenoconazol nas amostras de água-de-coco e albúmen. Esses resultados são justificáveis, uma vez que os agricultores de Neópolis-SE, ao enviarem as amostras para análises, afirmaram fazer constantes pulverizações utilizando esses agrotóxicos. Já nas demais amostras analisadas, Goianésia-GO e Campinas-SP, foram detectadas em ambas as matrizes o carbofurano. No entanto, em todas as amostras os níveis estão abaixo do LMR estabelecido pela EU ( $<10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Em nenhuma amostra foi possível quantificar os agrotóxicos por estarem abaixo do limite de quantificação do método. Estas análises, asseguraram a qualidade dos frutos consumidos nessas três regiões brasileiras.



## Capítulo 7

Aplicação dos métodos de análise em amostras coletadas em estudo de campo da Sococo; comportamento dos agrotóxicos através de um estudo da translocação dos mesmos aplicados em estipe do coqueiro (*Cocos nucifera* Linn.) e análise de progresso espacial e temporal com variáveis ambientais da região em estudo.

Os pesquisadores da Embrapa-Tabuleiros Costeiros auxiliaram na seleção dos agrotóxicos aplicados na cocoicultura para serem estudados neste trabalho. A aplicação dos agrotóxicos de classes diferentes em mistura, como “coquetel”, facilitou o trabalho de campo no que se refere, principalmente, ao número de amostras coletadas, e no futuro, mostrar o uso da endoterapia em estudos de eficiência agrônômica que contemplem diferentes agrotóxicos visando atingir alvos fitossanitários que estejam ocorrendo simultaneamente na planta.

Este estudo surgiu com o propósito de desenvolver métodos alternativos de aplicação de agrotóxicos e de obter novos conhecimentos sobre a translocação de agrotóxicos aplicados por métodos endoterápicos. A substituição dos métodos convencionais de aplicação de agrotóxicos, como a pulverização, é importante para o setor da cocoicultura, pois em algumas situações, a pulverização não propicia um controle eficiente das doenças e pragas como: resinose (*stem bleeding*), ácaro da necrose, anel vermelho, broca que perfura o meristema apical (*Eupalamides cyparissias*), colebroca (*Homalinotus depressus* L.), murcha-de-fitomonas (*Phytopomonas* sp.), entre outras, que tem provocado perdas significativas na produção/produtividade, e em casos de severidade, a eliminação de plantas.

## **7- Testes iniciais do tratamento endoterápico utilizando o *mix***

### **7.1 – Tratamento endoterápico de infusão**

A Tabela 14 apresenta os resultados das concentrações encontradas no tratamento endoterápico de infusão obtidos a partir de amostras coletadas 15 cm acima do ponto de infusão e analisadas 7 dias após a aplicação. Esses resultados foram obtidos através da extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

**Tabela 14** – Resultados do tratamento endoterápico por infusão.

Agrotóxicos	Concentração $\mu\text{g kg}^{-1}$
Tiametoxam	42,3
Tiofanato-metílico	< LOQ
Carbofurano	63,4
Carbendazim	< LOQ
Tiabendazol	41,7
Imidacloprido	< LOQ
3-OH-carbofurano	< LOQ
Ciproconazol	< LOQ
Difenoconazol	40

Neste método de aplicação não foi possível quantificar quatro agrotóxicos (tiofanato-metílico, carbendazim, imidacloprido, 3-OH-carbofurano) por estarem abaixo do LOQ do método. As concentrações de agrotóxicos encontradas a esta altura e com este tempo de aplicação foram baixas, considerando a alta dose aplicada. Com esta técnica, foi verificado que os agrotóxicos aplicados translocaram.

Contudo, a agulha do equipamento para tratamento endoterápico de infusão, fabricado na Unicamp, não era resistente ao impacto e a têmpera foi inadequada. Este método de operação manual precisa ser otimizado, devido à rigidez do estipe, sendo necessária inclusive a mecanização deste equipamento para uma área de plantação abrangente.

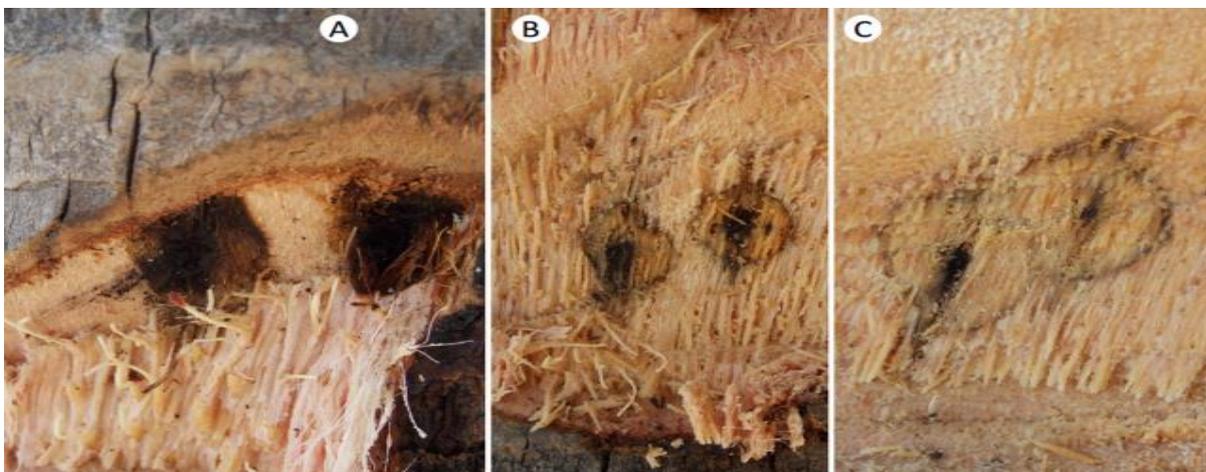
As Figuras 80 a 83 apresentam os resultados após o processo de infusão e de cicatrização dos orifícios, ocasionados com a introdução da agulha do equipamento.



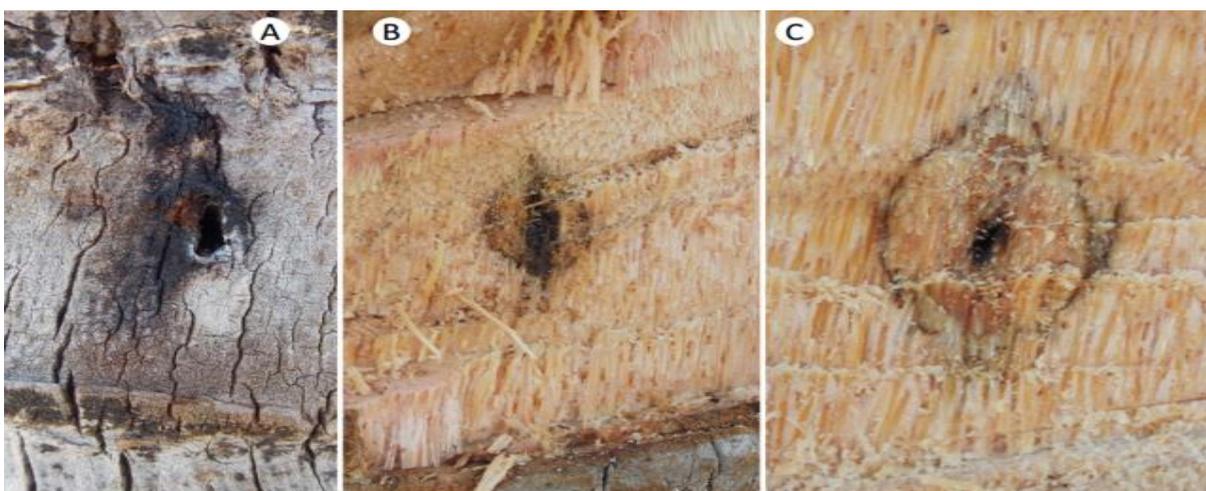
**Figura 80** – Sequência fotográfica do primeiro teste de infusão. (A) Equipamento de infusão já previamente instalado no estipe do coqueiro; (B) realização da infusão utilizando água na seringa; (C) foto aproximada da abertura causada pela agulha do equipamento de infusão com a infusão de água; (D) Cicatrização seis meses após o teste de infusão.



**Figura 81** – Resultados da cicatrização 11 meses após o teste de infusão. (A) registro do fechamento do orifício causado pela agulha do equipamento; (B) aproximação do orifício feito no item A; (C) orifício feito no mesmo coqueiro, em um ponto oposto ao item A.



**Figura 82** – Resultados da cicatrização dos orifícios ocasionados pela introdução da agulha do equipamento, 11 meses após a infusão com água. No estipe (A a C) foram realizados cortes em formato V, com o auxílio de um facão, sequencialmente aprofundados, com intuito de visualizar a cicatrização e a fechamento do orifício.



**Figura 83** - Resultados da cicatrização dos orifícios de outro coqueiro ocasionados pela introdução da agulha do equipamento, 11 meses após a infusão com água. Nos estipes (A), (B) e (C) foram realizados cortes em formato V, com o auxílio de um facão, sequencialmente aprofundados, com intuito de visualizar a cicatrização e o fechamento da abertura.

Foram realizadas algumas tentativas de melhorar a condição da agulha do equipamento de infusão, como: (1) diferentes diâmetros, (2) têmpera utilizando um maçarico por aproximadamente 10 minutos, e sucessivo resfriamento em óleo mecânico, (3) têmpera utilizando uma mufla a 900°C por 1 hora e resfriamento imediato em óleo mecânico e, posterior revenimento por 1 hora em banho de nitrogênio líquido.

A têmpera com maçarico não foi suficiente para suportar o impacto do martelo do equipamento, ocasionando empeno e quebra da agulha. Já a têmpera com a mufla apresentou um resultado superior, e só não foi adequada porque, erroneamente, a solda das peças foi realizada após a têmpera, tirando todo o efeito de têmpera e revenimento. Isso justificou a quebra das mesmas no exato ponto das soldas, com a diferença que, durante o impacto do martelo no estipe do coqueiro, as agulhas quebraram, mas não empenaram.

## 7.2– Tratamento endoterápico de injeção

A Tabela 15 mostra os resultados do primeiro tratamento endoterápico de injeção obtidos a partir das coletas das amostras 15 cm acima do ponto de injeção e 7 dias após a aplicação. Esses resultados foram obtidos através da extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

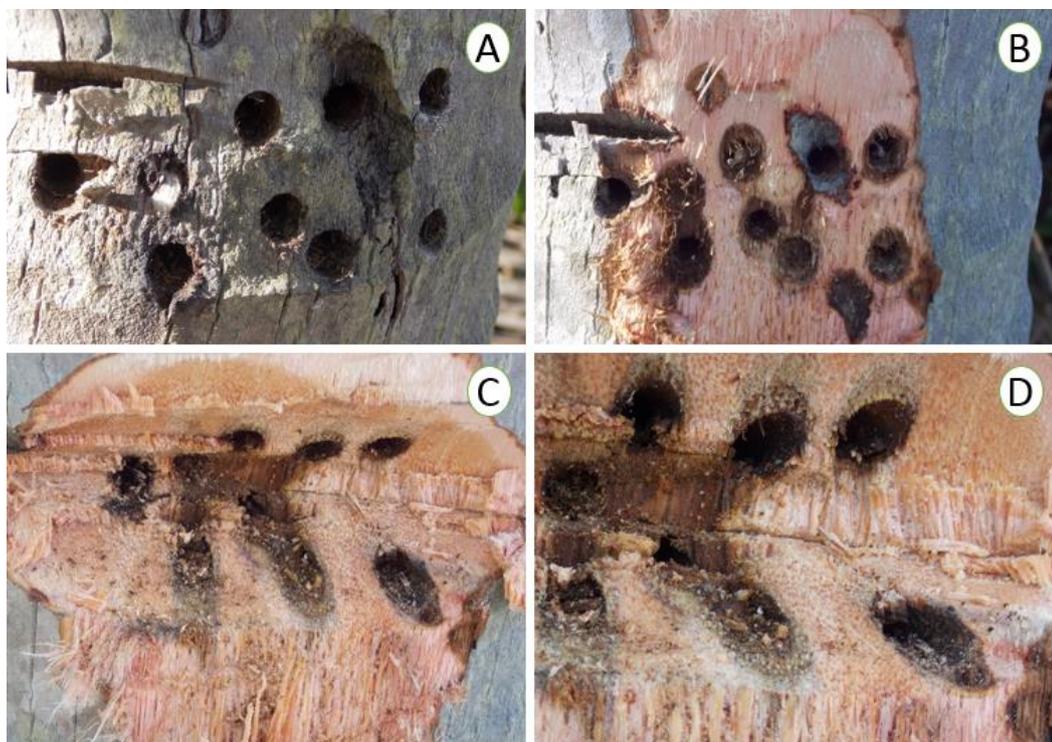
**Tabela 15** – Resultados do primeiro teste do tratamento endoterápico por injeção

<b>Agrotóxicos</b>	<b>Concentração <math>\mu\text{g kg}^{-1}</math></b>
<b>Tiametoxan</b>	< LOQ
<b>Tiofanato-metílico</b>	< LOQ
<b>Carbofurano</b>	< LOQ
<b>Carbendazim</b>	< LOQ
<b>Tiabendazol</b>	< LOQ
<b>3-OH-carbofurano</b>	< LOQ
<b>Ciproconazol</b>	66,5
<b>Difenoconazol</b>	191,7

Esse tratamento foi realizado no mesmo dia do teste de infusão, sendo utilizada a mesma concentração e calda de agrotóxicos que o empregado nos testes do tratamento endoterápico por injeção. Os resultados foram completamente diferentes dos agrotóxicos infundidos, dado que, a maioria dos agrotóxicos encontrados no teste de injeção foi detectada em níveis muito

abaixo de  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  e, os únicos agrotóxicos quantificados foram o difenoconazol e o ciproconazol, sendo que eles foram encontrados em concentrações superiores a  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Ambos os agrotóxicos são sistêmicos, justificando a translocação acropetal dos mesmos.

As cicatrizes geradas por este método de aplicação foram muito agressivas aos feixes condutores de seiva e, uma vez rompidos pela furadeira, a capacidade de cicatrização foi reduzida e não houve o fechamento das aberturas. A Figura 84 apresenta alguns furos realizados e a abertura do estipe do coqueiro com o auxílio de um facão, em formato V, para visualizar a cicatrização.



**Figura 84** – Resultados da cicatrização do estipe através do método de injeção.

Esses resultados mostraram que a utilização do equipamento de infusão causou menos danos ao coqueiro que o método de injeção como mostram as Figuras 82 e 83. Com isso, verificou-se que, a infusão apresenta vantagens como: (a) menor agressividade ao estipe com a introdução dos agrotóxicos, sem a destruição dos vasos condutores de seiva, (b) cicatrização branda do orifício de entrada da agulha do equipamento, com menor possibilidade de atração de pragas/doenças, (c) menor exposição do agricultor à calda durante a injeção de agrotóxicos, (d) menor contaminação ambiental. Apesar disso, é importante ressaltar que estes feixes atingidos nunca cicatrizarão.

### 7.3 – Tratamento endoterápico de injeção com adjuvantes

Nesta etapa, o tratamento de injeção foi reaplicado para verificar se a adição de adjuvantes à calda potencializaria a translocação dos agrotóxicos.

A Tabela 16 apresenta os resultados das concentrações obtidas através da extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS encontradas no tratamento endoterápico de injeção, a partir de amostras coletadas em pontos próximos ao ponto de aplicação e à copa, com 2 dias e 30 dias após a aplicação, utilizando seis tratamentos, sendo que, em cinco destes foram adicionados diferentes adjuvantes.

**Tabela 16** – Concentração dos agrotóxicos obtidas em diferentes alturas e tempos após aplicação no estipe pelo método endoterápico de injeção.

Agrotóxico	T	Ponto próximo ao local de aplicação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Ponto próximo à copa do coqueiro ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
		2 dias em 45 cm	30 dias à 15 cm	2 dias	30 dias
<b>Tiametoxam</b>	T1	555 (8)	477 (14)	<b>128 (1)</b>	<40
	T2	468 (9)	989 (20)	<b>107 (4)</b>	<b>139 (3)</b>
	T3	878 (20)	817 (20)	<b>185 (3)</b>	<b>69 (6)</b>
	T4	534 (20)	66 (5)	90 (5)	<40
	T5	292 (12)	521 (5)	79 (1)	<40
	T6	61 (5)	340 (20)	<40	<40
<b>Carbofurano</b>	T1	344 (10)	641 (20)	62 (3)	<b>74 (8)</b>
	T2	356 (16)	570 (18)	108 (4)	51 (3)
	T3	> 1000	787 (11)	<b>112 (4)</b>	<b>86 (3)</b>
	T4	575 (9)	270 (12)	<b>175 (7)</b>	73 (20)
	T5	> 1000	521 (5)	<b>917 (20)</b>	<40
	T6	381 (9)	398 (20)	99 (3)	<b>196 (12)</b>
<b>Carbendazim</b>	T1	<40	555 (20)	<40	50 (2)
	T2	<40	998 (20)	<40	<b>220 (6)</b>
	T3	476 (14)	>1000	<40	<b>266 (15)</b>
	T4	139 (1)	254 (17)	<40	<b>135 (2)</b>
	T5	327 (19)	963 (20)	<40	121 (3)
	T6	<40	522 (20)	<40	90 (3)
<b>Tiabendazol</b>	T1	<40	537 (20)	<40	57 (3)
	T2	<40	1000 (20)	<40	<b>227 (17)</b>
	T3	429 (20)	>1000	<40	<b>277 (8)</b>
	T4	126 (7)	253 (10)	<40	<b>136 (4)</b>
	T5	277 (15)	949 (20)	<40	118 (7)
	T6	<40	529 (20)	<40	89 (4)
<b>Imidacloprido</b>	T1	268 (16)	278 (2)	61 (6)	55 (5)
	T2	208 (13)	508 (20)	41 (3)	<b>157 (19)</b>
	T3	549 (20)	692 (11)	<b>101 (19)</b>	<b>132 (9)</b>
	T4	217 (4)	133 (10)	<b>74 (8)</b>	60 (20)
	T5	218 (12)	436 (2)	<b>77 (20)</b>	<b>123 (5)</b>
	T6	<40	235 (20)	<40	65 (7)
<b>3-OH-carbofurano</b>	T1	<40	45 (10)	<40	<40
	T2	<40	<40	<40	<40
	T3	52 (7)	<40	<40	<40
	T4	<40	<40	<40	<40
	T5	222 (18)	40 (12)	<b>50 (6)</b>	<40
	T6	<40	70 (5)	<40	<40

Continuação					
<b>Ciproconazol</b>	T1	132 (9)	139 (20)	<40	47 (11)
	T2	146 (6)	300 (14.5)	<40	<b>61 (2)</b>
	T3	375 (15)	298 (9.1)	<40	43 (4)
	T4	169 (6)	113 (9)	47 (6)	51 (20)
	T5	>1000	712 (20)	<b>525 (20)</b>	<b>518 (11)</b>
	T6	382 (20)	565 (20)	58 (3)	<b>362 (4)</b>
<b>Difenoconazol</b>	T1	<40	<40	<40	<40
	T2	<40	<40	<40	<40
	T3	<40	<40	<40	<40
	T4	<40	<40	<40	<40
	T5	437 (20)	355 (20)	<b>141 (6)</b>	<b>273 (8)</b>
	T6	47 (3)	242 (20)	<40	121 (4)
<b>Espirodiclofeno</b>	T1	<40	<40	<40	<40
	T2	<40	<40	<40	<40
	T3	67 (6)	<40	<40	<40
	T4	<40	<40	<40	<40
	T5	983 (19)	41 (20)	<b>245 (20)</b>	<40
	T6	128 (20)	123 (20)	92 (9)	<b>40 (12)</b>
<b>Tiofanato-metílico</b>	T1	<40	<40	<40	<40
	T2	<40	<40	<40	<40
	T3	<40	<40	<40	<40
	T4	<40	<40	<40	<40
	T5	<40	<40	<40	<40
	T6	<40	<40	<40	<40

( ) parênteses significa a estimativa do desvio padrão. T = Tratamentos: T1 – mix (carbendazim, carbofurano, carbosulfano, ciproconazol, difenoconazol, espirodiclofeno, imidacloprido, tiabendazol, tiametoxan and tiofanato-metílico; T2 – mix + sais; T3 – mix + ácido cítrico; T4 – mix + ácido cítrico + sais; T5 – mix + *Break-thru*® + T6 – mix + Silwet-L77®. Os números em negrito significam os melhores tratamentos.

### 7.3.1 Translocação nos pontos mais próximos de aplicação

As maiores concentrações de agrotóxicos obtidas a partir de amostras coletadas em diferentes alturas do estipe estavam nos pontos mais próximo da aplicação. Para avaliação da translocação 2 dias após aplicação foram coletas consideradas amostras na altura de 45 cm acima do ponto de aplicação, porque abaixo deste ponto, as concentrações estavam acima de 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , concentração mais alta da curva analítica e não puderam ser quantificadas. Assim, no ponto mais próximo da aplicação (15 cm), agrotóxicos como, carbofurano, carbendazim, tiabendazol e ciproconazol em tratamentos com acidificação (T3) e organossilicone (T5), não puderam ser quantificados, porque as concentrações estavam acima de 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Para agrotóxicos com  $\log K_{ow}$  1-3 e com diferentes valores de pKa, notou-se que a translocação foi fortemente aumentada com a acidificação do *mix*, assim como com a adição do organossilicone, mostrando que a sistemacidade dos agrotóxicos pode ser substancialmente beneficiada na planta, no fluxo do xilema. Além disso, esses adjuvantes podem auxiliar na solvatação durante o movimento dos agrotóxicos na fase aquosa das células<sup>108,208</sup>.

Em quase todos os tratamentos, com 30 dias após a aplicação, ainda obtiveram-se altas concentrações no ponto mais próximo da aplicação (15 cm). Por outro lado, muitos tratamentos não foram satisfatórios para a translocação dos agrotóxicos e apresentaram concentrações abaixo de  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  e também não puderam ser quantificados, por estarem em concentração abaixo do LOQ do método. Em geral, os resultados mostraram que 48% dos seis tratamentos aumentaram as concentrações entre os intervalos de 2 dias e 30 dias nos pontos mais próximos da aplicação, 28% reduziram as concentrações e, 24% dos tratamentos permaneceram inalterados, com a mesma concentração ou próxima em 30 dias após a aplicação dos agrotóxicos.

### **7.3.2 - Translocação no ponto mais próximo da copa do coqueiro**

Muitos agrotóxicos podem translocar rapidamente em troncos<sup>116</sup> e, neste trabalho, todos os agrotóxicos foram encontrados no ponto mais próximo da copa, 2 dias após a aplicação, exceto o carbendazim e o tiabendazol, que não puderam ser quantificados em nenhum tratamento. Contudo, 30 dias após a aplicação, esses dois agrotóxicos apresentaram elevadas concentrações em todos os tratamentos. O carbendazim e o tiabendazol são fungicidas que têm estruturas químicas semelhantes, pertencente ao mesmo grupo químico (benzimidazóis), uma dissociação com um  $\text{pK}_a$  maior do que 4 e um  $\log K_{ow} < 3$ , classificados como compostos mais polares e menos lipofílicos. Logo, tiveram o mesmo comportamento, com uma mobilidade mais lenta que os outros agrotóxicos, mesmo utilizando diferentes adjuvantes. Após 30 dias, a acidificação da solução provou ser mais eficaz na translocação destes dois agrotóxicos, apresentando maior concentração próximo à copa. A acidificação, a adição de sais e os tratamentos sem a adição de adjuvante podem ter induzido o retardo e a biodegradação do espiroclorfenol e do difenoconazol, assim como, o ciproconazol pode ter uma sensibilidade em meio ácido. Para ciproconazol, difenoconazol e espiroclorfenol, a translocação foi predominantemente potencializada usando os organossilicones mesmo 30 dias após a aplicação. Apesar de serem compostos que apresentam diferentes  $\text{pK}_a$  e classes (fungicidas e inseticidas) com  $\log K_{ow} > 3$ , considerados compostos mais apolares e lipofílicos, com

características de bioacumulação elevada, eles tiveram uma translocação muito eficaz no coqueiro<sup>1,208</sup>.

Alguns estudos abordaram a absorção e translocação de imidacloprido radiomarcado em plantas, os quais sugerem que, ao ser translocado, acumulam-se nas folhas<sup>9,15,73,134,209</sup>. Neste estudo, 30 dias após a aplicação, a translocação do imidacloprido foi satisfatória em todos os tratamentos, destacando o T2 (*mix* + sais) e T3 (*mix* + ácido cítrico), que também foram os dois melhores tratamentos para o tiametoxam. Ambos são inseticidas neonicotinóides, com  $\log K_{ow} < 1$ , de alta polaridade. O carbofurano repetiu o mesmo comportamento do imidacloprido, translocando com todos os adjuvantes. No entanto, em T5 (*mix* + *Break-thru®*), foram obtidas altas concentrações de carbofurano próximo à copa em 2 dias, mas não foi encontrado após 30 dias, até mesmo em outros pontos analisados em alturas inferiores. Existem duas hipóteses: (a) foi rapidamente para as folhas; ou (b) degradou-se. Em contrapartida, no tratamento com o organossilicone T6 (*mix* + Silwet-L77<sup>®</sup>), mostrou a maior concentração após 30 dias da aplicação. Para Carvalho *et al.*,<sup>15</sup>, agrotóxicos com  $\log K_{ow} \sim 1,8$ , como o carbofurano, tiveram translocação em matrizes como plantas aquática e cevada. Neste estudo, atribuindo a fisiologia e a estrutura do coqueiro, a eficiência de translocação foi melhor para agrotóxicos com  $\log K_{ow}$  0,57 até 3,09 e demonstraram grande capacidade de permeabilização/mobilidade nos tecidos vegetais. Finalmente, o tiofanato-metílico e 3-OH-carbofurano não foram encontrados 30 dias após a aplicação. Estes compostos podem ter sofrido uma decomposição no estipe, devido à sensibilidade ao pH da seiva, que pode ser expressa por hidrólise aquosa ou tempo de degradação 50%,  $DT_{50}$ <sup>209</sup>. De acordo com a FAO<sup>203</sup>, o tiofanato-metílico é degradado em carbendazim e derivados hidroxilados nas plantas.

Próximo à copa do coqueiro, as adições dos adjuvantes representaram a potencialização da translocação com acúmulo e persistência de agrotóxicos no tecido vegetal, notado através da concentração obtida das amostras de estipe. Os organossilicones foram 40% mais eficientes para a maioria dos agrotóxicos, seguidos pela acidificação com um aumento da translocação de 30% e pela adição de sais, sendo 22% mais eficientes quando comparados com a translocação sem adição de adjuvantes.

### 7.3.3 - Análise da água-de-coco após o tratamento endoterápico de injeção

Após a coleta dos frutos discriminados no item 4.10.4, as amostras de água-de-coco foram submetidas às análises por QuEChERS modificado e por UHPLC-MS/MS.

Os resultados dessas análises mostraram que não foi detectada a presença de agrotóxicos em nenhum dos tratamentos em concentrações acima dos LOD do método. Esses resultados mostraram a aplicação do método, e que os agrotóxicos não translocaram para a água-de-coco nos frutos do cacho 17. Frutos com esta maturidade não apresentam albúmen sólido, por isso não foi possível analisá-lo.

### 7.4 – Considerações durante a realização dos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão

Algumas observações foram presenciadas na execução deste tratamento e são importantes de serem relatadas e discutidas:

✿ O equipamento *Bite Infusion*<sup>®</sup> exigiu muita habilidade, treino e força do operador. A idealidade para este tipo de técnica é que a aplicação seja realizada pelo início da manhã ou ao final da tarde quando os estômatos das folhas estão abertos, a planta esteja transpirando, permitindo assim, a melhor introdução da calda de agrotóxico. Durante a tarde, quando o sol estava muito quente, foi necessária muita força e, por isso, a seringa de polietileno utilizada para a introduzir os agrotóxicos quebrou algumas vezes, expondo o operador ao agrotóxico. Também, a aplicação de líquido foi limitada, couberam no máximo 10 mL dentro da planta, devido a dimensão da agulha. Além disso, soluções de agrotóxicos com maior viscosidade tiveram que ser diluídas.

✿ Segundo o dicionário Houass da Língua Portuguesa<sup>210</sup>, o termo infusão significa:

- Ação de infundir, de verter um líquido dentro de um vaso ou sobre algum objeto;
- Ação de introduzir, de fazer penetrar.

Os agrotóxicos aplicados no estipe do coqueiro utilizando este equipamento não entraram no estipe por infusão (gravidade), como propõe e sugere o trabalho de Montecchio<sup>15</sup>, criador do *Bite Infusion*<sup>®</sup>. Foi necessária muita força (pressão no êmbolo da seringa) para que a calda de agrotóxicos entrasse no estipe, por isso, para o caso específico do coqueiro, o nome correto

deveria ser injeção, uma vez que a aplicação foi por pressão e não por gravidade. Contudo, para diferenciar as técnicas foi mantido o nome designado pelo fabricante, infusão, do inglês, *infusion*. Além disso, é importante destacar que as borrachas que protegem as conexões do equipamento desgastaram com facilidade e foram trocadas várias vezes, devido ao forte impacto para adentrar a agulha no estipe. Uma hipótese é que o estipe de coqueiro não é tão espesso/grosso em diâmetro comparado com o de outras palmeiras, por exemplo, palmeira imperial (*Roystonea oleracea*), por isso, verificou maior dificuldade para a entrada da solução. A sugestão é que a peça seja melhorada para ser usada na cocoicultura, a começar pela automatização.

Ainda, de acordo com Montecchio<sup>15</sup>, dois fenômenos físicos explicam a construção do formato da lâmina (agulha): (a) produz o “efeito Venturi”, em que a velocidade do fluido no interior de um ducto é substancial quando este líquido proferido de uma fonte externa transloca ativamente para cima; (b) princípio de Bernoulli, a pressão da seiva diminui e a velocidade aumenta (dinâmica dos fluidos). Este fenômeno ocorre quando a agulha é introduzida, as fibras do estipe são separadas o que ocasiona a compressão dos vasos, provocando o aumento na velocidade da seiva, o que acelera a absorção do líquido externo.

O tratamento endoterápico de injeção é bem mais simples de ser executado e basta abrir o estipe com uma furadeira e injetar os agrotóxicos com os volumes medidos na seringa de polietileno. Como não exige esforço para a introdução da calda de agrotóxicos é evidente que cabe um volume maior da calda de agrotóxicos. O único cuidado que se deve ter durante a aplicação é que o orifício não esteja obstruído com serragem do estipe e que este seja fechado, logo após a aplicação, com tarugo de madeira para prevenir a entrada de água e o desenvolvimento de microorganismos.

Em relação aos adjuvantes, o *Break-thru®* foi escolhido para as próximas etapas porque apresentou bons resultados, potencializando a translocação de todos os agrotóxicos selecionados. O ácido cítrico também apresentou bons resultados, contudo, foi retirado devido ao seu alto custo.

### 7.5 –Tratamentos endoterápicos de injeção e infusão empregando a mistura de agrotóxicos (*mix*) + *Break-thru*®

Da lista de agrotóxicos selecionados no início deste trabalho foram retirados para este teste, o carbofurano, agrotóxico proibido na maioria dos países desenvolvidos, o tiofanato-metílico e seu metabólito, carbendazim, por serem agrotóxicos proibidos na citricultura e abolidos em países da Europa e os Estados Unidos.

Para facilitar a discussão, os resultados da translocação dos agrotóxicos serão apresentados através da média e do coeficiente de variação de três plantas (triplicatas) referentes ao mesmo tratamento e mesmo intervalo de tempo e altura (espaço-temporal). Para as aplicações referentes a estes tratamentos foi estabelecido o volume de 20 mL da solução por planta, sendo 10 mL em pontos opostos na mesma altura do estipe. Enquanto o tratamento de injeção foi mais simples e rápido, pois foi utilizada a furadeira para perfurar os orifícios com a introdução de 20 mL por planta, no tratamento de infusão houve alguns inconvenientes como: dificuldade de introdução do *mix* pela agulha do equipamento e a diminuição do volume sendo aplicados 10 mL em apenas um único orifício. Em função disto, fez-se a diluição da calda de agrotóxicos (*mix*) e aplicação das soluções no estipe do coqueiro em apenas um orifício.

É importante destacar que os agrotóxicos comerciais possuem teores diferentes de princípio ativo. Por isso, os resultados de translocação para o *mix* de agrotóxicos foram discutidos individualmente, para a infusão (i) e injeção (ii). Para a análise comparativa das diferenças nas concentrações encontradas nos dois tratamentos (i) e (ii), o eixo das ordenadas para concentrações (y) foi ajustado em todos os gráficos.

As Figuras 85 a 104 apontam as médias das concentrações dos agrotóxicos (*mix*) obtidas no estipe das três plantas selecionadas para os intervalos de 2 dias, 15 dias, 30 dias e 45 dias após a execução do tratamento endoterápico de infusão (i) e injeção (ii), com coletas de amostras em 50 e 100 cm do ponto de aplicação. As discussões foram baseadas em: (1) eficiência de translocação que indica a concentração encontrada num determinado espaço-tempo em relação à concentração inicial aplicada. (2) paridade de translocação o que indica que, quanto mais próximo de 100%, mais proporcionais serão os resultados entre 50 e 100 cm.

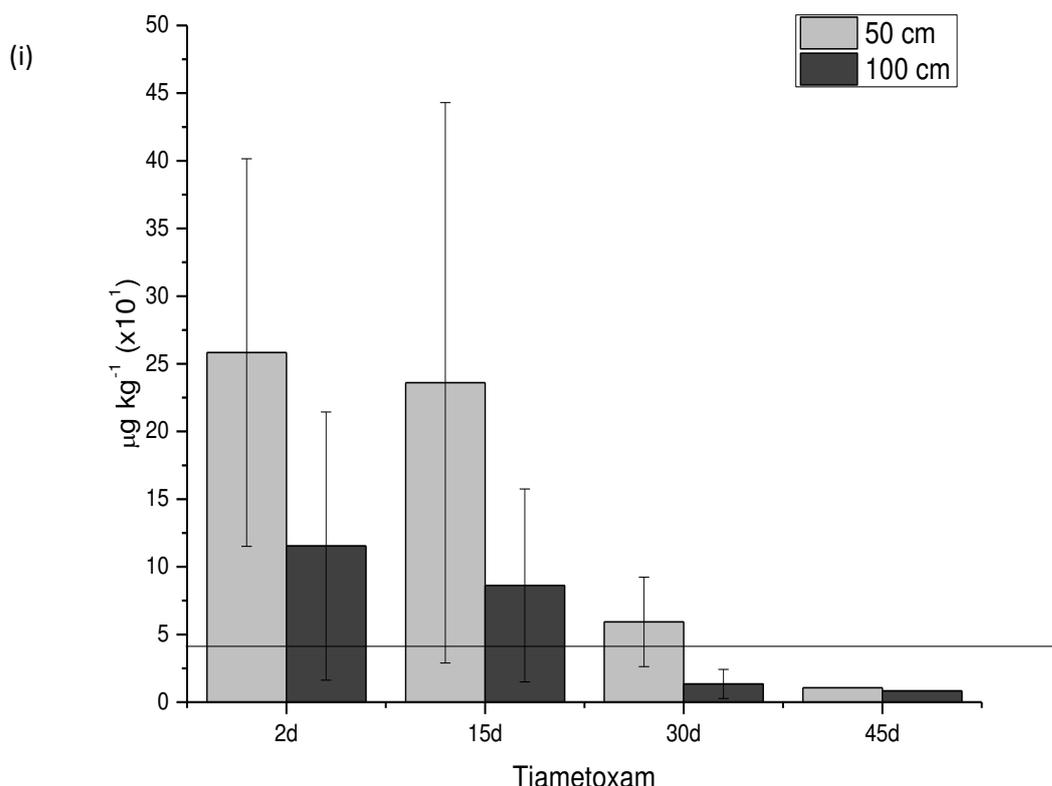
Os detalhamentos das concentrações de cada planta analisada no Teste 3 estão nas Figuras S1 a S9, no anexo.

### 7.4.1 - Resultados de translocação para o tiametoxam

#### (i) Tratamento endoterápico de infusão

O perfil das amostras coletadas nas alturas de 50 e 100 cm mostraram que os ápices de eficiência de translocação apresentaram concentrações bem próximas entre 2 e 15 dias. Os somatórios destas duas coletas representaram 0,7‰ (50 cm) e 0,3‰ (100 cm), aproximadamente, da solução de tiametoxam aplicada em 10 mL do *mix*. Já 30 dias após as aplicações, as concentrações caíram drasticamente e à medida que aproximou de 45 dias, as concentrações foram apenas detectadas.

Considerando as concentrações encontradas em 50 e 100 cm, a paridade de translocação para o tiametoxam próximo à copa dos coqueiros (100 cm) em 2 dias foram de 45% e 37% em 15 dias. Desta forma, esses resultados mostraram que os melhores resultados de translocação deste agrotóxico até à copa pelo método de infusão foram nos primeiros dias após as aplicações.

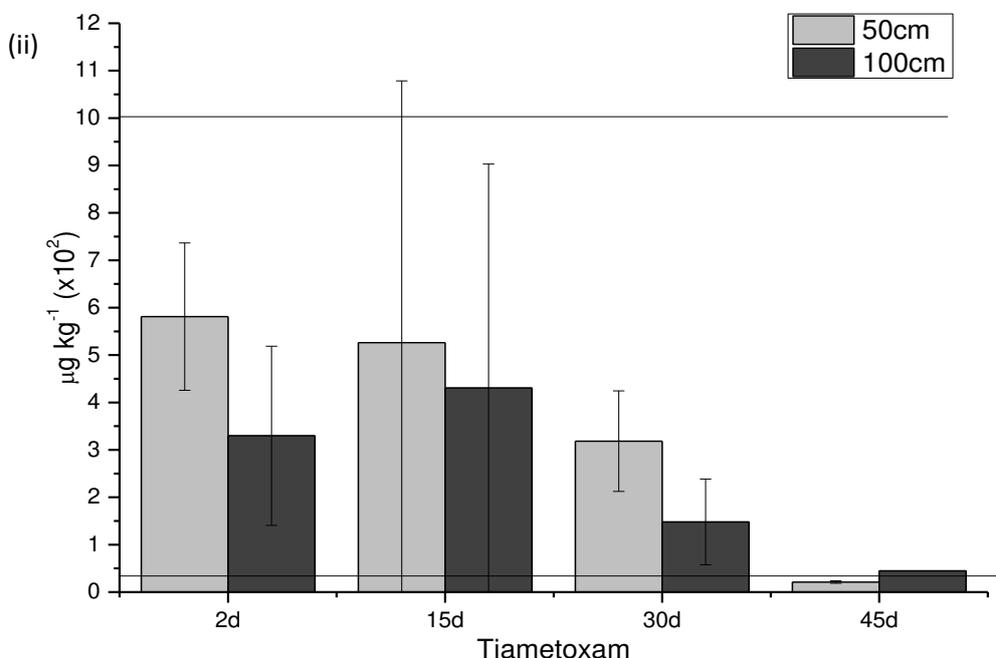


**Figura 85** – Concentração do tiametoxam após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de infusão, em amostras de estípe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos por extração QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de 40 µg L<sup>-1</sup> foram apenas detectadas e acima de 1000 µg L<sup>-1</sup> foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de 40-1000 µg L<sup>-1</sup> e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

## (ii) Tratamento endoterápico de injeção

Os resultados mostraram que o ápice da eficiência de translocação, por este método, a 50 cm acima do ponto de aplicação foram entre 2 e 15 dias. Assim, essas duas concentrações encontradas nestes dias e somadas corresponderam a 0,41‰ da concentração total aplicada de tiametoxam junto ao *mix*. Já em amostras coletadas a 100 cm, as maiores concentrações também foram obtidas após 2 e 15 dias, equivalendo a 0,25‰ da solução total aplicada. Assim, as concentrações caíram drasticamente após 45 dias para as alturas de 50 cm, sendo apenas detectado, e na altura de 100 cm foi obtida concentração de  $45 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

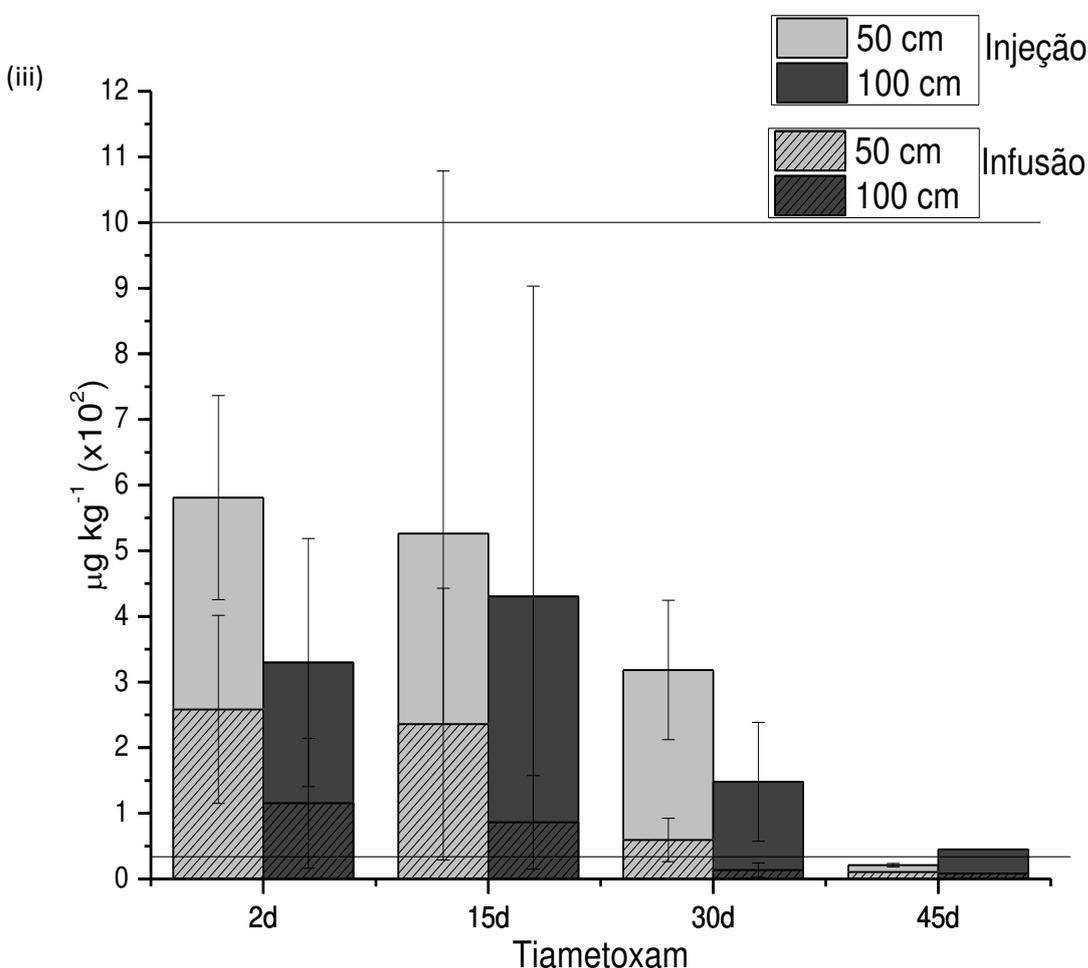
Considerando as concentrações encontradas em 50 e 100 cm, a paridade de translocação do tiametoxam próximo à copa do coqueiro (100 cm) partindo das concentrações encontradas em 50 cm foram de 46,5% para 2 dias e 82% após 15 dias. Esses resultados expressaram que a translocação próxima à copa, usando este método de aplicação, foi satisfatória até 15 dias após as aplicações.



**Figura 86** – Concentração do tiametoxam após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de injeção, em amostras de estípe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de  $40\text{-}1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

### (iii) Comparação dos tratamentos endoterápicos de infusão e injeção

Constatou-se, em ambos os métodos endoterápicos que, as maiores concentrações encontradas foram 2 e 15 dias após as aplicações. Considerando as concentrações aplicadas em cada um dos tratamentos endoterápicos, notou-se que, para os dois pontos de coleta de amostras, a cinética de translocação foi mais favorável usando o tratamento de infusão. Contudo, quanto a paridade de translocação próximo à copa dos coqueiros, os resultados mostraram que na infusão, dois dias após a aplicação obtiveram os maiores valores, e na injeção, 15 dias após as aplicações foi encontrado o dobro dos valores encontrados após 2 dias de aplicação.



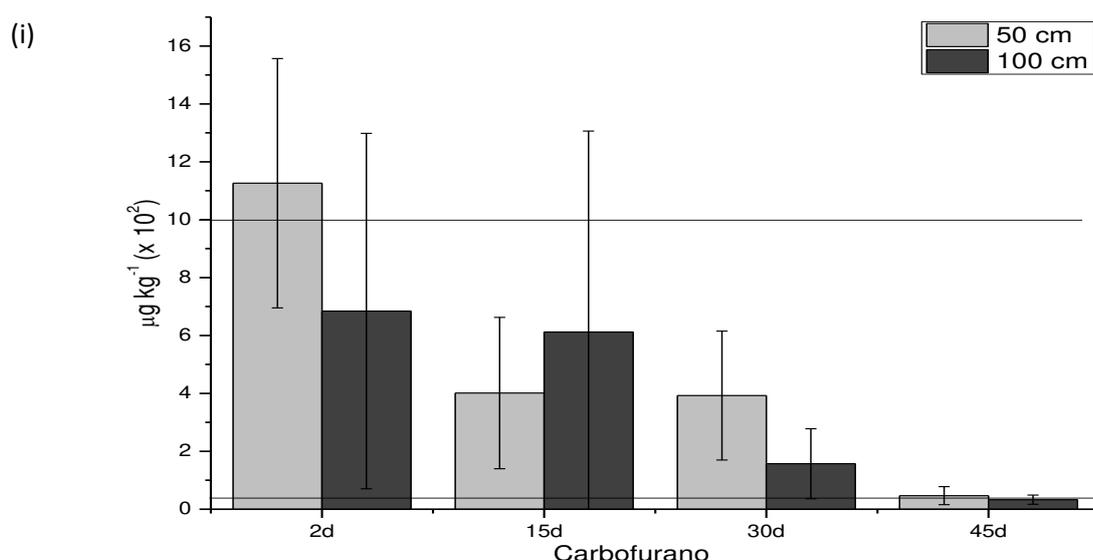
**Figura 87** - Sobreposição das concentrações encontradas para o tiametoxam após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando os métodos endoterápicos de infusão (área hachurada) e injeção (área lisa).

## 7.4.2 - Resultados de translocação para o carbofurano

### (i) Tratamento endoterápico de infusão

O carbofurano é um metabólito do carbossulfano. O perfil de translocação do carbofurano encontrado a 50 e 100 cm foram diferentes. O ápice da eficiência de translocação, em termos de concentração, para estes dois pontos de amostragem (50 e 100 cm) foram após 2 dias. Para o ponto de coleta em 50 cm, 2 dias após as aplicações, a concentração representou 0,55‰ de todo carbofurano aplicado. Já para 15 e 30 dias após as aplicações, as concentrações se mantiveram estáveis, diminuindo para  $47 \mu\text{g kg}^{-1}$  em 45 dias. Para as amostras coletadas em 100 cm, 15 dias após a aplicação, a concentração praticamente se manteve, e somando-se a concentração de 2 dias contabilizou-se 0,33‰, caindo sua concentração 30 dias depois, até que após 45 dias não pode mais ser quantificado.

Avaliando-se os resultados das amostras coletadas a 50 e 100 cm, a paridade de translocação para o carbofurano foi de 61% para 2 dias, 154% para 15 dias e 40% para 30 dias. Assim, notou-se que 15 dias após as infusões, as concentrações a 100 cm estavam maiores que as de 50 cm.



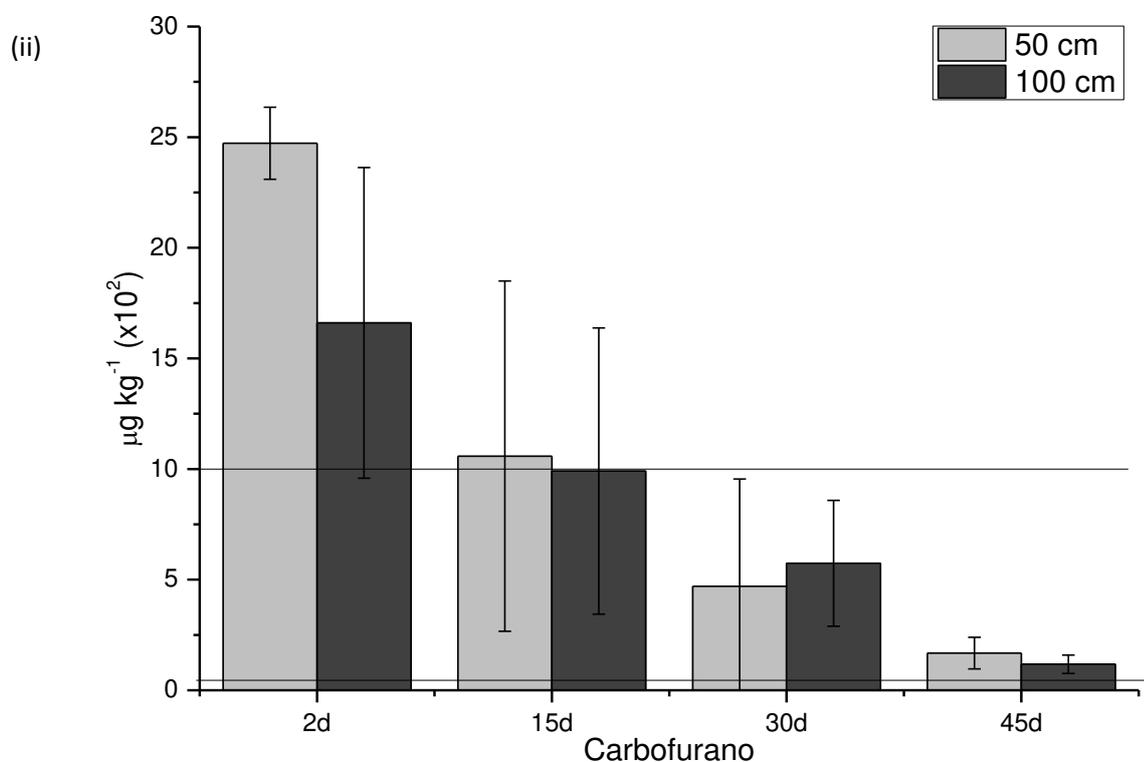
**Figura 88** – Concentração do carbofurano após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de infusão, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica

foi de 40-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

## (ii) Tratamento endoterápico de injeção

Os resultados de eficiência de translocação para o carbofurano a 50 e 100 cm tiveram um perfil parecido ao diminuírem a concentração de 2 para 45 dias, sendo 2 dias, a maior translocação para ambos os pontos de amostragem (50 e 100 cm), que somados corresponderam à 0,52% da concentração de carbofurano aplicado. Já as concentrações de 15 dias, 30 dias e 45 dias tiveram concentrações bem próximas e puderam ser quantificadas em todos os pontos de coletas.

Próximo à copa dos coqueiros, em amostras de 100 cm, partindo das concentrações encontradas em 50 cm, a paridade de translocação para o carbofurano foi de 55% para 2 dias, 94% para 15 dias, 113% para 30 dias e 70% para 45 dias. Assim, os resultados mostraram que 30 dias após às aplicações, as concentrações a 50 e 100 cm estavam mais próximas.



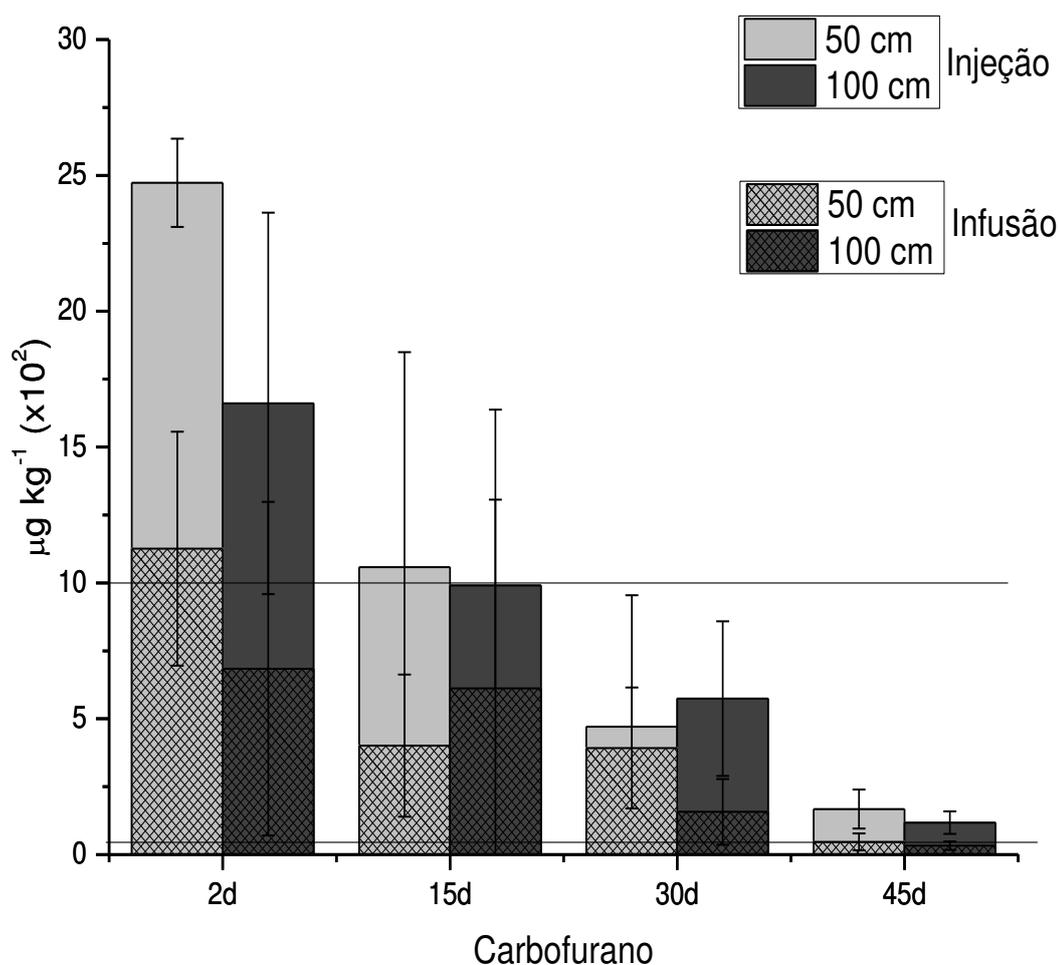
**Figura 89** – Concentração do carbofurano após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de injeção, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica

foi de 40-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

### (iii) Comparação dos tratamentos endoterápicos de infusão e injeção

Para os dois tratamentos, as maiores concentrações foram encontradas 2 dias após as aplicações, sendo que a infusão apresentou uma cinética de translocação um pouco maior que a injeção, já que foi aplicado uma menor concentração. Já a menor diferença entre as concentrações encontradas nos pontos 50 e 100 cm acima do ponto de aplicação foi com 15 dias para a infusão e 30 dias para a injeção. Mesmo a 45 dias após as aplicações foi possível quantificar/detectar o carbofurano no estipe.

(iii)



**Figura 90** - Sobreposição das concentrações encontradas para o carbofurano após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando os métodos endoterápicos de infusão (área hachurada) e injeção (área lisa).

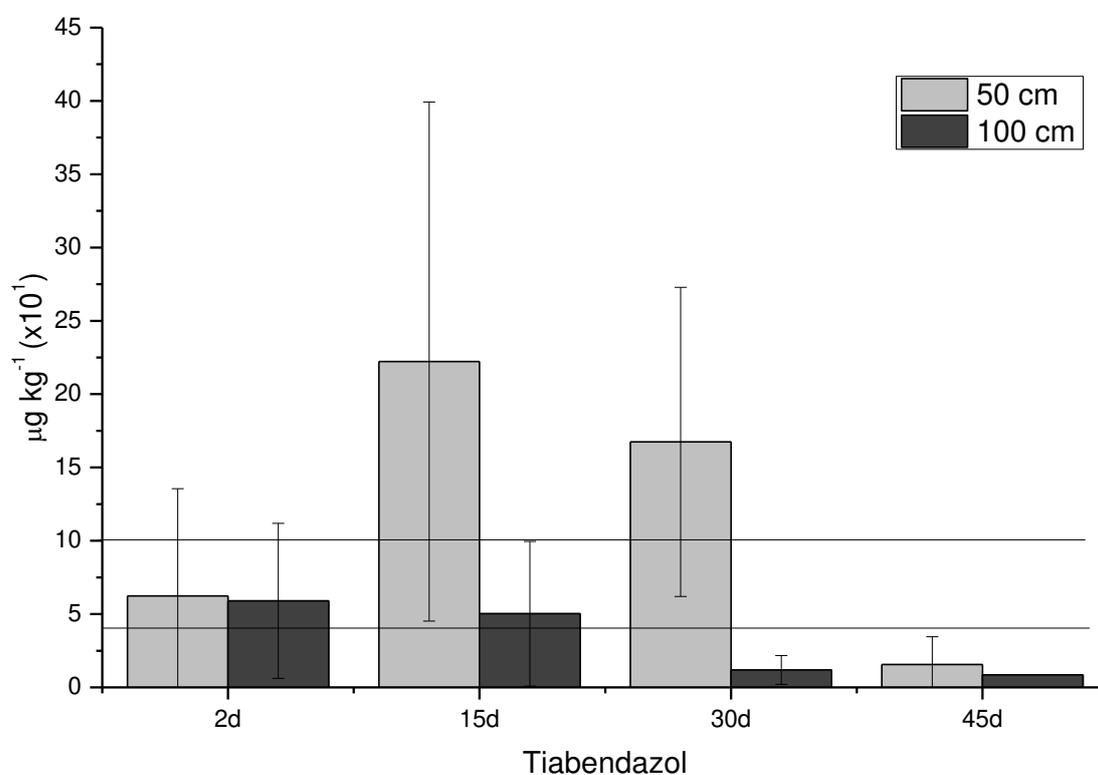
### 7.4.3 - Resultados de translocação para o tiabendazol

#### (i) Tratamento endoterápico de infusão

O tiabendazol é o agrotóxico do conjunto avaliado neste trabalho que possui maior concentração de princípio ativo. Contrariando as expectativas, o tiabendazol apresentou baixa eficiência de translocação, sendo que para amostras coletadas a 50 cm, 15 e 30 dias após aplicação, representaram 0,18‰ do tiabendazol aplicado. No ponto de amostras de 100 cm em 30 dias e 45 dias, as concentrações deste analito estavam abaixo do LOQ.

Considerando os resultados das amostras avaliadas em 50 e 100 cm, em termos de paridade de translocação próximo à copa do coqueiro (100 cm), em 2 dias foram 95% e 18% em 15 dias. Portanto, ao empregar o tratamento endoterápico de infusão, as melhores translocações para o tiabendazol foram obtidas nos primeiros dias após as aplicações.

(i)



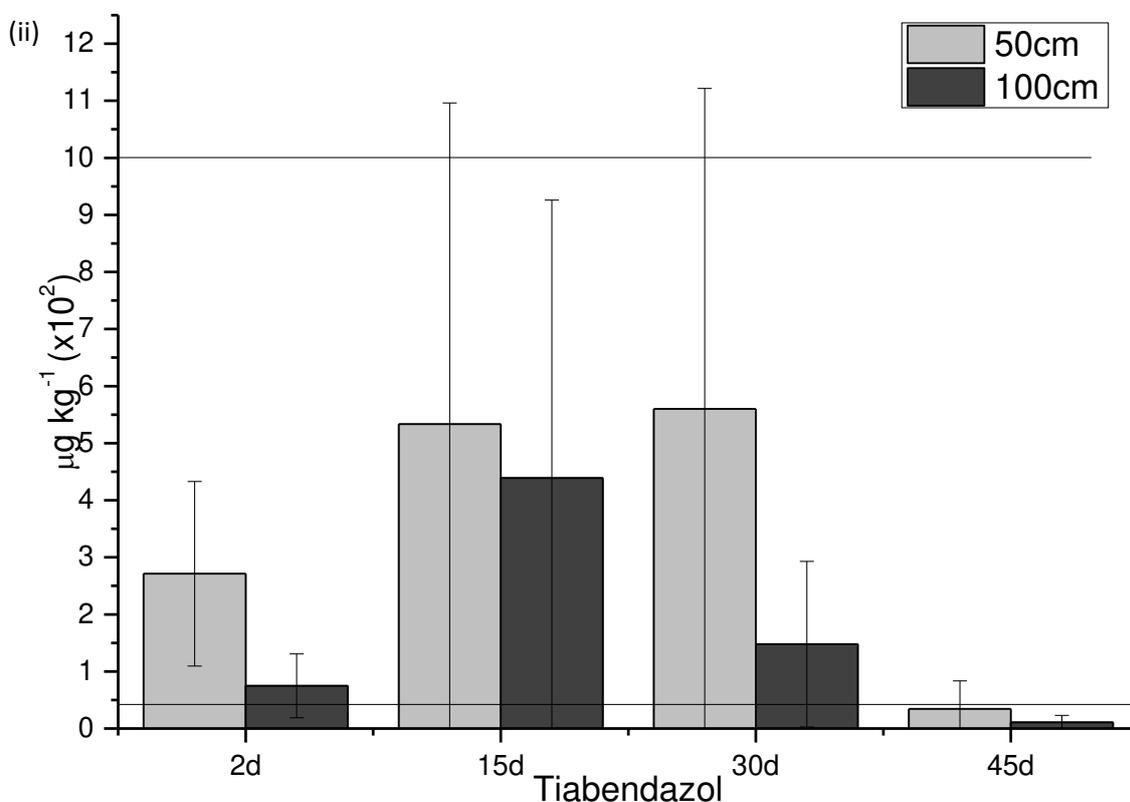
**Figura 91** – Concentração do tiabendazol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de infusão, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos

na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de  $40\text{-}1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

## (ii) Tratamento endoterápico de injeção

A translocação do tiabendazol na endoterapia de injeção teve o mesmo comportamento que no método endoterápico de infusão, uma vez que a translocação máxima foi encontrada entre 15 e 30 dias após a aplicação a 50 cm, representando 0,11‰, enquanto após 15 dias para 100 cm, representou 0,05‰ do tiabendazol aplicado. Além disso, os resultados mostraram que as concentrações caíram drasticamente após 45 dias, sendo apenas detectadas.

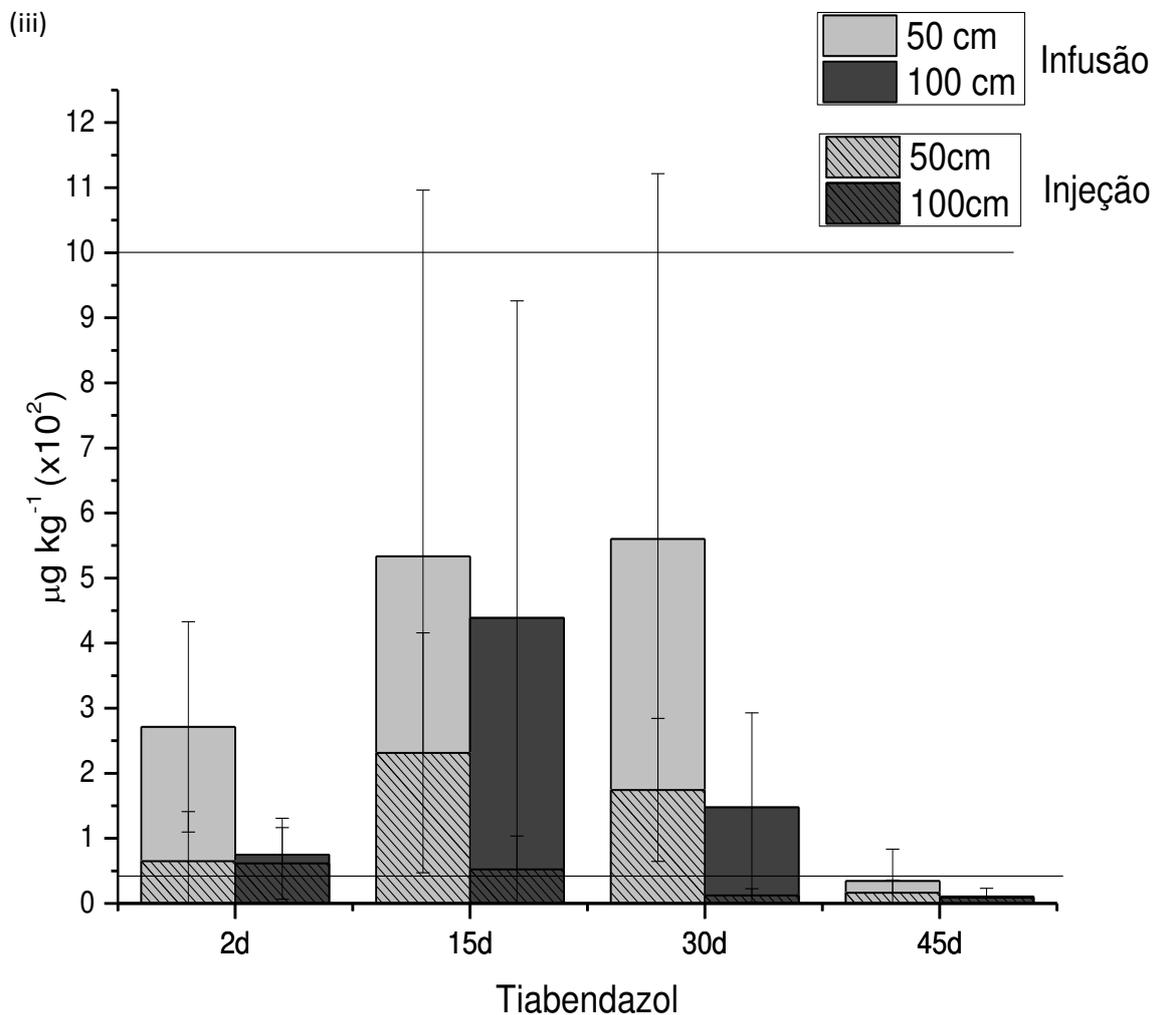
Quanto a paridade de translocação, partindo de resultados de concentração a 50 e 100 cm foram 25% para 2 dias, 82% para 15 dias e 25% para 30 dias. Desta forma, mostrou que com 15 dias houve uma menor diferença de concentração entre os resultados em 50 e 100 cm.



**Figura 92** – Concentração do tiabendazol após aplicação do mix de agrotóxicos empregando o método endoterápico de injeção, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de  $40\text{-}1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

### (iii) Comparação dos tratamentos endoterápicos de infusão e injeção

As maiores concentrações encontradas para o tiabendazol nos dois tratamentos endoterápicos foram entre 2 a 30 dias após as aplicações. Contudo, os resultados de cinética de translocação relativos à concentração aplicada em cada tratamento, utilizando a infusão, mostraram-se superiores à injeção. Já quanto às médias dos resultados encontrados a 50 e 100 cm, a paridade de translocação foi alcançado após 2 dias para infusão e 15 dias para a injeção.



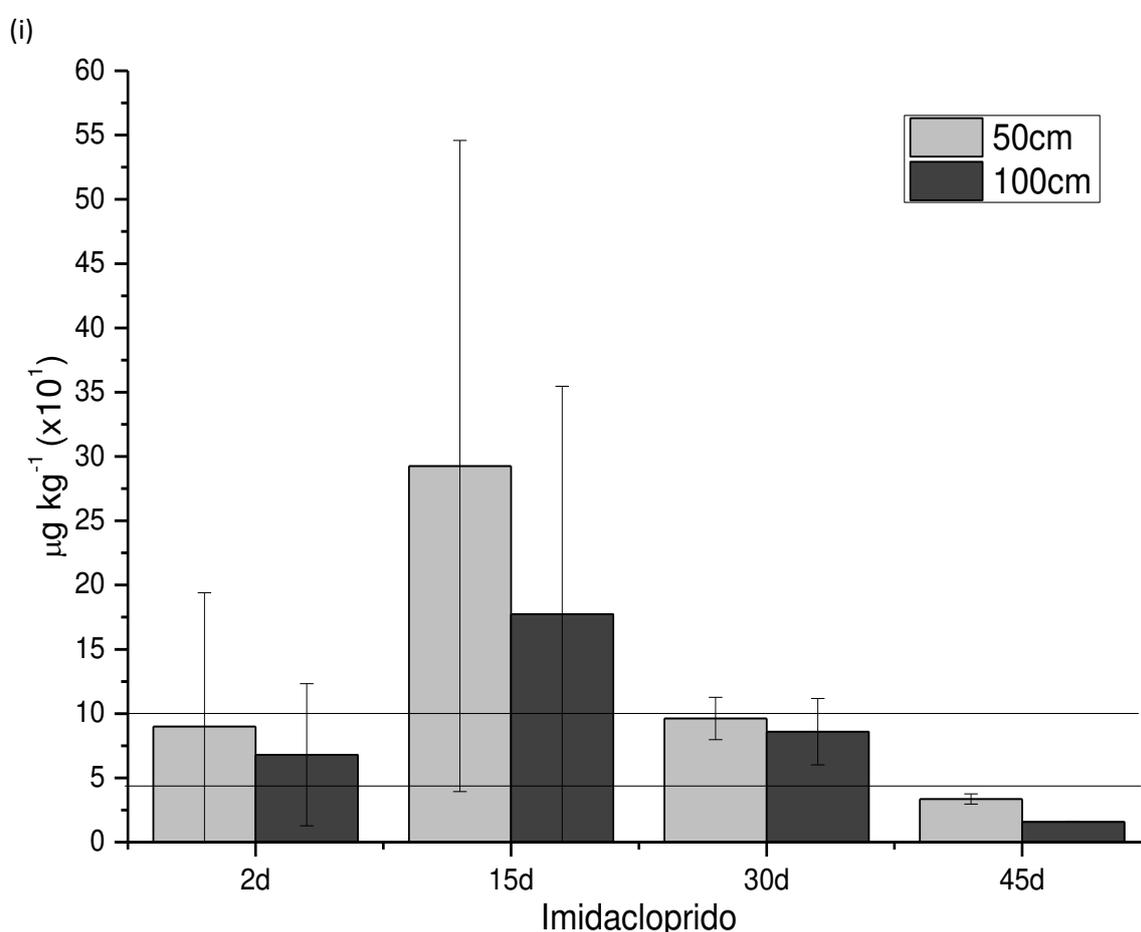
**Figura 93** - Sobreposição das concentrações encontradas para o tiabendazol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando os métodos endoterápicos de infusão (área hachurada) e injeção (área lisa).

#### 7.4.4 - Resultados de translocação do imidacloprido

##### (i) Tratamento endoterápico de infusão

A translocação do imidacloprido teve o ápice em 15 dias após a aplicação e, somando-se 50 e 100 cm, representou 0,50‰ da solução de imidacloprido aplicado. As concentrações em 2 e 30 dias após a aplicação estavam próximas, e com 45 dias foram apenas detectadas.

Considerando as concentrações encontradas em 50 e 100 cm, notou-se que os maiores valores de paridade de translocação para o imidacloprido foram com 30 dias representando 89%, 2 dias com 76% e 15 dias com 54%.



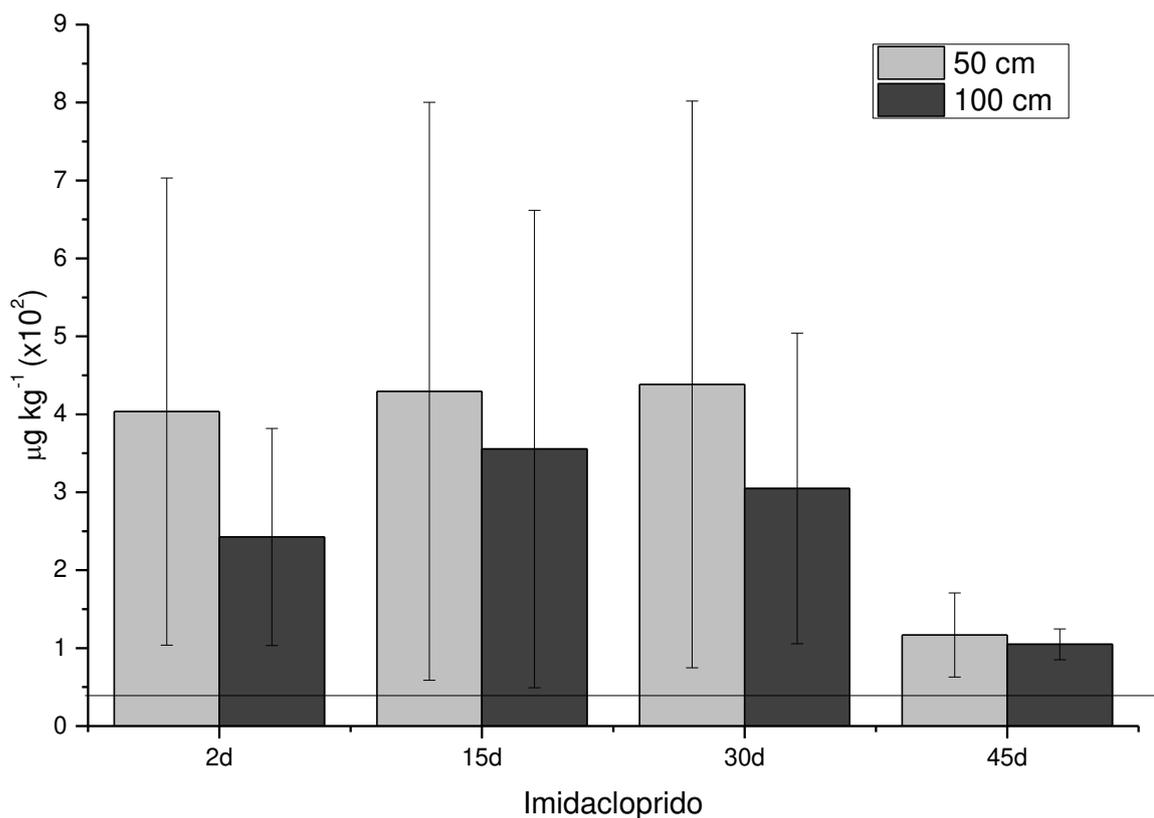
**Figura 94** – Concentração do imidacloprido após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de infusão, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de 40-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

## (ii) Tratamento endoterápico de injeção

A translocação do imidacloprido no método de injeção foi maior em 15 dias e somados os pontos 50 e 100 cm, representaram 0,23‰ deste analito aplicado. Contudo, as translocações de 2 a 30 dias mantiveram praticamente as mesmas concentrações, e somando-se todos os pontos de amostragens (50 e 100 cm), resultou em 0,63‰. As amostras coletadas após 45 dias (50 e 100 cm) ainda apresentavam concentrações acima de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Já a paridade de translocação, considerando os resultados das concentrações encontradas a 50 e 100 cm para o imidacloprido, representaram 54% para 2 dias, 82% para 15 dias, 70% para 30 dias e 90% para 45 dias.

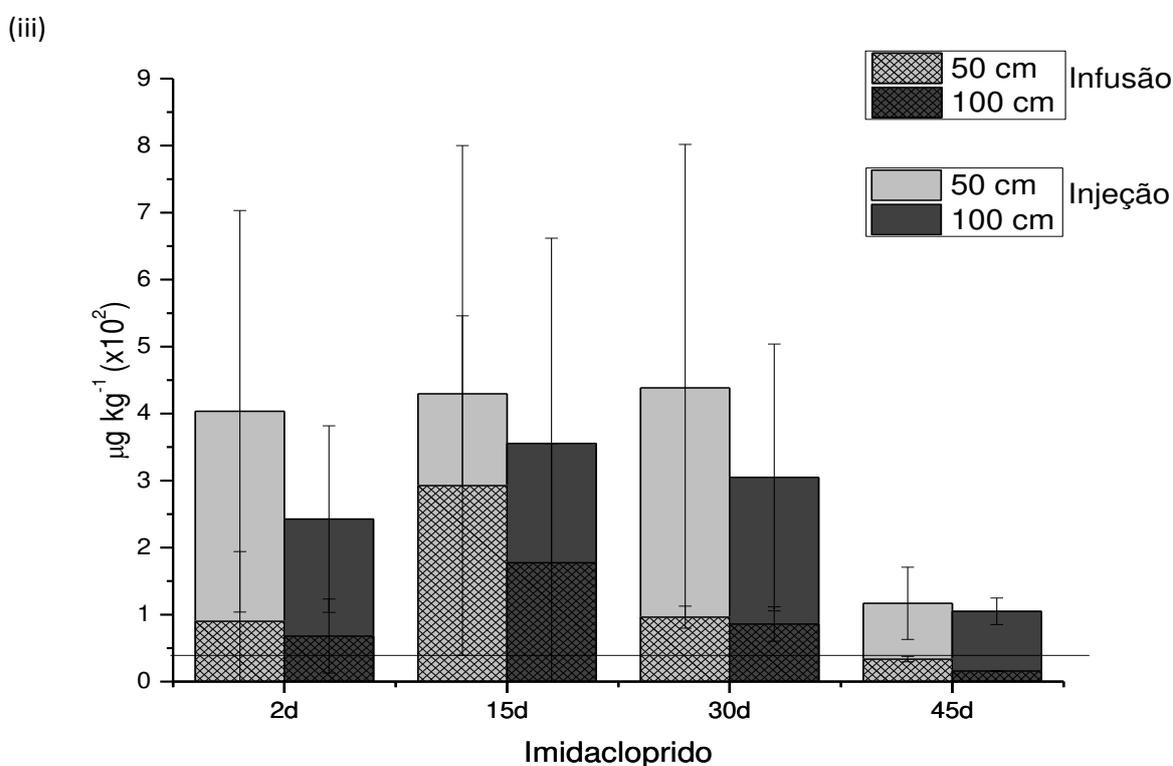
(ii)



**Figura 95** – Concentração do imidacloprido após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de injeção, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de  $40\text{--}1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

### (iii) Comparação dos tratamentos endoterápicos de infusão e injeção

As duas modalidades de tratamentos apresentaram perfis de translocação para o imidacloprido completamente diferentes. Contudo, esperavam-se concentrações maiores, já que da lista de agrotóxicos comerciais selecionados, o imidacloprido é o segundo que possui a maior concentração de princípio ativo. Além disso, a literatura já reportou alguns estudos baseado em translocação utilizando o imidacloprido, por isso, a expectativa era por melhores resultados<sup>9</sup>. Notou-se que em ambos os casos, os ápices das translocações foram com 15 dias e, considerando as concentrações aplicadas em cada um dos dois tratamentos, a eficiência de translocação para a endoterapia de infusão sobressaiu à injeção. Além disso, a paridade de translocação para a infusão foi com 30 dias e a injeção com 45 dias, mostrando que entre as médias das concentrações nos pontos de 50 e 100 cm nos mesmos intervalos de coleta foram diferentes, indicando que o produto teve uma translocação lenta, permanecendo por mais tempo na planta.



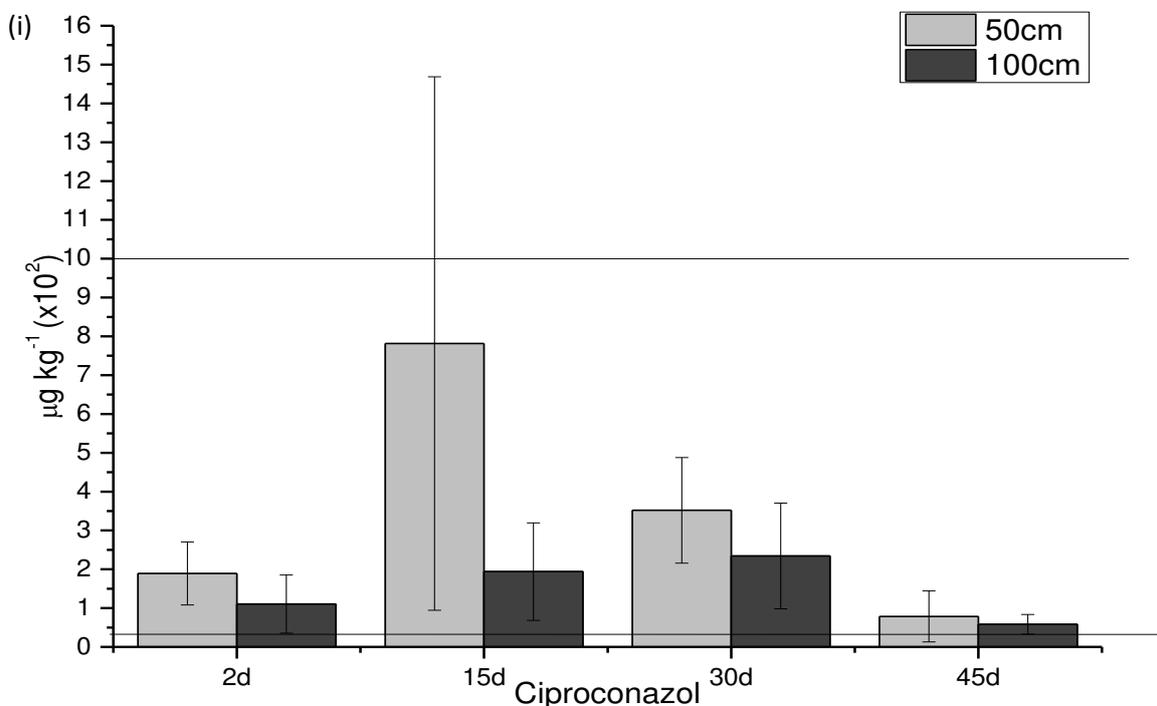
**Figura 96** - Sobreposição das concentrações encontradas para o imidacloprido após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando os métodos endoterápicos de infusão (área hachurada) e injeção (área lisa).

### 7.4.5 - Resultados de translocação do ciproconazol

#### (i) Tratamento endoterápico de infusão

As amostras coletadas a 100 cm não tiveram concentrações expressivas como em 50 cm. Logo, somando todas as concentrações em 50 cm equivaleram a 2,7‰ deste princípio ativo, sendo que, 15 dias após as aplicações teve a melhor eficiência de translocação correspondendo a 1,5‰ do total calculado. Já a 100 cm, o total de concentração encontrado considerando a dose de ciproconazol aplicado foi de 1,2‰, sendo a eficiência de translocação, com 30 dias, igual a 0,46‰. Ainda assim, 45 dias após a aplicação do *mix* contendo o ciproconazol, as concentrações em amostras coletadas de 50 e 100 cm estiveram bem próximas, sendo 78 e 58  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

Considerando as concentrações encontradas nos pontos de 50 e 100 cm acima do ponto de aplicação, a paridade de translocação próximo à copa dos coqueiros foram de 58% para 2 dias, 25% para 15 dias, 67% para 30 dias e 74% para 45 dias.

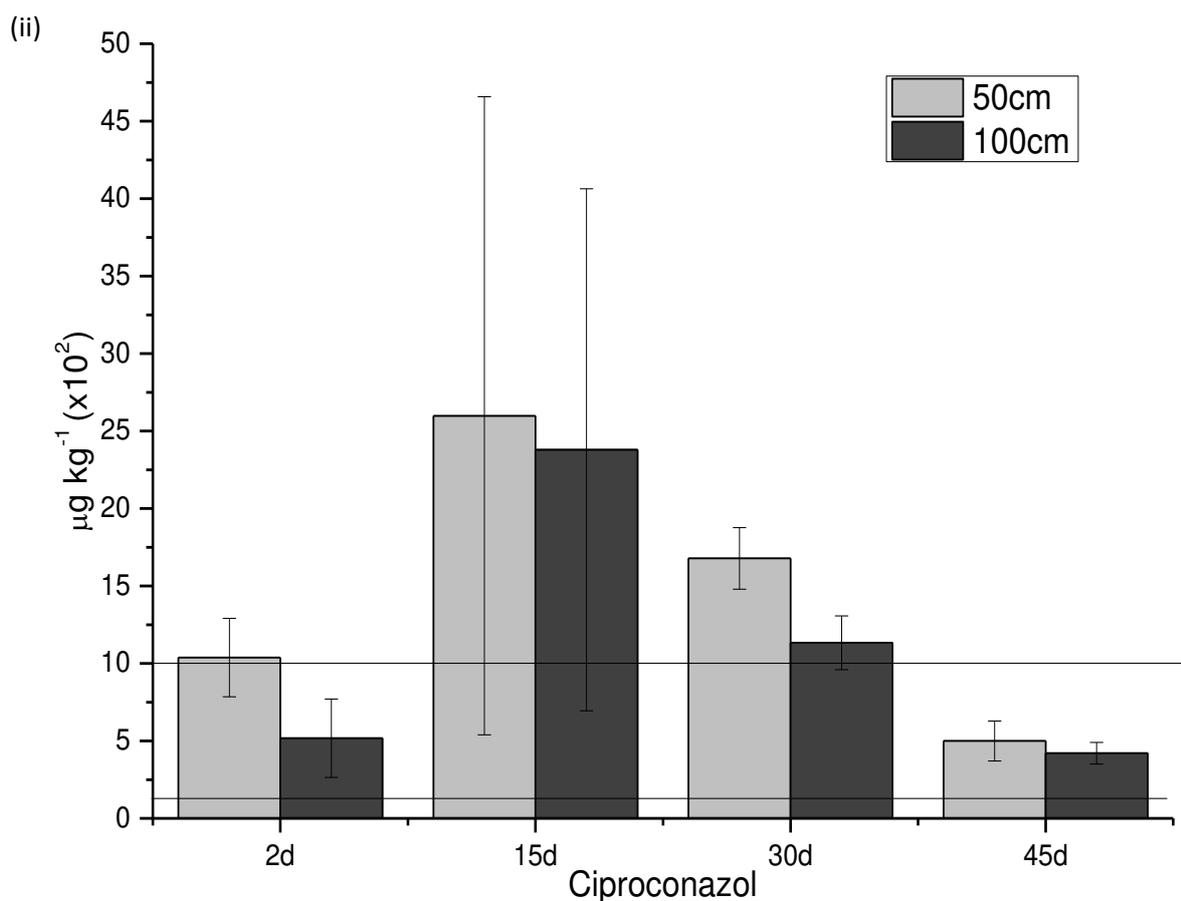


**Figura 97** – Concentração do ciproconazol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de infusão, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de  $40-1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

## (ii) Tratamento endoterápico de injeção

A translocação do ciproconazol no método endoterápico de injeção teve resultados de concentrações diferentes do método de infusão. A eficiência de translocação das amostras coletadas a 50 e 100 cm foi maior em 15 dias após a aplicação. As somas das concentrações a 50 cm corresponderam à 2,87‰, e em 15 dias equivaleram a 1,3‰ do total. Já a soma das concentrações em 100 cm foram de 2,07‰ e 15 dias correspondeu a 1,11‰ da totalidade. Ainda assim, 45 dias após a aplicação, as concentrações nos pontos 50 e 100 cm estavam acima de  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Já a paridade de translocação com 2 dias foi de 48%, 88% para 15 dias, 61% para 30 dias e 84% para 45 dias.

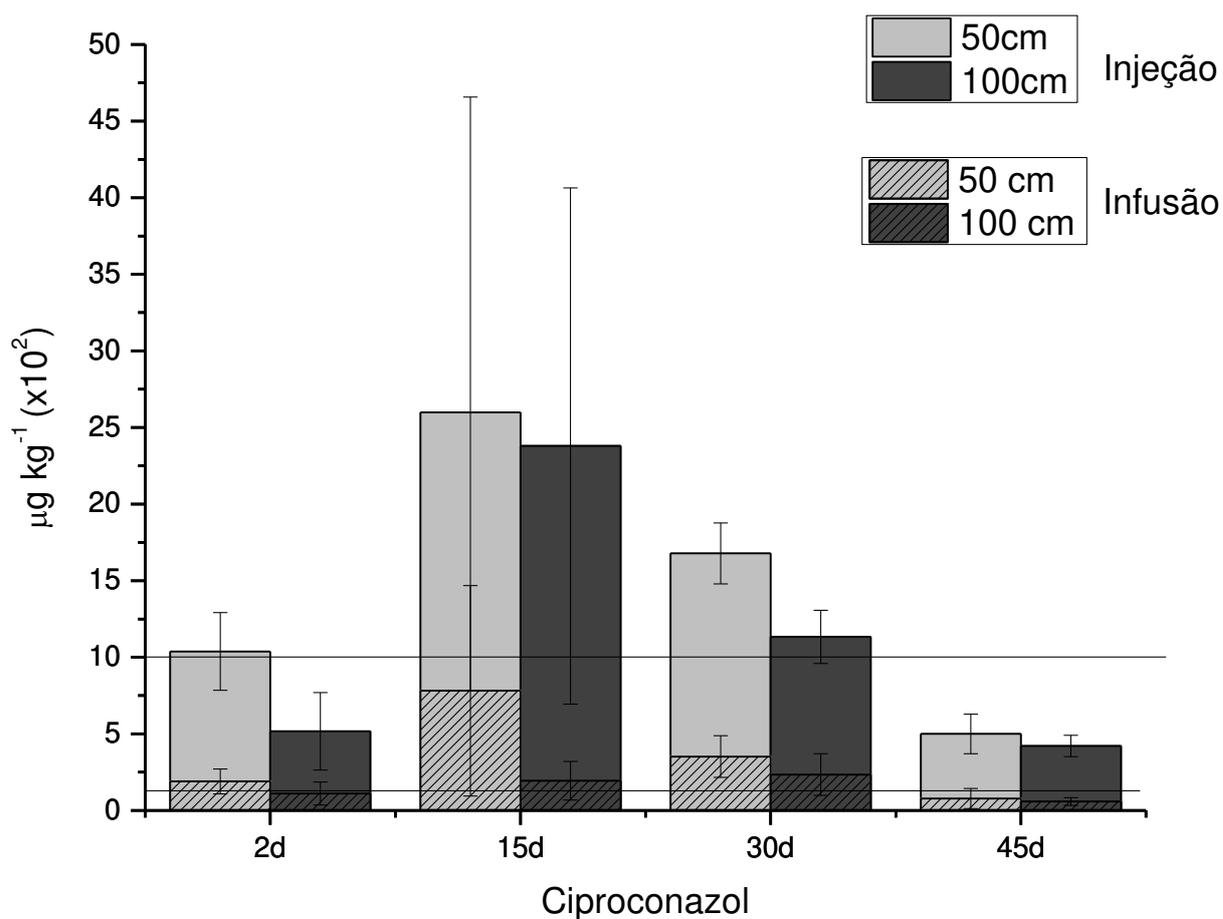


**Figura 98** – Concentração do ciproconazol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de injeção, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de  $40-1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

### (iii) Comparação dos tratamentos endoterápicos de infusão e injeção

De todos os agrotóxicos usados neste trabalho, o ciproconazol é o que tem a menor concentração de princípio ativo no produto comercial. Contudo, em relação aos outros agrotóxicos, como o tiabendazol, por exemplo, que tem a maior concentração do princípio ativo desta seleção, o ciproconazol teve um melhor desempenho de translocação. Em ambos os casos dos tratamentos endoterápicos, as eficiências de translocação foram melhores entre 15 e 30 dias após as aplicações. Já a paridade de translocação para a infusão foi significativa após 15 dias e para a injeção, após 30 dias, mostrando que a translocação para este agrotóxico foi mais lenta, permanecendo mais tempo dentro da planta.

(iii)



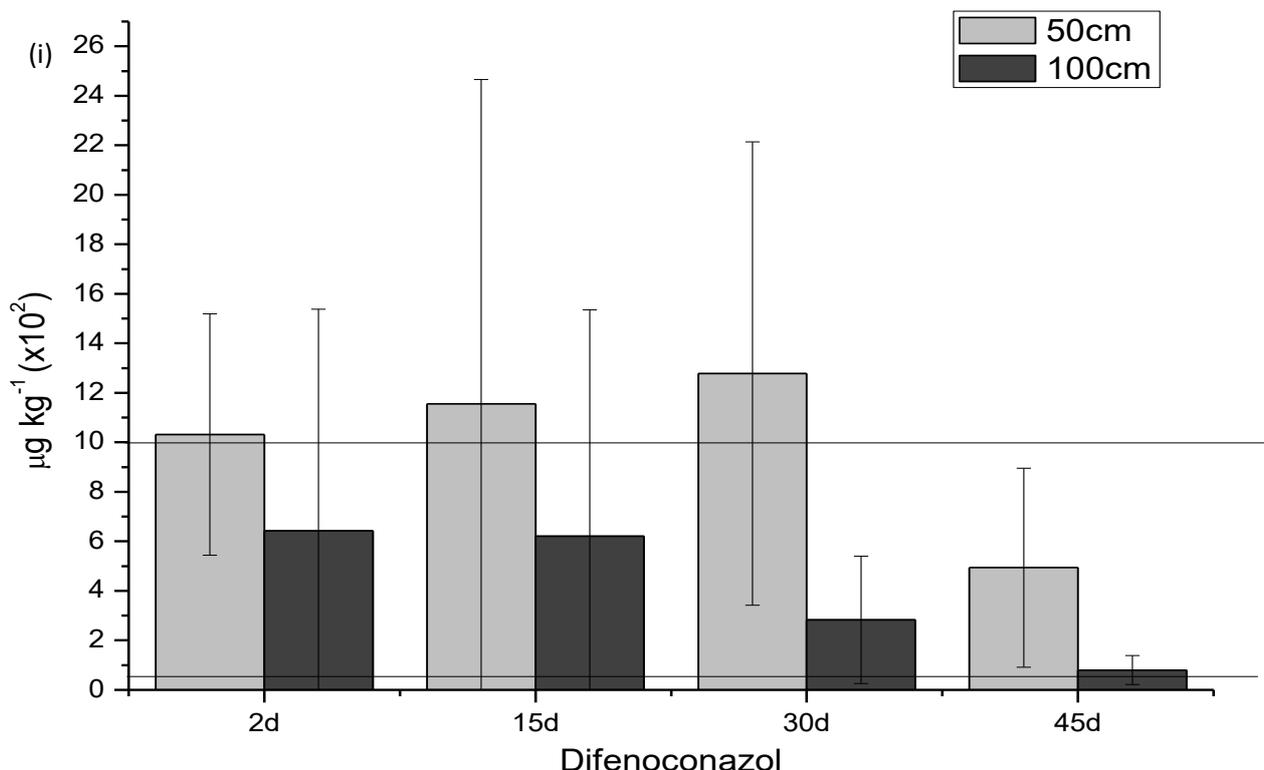
**Figura 99** - Sobreposição das concentrações encontradas para o ciproconazol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando os métodos endoterápicos de infusão (área hachurada) e injeção (área lisa).

#### 7.4.6- Resultados de translocação do difenoconazol

##### (i) Tratamento endoterápico de infusão

A translocação do difenoconazol apresentou perfis diferentes para 50 e 100 cm acima do ponto de aplicação. Em 50 cm, os intervalos de 2 a 30 dias tiveram resultados próximos, e juntos somaram 2,72‰ do difenoconazol aplicado. Já nas amostras de 100 cm, as concentrações após 2 e 15 dias praticamente se mantiveram, correspondendo a 0,99‰ da concentração de difenoconazol aplicado, caindo drasticamente com 30 e 45 dias, porém, sendo quantificadas com 257 e 80  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

Considerando os resultados encontrados a 50 e 100 cm, as paridades de translocação próximo à copa dos coqueiros foram de 62% para 2 dias, 54% para 15 dias, 22% para 30 dias e 25% para 45 dias. Esses resultados mostraram que após 2 dias houve uma maior eficiência em relação aos demais.

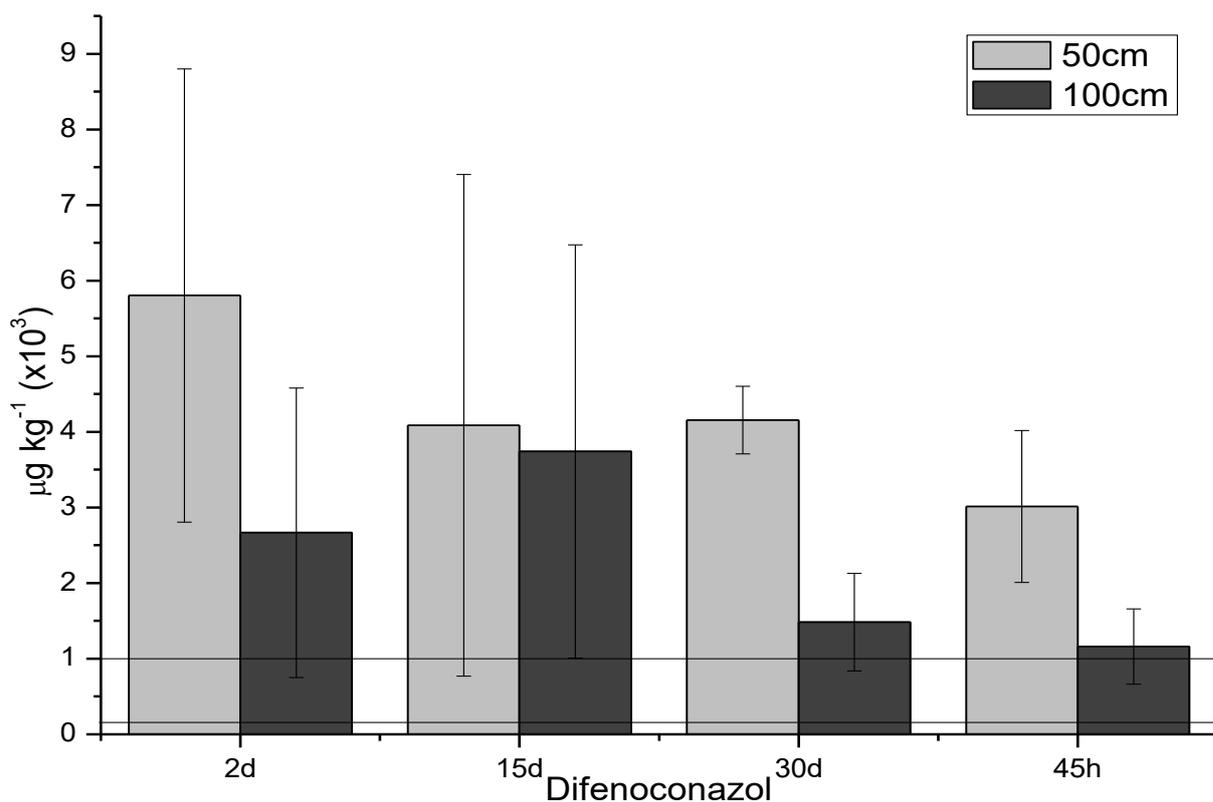


**Figura 100** – Concentração do difenoconazol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de infusão, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de 40-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

## (ii) Tratamento endoterápico de injeção

O comportamento do difenoconazol utilizando o método endoterápico de injeção foi bem diferente do método de infusão. A maior eficiência de translocação a 50 cm foi após 2 dias e correspondeu a 1,1‰ deste analito aplicado junto aos demais agrotóxicos, da soma calculada de 3,33‰. Já em 100 cm acima do ponto de aplicação, a maior eficiência de translocação foi após 15 dias, representando 1,7‰ da solução aplicada. Em 45 dias após as aplicações, as concentrações ainda estavam acima da faixa de trabalho com 3012  $\mu\text{g kg}^{-1}$  a 50 cm e 1161  $\mu\text{g kg}^{-1}$  a 100 cm. A paridade de translocação para 2 dias foi de 47%, 15 dias com 89%, 30 dias com 34% e 45 dias com 39%. Esses resultados mostraram o bom desempenho de translocação e persistência deste agrotóxico no estipe do coqueiro utilizando esta modalidade de aplicação endoterápica.

(ii)

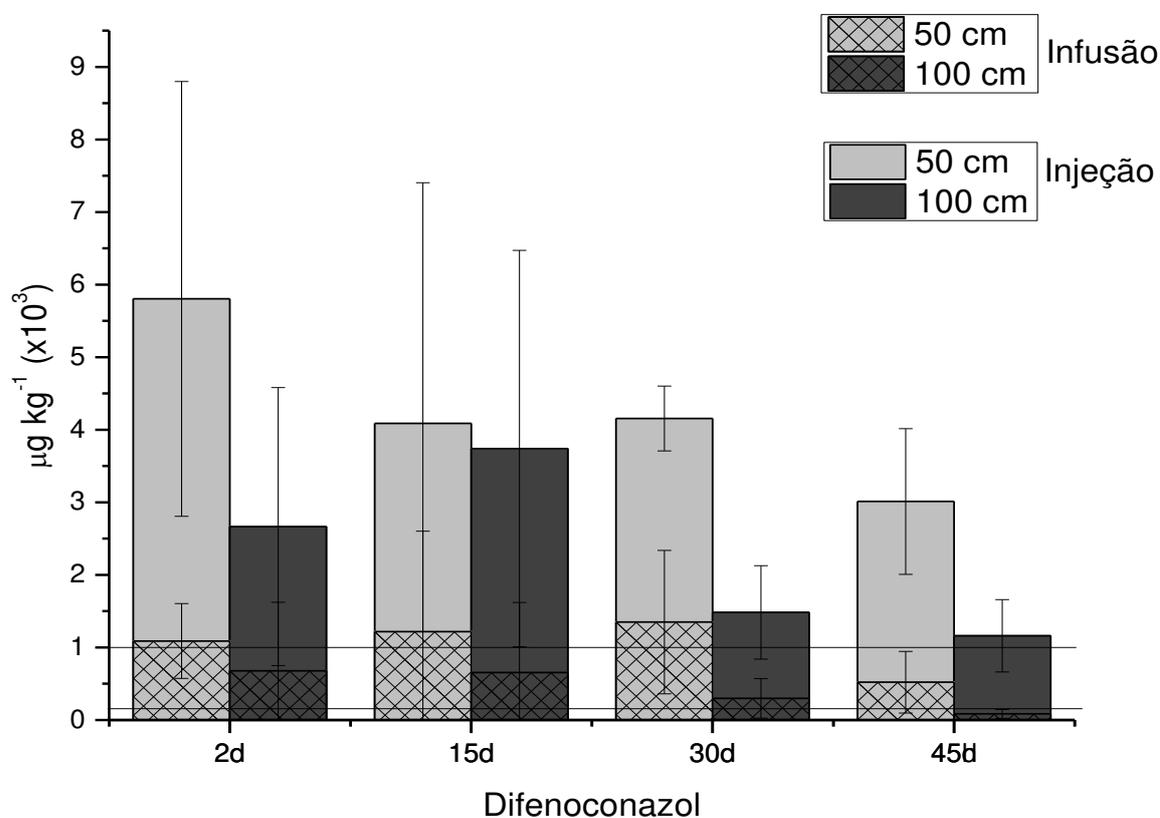


**Figura 101** – Concentração do difenoconazol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de injeção, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram apenas detectadas e acima de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de 40-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

### (iii) Comparação dos tratamentos endoterápicos de infusão e injeção

O difenoconazol foi o agrotóxico que teve a melhor mobilidade/translocação até à copa do coqueiro (100 cm) com altas concentrações, sobretudo, utilizando o método de injeção. A eficiência de translocação para a infusão foi alcançada entre 2 a 30 dias e para a injeção perdurou até os 45 dias. Já a paridade de translocação avaliados para a injeção foi alcançado com 15 dias e para a infusão foi com 2 dias.

(iii)



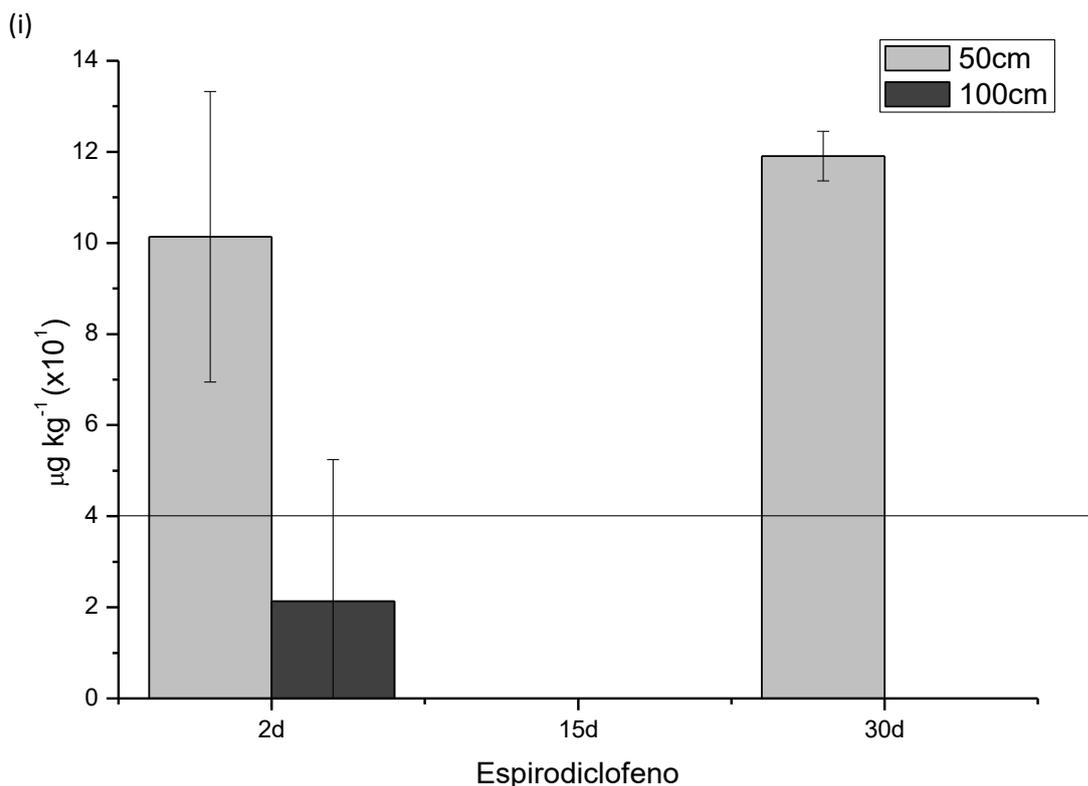
**Figura 102** - Sobreposição das concentrações encontradas para o difenoconazol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando os métodos endoterápicos de infusão (área hachurada) e injeção (área lisa).

### 7.4.7- Resultados de translocação do espirodiclofeno

#### (i) Tratamento endoterápico de infusão

O perfil de translocação do espirodiclofeno já era esperado, uma vez que este agrotóxico não é sistêmico. Sendo assim, esses resultados reforçaram que a translocação deste analito pode ir até 30 dias após a aplicação em pontos próximos à aplicação, como a 50 cm.

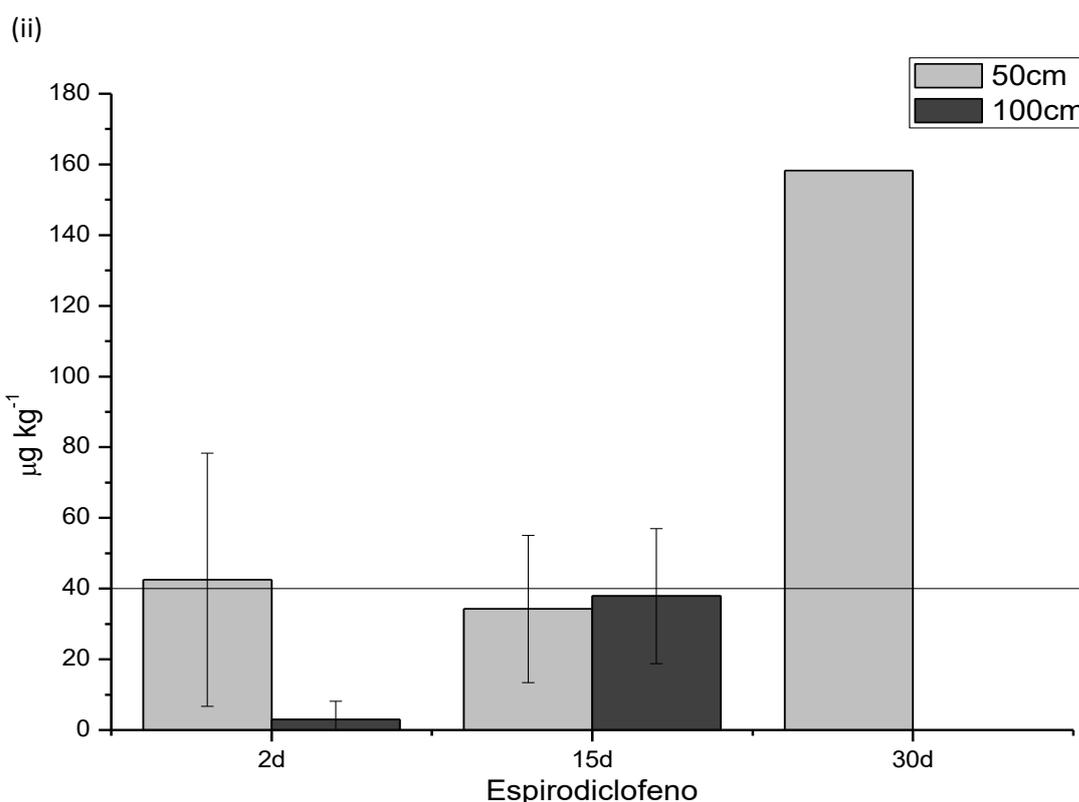
Uma justificativa para o fato de ter sido encontrada concentrações elevadas após 30 dias de aplicação a 50 cm acima do ponto de aplicação e não ter sido detectado/quantificado após 15 dias, pode ser atribuída a irrigação feita nas plantas em todos os tratamentos, após os 15 dias da aplicação, devido a um período de seca atípica na região, o que deve ter favorecido a translocação do espirodiclofeno.



**Figura 103** – Concentração do espirodiclofeno após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de infusão, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de 40 µg L<sup>-1</sup> foram apenas detectadas e acima de 1000 µg L<sup>-1</sup> foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de 40-1000 µg L<sup>-1</sup> e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

## (ii) Tratamento endoterápico de injeção

Assim como no método de infusão, os resultados do espiroclorfenol eram esperados por ser um agrotóxico não sistêmico, mostrando que a translocação deste analito só pode ser quantificada em 50 cm em 30 dias após a aplicação, sendo apenas detectado em 100 cm. Provavelmente, por ser um agrotóxico não sistêmico, a acumulação ficou próximo ao local da aplicação.



**Figura 104** – Concentração do espiroclorfenol após aplicação do *mix* de agrotóxicos empregando o método endoterápico de injeção, em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações abaixo de 40 µg L<sup>-1</sup> foram apenas detectadas e acima de 1000 µg L<sup>-1</sup> foram diluídas 5 vezes. A faixa de trabalho da curva analítica foi de 40-1000 µg L<sup>-1</sup> e está sinalizada nos gráficos por retas horizontais. A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

## 7.5 - Discussão dos resultados obtidos nos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão utilizando a mistura de agrotóxicos (*mix*) + *Break-thru*®

### 7.5.1 - Infusão

A detecção e quantificação dos agrotóxicos com diferentes propriedades físico-químicas e concentrações de princípios ativos forneceram resultados com diferentes perfis de translocação.

O tiametoxam e o carbofurano tiveram os perfis de translocação próximos, com maiores concentrações já nos primeiros dias, e diminuição dessas concentrações nos próximos intervalos de coletas. Já o tiabendazol, imidacloprido e ciproconazol também tiveram os perfis semelhantes, com o aumento súbito de concentração após 15 dias. Por outro lado, o espiroclorfenol e o difenoconazol tiveram perfis de translocação opostos e diferentes dos demais agrotóxicos, sendo que o espiroclorfenol foi o que menos translocou por ser não sistêmico e o difenoconazol o que teve maiores concentrações e tempo de permanência dentro da planta. O 3-OH-carbofurano, metabólito do carbosulfano e carbofurano foram apenas detectado nas amostras.

Assim, as maiores concentrações e translocações dos agrotóxicos aplicados por endoterapia de infusão foram: difenoconazol > carbofurano > ciproconazol > imidacloprido > tiametoxam > tiabendazol > espiroclorfenol. Estes resultados indicaram que utilizando esta técnica de aplicação, todos os agrotóxicos testados têm capacidade de translocar. O equipamento *Bite Infusion* mostrou potencial para ser utilizado, mas ainda necessita ser aprimorado para a introdução de maiores volumes de agrotóxicos, uma vez que na configuração atual, o gasto de tempo e o esforço do operador durante a aplicação são ainda desvantagens deste equipamento.

### **7.5.2 - Injeção**

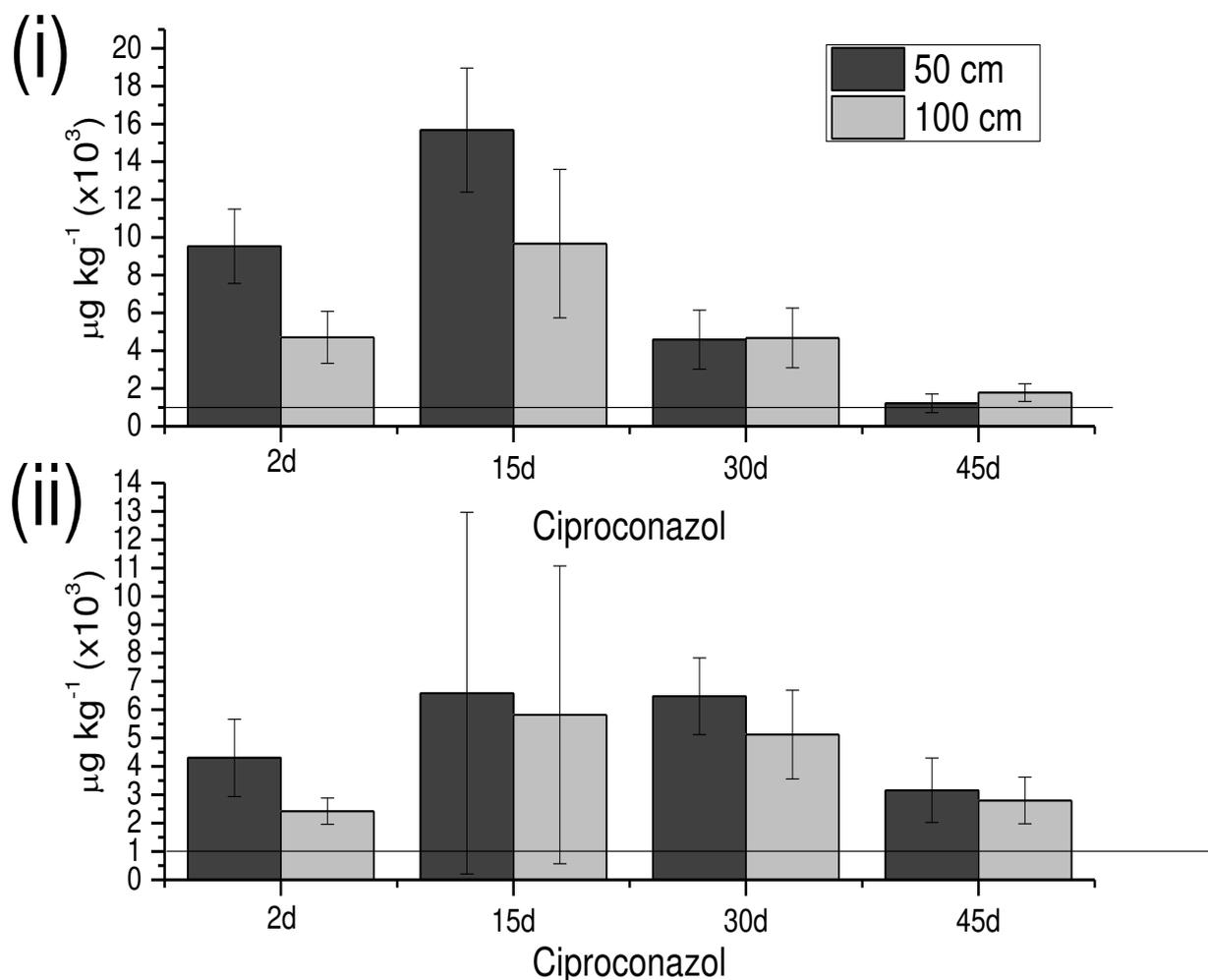
Como o volume de solução injetado foi o dobro do tratamento de infusão, as concentrações foram bem maiores, mas mesmo assim foi possível verificar que a ordem decrescente de translocações foi difenoconazol > ciproconazol > carbofurano > tiabendazol > tiametoxam > imidacloprido e espiroclorfenol, respectivamente. Esta sequência foi semelhante ao tratamento de infusão.

## **7.6 – Translocação de agrotóxicos utilizando os tratamentos endoterápicos de injeção e infusão empregando o ciproconazol + *Break-thru*®**

Em paralelo a este projeto, os pesquisadores da Embrapa-Tabuleiros Costeiros selecionaram o ciproconazol para ser avaliado isoladamente dos demais agrotóxicos em um estudo de aplicação endoterápica para controle de pragas e doenças no coqueiro. Os resultados mostraram que os tratamentos utilizando este agrotóxico reduziram o nível de infecção de pragas e doenças caulinares e foliares nos coqueiros. Por estas razões, o ciproconazol foi escolhido para ser avaliado individualmente.

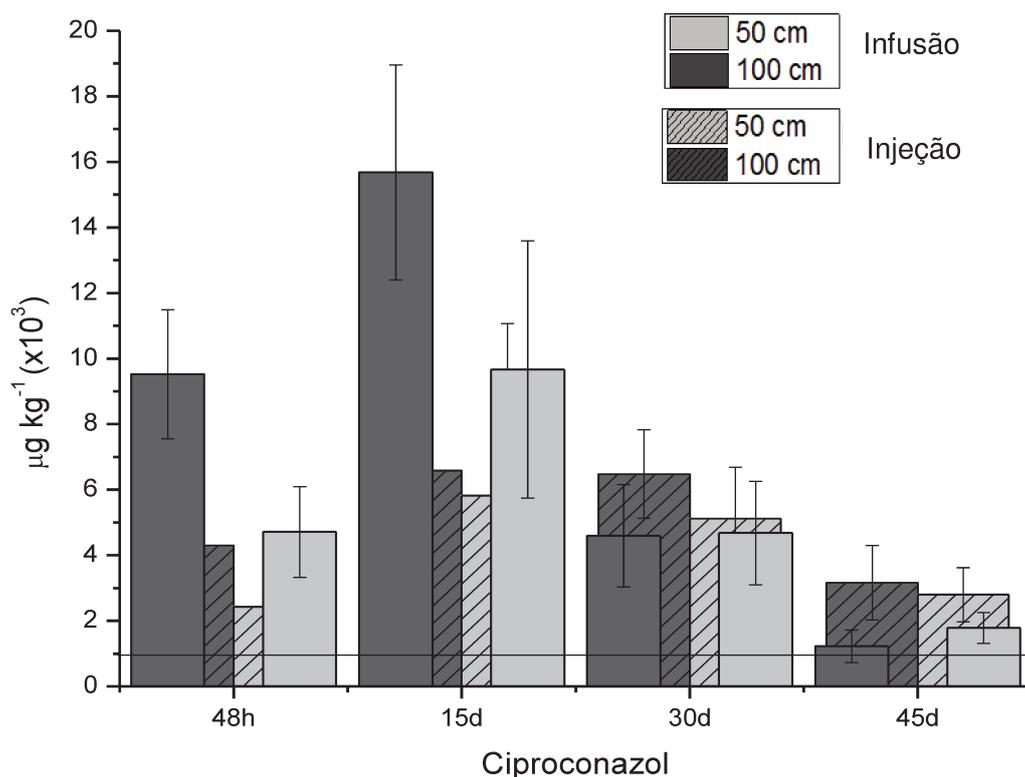
No tratamento com o ciproconazol, apesar do volume utilizado nos dois tratamentos (infusão e injeção) serem diferentes, ambos estavam sob a mesma concentração.

A Figura 105 aponta as médias das concentrações do ciproconazol nas três plantas selecionadas para intervalos de 2 dias, 15 dias, 30 dias e 45 dias após a execução do tratamento endoterápico de infusão (i) e injeção (ii), partindo de amostras coletadas a 50 e 100 cm do ponto de aplicação. A Figura 106 mostra a sobreposição dos tratamentos endoterápicos e foram calculadas as eficiências de translocação e as paridades de translocação. Os detalhamentos das concentrações de cada planta analisada neste Teste encontram-se nas Figuras S1 a S9 em anexo.



**Figura 105** – Concentração do ciproconazol após aplicação deste agrotóxico empregando os métodos endoterápicos de infusão (i) e injeção (ii), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS. As concentrações acima de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  estão sinalizadas nos gráficos por uma reta na horizontal. A faixa de trabalho compreendida foi de  $40-1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . A barra de erros indica a estimativa do desvio padrão entre três plantas.

Notou-se que os dois métodos de aplicação endoterápica possibilitaram a translocação do agrotóxico. Contudo, o método de infusão resultou em concentrações superiores ao método de injeção em determinadas alturas (2 e 15 dias), mesmo aplicando a metade do volume (10 mL) que a utilizada no método de injeção (20 mL).



**Figura 106** - Sobreposição das concentrações encontradas para o ciproconazol após aplicação empregando os métodos endoterápicos de injeção (área hachurada) e infusão (área lisa).

Considerando a mesma concentração, foi possível sobrepor os gráficos de barras dos métodos endoterápicos para que os resultados pudessem ser comparados. Observou-se que no método de infusão houve uma menor variação nas concentrações e a translocação deste agrotóxico entre as plantas. No entanto, no método endoterápico de injeção, nos intervalos de 30 e 45 dias após a aplicação, a concentração encontrada foi quase o dobro do método de infusão.

Estes resultados sugerem duas possíveis avaliações:

✿ O tratamento de infusão pode ser um método com respostas de translocação mais rápidas, dado a pressão exercida no êmbolo da seringa e pelo fato da agulha do equipamento permanecer dentro do estipe, é possível fazer o infusionamento de todo o líquido. Os resultados mostraram que os ápices da translocação ocorreram após 2 e 15 dias, e que 30 e 45 dias após a aplicação a concentração estava acima de  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,

demonstrando que ainda havia agrotóxico translocando até a copa dos coqueiros. Além disso, foi utilizada a metade do volume do tratamento de injeção. Logo, se o interesse/problema do produtor for a obtenção de respostas mais rápidas no controle de alguma doença ou praga para evitar a infestação numa área, este pode ser o tratamento mais indicado. Ainda é importante destacar uma concentração média de  $15000 \mu\text{g kg}^{-1}$  após 15 dias de aplicações. A eficiência de translocação em 50 cm foi de 0,62‰ e em 100 cm foi de 0,41‰. Os equilíbrios de translocação foram de 49% para 2 dias, 92% para 15 dias, 102% para 30 dias e 146% para 45 dias. Notou-se que as concentrações a partir de 30 dias ficaram acima de 100%, isso sugere que a translocação estava ocorrendo até a copa, e que dentro de mais alguns dias não seria possível detectar/quantificar o ciproconazol em 50 cm.

✿ Caso o interesse/problema do produtor seja por um tratamento com menos implicação ao meio ambiente e à saúde do homem, pode-se utilizar um método mais simples como o tratamento endoterápico de injeção. A translocação do ciproconazol neste teste foi mais demorada que no método de infusão e teve um efeito duradouro, com uma concentração acima de  $2700 \mu\text{g kg}^{-1}$  na copa do coqueiro 45 dias após a aplicação. Entretanto, foi utilizado o dobro do volume usado no método de infusão, a maior concentração média foi  $< 6500 \mu\text{g kg}^{-1}$ , 15 dias após as aplicações.

A eficiência de translocação, considerando a dose aplicada para o ciproconazol utilizando o tratamento de injeção em 50 cm, foi de 0,20‰ e 0,16‰ para 100 cm. Além disso, os equilíbrios de translocação foram de 56% para 2 dias, 88% para 15 dias, 79% para 30 dias e 89% para 45 dias.

Alguns dos cromatogramas referentes a essas análises estão em anexos.

### **7.7 - Análises dos frutos (água-de-coco e albúmen sólido) do cacho 19 e cacho de coco seco após as aplicações endoterápicas com intervalos de 45 a 120 dias**

Em todos os tratamentos endoterápicos, a água-de-coco e albúmen sólido foram analisadas separadamente, sendo três plantas para cada tratamento endoterápico (infusão e injeção) com intervalos de coleta que variaram de 45 a 120 dias. Estes intervalos foram selecionados porque no Teste 2, com 2 dias e 30 dias após as aplicações, não foram

detectados/quantificados nenhum agrotóxico no tratamento de injeção. Por estas razões, optou-se por estender os intervalos de coleta dos frutos. Contudo, em todos os intervalos estudados, em frutos do cacho 19 e cacho de coco seco, não foi detectada a presença de nenhum agrotóxico, mesmo nos testes utilizando o ciproconazol, no qual, na endoterapia de injeção, foi aplicado uma dosagem de 20 mL deste analito, sem diluição. Alguns dos cromatogramas referentes a essas análises encontram-se na nas Figuras S13 a S16, no anexo.

Os resultados encontrados neste trabalho permitem fazer algumas considerações:

(a) O coqueiro é todo vascularizado e os feixes se comunicam uns com outros, diluindo as concentrações, dispersando o agrotóxico aplicado;

(b) Os agrotóxicos não chegaram até os frutos. De acordo com Roth<sup>16</sup>, a seiva elaborada penetra na semente, nutre o embrião em desenvolvimento e abastece a cavidade ou saco embrionário com o endosperma através do poro funcional. Como o endocarpo consiste de tecido esclerificado, feixes fibrosos não vasculares e bainha fibrosa de feixes vasculares, a probabilidade de penetrar/translocar agrotóxicos até à cavidade pode ser pequena. Além disso, os taninos, compostos fenólicos presentes no tegumento, podem atuar como barreira física.

(c) Em frutos dos cachos 19 e coco seco não foram detectados resíduos de nenhum agrotóxico nas amostras coletadas 120 dias após às aplicações. Durante a aplicação dos tratamentos endoterápicos, os cachos de onde os frutos foram coletados para as análises eram mais jovens. Por exemplo, frutos do cacho 19 colhidos aos 45 dias estavam no cacho 17 durante a aplicação dos agrotóxicos, os colhidos aos 90 dias estavam no cacho 15, e os colhidos aos 120 dias estavam no cacho 14. Já os do cacho de coco seco, colhidos com 45 dias, estavam no cacho 20 durante a aplicação dos agrotóxicos, os colhidos aos 90 dias estavam no cacho 18 e os colhidos aos 120 dias estavam no cacho 17. Sabe-se que a água-de-coco (albúmen líquido, tecido endospermático) começa a acumular 30 dias após a fecundação e atinge um volume máximo aos 180 dias (6 meses)<sup>17</sup>, ou seja, até

aproximadamente o cacho 19. Após esse período, a formação da água-de-coco é interrompida já que houve o preenchimento do saco embrionário, quando se inicia a formação do albúmen sólido. Embora tendo cessado o movimento da água para o interior do fruto, achou-se conveniente analisar também, a água dos frutos do coco seco aos 45 dias (cacho 20) após a aplicação.

(d) Por fim, a endoterapia pode ser eficiente para controle de doenças/pragas: (i) caulinares, em experimentos baseados nos estudos de translocação e confirmados com as análises, e (ii) foliares, onde a avaliação da eficiência do produto pode ser feita por meio de inspeções visuais e dos sintomas, ou confirmada por meio de análises químicas que comprovem que o produto está translocando na planta. A aplicação endoterápica de injeção preconiza que o produto precisa translocar do ponto da aplicação no estipe até as folhas da planta. Contudo, a endoterapia pode não ser satisfatória para doenças/pragas nos frutos.

### **7.8 – Discussões gerais dos resultados obtidos nos tratamentos endoterápicos de injeção e infusão**

As translocações dos agrotóxicos aplicados no estipe de coqueiro de cada planta partiram das concentrações citadas nas Tabelas 10 e 11. As concentrações encontradas nas análises corresponderam as amostras coletadas num instante do dia referente àquele intervalo espaço-temporal. É importante destacar que a translocação ocorre diariamente e só é interrompida quando o sol está muito quente e os estômatos das folhas se fecham numa estratégia de evitar que a planta perca muita água. A translocação-transpiração depende de condições climáticas e geográficas, ademais, inevitavelmente, cada planta tem um perfil de translocação diferente de outra. Por isso, foram selecionadas três plantas para cada intervalo de coletas e que, a variabilidade existente entre as plantas pudesse ser melhor avaliada e os erros experimentais reduzidos.

O pH da seiva no estipe é outro fator ligado à movimentação dos agrotóxicos no interior da planta. Utilizando fitas para determinação de pH, entre as alturas intermediária e próximo à copa foi possível determinar que quanto mais próximo da copa, mais ácida é a seiva, com

um pH próximo a 5. Estes resultados podem auxiliar na compreensão das diferenças encontradas nos equilíbrios de translocação.

Os resultados dos perfis de translocação nos dois métodos de aplicação foram diferentes. Esta diferença pode ser justificada principalmente pela pressão exercida durante as aplicações. Considerando as concentrações dos agrotóxicos nas duas técnicas, as discrepâncias de resultados podem ser atribuídas à: (a) desproporção de volume aplicado no tratamento de infusão, devido à limitação do equipamento, sendo que no tratamento de injeção utiliza-se o dobro do volume aplicado; (b) as diferentes concentrações de princípios ativos dos agrotóxicos presentes nas soluções comerciais. Não foi uma regra, mas se notou que na maioria dos casos (infusão e injeção) quanto maior a concentração do agrotóxico translocado, maiores foram as dispersões entre as médias dos resultados.

Este estudo proporcionou uma visão ampla quanto à interação planta e agrotóxicos, já que, os agrotóxicos podem ser tidos como marcadores/traçadores. A translocação dos agrotóxicos está diretamente relacionada com o clima, o solo, as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, a condição da planta, entre outros. Quanto maior a temperatura do dia, maior a transpiração da planta, e conseqüentemente, maior a translocação. Por isso, a sugestão para quando for utilizar a endoterapia, como método de aplicação de agrotóxicos, é que a aplicação seja realizada em estações quentes. Para Zhang *et al.*,<sup>211</sup>, a absorção e a distribuição são dependentes das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, bem como das características do cultivo das espécies das plantas e da fisiologia, incluindo importantes propriedades como enzimas, lipídeos e taxas de transpiração. Adicionalmente, Pereira *et al.*,<sup>212</sup> afirmaram que a acumulação e o transporte de agrotóxicos são controlados pela polaridade, afinidade para tecidos gordurosos ( $\log K_{ow}$ ) e solubilidade em água.

A translocação xilemática, partindo da raiz até as folhas, depende da lipofilicidade do produto, bem como da translocação floemática que faz o caminho inverso, das folhas às raízes. Assim, agrotóxicos lipofílicos (alto  $K_{ow}$ , apolar,  $\log > 3$ ) são capazes de penetrar facilmente nas cutículas por difusão em taxas mais altas que os agrotóxicos hidrofílicos. Os

agrotóxicos lipofílicos atacam fortemente os lipídeos, apresentando grande potencial de bioacumulação em tecidos gordurosos, como alguns tecidos de plantas<sup>11</sup>. Nas duas técnicas utilizadas, os três agrotóxicos com maiores translocações e concentrações foram o difenoconazol, ciproconazol e carbofurano, que apresentam um  $K_{ow}$  de 4,36; 3,09; 1,8, respectivamente. Outras características relevantes desses três agrotóxicos é que eles apresentam polaridades que variam de moderadamente polar a apolar e possuem capacidade de bioacumulação versátil. Neste caso, o  $K_{ow}$  não especificou/determinou nenhum parâmetro. Este fato torna-se curioso, porque o tiabendazol tem um  $K_{ow}$  maior que o carbofurano. Contudo, independente desta propriedade, a literatura reporta inúmeros estudos sobre a translocação, persistência e acumulação do carbofurano em diversas matrizes, como tomateiros<sup>213</sup>, arroz *paddy*, amendoim e algodão<sup>214</sup>. Para os demais agrotóxicos como o tiametoxam, tiabendazol, imidacloprido e espirodiclofeno há uma variabilidade e inconstância nas concentrações quando se compara os resultados de eficiência de translocação dos dois tratamentos endoterápicos.

De uma forma geral, todos os agrotóxicos aplicados translocaram e chegaram até à copa do coqueiro utilizando os dois tratamentos endoterápicos. É importante enfatizar que os agrotóxicos quantificados/detectados foram referentes à translocação nos feixes no exato momento da coleta, e que durante às extrações das amostras, os agrotóxicos impulsionados pela seiva durante o equilíbrio de translocação-transpiração foram interrompidos, posto que, tais feixes vasculares condutores de seivas funcionam como “ductos hidráulicos”. Por isso, as plantas que sofreram com o rompimento dos feixes não foram reutilizadas nas coletas seguintes, e os coqueiros utilizados para a coleta dos frutos foram tratados apenas para esta finalidade.

Em termos de persistência, com exceção do espirodiclofeno e do 3-OH-carbofurano (metabólito do carbossulfano e carbofurano) que só foi detectado, todos os demais agrotóxicos puderam ser quantificados ou detectados no estipe do coqueiro, mesmo 45 dias após a aplicação, usando as duas técnicas endoterápicas.

De uma forma geral, somando-se todas as concentrações encontradas em 50 e 100 cm para cada agrotóxico com intervalos de 2 a 45 dias após as aplicações, foi possível estimar as paridades de translocação até a copa do coqueiro utilizando a endoterapia de infusão para os seguintes analitos: tiametoxam (28%), carbofurano (43%), tiabendazol (22%), imidacloprido (40%), ciproconazol (30%), difenoconazol (29%) e espirodiclofeno (9%). Já para a endoterapia de injeção, os resultados foram: tiametoxam (40%), carbofurano (45%), tiabendazol (32%), imidacloprido (42%), ciproconazol (43%), difenoconazol (35%) e espirodiclofeno (15%). Para o ciproconazol, a porcentagem de paridade de translocação utilizando a endoterapia de infusão foi de 67% e para a endoterapia de injeção foi de 79%. Esses resultados são consistentes, pois na injeção foi usado um maior volume de calda de agrotóxicos que na infusão, por isso, os valores maiores de porcentagens nesse método de aplicação.

Alguns dos cromatogramas referentes a essas análises encontram-se nas Figuras S10 a S16 na parte em anexos.

## Capítulo 8

# CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos permitiram contextualizá-los com outras áreas do conhecimento, como a botânica, a química e a agronomia, e foram trazidas à esta discussão, tornando-as fundamentais para o enriquecimento e multidisciplinaridade deste trabalho.

Os experimentos utilizando os traçadores para estudos qualitativos iniciais de translocação mostraram que o coqueiro é totalmente vascularizado e os feixes podem se comunicar em toda a sua extensão. Os resultados com a rodamina B foram mais evidentes que os com o azul brilhante FCF, já que a coloração da rodamina B foi mais fácil de ser visualizada, facilitando a contagem dos feixes corados/traçados. A translocação do traçador foi lenta e dependeu de importantes variáveis, como: a) estágio de saúde da planta; b) volume de irrigação; c) forma de aplicação, volume e tempo de injeção do traçador e d) condições climáticas e estação do ano. Os experimentos via raiz não foram eficientes para os estudos de translocação, pois observou que com este método seria necessária a reposição contínua de traçador, além do risco de contaminar o solo, caso houvesse qualquer descuido do operador. Esses resultados de campo contribuíram para o conhecimento do processo de translocação dos traçados e forneceram subsídios para as técnicas de aplicação de agrotóxicos.

O estudo de dissecação do coqueiro permitiu compreender a anatomia vascular do estipe e suas respectivas distribuições de feixes. Estas avaliações foram importantes devido à poucas informações na literatura para a elaboração de estratégias a serem adotadas nas coletas das amostras, para a compreensão de como são formados os feixes vasculares e suas distribuições no estipe, além do aprimoramento dos tratamentos endoterápicos voltado às necessidades do coqueiro.

A filotaxia que aborda a sequência de Fibonacci demonstrou que não há translocação sem transpiração. As folhas formam uma simetria e um padrão de 5 espirais e ao avaliar quaisquer duas folhas consecutivas do coqueiro, verifica-se que há entre elas um ângulo de

aproximadamente  $137,5^\circ$ , sendo que este fenômeno é conhecido como a sequência de Fibonacci. Nestas proporções, as folhas não se sobrepõem, facilitando a exposição solar, a sustentação dos cachos e, conseqüentemente, propiciando uma maior superfície de contato para estimular a evaporação e transpiração da seiva pelo processo da fotossíntese, princípio para a sua sobrevivência. Assim, a translocação dos agrotóxicos está diretamente ligada à transpiração proporcionada no arranjo de espirais das folhas.

É importante enfatizar a extensa aplicação de agrotóxicos na cocoicultura para controle das doenças e pragas. Os métodos para determinação dos agrotóxicos propostos neste trabalho para o estipe e frutos (água-de-coco e albúmen sólido) foram desenvolvidos, validados e aplicados, mostrando a capacidade de detecção/quantificação. Pelos resultados, concluiu-se que o método QuEChERS acetato modificado para a determinação de agrotóxicos em UHPLC-MS/MS, no estudo de translocação acropetal e avaliação dos frutos consumidos pode ser aplicado em análises de rotina, por atender as legislações e os parâmetros requeridos de validação de métodos cromatográficos.

Para o estipe, o método QuEChERS acetato modificado foi satisfatório para a extração de 10 dos 11 agrotóxicos avaliados. O mesmo método de extração foi empregado para extração dos agrotóxicos no albúmen sólido e na água-de-coco, com o diferencial na etapa de partição, na qual se congelou o sobrenadante por 5 min em gelo seco. Deste modo, foram extraídos/analísados 9 dos 11 agrotóxicos avaliados para cada um dos dois métodos desenvolvidos. Em todos os métodos, a extração do carbossulfano ficou comprometida devido à sua degradação, possivelmente, devido o ajuste de pH ao adicionar o ácido acético na acetonitrila durante a etapa de extração do QuEChERS. No albúmen sólido, não foi obtida recuperação satisfatória para o espiroclorfenol. Na água-de-coco, as recuperações do tiofanato-metílico excederam os valores estabelecidos na literatura para os três níveis de fortificação e não puderam ser validados. Também, não foi obtido o valor de recuperação esperado para o carbendazim entre 70 e 120%, mas ainda assim, devido à complexidade da água-de-coco, os valores estiveram na faixa de 50 a 120% com  $RSD \leq 20\%$ .

Ao utilizar a técnica UHPLC-ESI-(+)-MS/MS foram obtidos valores de recuperação para todos os analitos entre 59-120% e precisão (RSD)  $\leq$  20%. Os demais parâmetros, como a faixa linear, apresentaram valores de  $r^2$  maiores de 0,99, a seletividade foi garantida, os limites de quantificação e detecção foram de 0,003 e 0,010 mg kg<sup>-1</sup> para o albúmen e a água de coco e para o estipe 0,012 e 0,040 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, atendendo a legislação brasileira ANVISA, e para os agrotóxicos ainda não registrados na cocoicultura, concordaram com a legislação da União Europeia.

Foram analisadas os resíduos de agrotóxicos em 36 amostras de frutos colhidos, sendo 18 de água-de-coco e 18 de albúmen sólido de algumas regiões do Brasil, como Campinas-SP, Neópolis-SE e Goianésia-GO, e foram detectada a presença de contaminação por carbendazim, tiabendazol, carbofurano, ciproconazol e difenoconazol. Contudo, em todas as amostras analisadas, com base no LMR estabelecidos pela EU ( $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), os agrotóxicos estavam abaixo do limite de quantificação dos métodos. Notou-se que em frutos utilizando a pulverização, pode ocorrer a contaminação dos mesmos. A hipótese é que nesta modalidade, a aplicação de agrotóxicos é realizada diretamente nos cachos/ramos florais/frutos, diferente da endoterapia que depende da translocação do analito, em um sistema complexo de feixes vasculares até chegar ao fruto.

Foram testados dois diferentes tratamentos endoterápicos: a injeção e a infusão. A aplicação endoterápica tem a vantagem de superar a altura dos coqueiros e minimizar a exposição do contaminante ao meio ambiente e ao agricultor, principalmente em áreas com focos de doenças e pragas. Além de ter grande utilidade em regiões com altas incidências de chuva e/ou sol, protegendo assim o tratamento.

Os resultados do 1º Teste dos tratamentos de injeção e infusão foram promissores, apesar dos coqueiros estarem desnutridos, sem produção e com os estipes brocados. Constatou-se, nestes dois métodos de aplicação, que houve a translocação dos agrotóxicos, sendo detectados e/ou quantificados a 15 cm acima do ponto de aplicação. Durante a aplicação, observou-se que a réplica do equipamento de infusão desenvolvido no IQ-Unicamp

apresentou problemas de aplicação, devido à instabilidade na agulha e a alta rigidez do estipe. Porém, os resultados obtidos neste tipo de aplicação mostraram que os danos causados ao coqueiro foram menos agressivos, considerando os orifícios necessários para utilização do método de injeção. Embora, este método tenha se mostrado mais prático do que o de infusão.

No 2º Teste foram avaliados os primeiros estudos de translocação de diferentes agrotóxicos, envolvendo o parâmetro espaço-temporal, em que foram analisadas amostras em diferentes tempos e alturas do coqueiro. A partir dos resultados de valores de concentração foram estabelecidos os intervalos de 2 dias e 30 dias após a injeção dos agrotóxicos, com amostragens a 15 e 45 cm acima do ponto de aplicação e próximo à copa do coqueiro. Foi possível propor/estudar 6 diferentes tipos de tratamentos com a adição de adjuvantes variados e, conseqüentemente, comprovar a sistematicidade da translocação dos agrotóxicos e a possibilidade de potencializá-los. Os resultados mostraram que, para a maioria dos agrotóxicos injetados, 2 dias é um período suficiente para chegarem próximo à copa. Já para outros agrotóxicos, foi necessário mais tempo, como os 30 dias. Esses resultados foram inovadores, dado que, era desconhecida a sistematicidade dos agrotóxicos em tratamentos endoterápicos quando se aplicam simultaneamente vários fungicidas e inseticidas comerciais. Foram homogeneizados e analisados três frutos do cacho 17 e, constatou-se que não houve nenhum tipo de contaminação na água-de-coco nos 6 diferentes tipos de tratamento, tanto em amostras de 2 dias, quanto nas amostras colhidas após 30 dias.

Para resultados conclusivos, o número de plantas no 3º Teste foi ampliado, totalizando 60 plantas, sendo 30 plantas para cada tratamento endoterápico (injeção e infusão) que foram divididos em dois tratamentos: (a) injeção com seringa de polietileno e (b) utilização do equipamento comercial *Bite Infusion* versão *Di Palma* e subdivididos em dois procedimentos utilizando: (i) *mix* de 7 agrotóxicos comerciais + *Break-thru®*, e (ii) ciproconazol comercial + *Break-thru®*. No decorrer da aplicação dos tratamentos endoterápicos, a injeção foi bem mais simples de realizar do que a infusão que exigiu habilidade e treino do operador, além da demora para o infusão e o volume limitado durante a aplicação.

Durante a aplicação do *mix* aconteceram alguns imprevistos como: a diluição da calda de agrotóxicos no tratamento de infusão para diminuir a viscosidade durante a introdução no estipe. Além disso, cada agrotóxico comercial continha diferentes valores de princípio ativo, o que dificultou a comparação das técnicas endoterápicas e da translocação dos agrotóxicos. Apesar destas variações, notou-se que a concentração do princípio ativo não estava relacionada com a capacidade do agrotóxico translocar no estipe. Cada agrotóxico apresentou um perfil de translocação, dado às suas propriedades físico-químicas peculiares. Apesar de todos imprevistos, foi possível destacar nos dois tratamentos endoterápicos avaliados, a translocação do difenoconazol, ciproconazol e carbofurano.

Na maioria dos casos, as amostras de estipe com 50 cm acima do ponto de aplicação apresentaram concentrações maiores que aquelas em 100 cm (próximo à copa do coqueiro). Com base nesses resultados, as hipóteses levantadas foram que, com a comunicação entre os feixes vasculares pode ter havido uma distribuição/diluição dos agrotóxicos e a diferença de pH encontrada na extensão do estipe pode ter alguma influência na translocação dos mesmos. Assim, com exceção do espiroclorfenol (agrotóxico não-sistêmico) e do seu metabólito, 3-OH-carbofurano, todos os agrotóxicos foram quantificados/detectados nas amostras analisadas 45 dias após as aplicações.

Quanto aos tratamentos endoterápicos utilizando apenas o ciproconazol + *Break-thru®*, apesar dos volumes de aplicação serem diferentes, porém com a mesma concentração (sem diluições), os resultados de translocação puderam ser comparados. Apesar do volume de infusão ser a metade do utilizado no método de injeção, os resultados do infusão foram mais rápidos (2 e 15 dias) e superiores aos do método de injeção. Logo, se o interesse do produtor for um método para o controle, a infusão pode ser o tratamento mais indicado. De outra forma, caso o interesse do produtor seja um tratamento preventivo, em que a translocação do ciproconazol seja mais demorada, recomenda-se o método de injeção.

De forma geral, a eficiência de translocação, calculada com a concentração aplicada e translocada, mostrou que a infusão foi superior à injeção. Já a paridade de translocação,

mostrou que os valores encontrados estão diretamente relacionados com a concentração aplicada, por isso, os resultados de injeção, em que foi aplicado o dobro do volume da infusão, foram superiores.

Em todos os frutos analisados (água-de-coco e albúmen sólido), dos cachos 19 e de coco seco, utilizando os tratamentos endoterápicos, no último Teste com intervalos de coletas de 45 a 120 dias após as aplicações, não foi quantificado/detectado nenhum agrotóxico. Estes resultados garantiram a qualidade dos frutos nestes intervalos de coleta ao empregar a endoterapia.

Durante os experimentos realizados neste período do último Teste, concluiu-se que o número de tratamentos e as amostras coletadas foram suficientes para se obterem respostas comprobatórias acerca da translocação acropetal dos agrotóxicos aplicados por endoterapia se houve contaminação nos frutos. Os agrotóxicos, neste caso, comportaram-se como marcadores/traçadores, atingindo o objetivo inicial deste trabalho ao indicar que não houve nenhuma contaminação dos cachos 19 e no coco seco causada pelo emprego de agrotóxicos até 120 dias após a aplicação.

Como perspectivas a partir dos resultados obtidos neste trabalho, espera-se que mais estudos sejam realizados para que a endoterapia seja uma alternativa viável e segura aos produtores, com estratégias baseadas no: (i) volume para a introdução dos agrotóxicos considerando a altura, idade e a circunferência do estipe de cada planta; (ii) aplicação em outras culturas; (iii) melhoramento dos equipamentos de infusão.

Por fim, as informações e conhecimentos construídos neste trabalho serão úteis para orientar os pesquisadores e agricultores que tenham o objetivo de minimizar o risco de contaminação de frutos, meio ambiente e do operador ao utilizar a endoterapia como método alternativo de aplicação de agrotóxicos.

## REFERÊNCIAS

- (1) GOMES, P. F.; PRADO, C. H.B.A. Ecophysiology of coconut palm under water stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19, 377-391, 2007.
- (2) FOALE, M. *The coconut odyssey: the bounteous possibilities of the tree of life*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, 2003.
- (3) LORENZI, H. *Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, 1, 368, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- (4) FERREIRA, J. M. S. Pragas e métodos de controle ajustados à baixa capacidade de investimento dos pequenos produtores rurais. *In: CINTRA, F. L. D; FONTES, H. R; PASSOS, E. E. M; FERREIRA, J. M. S. Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil*. Aracaju: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2009.
- (5) ARAGÃO, F. B; LOILA, C. M.; CAMBUI, E. V. F; ARAGÃO, W. M. Produção de Água de Coco de Cultivares de Coqueiro Verde. Comunicado técnico 42. Aracaju: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2005.
- (6) BRITO, N. M.; NAVICKIENE, S; POLESE, L.; JARDIM, E.F.G., ABAKERLI, R.B.; RIBEIRO, M.L. Determination of pesticide residues in coconut water by liquid– liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high- performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 957, 201–209, 2002.
- (7) RANASINGHE, C.S.; FERNANDO, W.P.K.K.; ZANEER, S.M.M.; MUBARAK, A. M. Analysis of residue levels in kernel and nut water of coconut palms injected with monocrotophos. *The Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 31, 431-436, 2003.
- (8) OLEKE, J. M.; MANYONG, V.; MIGNOUNA, D.; ISINIKA, A.; MUTABAZI, K.; HANNA, R.; SABELIS, M. Ex-ante Economic Analysis of Biological Control of Coconut Mite in Benin. *AgBioForum*, 16, 161-169, 2013.
- (9) MONTECCHIO, L. A Venturi effect can help cure our trees. *Journal of Visualized Experiments*, 2013, 80, e51199.
- (10) MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acessado em: 30/08/2016.
- (11) HERATH, C. S.; WIJEKOON, R. Study on attitudes and perceptions of organic and non-organic coconut growers towards organic coconut farming. *Idesia*, 31, 5-14, Mayo-Agosto, 2013.
- (12) CHAN, E.; ELEVITCH, C.R. *Cocos nucifera* (coconut). In: *Species profiles for Pacific island agroforestry*. Ed. by Elevitch, C. R. Honolulu, Hawaii, USA: Permanent Agriculture Resources (PAR), 2006.

- (13) RAMJEGATHESH, R.; KARTHIKEYAN, G.; RAJENDRAN, L.; JOHNSON, I.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Root (wilt) disease of coconut palms in South Asia – an overview. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45, 2485–2493, 2012.
- (14) CHAIM, A.; VALARINI, P. J.; OLIVEIRA, D. A.; MORSOLETO, R. V.; PIO, L. C. Avaliação de perdas de pulverização em culturas de feijão e tomate. *Boletim de Pesquisa*. Jaguariúna: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 1999.
- (15) WANG, J.; LIU, Z.Q. Foliar uptake of pesticides – Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 1–8, 2007.
- (16) ZHAO, M.; ZHANG, S.; WANG, S.; HUANG, H. Uptake, translocation, and debromination of polybrominated diphenyl ethers in maize. *Journal of Environmental Sciences*, 24, 402–409, 2012.
- (17) DEME, P.; AZMEERA, T.; KANJILAL, S.; JONNALAGADDA, P.; UPADHYAYULA, V. S. LCMS/MS Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Coconut Water. *Food Analytical Methods*, 6, 1162–1169, 2013.
- (18) SUR, R.; STORK, A. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull. Insectology*, 2003, 1, 35-40.
- (19) 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*, 86, 412-31, 2003.
- (20) MAJOR, R. E. QuEChERS - A New Sample Preparation Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples. *LC-GC Europe*, 20, 574, 2007.
- (21) LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2548-2560, 2010.
- (22) SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. A introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agrônômica. Documentos. Aracaju: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2002.
- (23) SECRETARIA DE AGRICULTURA, IRRIGAÇÃO E REFORMA AGRÁRIA (SEAGRI). Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/coqueiro.htm> Acessado em: 20/07/2012.
- (24) ARAGÃO, W. M. Coco: pós-colheita. (Frutas do Brasil). Informação Tecnológica. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2002.
- (25) LOIOLA, C.M.; ARAGÃO, W.M.; MANN, R.S.; VIÉGAS, P.R.A. Seleção de Cultivares de Coqueiro (*Cocos nucifera* L.) com Menor Comprimento do Estipe. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. Aracaju: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2008.

- (26) SANTOS, D. M.; ALBUQUERQUE, M. M.; MELO, J. F.; IVO, W. M. P. M. Relatório de atividades 1997-2002 da Unidade de Execução de Pesquisa. Rio Largo-Alagoas: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2003.
- (27) EWANSIHA, C.J.; EBHOAYE, J.E.; ASIA, I.O.; EKEBAFE; L.O.; EHIGIE, C. Proximate and Mineral Composition of Coconut (*Cocos Nucifera*) Shell. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 13, 53-56, 2012.
- (28) GARCIA, J. N. M.; AGUILAR, E. A.; SANGALANG, J. B.; ALCANTARA, A. J.; HABITO, R. C. F.; MEDINA, C. P.; MALAYANG III, B. S. Valuation of Ecosystem Services of Coconut Types: Framework and Methodology Development. *Journal of Environmental Science and Management*, 12, 68-78, 2009.
- (29) RAMOS, S.R.R.; BRITO, K. M.; TUPINAMBA, E.A. Banco ativo de germoplasma. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/coco/arvore/CONT000giw3zt3v02wx5ok05vadr13f3ba09.html>. Acessado em: 15/09/2016.
- (30) GITAU, C. W.; GURR, G. M.; DEWHURST, C. F.; FLETCHER, M. J.; MITCHEL, A. Insect pests and insect-vectored diseases of palms. *Australian Journal of Entomology*, 48, 328–342, 2009.
- (31) VALE, A. T.; BARROSO, R. A.; QUIRINO, W. F. Caracterização da biomassa e do carvão vegetal do coco-da-baía (*Cocos nucifera* L.) para uso energético. *Biomassa & Energia*, 1, 365-370, 2004.
- (32) CUENCA, M.A.G. Importância econômica da cocoicultura no Brasil. In: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). *Sistema de Produção para a Cultura do Coqueiro*. Aracaju: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, 2002.
- (33) ROLLE, R. Good practice for the small-scale production of bottled coconut water. Agricultural and Food Engineering Technologies Service. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2007.
- (34) KABARA, J. J. Health oils from the tree of life (nutritional and health aspects of coconut oil). *Indian Coconut Journal*, 31, 2-8, 2000.
- (35) CHOMCHALOW, N. Health and Economic Benefits of Coconut Oil Production. *AU Journal of Technology*, 14, 181-187, 2011.
- (36) PRADES, A.; DORNIER, M.; DIOP, N.; PAIN, J.P. Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67, 87-107, 2012.
- (37) DEBMANDAL, M; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, 241-247, 2011.
- (38) YONG, J.; GE, L.; NG, Y; TAN, S. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) *Molecules*, 14, 5144–5164, 2009.

- (39) MA, Z; GE, L; LEE, A. S.Y.; YONG, J. W. H.; TAN, S. N.; ONG, E. S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 61, 274–281, 2008.
- (40) HAHN, F. An on-line detector for efficiently sorting coconut water at four stages of maturity. *Biosystems Engineering*, 111, 49–56, 2012.
- (41) CARANDANG, E.V. Health benefits of virgin coconut oil explained. *Philippine Journal of Coconut Studies*, 31, 2006.
- (42) AROUCHA, E.M.M.; MAGALHÃES, J.A.S.; AROUCHA, M.C.M.; VIANA, A.P.; VIANNI, R. Composição lipídica do albúmen do coco anão verde e anão vermelho em diferentes estágios de maturação. *Caatinga, Mossoró*, 18, 143-147, jul./set., 2005.
- (43) VIGLIAR, R; SDEPANIAN, V. L; FAGUNDES NETO, U. Perfil bioquímico da água de coco de coqueiros de região não litorânea. *Jornal de Pediatria*, 82, 308-312, 2006.
- (44) KONAN, Y. N.; KONAN, J. L. K.; ASSA, R. R.; KONAN, B. R.; OKOMA, J. M. D.; ALLOU, K.; BIEGO, H. M. G. Assessment of Sap Production Parameters From Spathes of Four Coconut (*Cocos nucifera* L.) Cultivars in Côte d'Ivoire. *Sustainable Agriculture Research*, 2, 4, 2013.
- (45) SCALOPPI JÚNIOR, E. J. Coco-da-baía. In: Informa Economics FNP. (Org.) Anuário da agricultura brasileira – AGRIANUAL 2014, 1ed. São Paulo, 2016.
- (45) DAVIS, T.A.; SUDASRIP, H.; DAN DARWIS, S.N. Coconut Research Institute Manado Indonesia, An Overview of Research Activities, Manado: CRI, 1985.
- (46) PASSOS, E.E.M. Exigências climáticas do coqueiro. In: FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). *A cultura do coqueiro*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002.
- (47) MENON, K.P.V; PANDALAI, K.M. Coconut palm - A monograph. Indian Central Coconut Committee, Ernakulam. 1958.
- (48) TOMLINSON, P. B.; HUGGETT, B. A. Cell longevity and sustained primary growth in palm stems. special paper. *American Journal of Botany*, 99, 12, 2012.
- (49) ADKINS, M.F; FOALE, M.; SAMOSIR, Y.M.S. Coconut revival: new possibilities for the 'tree of life'. Proceedings of the International Coconut Forum held in Cairns, Australia, 2005.
- (50) COLLINS, C.; MARTIN, I; FRYER, M. Evaluation of models for predicting plant uptake of chemicals from soil. *Science Report*, SC050021, 2006.
- (51) OLIVEIRA, R. Como plantar coco. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/NoryamEditora/como-plantar-coco>. Acessado em: 20 de fevereiro de 2015.

- (52) PASSOS, E. E. M. Árvore do conhecimento – Coco. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/coco/arvore/CONT000gix1kou302wx5ok05vadr1lvrngh5.html>. Acessado em: 20 de fevereiro de 2015.
- (53) ROTH, I. Fruits of the Angiosperms. In: K. LINSBAUER, F.G. TISCHLER & A. PASCHER (Ed.). Encyclopedia of Plant Anatomy, Berlin, 1977.
- (54) TOMLINSON, P. B. The Structural Biology of Palms. Oxford, Reino Unido: Clarendon Press, 1991.
- (55) CHILD, R. Coconuts. 2ª Edição. Longmans, Green and Co., Londres, 1974.
- (56) HAMMER, G. Aceite de coco: uma maravilha de la naturaleza. Disponível em: <http://e-rastrillo.blogspot.com.br/2012/08/aceite-de-coco-una-maravilla-de-la.html>. Acessado em: 16/05/2013.
- (57) ADKINS, M. F.; SAMOSIR, Y.M.S. Coconut revival: new possibilities for the ‘tree of life’. Australian centre for International Agricultural Research, Canberra, 2006.
- (58) GE, L.; YONG, J. W. H.; TAN, S. N.; YANG, X. H.; ONG, E. S. Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. Journal of Chromatography A, 1048, 119–126, 2004.
- (59) GE, L.; YONG, J. W. H.; GOH, N. K.; CHIA, L. S.; TAN, S. N.; ONG, E. S. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of Chromatography B, 829, 26–34, 2005.
- (60) JAMESON, P.E. Regulators of growth: cytokinins. In: Thomas B, Murphy D, Murray B, editors. Encyclopedia of applied plant sciences. Oxford: Academic Press, 2003.
- (61) MA, Z; GE, L; LEE, A. S.Y.; YONG, J. W. H.; TAN, S. N.; ONG, E. S. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. Analytica Chimica Acta, v.61, p. 274–281, 2008.
- (62) SOUZA, S. O.; ASSIS, J. S.; MORAES, P. L. D.; MENDONÇA, C. E. S. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/147342>. Acessado em: 21/05/2013
- (63) HODGE, W.H. *Cocos nucifera* L. Germination shown in sectioned nut. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Image/16859>. Acessado: 02/02/2015.
- (64) ARMSTRONG, W. P. Edible Palm Fruits. Disponível em: <http://waynesword.palomar.edu/ecoph10.htm>. Acessado em: 02/02/2015.
- (65) KATZER, G. 2011. Coconut (*Cocos nucifera* L.). Disponível em: [http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Coco\\_nuc.html](http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Coco_nuc.html). Acessado em: 02/02/2015.

- (66) MINAROVA, N. The Fibonacci sequence: nature's little secret. *CRIS*, 1, 7–17, 2014.
- (67) MITCHISON, G. J. Phyllotaxis and the Fibonacci Series. *Science*, 196, 270-275, 1977.
- (68) REHMEYER, J. The Mathematical Lives of Plants. *Science News*, 2007, <http://www.sciencenews.org/article/mathematicallives-plants>. Acessado em 02/12/ 2015.
- (69) ADLER, I. The role of mathematics in phyllotaxis. In: JEAN, R.V.; BARABÉ, D. (Ed.). *Symmetry in plants*, World Scientific, Singapore, 1998.
- (70) DUMAIS, J.; STEELE, C. R. New Evidence for the role of mechanical forces in the shoot apical meristema. *Journal Plant Growth*, 19, 7–18, 2000.
- (71) DAVIS, T.A.; BOSE, T.K. Fibonacci systems in aroids. *Fibonacci Quarterly*, 9, 253-263, 1971.
- (72) DAVIS, T.A. Why Fibonacci sequence for palm foliar spirals? *Fibonacci Quarterly*, 9, 237-244, 1971.
- (73) MILBURN, J.A.; DAVIS, T.A. Role of pressure in xylem transport of coconut and other palms. *Physiologia Plant*, 29, 415-420, 1973.
- (74) DAVIS, T.A. The non-inheritance of asymmetry in *Cocos nucifera*. *Journal of Genetics*, 58, 42-50, 1962.
- (75) DAVIS, T.A. Fibonacci numbers for palm foliar spirals. *Acta Botanica Neerlandica*, 19, 249-256, 1970.
- (76) DAVIS, T.A. Right-handed, left handed and neutral palms. *Principes*, 15, 63-68, 1971.
- (77) DAVIS, T.A.; MATHAI, A.M. A mathematical explanation of the emergence of foliar spirals in palms, *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39, 194-202, 1973.
- (78) DAVIS, T. A.; DAVIS, B. Association of coconut foliar spirality with latitude. *Math modelling*, 8, 730-733, 1987.
- (79) MINORSKY, P. V.; BRONSTEIN, N. B. Natural Experiments indicate that geomagnetic variations cause spatial and temporal variations in coconut palm asymmetry. *Plant Physiology*, 142, 40–44, 2006.
- (80) SOBRAL, L. F. Nutrição e adubação do coqueiro. In: Ferreira, J. M. S.; Warwick, D. R. N.; Siqueira, L. A. (Eds.). *A cultura do coqueiro no Brasil*. Aracaju: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa-CPATC, 1997.
- (81) WHEELER, T. D.; STROOC, A. D. The transpiration of water at negative pressures in a synthetic tree. *Nature*, 455, 208-212, 2008.
- (82) THEILEIS, J.; KOPP, O.; STACHE, M.; RECHENBERG, I. Development of a bionic pump based on the sap-rising principle of trees. In: SELIGER, G.; KHRAISHED, M. K.; JAWAHIR, I. S. (Eds.). *Advances in Sustainable Manufacturing*, 2011.

- (83) SPELLMAN, F. R. The Science of Water: Concepts and Applications. Disponível em: <http://www.stu.edu.vn/uploads/documents/260309-103229.pdf>. Acessado em: 15/10/2015.
- (84) STEPPE, K.; PAUW, D. J. W.; LEMEURE, R.; Vanrolleghem, P.A. A mathematical model linking tree sap flow dynamics to daily stem diameter fluctuations and radial stem growth. *Tree Physiology*, 26, 257–273, 2005.
- (85) FERRY, M.; GOMEZ, S. Assessment of risks and potential of injection techniques in integrated programs to eradicate the red palm weevil: review and new perspectives. *Fruits*, 69, 134-157, 2013.
- (86) SILVA, L. L.; DONNICI, C. L.; AYALA, J. D.; FREITAS, C. H.; MOREIRA, R. M.; PINTO, A. M. F. Tracers: the use of chemical agents for hydrological, environmental, petrochemical and biological studies. *Química Nova*, 32, 1576-1585, 2009.
- (87) MABIT, L.; MEUSBURGER, K.; FULAJTAR, E.; ALEWELL, C. The usefulness of <sup>137</sup>Cs as a tracer for soil erosion assessment: A critical reply to Parsons and Foster. *Earth-Science Reviews*, 127, 300-307, 2011.
- (88) KADLEC, R. H. Tracer and spike tests of constructed wetlands. *Ecology and Hydrobiology*, 7, 283-295, 2007.
- (89) SIROTKINA, M.; LYAGIN, I.; EFREMENKO, E. Hydrolysis of organophosphorus pesticides in soil: New opportunities with eco-compatible immobilized His6-OPH. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68, 18-23, 2012.
- (90) WANG, K.; ZHANG, R. Heterogeneous soil water flow and macropores described with combined tracers of dye and iodine. *Journal of Hydrology*, 397, 105–117, 2011.
- (91) GRENIER, N.; PEDERSEN, M.; HAUGER. Contrast agents for functional and cellular MRI of the kidney. *European Journal of Radiology*, 60, 341-352, 2006.
- (92) CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. Functional magnetic resonance imaging of the kidney using macromolecular contrast agents. *Abdominal Imaging*, 31, 224-231, 2006.
- (93) NI, Y.; HUYGHE, D.; VERBEKE, K.; WITTE, P. A.; NUYTS, J.; MORTELMANS, L.; CHEN, F.; MARCHAL, G.; VERBRUGGEN, A. M.; BORMANS, G. M. First preclinical evaluation of mono-[<sup>123</sup>I]iodohypericin as a necrosis-avid tracer agent. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 33, 595-601, 2006.
- (94) GOLDSCHIEDER, N.; HALLER, L.; POTÉ, J.; WILDI, W.; ZOPFI, J.; Characterizing Water Circulation and Contaminant Transport in Lake Geneva Using Bacteriophage Tracer Experiments and Limnological Methods. *Environmental Science Technology*, 41, 5252-5258, 2007.
- (95) CORAPCIOGLU, M. Y.; VOGEL, J. R.; MUNSTER, C. L.; PILLARI, S. D.; DOWD, S.; WANG, S. Virus transport experiments in a sandy aquifer. *Water, Air and Soil Pollution*, 169, 47-65, 2006.
- (96) YU, C.; WANG, W.; ZHANG, A.; GU, C.; ZHOU, M.; GAO, T. Activity of the fungicide js399-19 against fusarium head blight of wheat and the risk of resistance. *Agricultural Sciences in China*, 10, 1906-1913, 2011.

- (97) SUHOGUSOFF, V.; HIRATA, R.; FERRARI, L. C. Adsorção do traçador fluorescente uranina em sedimentos quaternários da bacia de São Paulo. *Revista Brasileira de Geociências*, 35, 551-558, 2005.
- (98) SCRAMIN, S.; CHAIM, A.; PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L.; PAVAN, L. A.; ALVARENGA, N. Avaliação de bicos de pulverização de agrotóxicos na cultura do algodão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 12, 43-50, 2002.
- (99) FERRACINI, V.L.; CHAIM, A.; PESSOA, M.C.P.Y. Utilização da Rodamina B como traçador na avaliação de deposição de agrotóxicos. *Libro de comunicaciones*. Valladolid: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, p. 467-472, 2004.
- (100) MATHEW, S. B.; PILLAI, A. K.; GUPTA, V. K. A rapid spectrophotometric assay of some organophosphorus pesticide residues in vegetable samples. *Spectrochimica Acta Part A.*, 67, 1430–1432, 2007.
- (101) BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 133–153, 2000.
- (102) TURPIN, K.M.; LAPEN, D.R.; TOPP, E.; ROBIN, M.J.L.; EDWARDS; CURNOE, M; COELHO, B. B.; MCLAUGHLIN, N.B.; PAYNEE, M. Tine-influenced infiltration patterns and informing timing of liquid amendment applications using brilliant blue dye tracers. *Biosystems Engineering*, 98, 235– 247, 2007.
- (103) BITTMAN. S; VILET, L. J. P.; KOWALENKO, G. C.; MCGINN, S.; HUNT, D. E.; BOUNAIX, F. Surface-banding liquid manure over aeration slots: a new low-disturbance method for reducing ammonia emissions and improving yield of perennial grasses. *Agronomy Journal*, 97, 1304–1313, 2005.
- (104) BALL-COELHO, B R; ROY, R C; TOPP, E; LAPEN, D R. Tile water quality following liquid swine manure application into standing corn. *Journal of Environmental Quality*, 36, 580–587, 2007.
- (105) WEILER, M; FLÜHLER, H. Inferring flow types from dye patterns in macroporous soils. *Geoderma*, 120, 137–153, 2004.
- (106) PALLADINI, L. A.; RAETANO, C. G.; VELINI, E. D. Choice of tracers for the evaluation of spray deposits. *Scientia Agricola*, 62, Sept./Oct., 2005
- (107) ZHAO, M.; ZHANG, S.; WANG, S.; HUANG, H. Uptake, translocation, and debromination of polybrominated diphenyl ethers in maize. *Journal of Environmental Sciences*, 24, 402–409, 2012.
- (108) CHAMBERLAIN, K.; PATEL, S.; BROMILOW, R.H. Uptake by Roots and Translocation to Shoots of Two Morpholine Fungicides in Barley. *Pesticide Science*, 54, 1-7, 1998.
- (109) SICBALDI, F.; SACCHI, G. A.; TREVISAN, M.; Del Re, A. A. M. Root uptake and xylem translocation of pesticides from different chemical classes. *Pesticide Science*, 50, 111-119, 1997.
- (110) ROJANO-DELGADO, A. M.; CRUZ-HIPOLITO, H.; PRADO, R.; CASTRO, M. D. L.; FRANCO, AN.R. Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. *utilis* plants. *Phytochemistry*, 73, 34-41, 2012.

- (111) OWENS, D. K.; NANAYAKKARA, N. P. D.; DAYAN, F. E. In planta mechanism of action of leptosperone: impact of its physico-chemical properties on uptake, translocation, and metabolism. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 262–270, 2013.
- (112) SAMOUCHA, Y.; GISI, U. Systemicity and persistence of cymoxanil in mixture with oxadixyl and mancozeb against *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*. *Crop Protection*, 6, 393-398, 1987.
- (113) STEVENS, P. J.G; BUKOVAC, M.J. Effects of spray application parameters on foliar uptake and translocation of daminozide and 2,4-D-triethanolamine in *Vicia faba*. *Crop Protection*, 6, 163-170, 1987.
- (114) YOSHIDA, T. Adventitious shoot formation from hypocotyl sections of mature soybean seeds. *Breeding Science*, 52, 1-8, 2002.
- (115) KAMINSKI, J.E.; FINDANZA, M.A. Dollar spot severity as influenced by fungicide mode of activity and spray nozzle. *Hortscience*, 44, 1762–1766, 2009.
- (116) BELL, J.L.; BURKE, I.C.; PRATHER, T.S. Uptake, translocation and metabolism of aminocyclopyrachlor in prickly lettuce, rush skeletonweed and yellow starthistle. *Pest Management Science*, 67, 1338–1348, 2011.
- (117) PERAZZOLLI, M; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control*, 47, 228–234, 2008.
- (118) FENG, P.C.C.; CHIU, T. Distribution of [<sup>14</sup>C] glyphosate in mature glyphosate-resistant cotton from application to a single leaf or over-the-top spray. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82, 36–45, 2005.
- (119) OWENS, D. K.; NANAYAKKARA, N. P. D.; DAYAN, F. E. In planta mechanism of action of leptosperone: impact of its physico-chemical properties on uptake, translocation, and metabolism. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 262–270, 2013.
- (120) LV, T.; ZHANG, Y.; CASAS, M.E.; CARVALHO, P.N.; ARIAS, C.A.; BESTER, K.; BRIX, H. Phytoremediation of imazalil and tebuconazole by four emergent wetland plant species in hydroponic medium. *Chemosphere*, 148, 459-466, 2016.
- (121) DENG, D.; LIU, J.; XU, M.; ZHENG, G.; GUO, J.; SUN, G. Uptake, translocation and metabolism of decabromdiphenyl ether (BDE-209) in seven aquatic plants. *Chemosphere*, 152, 360-368, 2016.
- (122) NANDULA, V.K.; VENCILL, W.K.; Herbicide absorption and translocation in plants using radioisotopes. *Weed Science*, Special Issue, 140-151, 2015.
- (123) SCHÜBBERS, L.C.; VALVERDE, B.E.; STROBEL, B.W.; CEDERGREEN, N. Glyphosate accumulation, translocation and biological effects in *Coffea arabica* after single and multiple exposures. *European Journal of Agronomy*, 74, 133-143, 2016.
- (124) FANTKE, P.; GILLESPIE, B.W.; JURASKE, R.; JOLLIET, O. Estimating half-lives for pesticide dissipation from plants. *Environmental Science & Technology*, 48, 8588-8602, 2014.

- (125) TRAPP, S. Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*, 1111, 33–39, 2004.
- (126) SILVA, J. F. *et al.* Herbicida: absorção, translocação, metabolismo, formulação e misturas. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- (127) ÁLVAREZ, E.; LLANO, G. A.; LOKE, J. B.; CHACON, M. I. Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador and Brazil. Plant Pathology Program, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 2012.
- (128) SILVA, R. P. Análise e implicação do uso de agrotóxico em coqueiro no perímetro irrigado de São Gonçalo–Sousa/PB. Tese de doutorado. MOSSORÓ – RN, 2012.
- (129) KARTHIKEYAN, M.; BHASKARAN, R.; RADHIKA, K.; MATHIYAZHAGAN, S.; SANDOSSKUMAR, R.; SAMIYAPPAN, R.; VELAZHAHAN, R. Purification and partial characterization of a toxin produced by *Ganoderma lucidum*, the coconut *Ganoderma* disease pathogen. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41, 507-513, 2008.
- (130) KANDAN, A.; BHASKARAN, R.; SAMIYAPPAN, R. *Ganoderma* basal stem rot disease of coconut palm in South Asia and Asia Pacific regions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43, 1145–1149, 2010.
- (131) TRAPP, S. Fruit Tree model for uptake of organic compounds from soil and air. SAR and QSAR in *Environmental Research*, 18, 367-387, 2007.
- (132) RENNINGER, H. J.; MCCULLOH, K. A.; PHILLIPS, N. A comparison of the hydraulic efficiency of a palm species *Iriartea deltoidea* with other wood types. *Tree Physiology*, 33, 152–160, 2013.
- (133) ROBISON, W. L.; BROWN, P. H.; STONE, E. L.; HAMILTON, T. F.; CONRADO, C. L.; KEHL, S. Distribution and ratios of <sup>137</sup>Cs and K in control and K-treated coconut trees at Bikini Island where nuclear test fallout occurred: effects and implications. *Journal of Environmental Radioactivity*, 100, 76–83, 2009.
- (134) DOCCOLA, J. J.; WILDO, P. M. Tree Injection as an Alternative Method of Insecticide Application. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-basic-and-other-applications/tree-injection-as-an-alternative-method-of-insecticide-application>. Acessado em: 15/04/2013.
- (135) DOUCETTE, W.; DETTENMAIER, E. M.; BUGBEE, B.; MACKAY, D. Mass transfer from soil to plants, *Handbook of Chemical Mass Transport in the Environment*, Ed. CRC Press, 2010.
- (136) TAIZ, L.; ZEIGER, E. E. *Plant Physiology. Translocation in the phloem, a companion to plant physiology*, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 5ª Ed, 2010.
- (137) FENNER, K.; CANONICA, S.; WACKETT, L. P.; ELSNER, M. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science*, 341, 752, 2013.
- (138) SICBALDI, F.; SACCHI, G. A.; TREVISAN, M.; Del Re, A. A. M. Root uptake and xylem translocation of pesticides from different chemical classes. *Pesticide Science*, 50, 111-119, 1997.

- (139) OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba: Ed. Omnipax, 2011.
- (140) EGGEN, T.; HEIMSTAD, E. S.; STUANES, A. O.; NORLI, H. R. Uptake and translocation of organophosphates and other emerging. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 4520–4531, 2013.
- (141) BROMILOW, R. H.; CHAMBERLAIN, K.; EVANS, A. A. Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Science*, 38, 305-314, 1990.
- (142) YANG, X.; XIA, H. H. Application of Some Non-spray Techniques in Landscape Pest Control; Congresso: Guangzhou Institute of Landscape Gardening, Guangzhou 510405, China, Guangdong Landscape Architecture, 2010.
- (143) VINCENT, J. Apple trees get 'shot' of protection. *Crop Production*. Disponível em: [www.farmprogress.com](http://www.farmprogress.com). Acessado em:02/10/2013.
- (144) LECOMTE, P.; DARRIEUTORT, G. Evaluation of trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathology Mediterranea*, 46, 50–57, 2007.
- (145) MOURA, J. I. L.; FANTON, C. J.; MESQUITA, C. A. B. Evaluación de un método agronómico, biológico y químico para el combate de *Amerrhinus ynca* em plantaciones de coco. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65, 109-112, 2002.
- (146) FONTES, H.R. PROCOPIO, S.O.; CARGNELUTTI FILHO, A.; FERREIRA, J.M.S; FERNANDES, M.F. Efficacy of the herbicide MSMA in eradicating coconut trees infected with stem-bleeding. *Planta Daninha*, 27, 859–865, 2009.
- (147) SILVA, A.B.; MULLER, A. A.; SOUZA, L. A.; SILVA, J.S.O.; BUECKE, J.; VALE, M.P.; OHASHI, O.S. Injeção de inseticidas no estipe de dendezeiros para controle lagartas de *Eupalamides dedalus* (Cramer) (Lepidoptera: Castniidae). *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. Belém, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, 2003.
- (148) DOCCOLA, J. J.; SMITH, S. L.; STROM, B. L.; MEDEIROS, A. C.; VON ALLMEN, E. Systemically applied insecticides for treatment of erythrina gall wasp, *quadrastrichus erythrina* e kim (Hymenoptera: Eulophidae). *Arboriculture & Urban Forestry*, 35, 173–181, 2009.
- (149) SAMARRIE, A. I. A.; AKELA, A. A. Distribution of injected pesticides in date palm trees. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2, 1416-1426, 2011.
- (150) NADARAJAN, L.; BASAVANNA, G. P. C.; CHANDRA, B. K. N. Control of coconut pests through stem Injection of systemic insecticides. Mysore. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14, 355-364, 1980.
- (151) KANAGARANTNAM, P.; PINTO, J. L. J. G. Effect of monocrotophos on the leaf-eating caterpillar, *Opisina arenosella* Walk, when injected into the trunk of the coconut palm. *Cocos*, 3, 9-15, 1988.
- (152) RANASINGHE, C. S.; FERNANDO, W. P. K. K.; ZANEER, S. M. M.; MUBARAK, A. M. Analysis of residue levels in kernel and nut water of coconut palms injected with monocrotophos. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 31, 431-436, 2003.
- (153) PATEL, R.K.; SHAL, A. H.; JHALA, R. C. Residue status of monocrotophos in coconut water injected by stem Injection technique. *GAU Research Journal*, 10, 16-22, 1985.

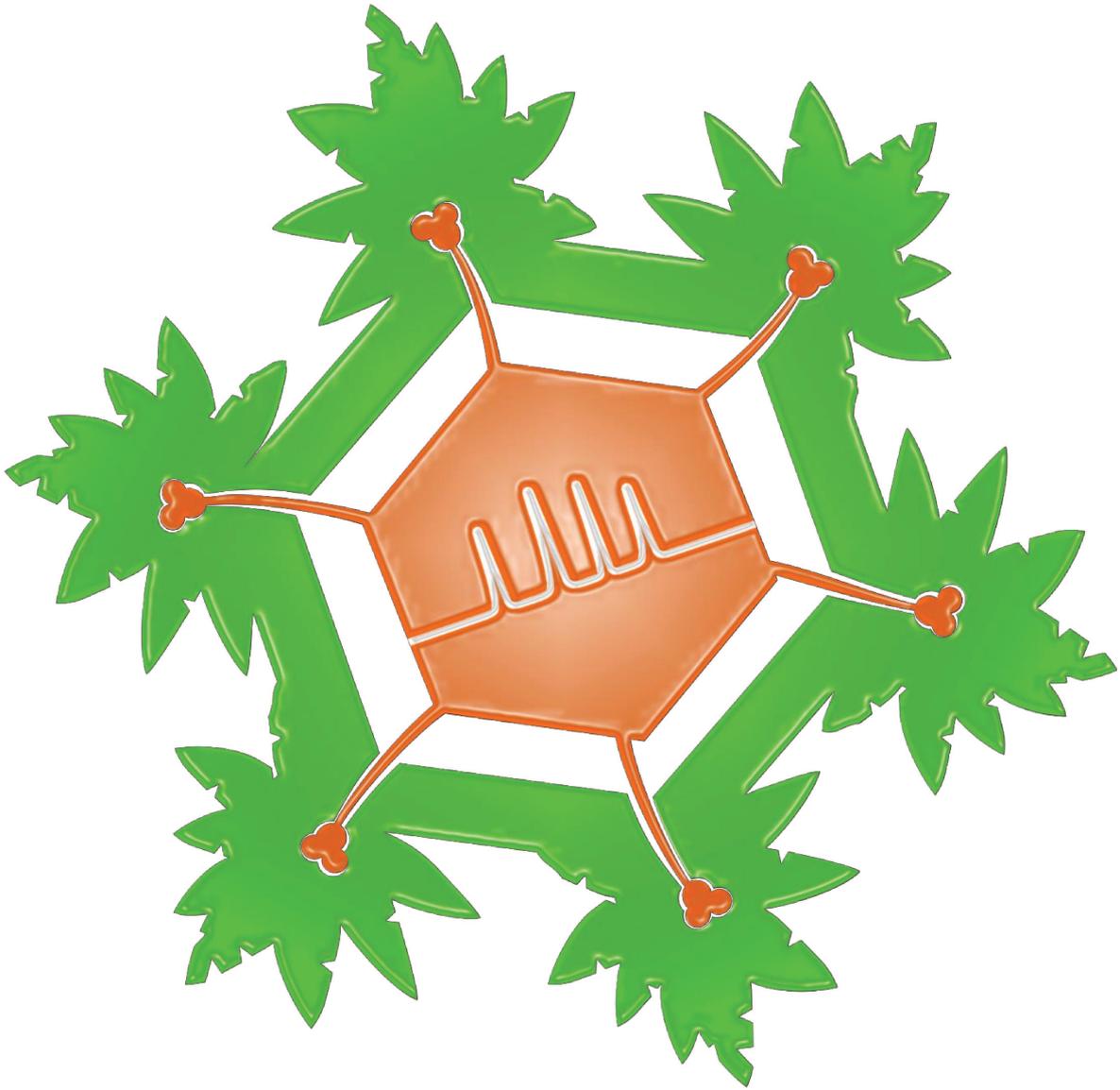
- (154) ELLIOTT, M.L.; BROSCHEAT, T. K. Detection of thiabendazole fungicide in coconut palms using a bioassay. *Palms*, 56, 21-27, 2012.
- (155) YU, J.; BROSCHEAT, T.K.; LATHAM, W.G.; ELLIOTT, M.L. Dynamics and distribution of trunk-injected phosphite in coconut palm. *HortScience*, 50, 1327-1331, 2015.
- (156) MILES, DAVID. Adjuvant for pesticides. Patente 2003. US20030224939. Disponível em: <http://www.google.tl/patents/US20030224939>. Acessado em: 12/10/2014.
- (157) ZABKIEWICZ, J.A. Organossilicone surfactants... Progress in their use and our understanding over 20 years. *Proc. ISAA 2013. Foz do Iguaçu*, 22–26, 2013.
- (158) GITAU, C. W; GURR, G. M.; DEWHURST, C. F.; FLETCHER, M. J.; MITCHEL, A. Insect pests and insect-vectored diseases of palms. *Australian Journal of Entomology*, 48, 328–342, 2009.
- (159) BOLOGNESI, C.; MERLO, F.D. Pesticides: Human Health Effects. *Encyclopedia of Environmental Health*, 438–453, 2011.
- (160) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>>. Acessado em: 13/10/2011.
- (161) TIRADO, M.C; CLARKE, R; JAYKUS, L.A.; MCQUATTERS-GOLLOP, A; FRANK, J.M. Climate change and food safety: A review. *Food Research Internacional*, 43, 1745-1765, 2010.
- (162) FERMAN; R.K.S.; ANTUNES, A.M. S. Uso de defensivos agrícolas, Limites Máximos de Resíduos e impacto no comércio internacional: estudo de caso. *Economia e Agronegócio*, 7, 197-214, 2009.
- (163) RAMOS, G. E. Pragas e Soluções. Disponível em: <http://www.sindcoco.com.br/pragas.php>. Acessado em: 22/02/2014.
- (164) BRITO, N. M.; NAVICKIENE, S; POLESE, L.; JARDIM, E.F.G., ABAKERLI, R.B.; RIBEIRO, M.L. Determination of pesticide residues in coconut water by liquid– liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high- performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A.*, 957, 201–209, 2002.
- (165) OGAWA, S.; BRITO, N. M.; SILVA, M. R. S. ; RIBEIRO, M. L.; LEITE, L. A.; DÓREA, H. S.; NAVICKIENE, S.; ABAKERLI, R. B.; FERREIRA, J. M. S. Determination of Carbofuran and 3-Hydroxycarbofuran Residues in Coconut Water by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with UV Detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29, 1833–1841, 2006.
- (166) SILVA, M. G. D. ; AQUINO, A. ; DOREA, H. S. ; NAVICKIENE, S. . Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS. *Talanta*, 76, 680-684, 2008.
- (167) SANTOS, L. F. S.; FERREIRA, J.A; SOUZA, N. R. S.; NAVICKIENE, S. A reversed-phase high-performance liquid chromatography method combined with matrix solid-phase dispersion extraction for the determination of teflubenzuron, lufenuron and bifenthrin residues in lyophilized coconut water. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 1576-1585, 2012.

- (168) DEME, P.; AZMEERA, T.; KANJILAL, S.; JONNALAGADDA, P.; UPADHYAYULA, V. S. LC-MS/MS Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Coconut Water. *Food Analytical Methods*, 6, 1162–1169, 2013.
- (169) ANJOS, J. P.; ANDRADE, J. B. Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC–MS. *Microchemical Journal*, 112, 119–126, 2014.
- (170) FERREIRA, J. A.; SANTOS, L. F. S.; SOUZA, N. R. S.; NAVICKIENE, S.; OLIVEIRA, F. A.; TALAMINI, V. MSPD sample preparation approach for reversed-phase liquid chromatographic analysis of pesticide residues in stem of coconut palm. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 91, 160–164, 2013.
- (171) PFANNKUCH, E. A.; STUFF, J. R.; WHITECAVAGE, J. A. Qualitative analysis of coconut water products using stir bar sorptive extraction combined with thermal desorption-GC/MS. GERSTEL GmbH & Co. KG, 2012.
- (172) PARANTHAMAN, R.; KUMARAVEL, S. A Reversed-Phase HighPerformance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Determination of Pesticide Residues in Tender Coconut Water (elaneer/nariyal pani). *Journal of Chromatography and Separation Techniques*, 4, 208, 2013.
- (173) EUROPEAN COMMISSION (EU). EU Pesticides database. Disponível em: [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/?event=homepage&language=EN](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage&language=EN). Acessado em: 20 de janeiro de 2014.
- (174) MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. UHPLC - Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, 4, 197-207, 2012.
- (175) GUILLARME, D.; VEUTHEY, J.L. UHPLC in Life Sciences. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*, 447, 2012.
- (176) KOLBERG, D. I.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. *Food Chemistry*, 125, 1436–1442, 2011.
- (177) DUNOVSKÁ, L.; CAJKA, T.; HAJŠLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, J. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 578, 234-240, 2006.
- (178) MASTOVSKA, S.J.; LEHOTAY, J. Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7001, 2006.
- (179) GIERA, M.; PLÖSSL, F.; BRACHER, F. Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway. *Steroids*, 72, 633, 2007.
- (180) KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MOLONEY, M.; CANTWELLA, H.; FUREY, A.; DANAHER, A. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A.*, 1216, 7977–8015, 2009.
- (181) ALCUDIA-LEÓN, M.C.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Dispersive solid phase extraction for in-sorbent surface attenuated total reflection infrared detection. *Analytical chemistry*, 81, 1184-1190, 2009.

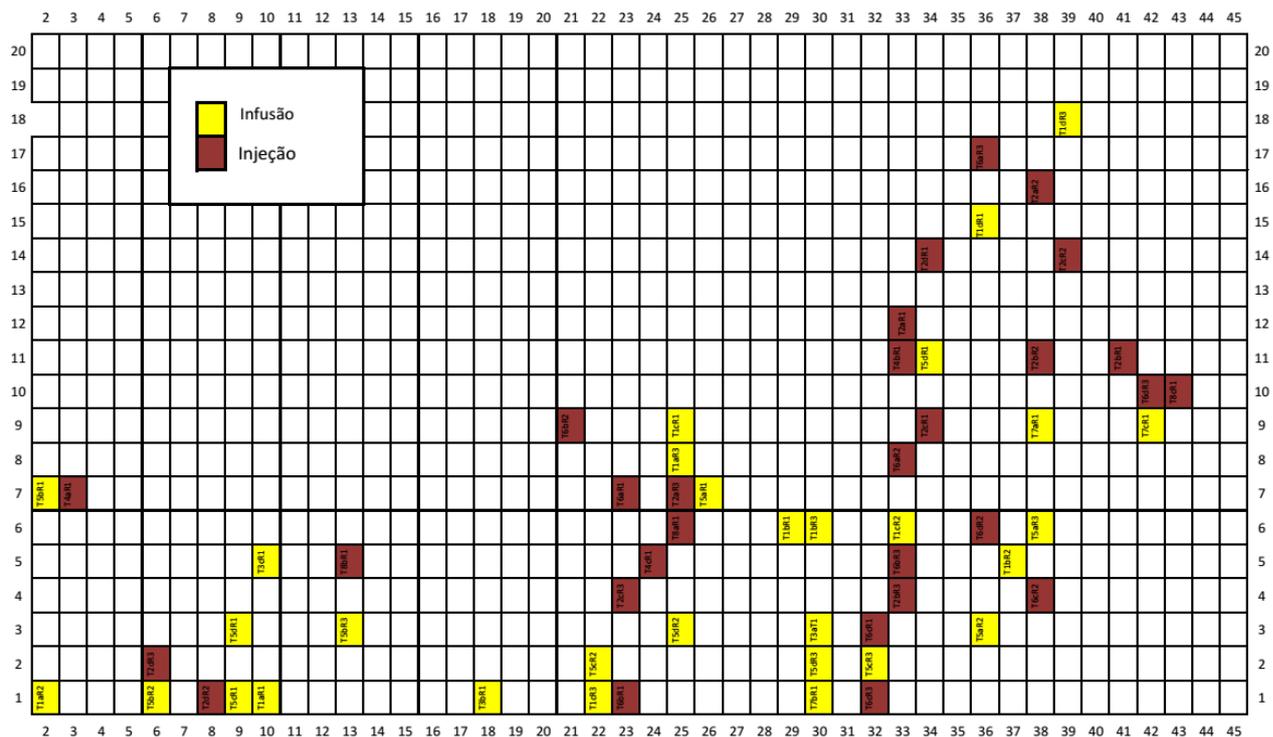
- (182) STEPAN, R.; CUHRA, P.; BARSOVA, S. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the determination of anabolic steroids and related compounds in nutritional supplements. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 25, 557-565, 2008.
- (183) LESUEUR, C.; GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta*, 75, 284-93, 2008.
- (184) STENERSEN, J. *Chemical pesticides: mode of action and toxicology*. United States of America. CRC PRESS, 2004.
- (185) SANTE. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed*. Document. N° 11945/2015.
- (186) LANÇAS, F.M. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. 6ªed., São Carlos, Editora RiMa, 2004.
- (187) RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S; MELO, L, F. C. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*, *Química Nova*, 27, 771-780, 2004.
- (188) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGRE-008-2011.
- (189) RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C.B.G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography A.*, 1156, 201-205, 2007.
- (190) KRUIVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M.L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870, 29-44, 2015.
- (191) FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; GIRÓN, A. J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A.*, 1218, 7634–7639, 2011.
- (192) 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*, 121, 251–256, 2010.
- (193) PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1697–1714, 2007.
- (194) KITTLAUS, S.; SCHIMANKE, J.; KEMPE, G.; SPEER, K. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A.*, 1218, 8399–8410, 2012.

- (195) RAJSKI, L.; LOZANO, A.; UCLÉS, A.; FERRER, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1304, 109-120, 2013.
- (196) IUPAC FOOTPRINT PESTICIDES PROPERTIES DATABASES. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/> Acessado em: 23/11/2012.
- (197) SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. AGROFIT. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acessado em: 23/11/2012.
- (198) PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduos de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química nova*, 32, 1620, 2009.
- (199) KRUIVE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. *Analytica Chimica Acta*, 651, 75-80, 2009.
- (200) CHIARADIA, M.C. Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM-EM e CLUE-DAD. Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 2009.
- (201) SOBHANZADEH, E.; BAKAR, N. K. A.; ABAS, M. R. B.; NEMATI, K. A simple and efficient multi-residue method based on QuEChERS for pesticides determination in palm oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 5821–5828, 2012.
- (202) LEE, S. W.; CHOI, J.H.; CHO, S.K.; YU, H.A; EL-ATY, A.M. A.; SHIM, J.H. Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 218, 4366–4377, 2011.
- (203) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Report\\_09/Spirodiclofen.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report_09/Spirodiclofen.pdf). Acessado em: 06/2015.
- (204) SOLER, C.; MAÑES, J.; PICÓ, Y. Determination of carbosulfan and its metabolites in oranges by liquid chromatography ion-trap triple-stage mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1109, 228–241, 2006.
- (205) LEHOTAY, S.J., MASTOVSKÁ, K.; YUN, S.J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices. *Journal AOAC Internacional*, 88, 630-638, 2005.
- (206) LIU, N., DONG, F., LIU, X., XU, J., LI, Y., HAN, Y., ZHU, Y., CHENG, Y., CHEN, Z., TAO, Y., ZHENG, Y. Effect of house hold canning on the distribution and reduction of thiophanate-methyl and its metabolite carbendazim residues in tomato. *Food Control*, 43, 115-120, 2014.

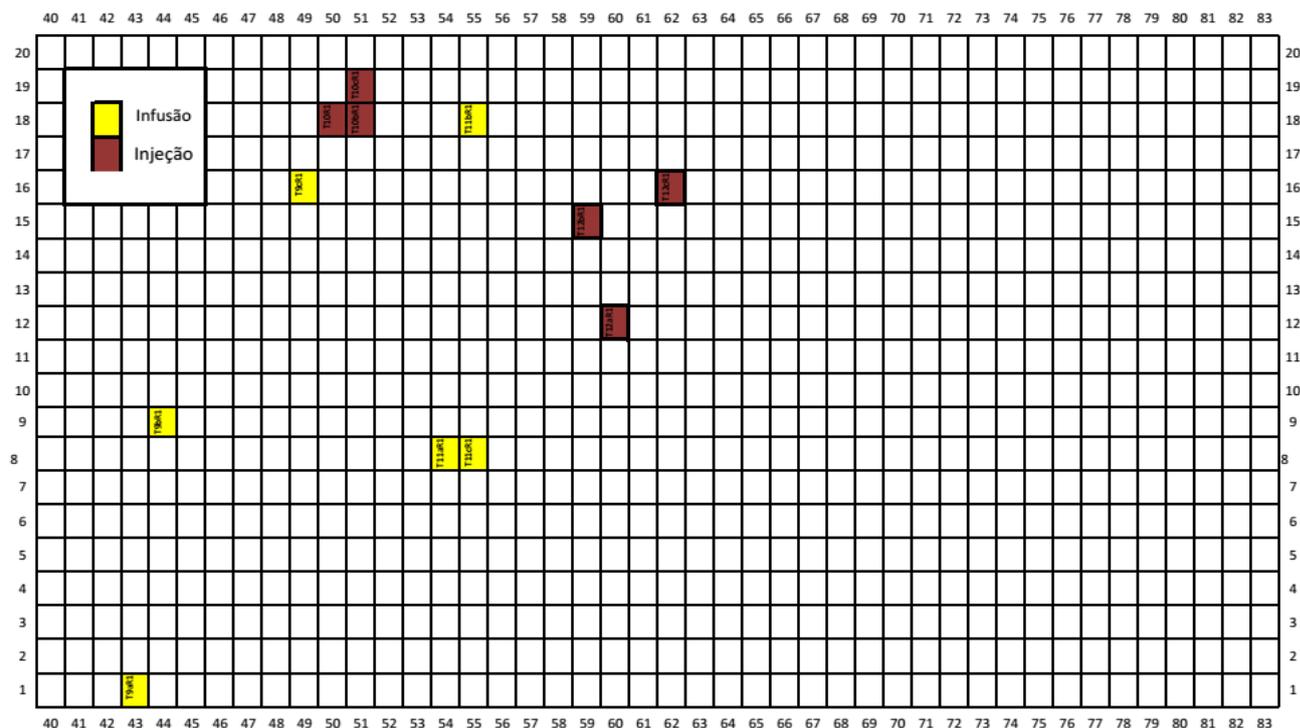
- (207) OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Evaluation of dispersive and cartridge SPE clean-up procedures using the modified QuEChERS method for the analysis of pesticides in strawberries. *Analytical Methods*, 7, 982-989, 2015.
- (208) SUN, J.; LIU, J.; LIU, Y.; YU, M.; JIANG, G. Reciprocal transformation between hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in young whole pumpkin plants. *Environmental Science Technology Letters*, 1, 236-241, 2014.
- (209) COHN, J.H.E. Square Fibonacci numbers etc. *Fibonacci Quartely*, 2, 109-113, 1964.
- (210) HOUAISS, A. e VILLAR, M. de S. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Elaborado no Instituto Antonio Houaiss de Lexicografia e Banco de Dados da Portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.
- (211) ZHANG, Z.; JIANG, W.; JIAN, Q.; SONG, W.; ZHENG, Z.; KE, C. Thiabendazole uptake in shimeji, king oyster and oyster mushrooms and its persistence in sterile and nonsterile substrates. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1221-1226, 2014.
- (212) PEREIRA, V. J.; CUNHA, J.P.A.R.; MORAIS, T.P.; Ribeiro-Oliveira, J.P.; Moaris, J.B. Physical-chemical properties of pesticides: concepts, applications, and intercatons with the environmental. *Bioscience Journal*, Uberlândia, 32, 627-641, may/jun, 2016.
- (213) SALAMA, A. K. Translocation and metabolism of oxamyl and carbofuran in tomato plants grown in greenhouses. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 33, 5, 1998.
- (214) ARUNACHALAM. K.; LAKSHMANAN, M. Translocation, accumulation and persistence of carbofuran in paddy, ground nut, and cotton. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 28, 230-238, 1982.



# Anexos



**Figura S1** – Mapa de identificação dos experimentos realizados nos tratamentos endoterápicos. Cada quadrado representa uma planta da área LM-082, e os quadrados coloridos representam as plantas selecionadas conforme a especificação do tipo de tratamento endoterápico.



**Figura S2** - Mapa de identificação dos experimentos refeitos e realizados nos tratamentos endoterápicos para os frutos. Cada quadrado representa uma planta da área LM-082, e os quadrados coloridos representam as plantas selecionadas conforme a especificação do tipo de tratamento endoterápico.

**Tabela S1** - Delineamento inteiramente casualizado das plantas selecionadas neste trabalho.

Exper. *	Descrição	Tempo de coleta (dias)	Número da planta	Linha	Planta	Nº de folhas	Espessura do estipe no ponto de aplicação (cm)	Comprimento do estipe (cm)	Nº de Cachos de frutos	Direção do espiral
<b>T1</b>	INFUSÃO – <i>Mix**</i> + <i>Break-thru®</i>	2	T1aR1	10	1	22	70	200	15	Anti-horário
			T1aR2	2	1	23	64	208	13	Horário
			T1aR3	25	8	22	71	228	16	Anti-horário
		15	T1bR1	29	6	20	75	180	16	Anti-horário
			T1bR2	37	5	21	86	210	13	Anti-horário
			T1bR3	30	6	20	68	210	11	Anti-horário
		30	T1cR1	25	9	18	80	212	11	Anti-horário
			T1cR2	33	6	22	81	210	18	Horário
			T1cR3	22	1	22	76	200	13	Horário
		45	T1dR1	36	15	21	74	203	18	Horário
			T1dR2	39	18	21	66	213	8	Anti-horário
			T1dR3	31	6	20	67	200	19	Anti-horário
<b>T2</b>	INJEÇÃO – <i>Mix**</i> + <i>Break-thru®</i>	2	T2aR1	33	12	22	64	180	15	Anti-horário
			T2aR2	38	16	20	70	227	8	Horário
			T2aR3	25	7	20	80	200	10	Anti-horário
		15	T2bR1	41	11	19	61	183	12	Horário
			T2bR2	38	11	22	63	193	16	Anti-horário
			T2bR3	33	4	23	69	210	15	Anti-horário
		30	T2cR1	34	9	22	63	215	14	Horário
			T2cR2	39	14	18	74	200	13	Horário
			T2cR3	23	4	20	71	224	18	Horário
		45	T2dR1	34	14	21	60	210	13	Horário
			T2dR2	8	1	20	68	222	13	Anti-horário
			T2dR3	6	2	21	72	215	14	Anti-horário

## Continuação

Exper. *	Descrição	Tempo de coleta (dias)	Número da planta	Linha	Planta	Nº folhas	Espessura do estipe no ponto de aplicação (cm)	Comprimento do estipe (cm)	Nº de Cachos de frutos	Direção do espiral
<b>T3</b>	INFUSÃO – <i>Mix**</i> + <i>Break- thru®</i>  3 frutos de cada cacho	45	T3aR1	30	3	20	85	195	9	
		90	T3bR1	18	1	20	68	220	14	
		120	T3cR1	10	5	21	65	222	24	Anti-horário
<b>T4</b>	INJEÇÃO – <i>Mix**</i> + <i>Break- thru®</i>  3 frutos de cada cacho	45	T4aR1	3	7	19	69	222	13	Horário
		90	T4bR1	33	11	24	64	220	98	Horário
		120	T4cR1	24	5	20	60	215	19	Anti-horário

## Continuação

Exper. *	Descrição	Tempo de coleta (dias)	Nº da planta	Linha	Planta	Nº de Folhas	Espessura do estipe no ponto de aplicação (cm)	Comprimento do estipe (cm)	Nº de cachos de frutos	Direção do espiral
T5	INFUSÃO – ciproconazol + Break-thru®	2	T5aR1	26	7	22	64	215	11	Anti-horário
			T5aR2	36	3	23	58	200	16	Horário
			T5aR3	38	6	20	64	185	16	Anti-horário
		15	T5bR1	2	7	20	86	231	14	Horário
			T5bR2	6	1	23	71	198	15	Anti-horário
			T5bR3	13	3	21	68	200	13	Horário
		30	T5cR1	9	1	20	71	222	13	Horário
			T5cR2	22	2	22	70	200	14	Anti-horário
			T5cR3	32	2	18	75	190	11	Anti-horário
		45	T5dR1	34	11	22	67	205	15	Anti-horário
			T5dR2	25	3	21	78	200	14	Horário
			T5dR3	30	2	22	86	200	11	Anti-horário
T6	INJEÇÃO – ciproconazol + Break-thru®	2	T6aR1	23	7	21	72	211	14	Horário
			T6aR2	33	8	22	63	223	11	Horário
			T6aR3	36	17	22	70	180	15	Anti-horário
		15	T6bR1	23	1	22	74	224	11	Horário
			T6bR2	21	9	21	76	226	16	Horário
			T6bR3	33	5	22	71	210	12	Anti-horário
		30	T6cR1	32	3	18	68	183	8	Anti-horário
			T6cR2	38	4	22	70	187	8	Anti-horário
			T6cR3	32	1	22	75	190	15	Anti-horário
		45	T6dR1	9	3	21	76	190	4	Horário
			T6dR2	36	6	21	78	205	13	Anti-horário
			T6dR3	42	8	22	73	220	16	Horário

Exper.*	Descrição	Tempo de coleta (dias)	Nº da planta	Linha	Planta	Nº de Folhas	Espessura do estipe no ponto de aplicação (cm)	Comprimento do estipe (cm)	Nº de cachos de frutos	Direção do espiral
T7	INFUSÃO – Ciproconazol + <i>Break-thru</i> ® 3 frutos de cada cacho	45	T7aR1	38	9	21	62	213	13	Horário
		60	T7bR1	30	1	22	76	212	16	Anti-horário
		120	T7cR1	42	9	23	66	215	16	Horário
T8	INJEÇÃO – Ciproconazol + <i>Break-thru</i> ® 3 frutos de cada cacho	45	T8aR1	25	6	20	79	213	12	Horário
		90	T8bR1	13	5	19	66	228	13	Horário
		120	T8cR1	42	10	23	74	220	15	Horário

## Continuação

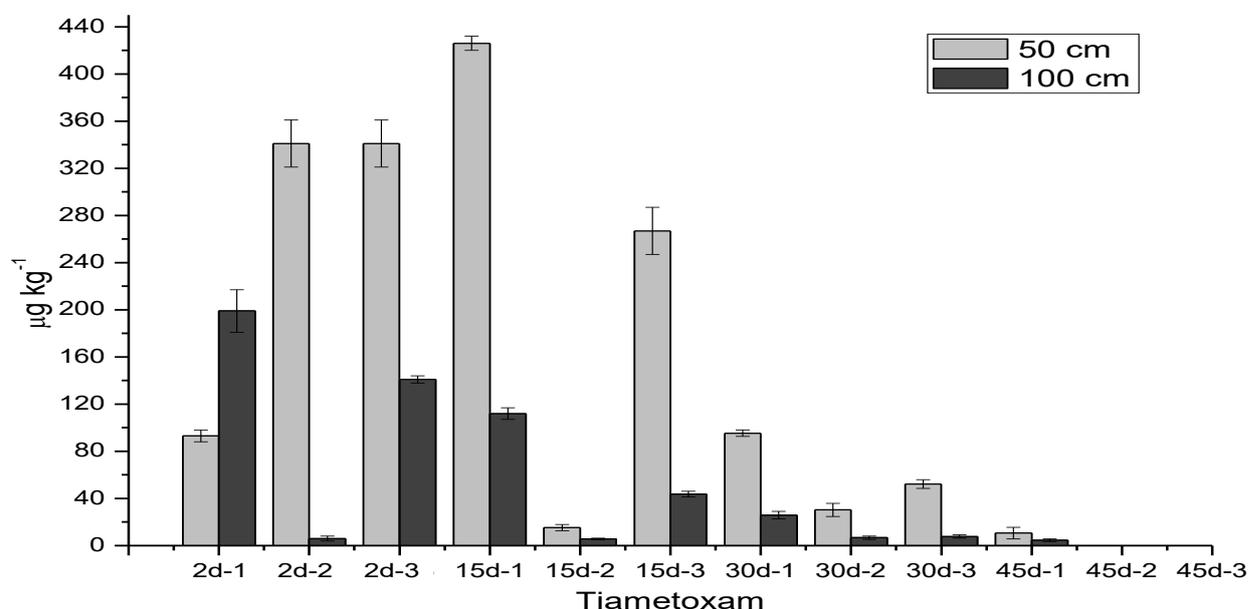
Exper. *	Descrição	Tempo de coleta (dias)	Número da planta	Linha	Planta	Nº folhas	Espessura do estipe no ponto de aplicação (cm)	Comprimento do estipe (cm)	Nº de Cachos de frutos	Direção do espiral
T9	INFUSÃO – <i>Mix</i> ** + <i>Break-thru</i> ®  3 frutos de cada cacho	45	T9aR1	43	1	25	78	220	18	Anti-horário
		90	T9bR1	44	9	20	95	230	14	Anti-horário
		120	T9cR1	49	16	21	75	239	17	Horário
T10	INJEÇÃO – <i>Mix</i> + <i>Break-thru</i> ®  3 frutos de cada cacho	45	T10aR1	50	18	21	78	229	12	Anti-horário
		90	T10bR1	51	19	20	81	230	16	Horário
		120	T10cR1	51	18	21	71	219	18	Horário
T11	INFUSÃO – ciproconazol + <i>Break-thru</i> ®  3 frutos de cada cacho	45	T11aR1	54	8	24	63	223	21	Anti-horário
		90	T11bR1	55	18	24	60	230	19	Anti-horário
		120	T11cR1	55	8	24	75	229	17	Horário
T12	INJEÇÃO – ciproconazol + <i>Break-thru</i> ®  3 frutos de cada cacho	45	T12aR1	60	12	22	73	230	17	Anti-horário
		90	T12bR1	59	15	23	76	231	16	Anti-horário
		120	T12cR1	62	16	21	78	229	17	Horário

\*Exper. = Experimento

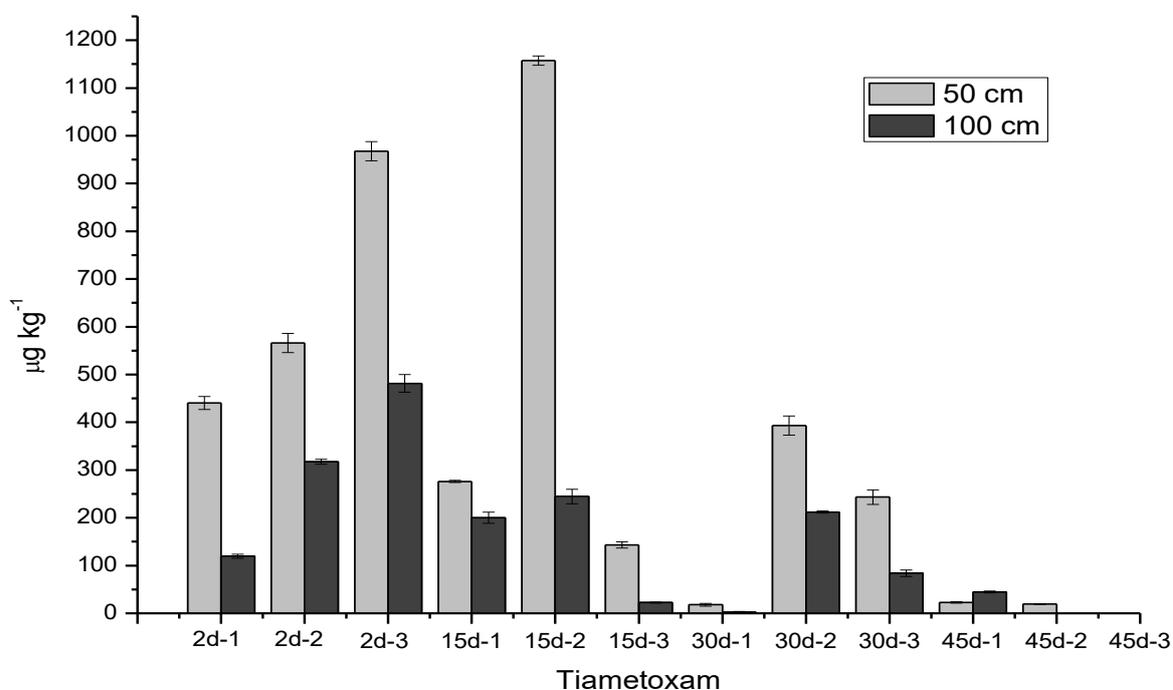
\*\* *Mix* – Ciproconazol, imidacloprido, espirodiclofeno, tiabendazol, carbosulfano, tiametoxam, difenoconazol

Figuras referentes aos resultados de translocação dos agrotóxicos aplicados em 3 plantas selecionadas para cada intervalo compreendido entre 2 a 45 dias com coleta de amostras em 50 e 100 cm acima do ponto de aplicação.

A) Tratamento 1 – Infusão/*Mix*

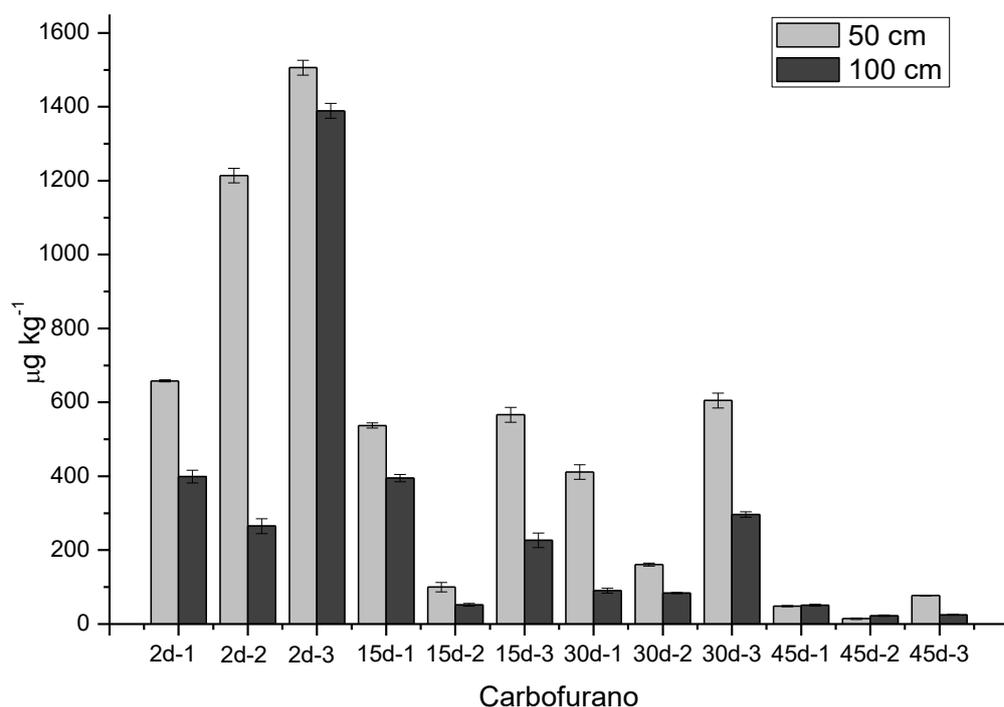


B) Tratamento 2 – Injeção/*Mix*

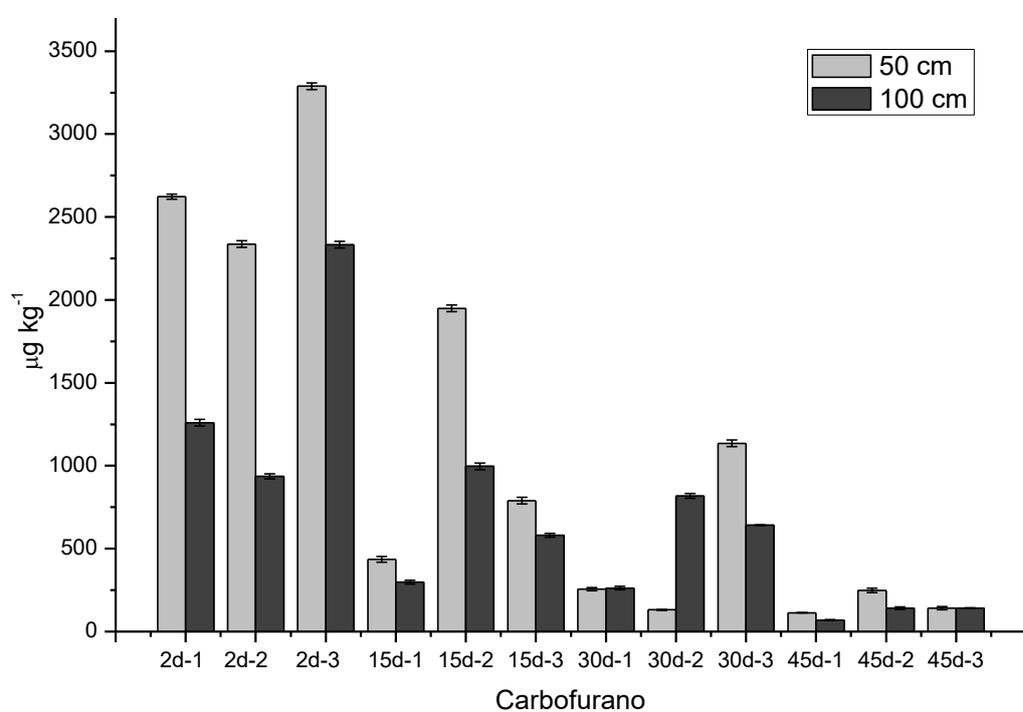


**Figura S3-** Resultados de translocação do tiametoxam referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas nos intervalos de coletas que variaram de 2 a 45 dias empregando os métodos endoterápicos de infusão (A) e injeção (B), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

## (A) Tratamento 1 – Infusão/Mix

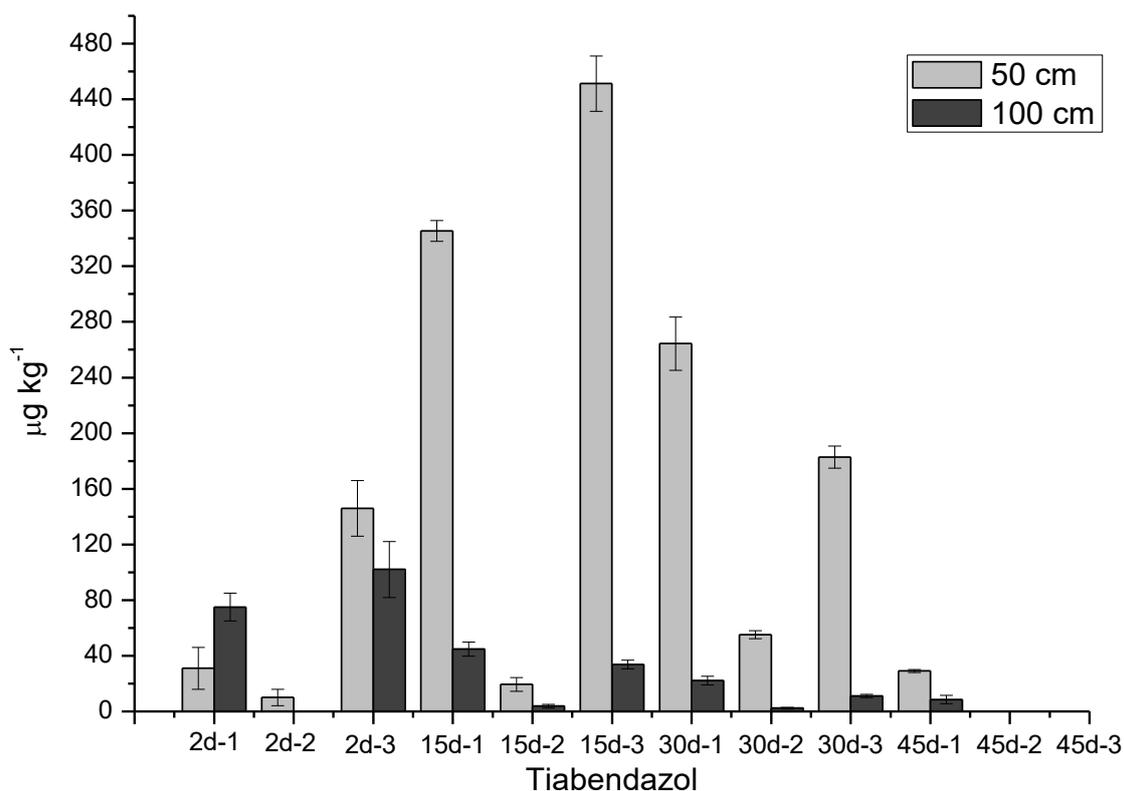


## (B) Tratamento 2 – Injeção/Mix

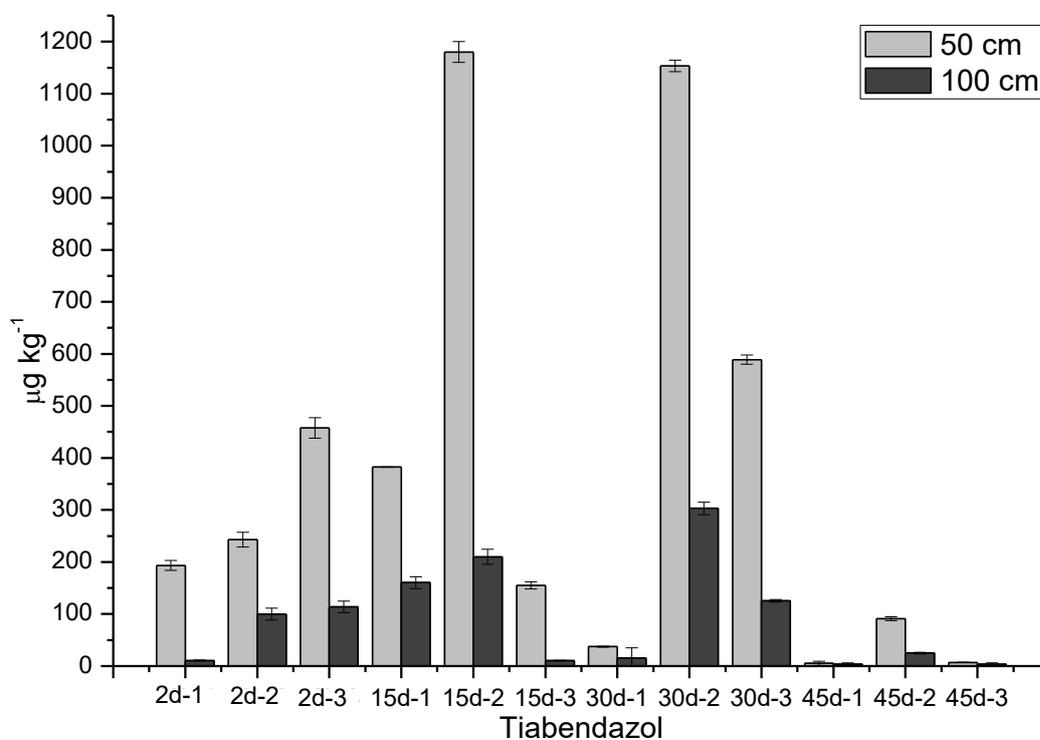


**Figura S4-** Resultados de translocação do carbofurano referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas nos intervalos de coletas que variaram de 2 a 45 dias empregando os métodos endoterápicos de infusão (A) e injeção (B), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

## (A) Tratamento 1 – Infusão/Mix

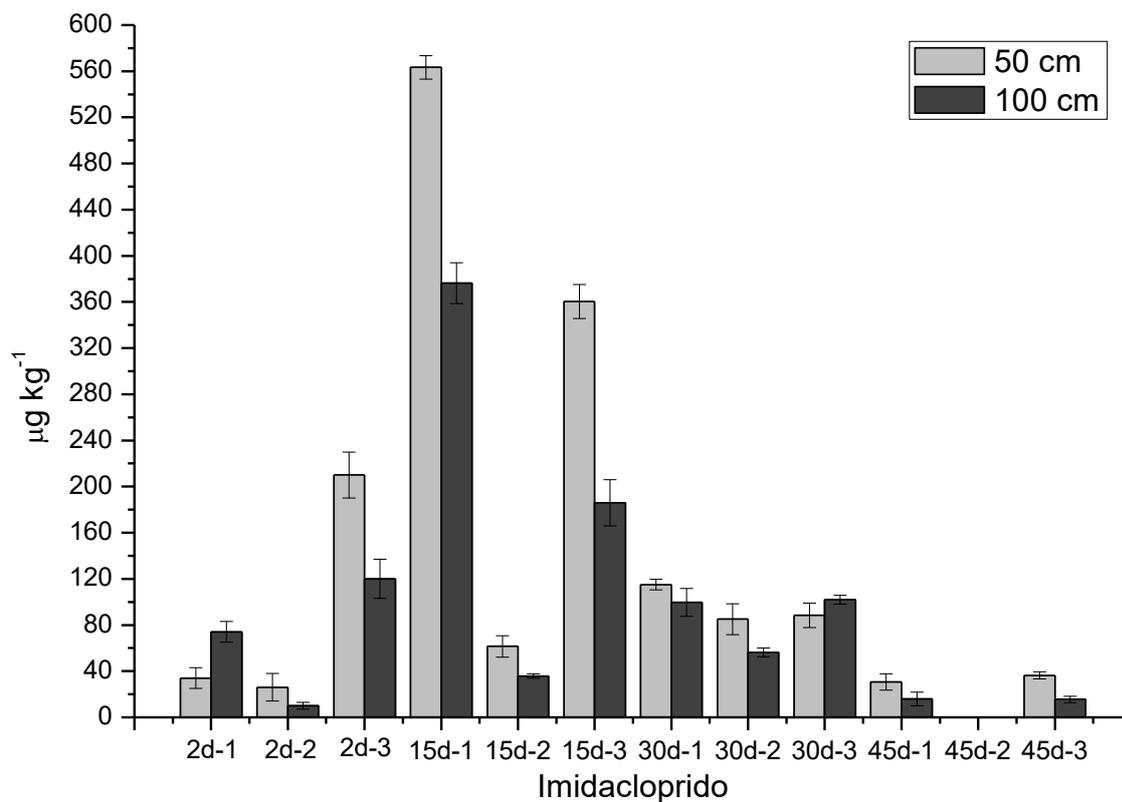


## (B) Tratamento 2 – Injeção/Mix

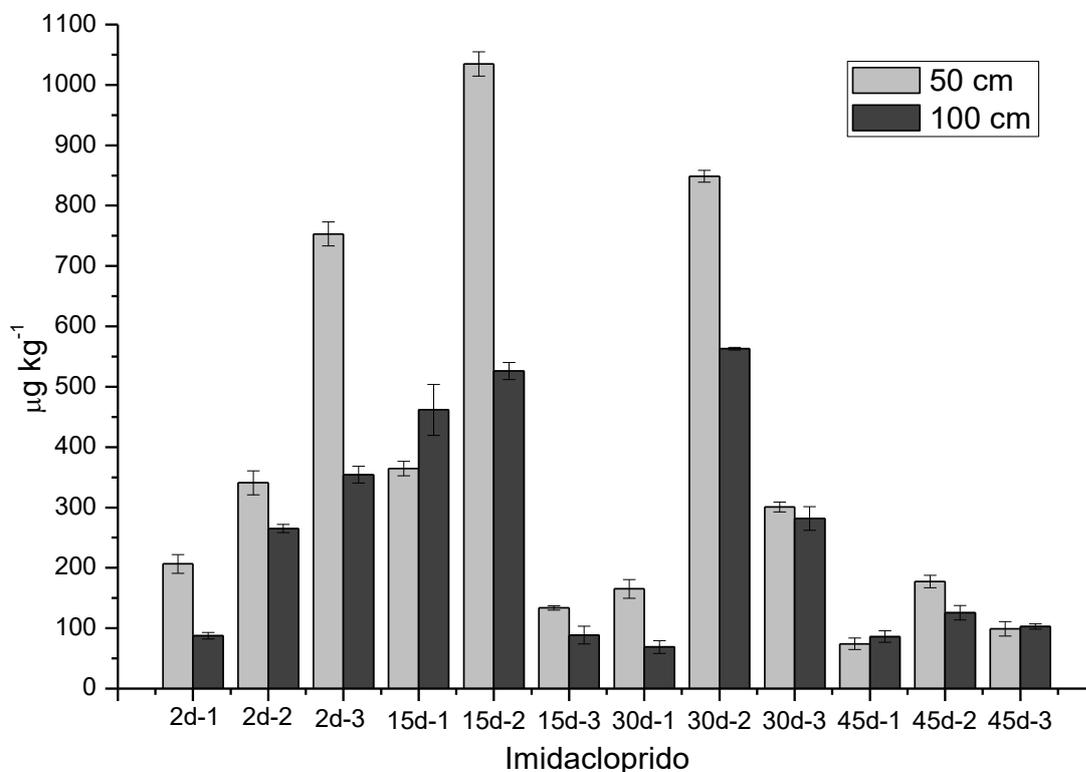


**Figura S4-** Resultados de translocação do tiabendazol referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas nos intervalos de coletas que variaram de 2 a 45 dias empregando os métodos endoterápicos de infusão (A) e injeção (B), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

## (A) Tratamento 1 – Infusão/Mix

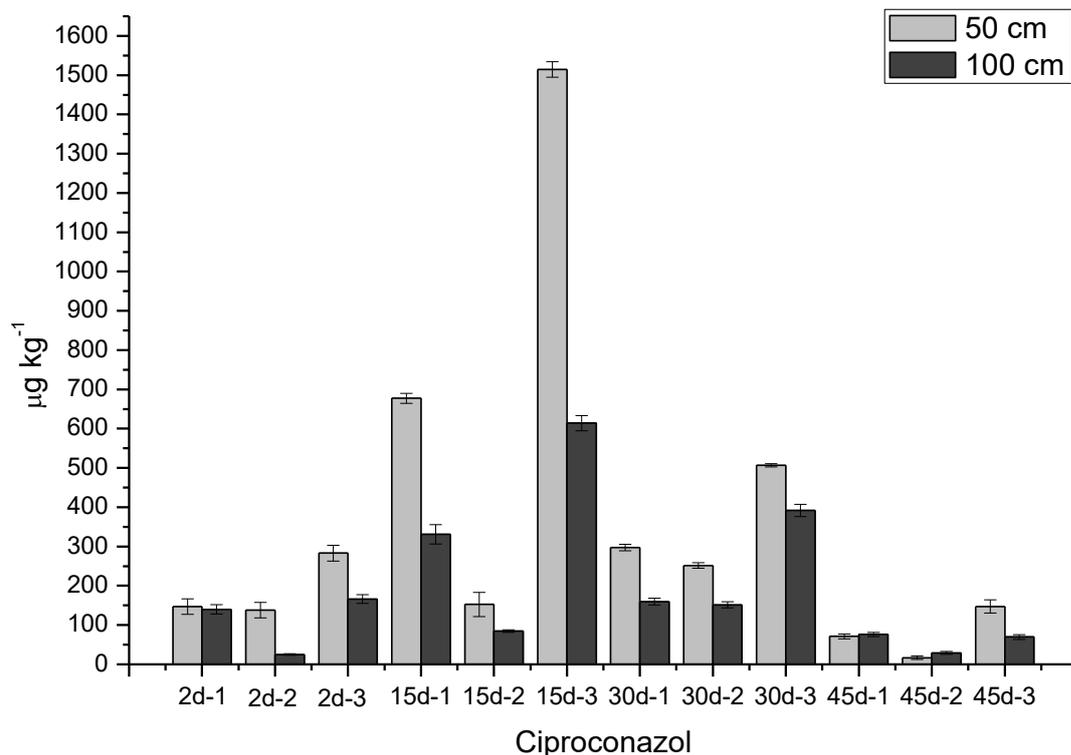


## (B) Tratamento 2 – Injeção/Mix

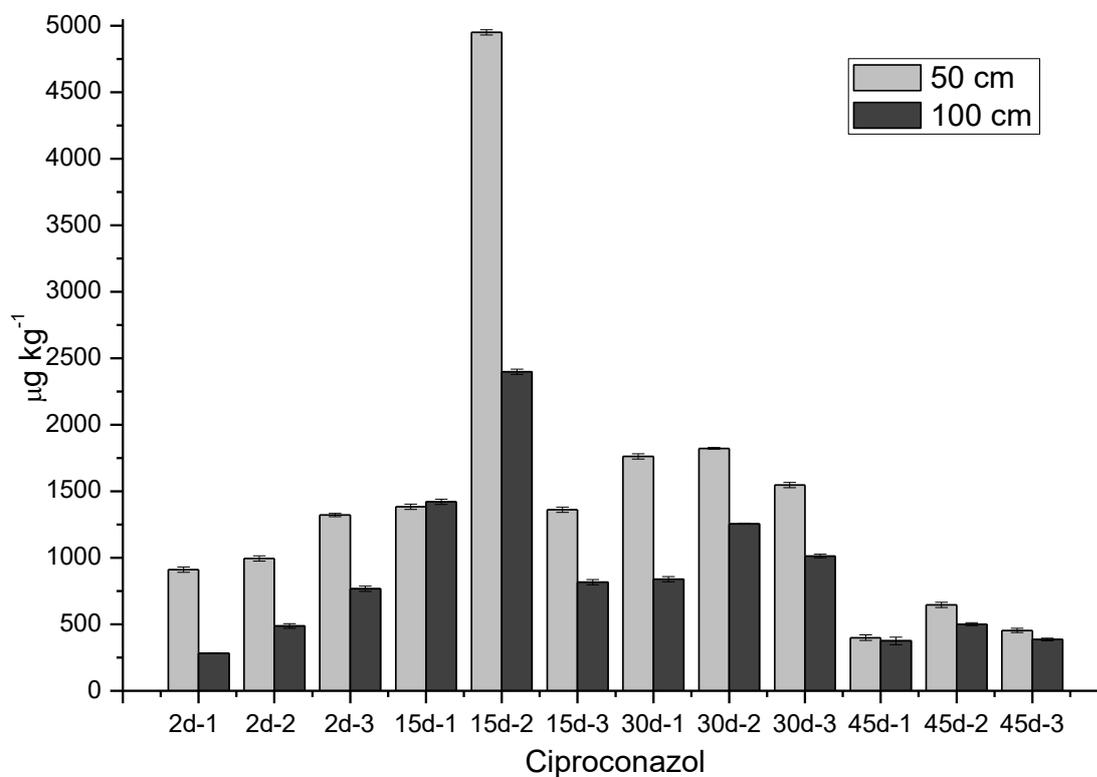


**Figura S5-** Resultados de translocação do imidacloprido referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas nos intervalos de coletas que variaram de 2 a 45 dias empregando os métodos endoterápicos de infusão (A) e injeção (B), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

## (A) Tratamento 1 – Infusão/Mix

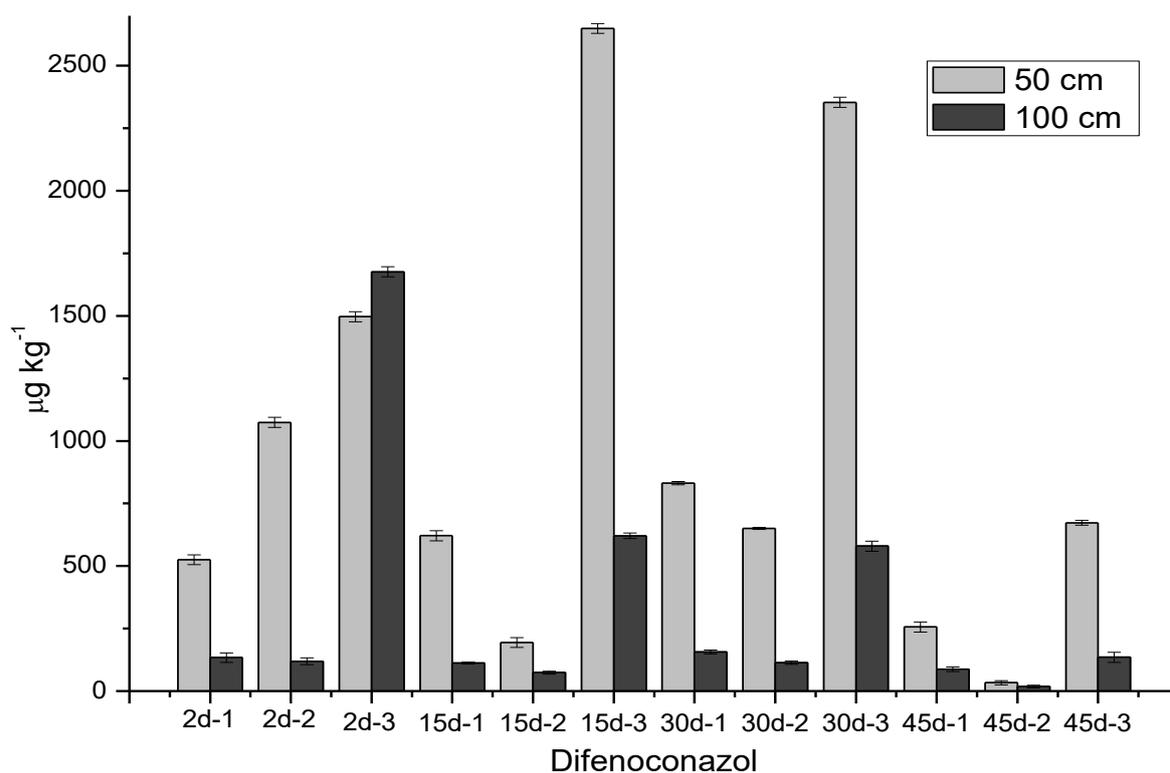


## (B) Tratamento 2 – Injeção/Mix

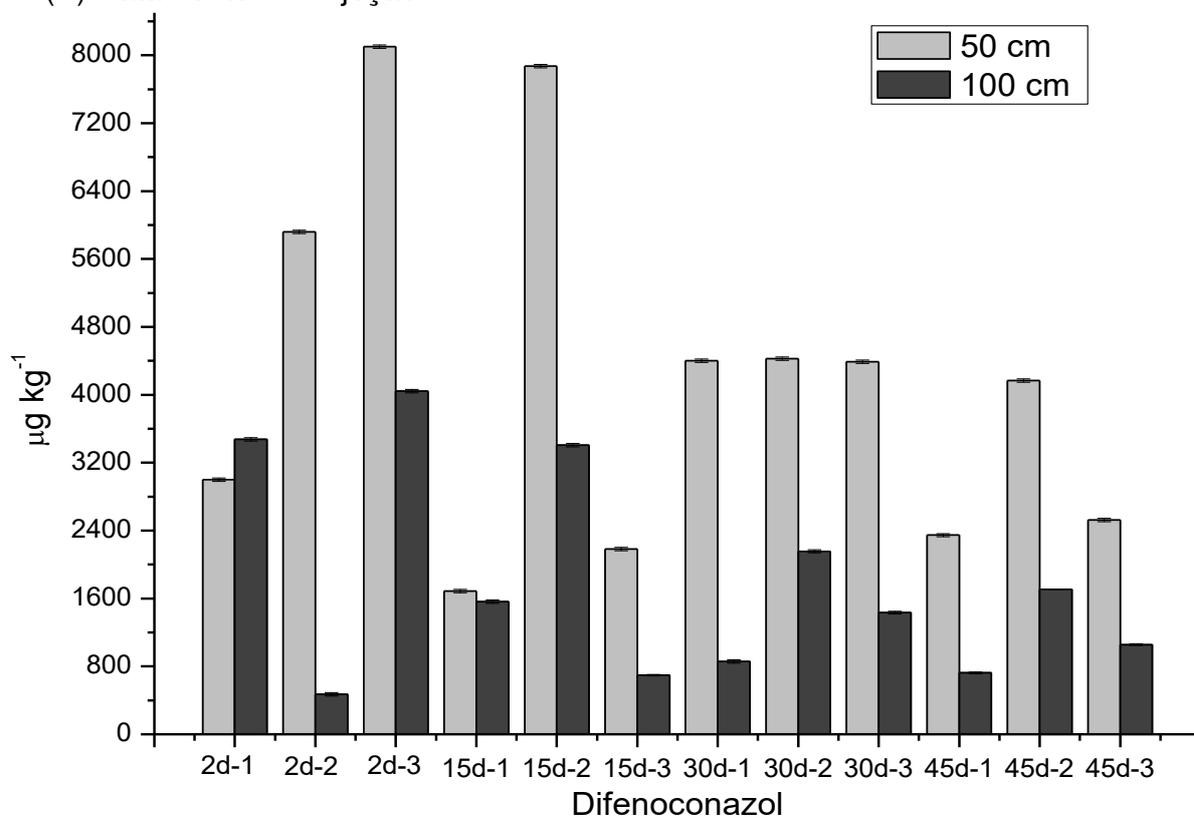


**Figura S6-** Resultados de translocação do ciproconazole referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas nos intervalos de coletas que variaram de 2 a 45 dias empregando os métodos endoterápicos de infusão (A) e injeção (B), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

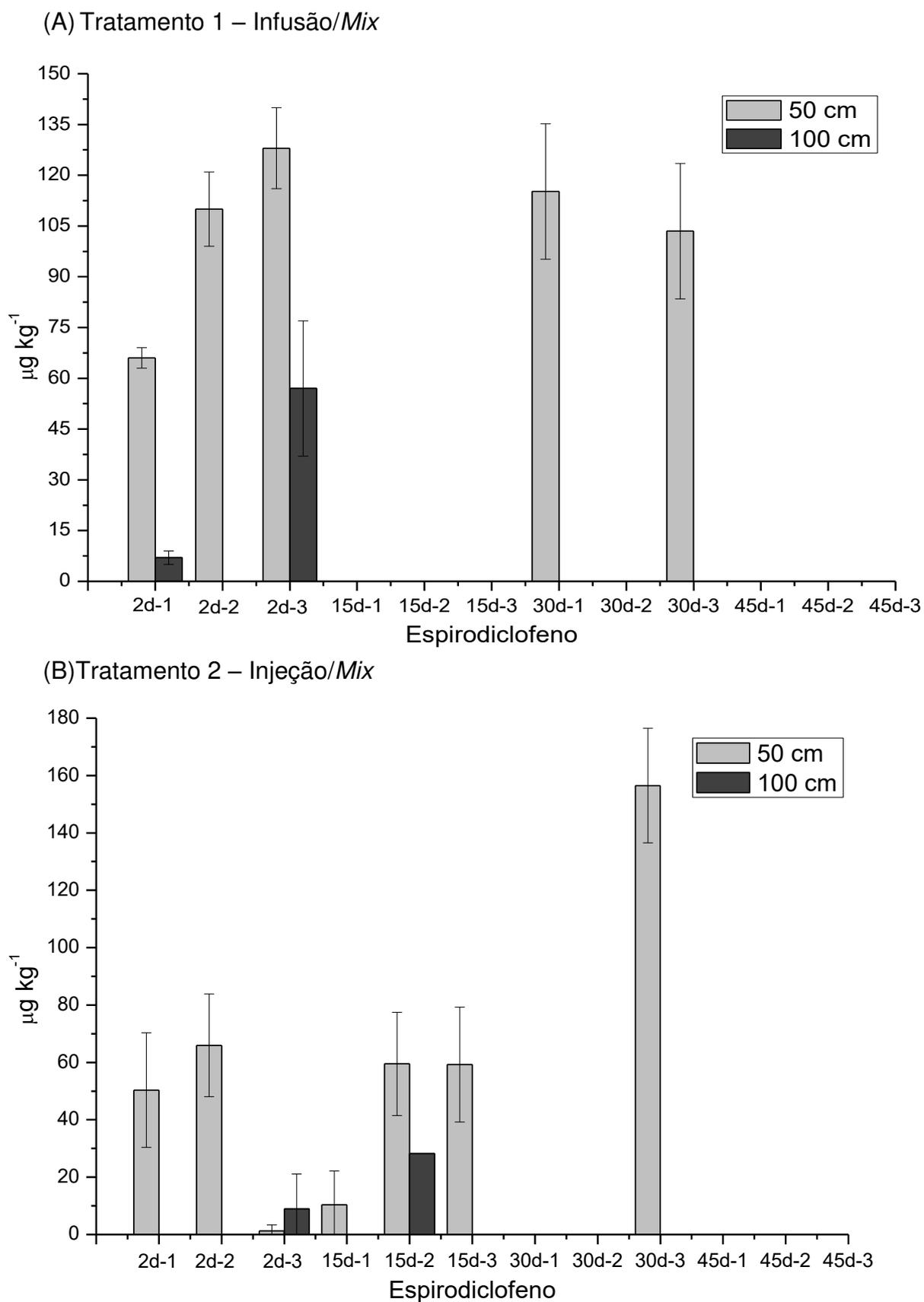
(A) Tratamento 1 – Infusão/Mix



(B) Tratamento 2 – Injeção/Mix

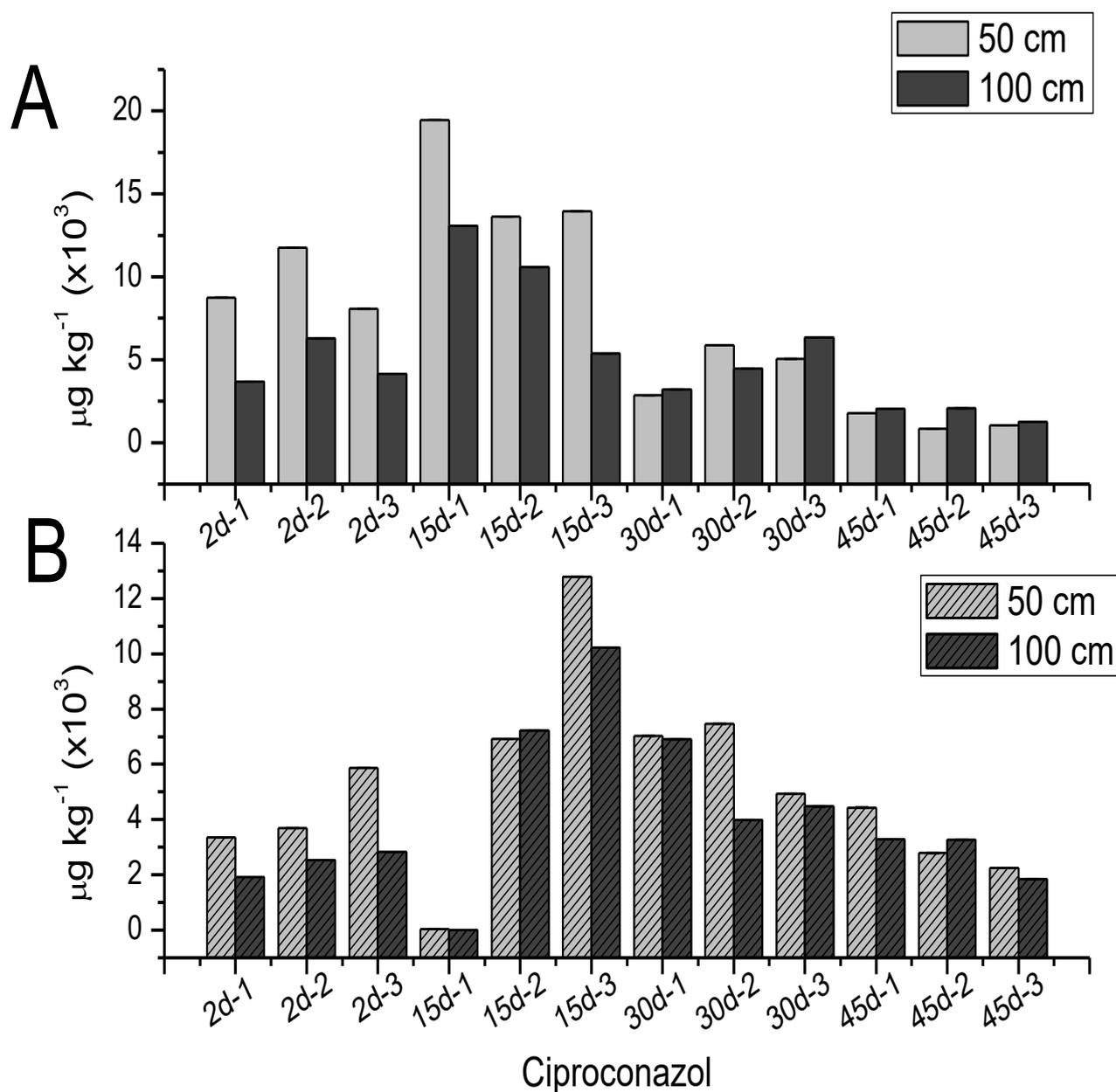


**Figura S7-** Resultados de translocação do difenoconazol referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas nos intervalos de coletas que variaram de 2 a 45 dias empregando os métodos endoterápicos de infusão (A) e injeção (B), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.



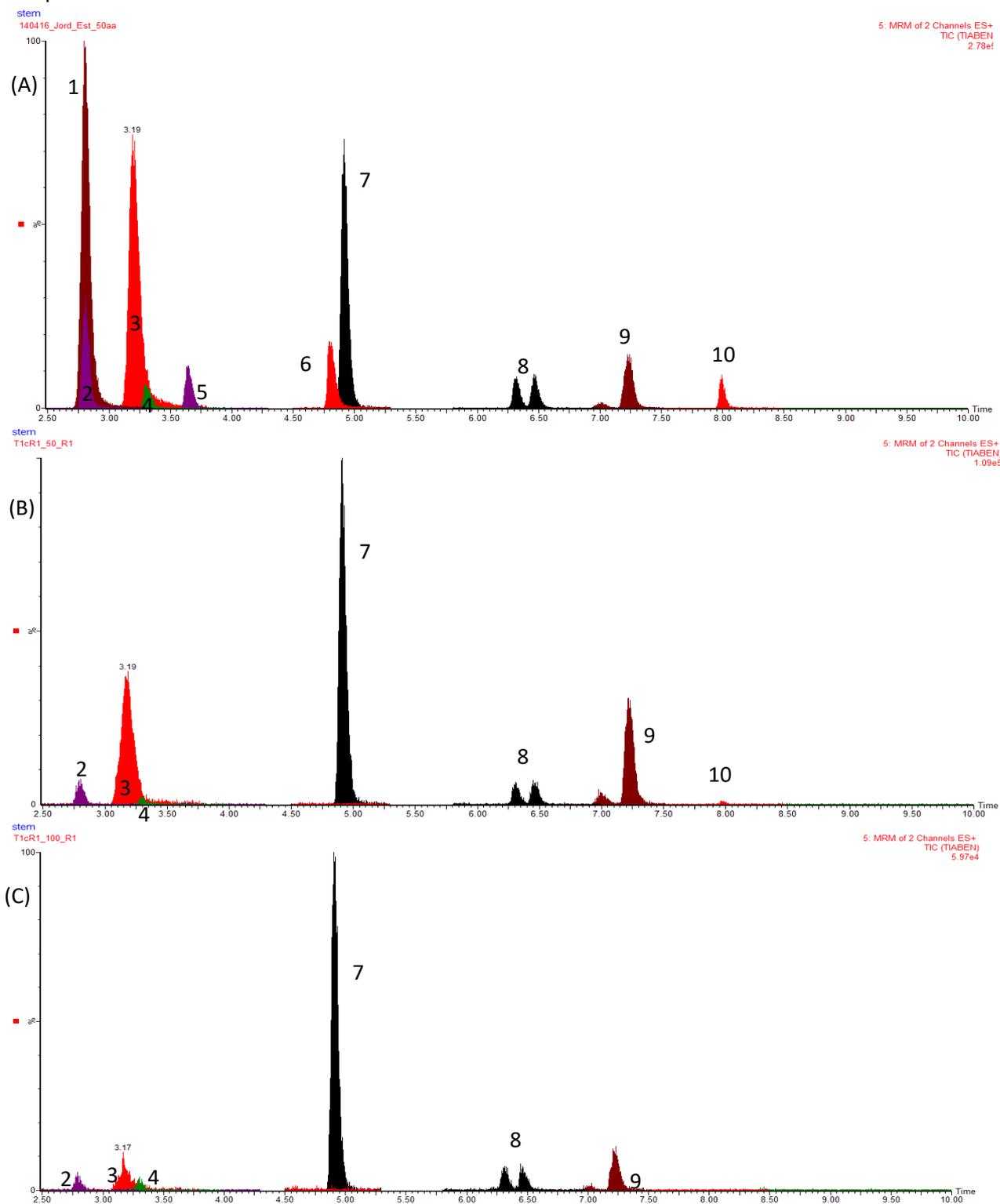
**Figura S8-** Resultados de translocação do espirodiclofenos referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas nos intervalos de coletas que variaram de 2 a 45 dias empregando os métodos endoterápicos de infusão (A) e injeção (B), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

Figuras referentes aos resultados de translocação do ciproconazol aplicados em 3 plantas selecionadas para cada intervalo compreendido entre 2 a 45 dias com coleta de amostras em 50 e 100 cm acima do ponto de aplicação.

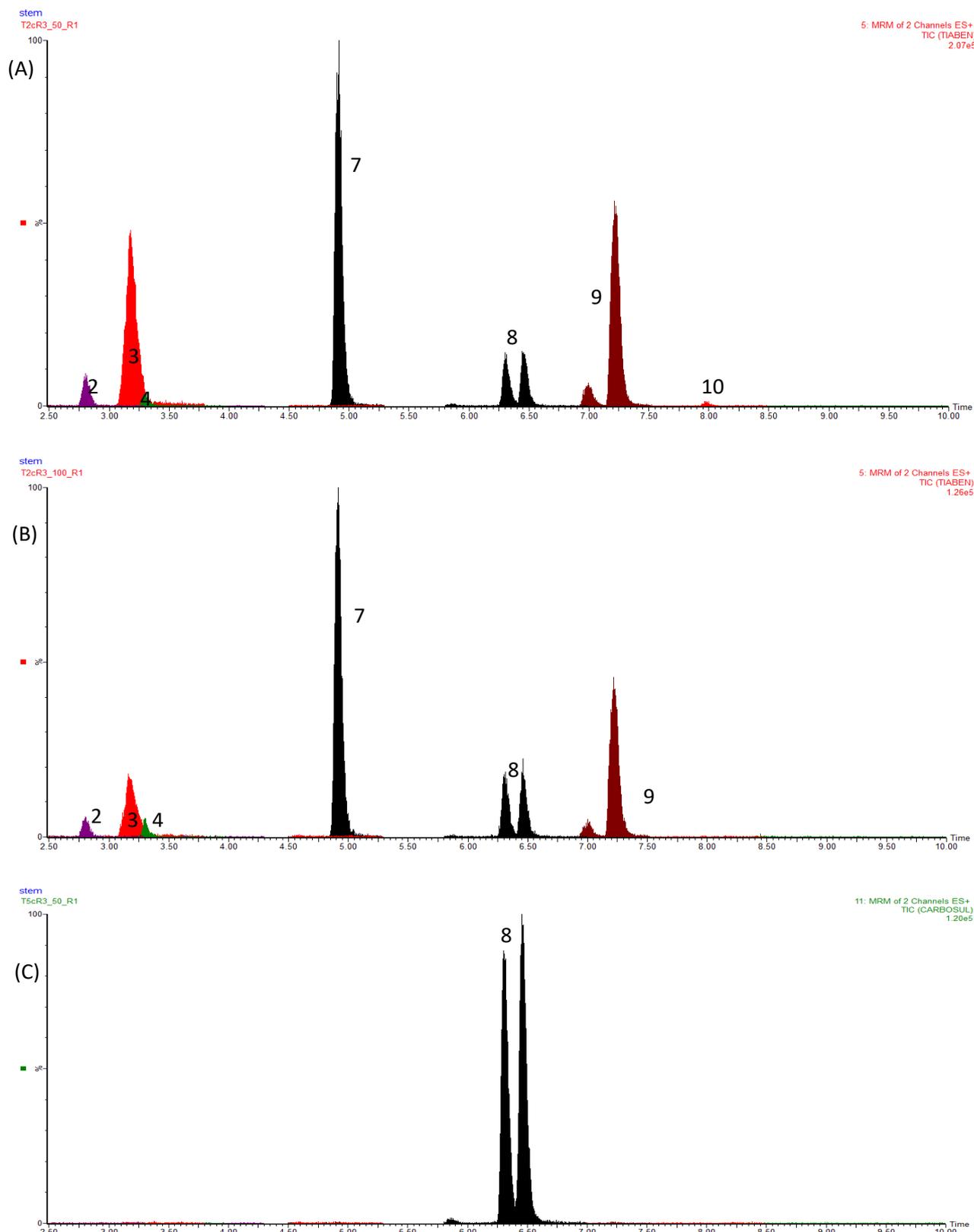


**Figura S9-** Resultados de translocação do ciproconazol referentes ao tratamento aplicado em três diferentes plantas nos intervalos de coletas que variaram de 2 a 45 dias empregando os métodos endoterápicos de infusão (A) e injeção (B), em amostras de estipe coletadas acima do ponto de aplicação (50 e 100 cm), obtidos na extração por QuEChERS modificado e análise por UHPLC-MS/MS.

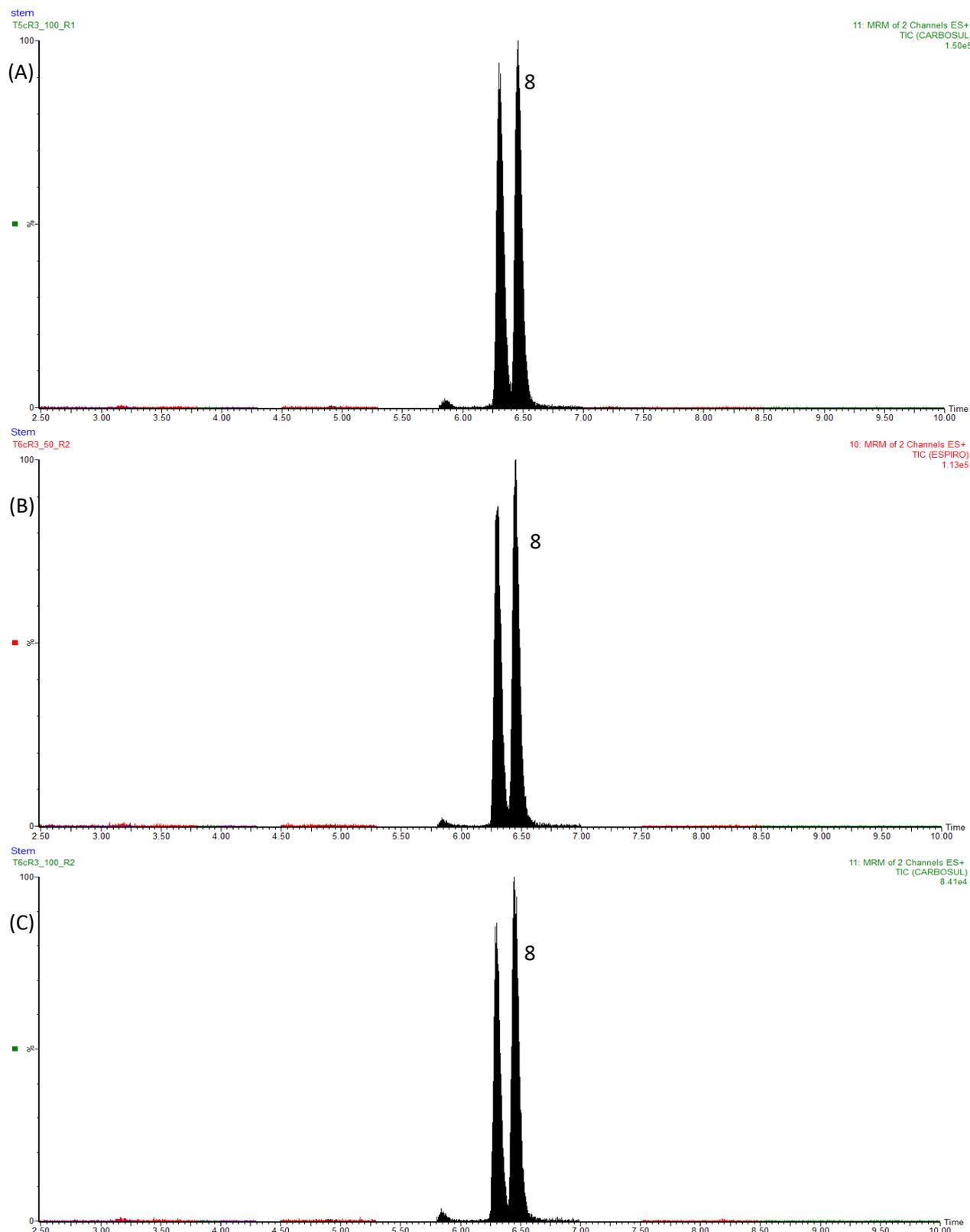
## Cromatogramas referentes aos resultados de translocação dos agrotóxicos no estipe de coqueiro



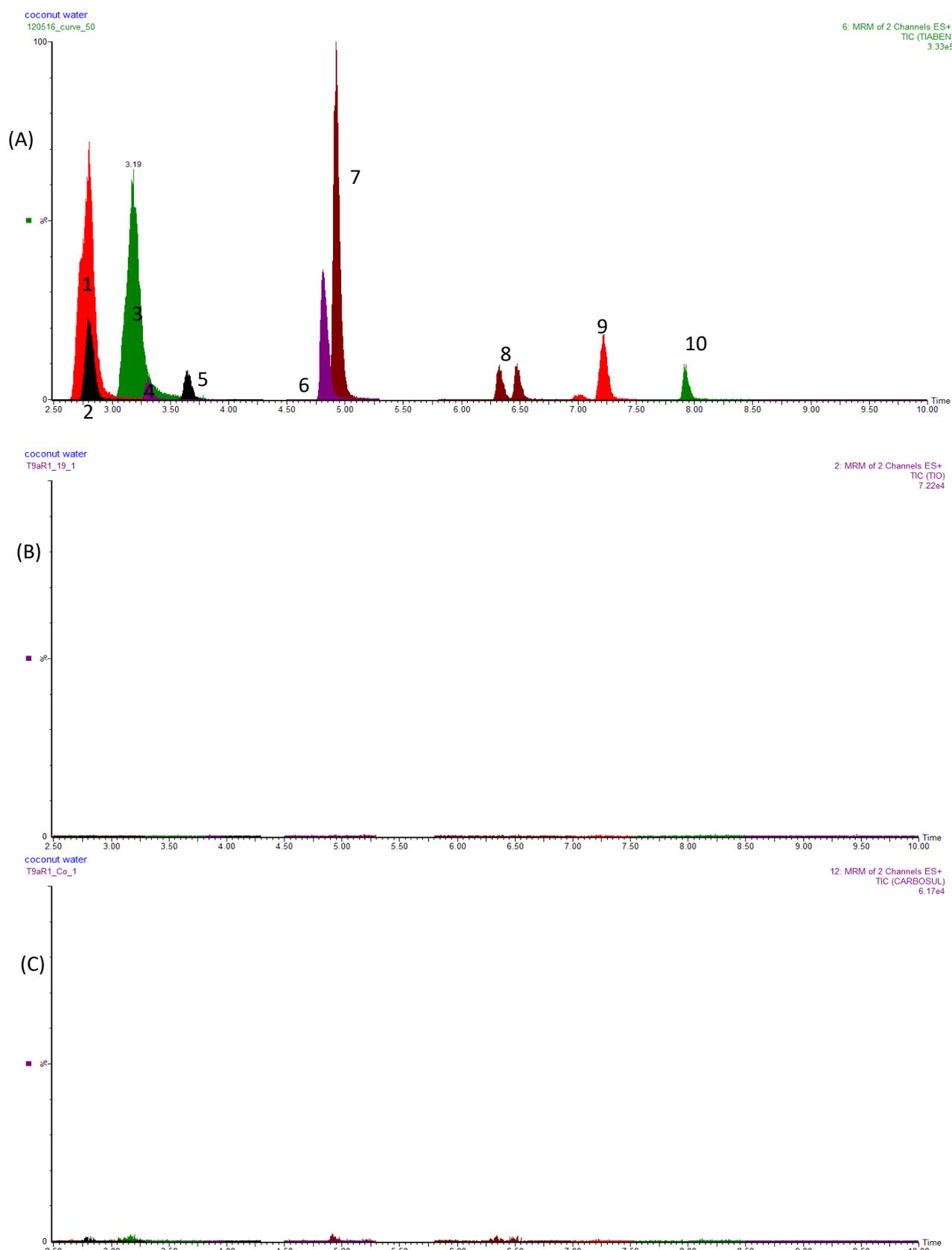
**Figura S10** – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS. Identificação dos compostos: (1) Carbenfendazim, (2) Tiametoxan, (3) Tiabendazol, (4) Imidacloprido, (5) 3-OH-carbofurano, (6) Tiofanato-metílico, (7) Carbofurano, (8) Ciproconazol (isômero), (9) Difenconazol, (10) Espirodiclofeno. (A) Cromatograma do extrato do estipe numa concentração de 50 µg L<sup>-1</sup>; (B) Cromatograma do extrato do estipe em 50 cm acima do ponto de aplicação no intervalo de 30 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de infusão, (C) Cromatograma do extrato do estipe em 100 cm acima do ponto de aplicação no intervalo de 30 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de infusão.



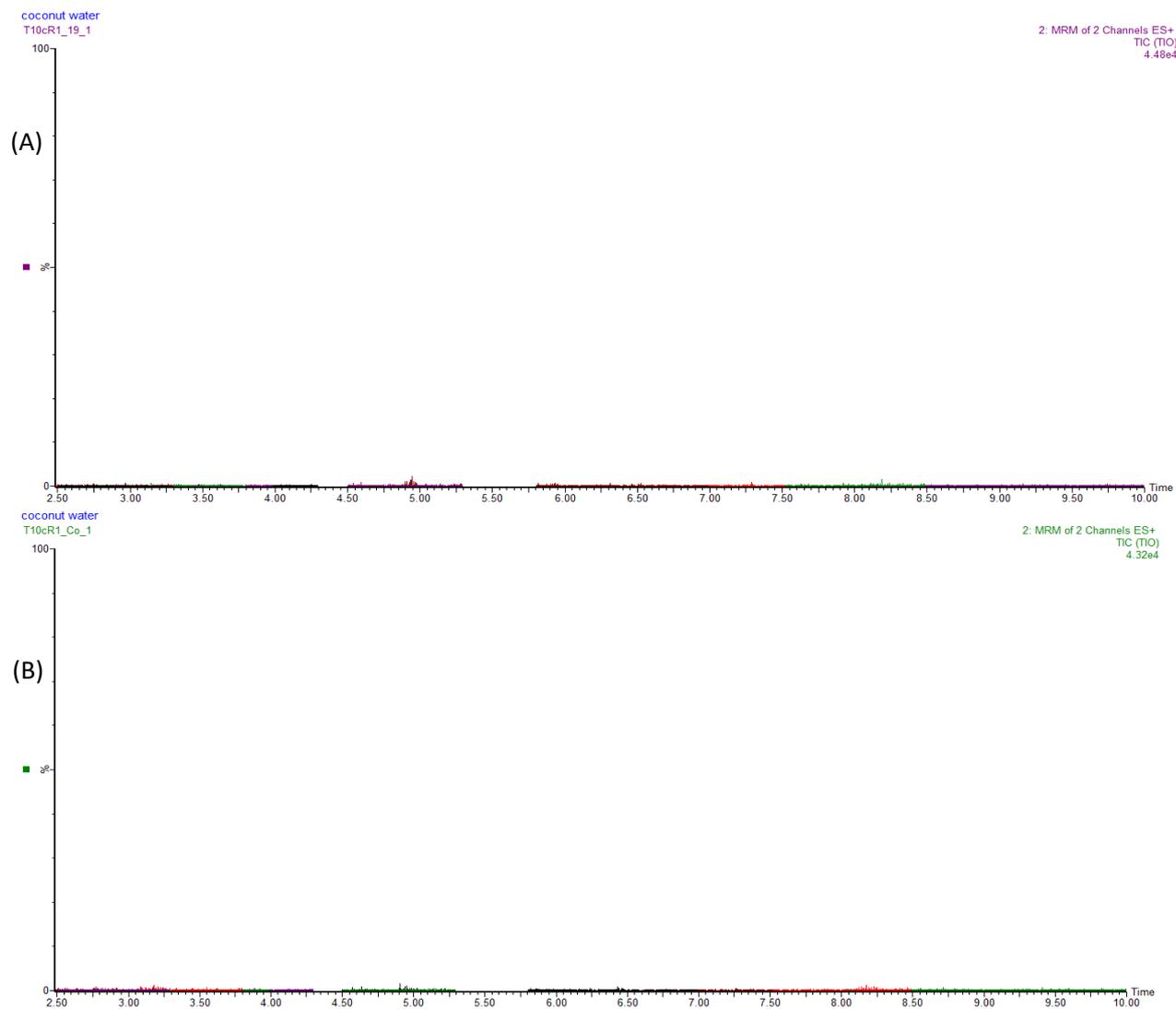
**Figura S11** – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS. Identificação dos compostos: (1) Carbondazim, (2) Tiametoxan, (3) Tiabendazol, (4) Imidacloprido, (5) 3-OH-carbofurano, (6) Tiofanato-metílico, (7) Carbofurano, (8) Ciproconazol (isômero), (9) Difenconazol, (10) Espirodiclofeno. (A) Cromatograma do extrato do estipe numa concentração 50 cm acima do ponto de aplicação no intervalo de 30 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de injeção; (B) Cromatograma do extrato do estipe em 100 cm acima do ponto de aplicação no intervalo de 30 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de injeção, (C) Cromatograma do extrato do estipe em 50 cm acima do ponto de aplicação no intervalo de 30 dias após a aplicação do ciproconazol utilizando o método de infusão.



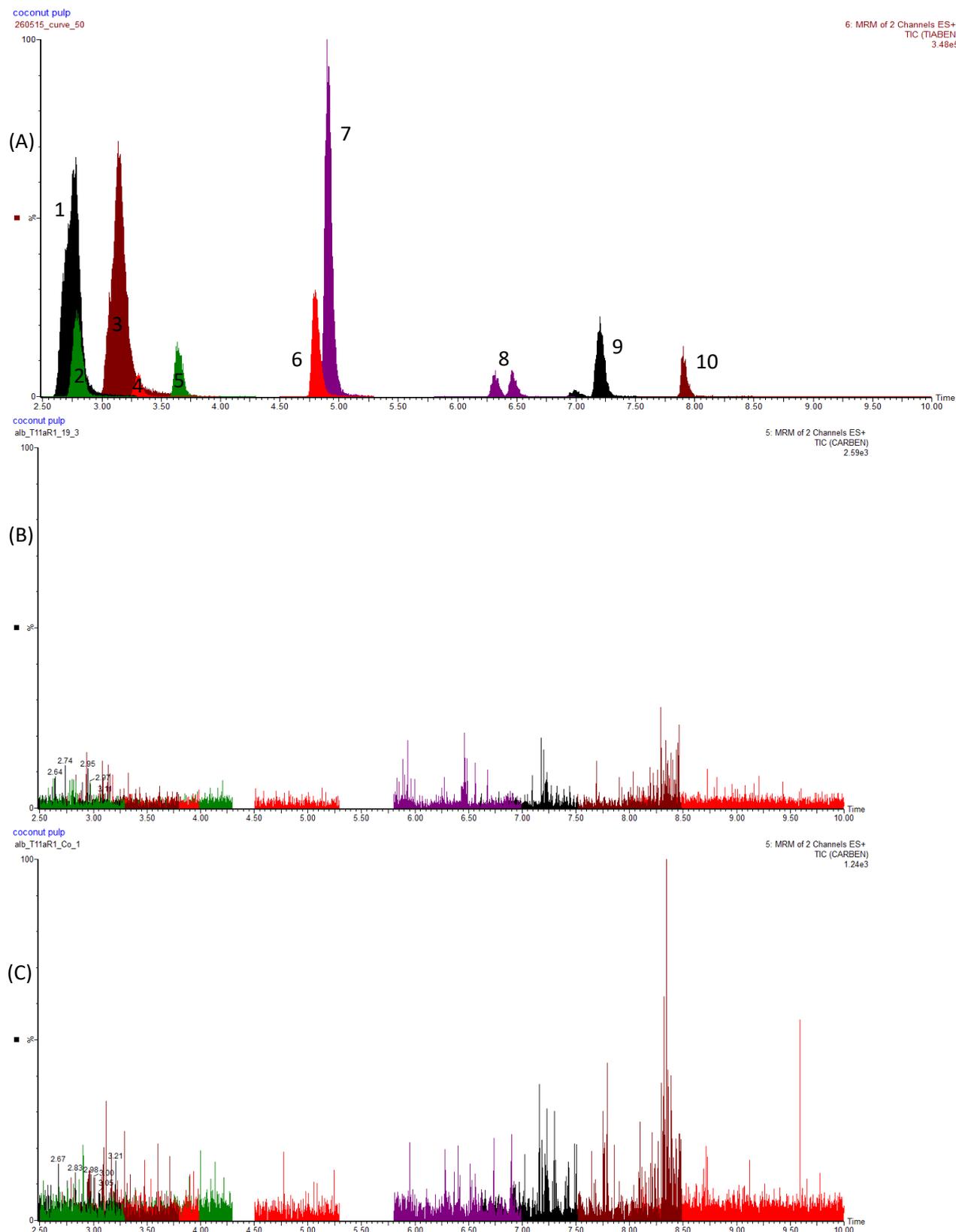
**Figura S12** – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS. Identificação dos compostos: (1) Carbenfazim, (2) Tiametoxan, (3) Tiabendazol, (4) Imidacloprido, (5) 3-OH-carbofurano, (6) Tiofanato-metílico, (7) Carbofurano, (8) Ciproconazol (isômero), (9) Difenconazol, (10) Espirodiclofeno. (A) Cromatograma do extrato do estipe numa concentração 100 cm acima do ponto de aplicação no intervalo de 30 dias após a aplicação do ciproconazol utilizando o método de infusão; (B) Cromatograma do extrato do estipe em 100 cm acima do ponto de aplicação no intervalo de 30 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de infusão, (C) Cromatograma do extrato do estipe em 50 cm acima do ponto de aplicação no intervalo de 30 dias após a aplicação do ciproconazol utilizando o método de injeção.



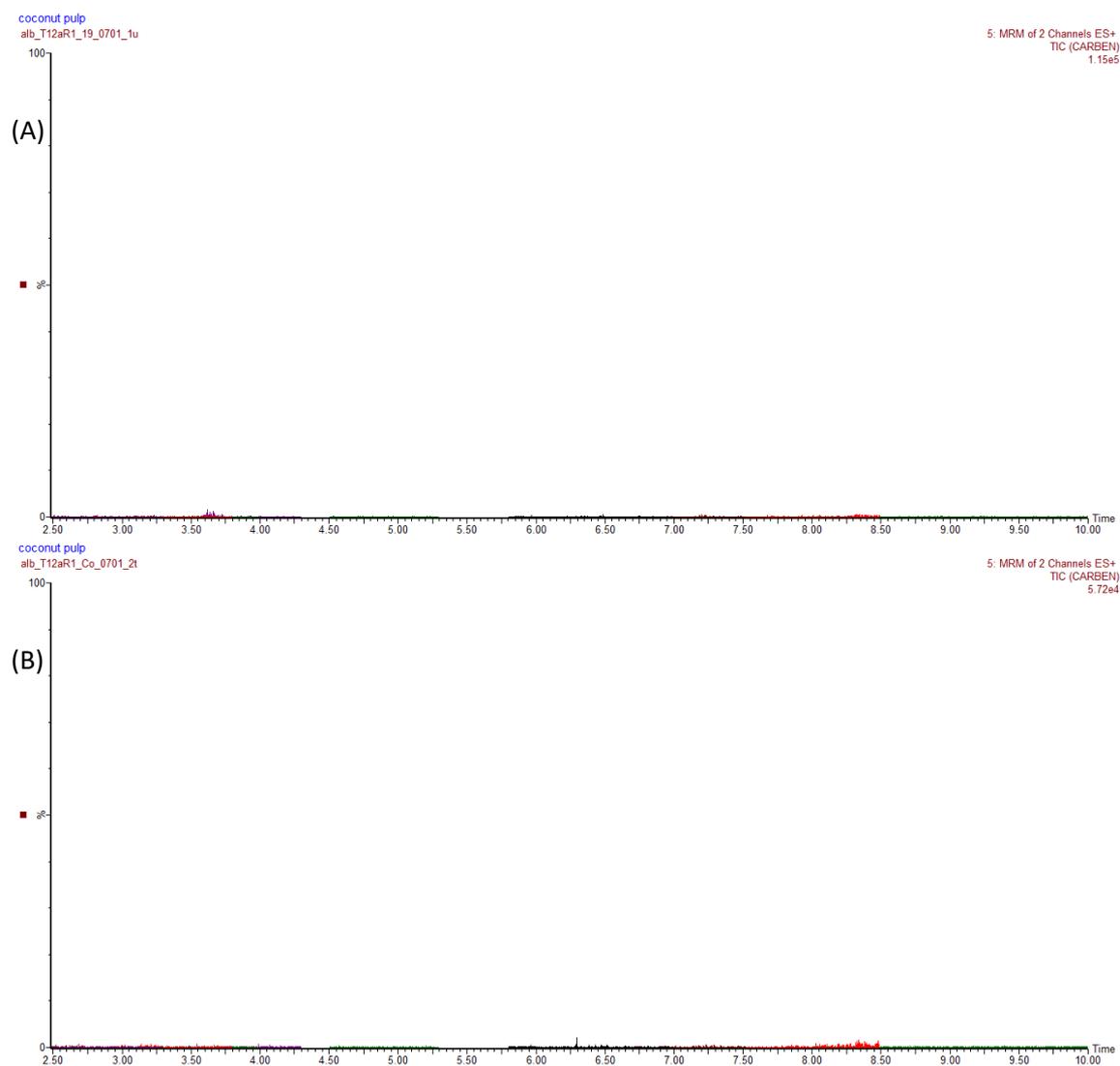
**Figura S13** – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS. Identificação dos compostos: (1) Carbendazim, (2) Tiametoxan, (3) Tiabendazol, (4) Imidacloprido, (5) 3-OH-carbofurano, (6) Tiofanato-metílico, (7) Carbofurano, (8) Ciproconazol (isômero), (9) Difenconazol, (10) Espirodiclofeno. (A) Cromatograma do extrato da água-de-coco numa concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ; (B) Cromatograma do extrato da água-de-coco do cacho 19 no intervalo de 2 dias após a aplicação do ciproconazol utilizando o método de infusão; (C) Cromatograma do extrato da água-de-coco do cacho seco no intervalo de 2 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de infusão.



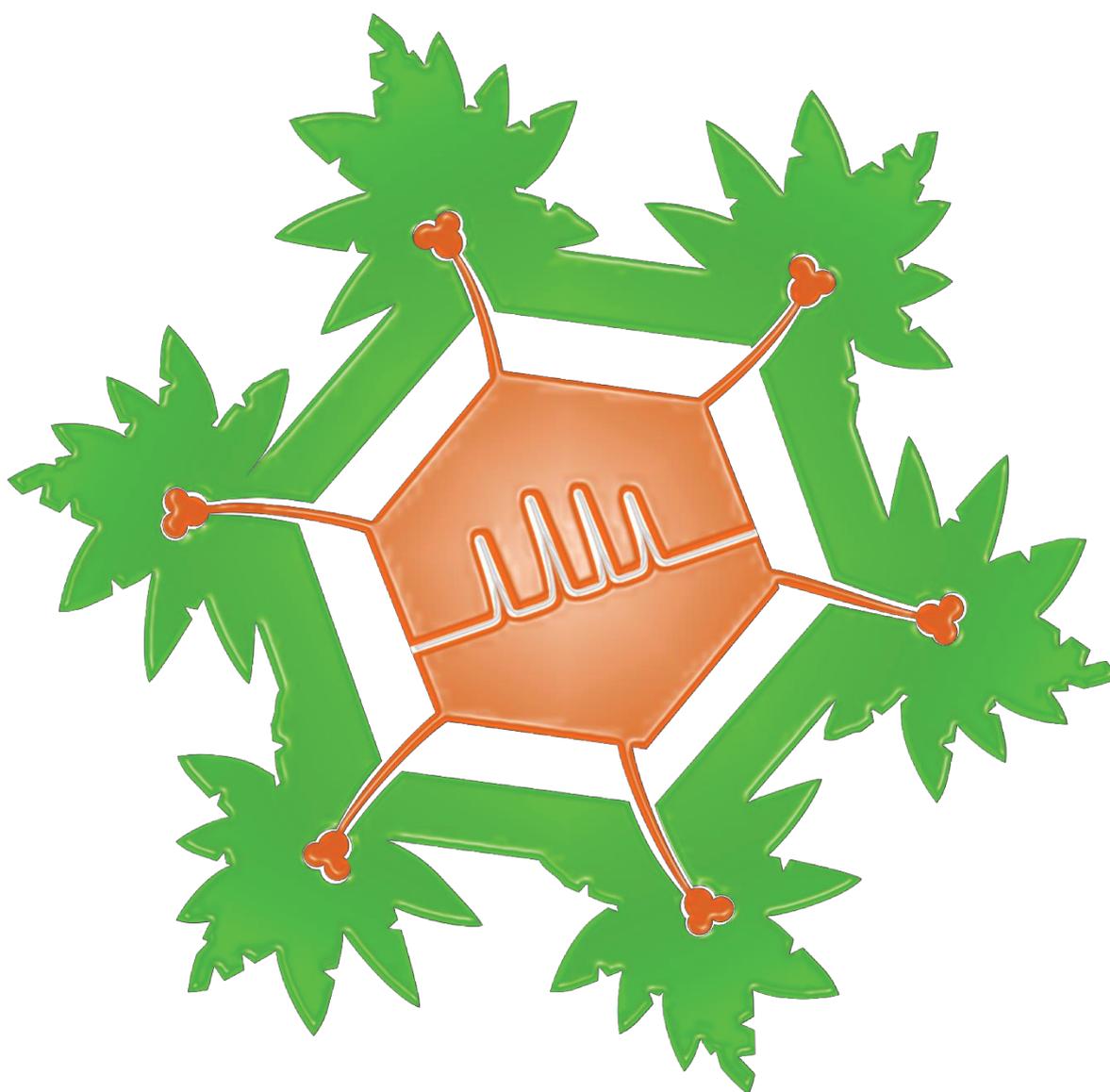
**Figura S14** – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS. Identificação dos compostos: (1) Carbendazim, (2) Tiametoxan, (3) Tiabendazol, (4) Imidacloprido, (5) 3-OH-carbofurano, (6) Tiofanato-metílico, (7) Carbofurano, (8) Ciproconazol (isômero), (9) Difenconazol, (10) Espirodiclofeno. (A) Cromatograma do extrato da água-de-coco do cacho 19 no intervalo de 30 dias após a aplicação do ciproconazol utilizando o método de injeção; (B) Cromatograma do extrato da água-de-coco do cacho seco no intervalo de 30 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de injeção.



**Figura S15** – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS. Identificação dos compostos: (1) Carbendazim, (2) Tiametoxan, (3) Tiabendazol, (4) Imidacloprido, (5) 3-OH-carbofurano, (6) Tiofanato-metílico, (7) Carbofurano, (8) Ciproconazol (isômero), (9) Difenconazol, (10) Espirodiclofeno. (A) Cromatograma do extrato do albúmen sólido numa concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ; (B) Cromatograma do extrato do albúmen sólido do cacho 19 no intervalo de 2 dias após a aplicação do ciproconazol utilizando o método de infusão; (C) Cromatograma do extrato da água-de-coco do cacho seco no intervalo de 2 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de infusão.



**Figura S16** – Cromatogramas dos íons selecionados obtidos por UHPLC-MS/MS. Identificação dos compostos: **(1)** Carbendazim, **(2)** Tiametoxan, **(3)** Tiabendazol, **(4)** Imidacloprido, **(5)** 3-OH-carbofurano, **(6)** Tiofanato-metílico, **(7)** Carbofurano, **(8)** Ciproconazol (isômero), **(9)** Difenconazol, **(10)** Espirodiclofeno. (A) Cromatograma do extrato do albúmen sólido do cacho 19 no intervalo de 2 dias após a aplicação do ciproconazol utilizando o método de injeção; (B) Cromatograma do extrato do albúmen sólido do cacho seco no intervalo de 2 dias após a aplicação do *mix* utilizando o método de injeção.



Esta arte de autoria de Daimone Poliard sintetiza a ideia da aplicação de agrotóxicos no estipe dos coqueiros utilizando os tratamentos endoterápicos, a possibilidade de translocação até os frutos e a análise dos agrotóxicos em produtos do coqueiro utilizando técnicas cromatográficas.