

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Programas de Pós-Graduação

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MEL DE
ABELHAS (*Apis sp*) POR CROMATOGRÁFIA DE FASE GASOSA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Carla Martins Pittella

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2009

Carla Martins Pittella

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MEL DE ABELHAS (*Apis sp*)
POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dissertação apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à obtenção do
grau de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Tecnologia e Inspeção
de Produtos de Origem Animal
Orientador: Prof. Dr. Leorges Moraes da
Fonseca
Co-orientador: Prof. Dr. Robson José de Cassia
Franco Afonso

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2009

P688d Pittella, Carla Martins, 1963-

Determinação de resíduos de agrotóxicos em mel de abelhas (*Apis sp*) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas / Carla Martins Pittella. – 2009.

117 p. : il.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Co-orientador: Robson José de Cassia Franco Afonso

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Mel – Análise – Teses. 2. Alimentos – Contaminação – Teses. 3. Agrotóxicos – Teses. 4. Análise cromatográfica – Teses. 5. Espectrometria de massa – Teses. I. Fonseca, Leorges Moraes da. II. Afonso, Robson José de Cássia Franco. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 641.38

Dissertação defendida e aprovada em 28/05/2009 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Leorges Moraes da Fonseca
Orientador

Prof. Dr. Renaldo Travassos Martins

Prof^a. Dra Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz

Prof^a. Dra Marília Martins Melo

Ao meu marido Robson

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Leorges Moraes da Fonseca pela orientação e por disponibilizar os recursos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renaldo Travassos Martins pela orientação e pela confiança depositada durante o curso.

Ao meu querido co-orientador, Prof. Dr. Robson de Cassia Franco Afonso, agradeço com particular referência, pelo incentivo, pela orientação, pelo apoio irrestrito e, principalmente, pela ética na condução do trabalho sem a qual não seria possível a sua realização.

Ao Júlio César Cardoso da Silva pela preciosa contribuição, pela paciência e pelos longos fins de semana de trabalho no Laboratório de Caracterização Molecular.

Um agradecimento especial à futura Dra. Karyne Mourthé de Miranda pelo grande incentivo para o começo deste trabalho.

Às amigas Christiane Contigli, Inês Tristão, Patrícia Pimentel e Mércia Helena dos Santos pelas correções e sugestões da parte escrita e pelo carinho nas horas mais difíceis.

Aos colegas do Setor de Biotecnologia e Tecnologia Química do Cetec, Maria Emília, Darci, Graça, Luciene, Ilton, Paulo Gilberto, Anali, Iolanda e Eliseu pela colaboração nas atividades no Cetec.

Aos colegas do Setor de Medições Ambientais do Cetec, Vagner Fernandes Knnup e Gleidiane, pela disposição em ajudar sempre.

À Coordenadora do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Veterinária Profa. Dra. Marília Martins Melo pelo apoio.

À todas as Cooperativas, as Associações e aos produtores pela colaboração no envio das amostras de mel para esta pesquisa.

À Eliane Hooper do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e à Jorge Ghelli da SOUZA CRUZ/RS pelo cessão dos padrões de agrotóxicos utilizados neste trabalho.

À Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais/CETEC pelo apoio para a execução de grande parte dos trabalhos experimentais.

Ao Laboratório de Caracterização Molecular/Espectrometria de Massas da UFOP que disponibilizou muitos dos recursos humanos, materiais e equipamentos necessários a execução do projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pela Bolsa de Mestrado do Programa de Capacitação de Recursos Humanos concedida.

À Shimadzu do Brasil pelo apoio.

Aos meus pais, Carlos e Marise, pelo carinho, pela dedicação e pelo apoio para que eu pudesse conciliar todas as minhas tarefas.

Aos meus filhotes Marcelo, Guilherme, Pedro e Lucas, pelo amor e pela compreensão nos momentos de ausência.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | RESUMO | 15 |
| | ABSTRACT | 16 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE ASPECTOS RELACIONADOS À QUALIDADE DO MEL DE ABELHAS E TÉCNICAS APLICADAS NAS DETERMINAÇÕES DA AUTENTICIDADE E DE CONTAMINANTES | 18 |
| 2.1 | DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO MEL..... | 18 |
| 2.2 | PRODUÇÃO E EXPORTAÇÃO DE MEL NO BRASIL E NO MUNDO | 19 |
| 2.3 | LEGISLAÇÃO..... | 21 |
| 2.4 | COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL | 21 |
| 2.5 | PRINCIPAIS FONTES DE ADULTERAÇÃO | 24 |
| 2.5.1 | Adulteração com xaropes | 24 |
| 2.5.2 | Certificação da origem botânica | 24 |
| 2.5.3 | Compostos voláteis..... | 25 |
| 2.6 | CONTAMINAÇÃO DO MEL POR ANTIBIÓTICOS..... | 25 |
| 2.7 | CONTAMINAÇÃO DO MEL POR AGROTÓXICOS..... | 27 |
| 2.7.1 | Histórico e definição..... | 27 |
| 2.7.2 | Classificação..... | 27 |
| 2.7.3 | Toxicidade | 29 |
| 2.7.4 | Resíduos de agrotóxicos em mel | 29 |
| 2.7.5 | Limites Máximos de Resíduos (LMR's) | 32 |
| 2.7.6 | Análises multirresíduo para detecção de agrotóxicos..... | 33 |
| 2.7.7 | Técnicas de extração e concentração | 34 |
| 2.7.8 | Técnicas para determinação de resíduos de agrotóxicos | 35 |
| 2.7.9 | Efeito matriz | 46 |
| 2.8 | VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA | 46 |
| 2.8.1 | Linearidade e curva analítica | 46 |
| 2.8.2 | Exatidão | 47 |
| 2.8.3 | Precisão..... | 47 |
| 2.8.4 | Limite de detecção e limite de quantificação..... | 47 |
| 2.9 | SÍNTESE DA REVISÃO DA LITERATURA | 47 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 3.1 | REAGENTES..... | 48 |
| 3.2 | AMOSTRAS | 49 |
| 3.3 | AGROTÓXICOS SELECIONADOS | 49 |
| 3.4 | TESTE DE SOLVENTES PARA PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS DE AGROTÓXICOS | 50 |
| 3.5 | PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS EM SOLVENTE | 50 |
| 3.6 | PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS EM EXTRATOS DA MATRIZ COMPOSTA | 51 |
| 3.7 | ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS..... | 51 |
| 3.8 | AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO..... | 53 |
| 3.8.1 | Extração em fase sólida com cartucho C18 (SPE – C18)..... | 53 |
| 3.8.2 | Extração “QuEChERS” modificado:..... | 53 |
| 3.8.3 | Extração líquido-líquido:..... | 53 |
| 3.9 | AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS RENDIMENTOS DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO..... | 54 |
| 3.10 | ESTABELECIMENTO DE CURVAS ANALÍTICAS NA MATRIZ..... | 54 |
| 3.11 | VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA | 55 |
| 3.11.1 | Testes de índice de recuperação | 55 |
| 3.12 | DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS..... | 55 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 4.1 | CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 55 |
| 4.2 | TESTE DE SOLVENTES PARA OS PADRÕES DE AGROTÓXICOS | 57 |
| 4.3 | OBTENÇÃO DOS TEMPOS DE RETENÇÃO DOS COMPOSTOS ANALISADOS..... | 59 |
| 4.4 | OBTENÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS EM ACETATO DE ETILA..... | 62 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS RENDIMENTOS DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO..... | 63 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ NAS RESPOSTAS DOS AGROTÓXICOS..... | 67 |
| 4.7 | VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA | 68 |
| 4.7.1 | Especificidade..... | 68 |
| 4.7.2 | Linearidade | 68 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.7.3 | Estudos dos índices de recuperação..... | 70 |
| 4.7.4 | Precisão..... | 71 |
| 4.7.5 | Estimativa dos limites de detecção e quantificação..... | 73 |
| 4.8 | DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS | 74 |
| 5 | CONCLUSÕES | 75 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 76 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1. | Produção mundial de mel em toneladas no ano de 2005..... | 20 |
| Tabela 2. | Exportação da produção brasileira de mel – 2000 a 2006 (em US\$ e kg.)..... | 21 |
| Tabela 3. | Parâmetros e valores máximos e mínimos para méis permitidos pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 | 22 |
| Tabela 4. | Caracterização e composição do mel..... | 23 |
| Tabela 5. | Variação entre resultados para algumas características físico-químicas em mel de abelhas | 23 |
| Tabela 6. | Limites máximos de resíduos de antibióticos permitidos para mel no Brasil..... | 26 |
| Tabela 7. | Programa de controle de resíduos e contaminantes em mel – PNCR/2007. Plano de Controle | 33 |
| Tabela 8. | Concentração das soluções estoque de padrões de agrotóxicos preparadas no IMA e na Souza Cruz/RS | 49 |
| Tabela 9. | Agrotóxicos analisados por GC-MS; íons monitorados; valores de tempo de retenção (tr), íons monitorados/intensidade relativa, segmento e janela de tempo de aquisição..... | 60 |
| Tabela 10. | Parâmetros das curvas analíticas obtidos para os agrotóxicos analisados por GC-MS modo SIM, a partir das soluções 10 ng mL ⁻¹ , 50 ng mL ⁻¹ , 100 ng mL ⁻¹ , 200 ng mL ⁻¹ , 350 ng mL ⁻¹ e 500 ng mL ⁻¹ em acetato de etila..... | 62 |
| Tabela 11. | Parâmetros das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos analisados por GC-MS modo SIM, a partir das soluções 10 ng mL ⁻¹ ; 20 ng mL ⁻¹ ; 50 ng mL ⁻¹ ; 75 ng mL ⁻¹ ; 100 ng mL ⁻¹ ; 150 ng mL ⁻¹ e 300 ng mL ⁻¹ no extrato da matriz. | 69 |

| | |
|--|----|
| Tabela 12. Índice de recuperação (%) de agrotóxicos obtidos pela curva analítica em extrato da matriz, íon monitorado, média e DPR de mel fortificado em diferentes níveis de concentração | 70 |
| Tabela 13. Média das concentrações de 7 injeções e DPR (%), de solução de 10,0 µg kg ⁻¹ de agrotóxicos preparada em extrato da matriz analisados por GC-MS no modo SIM..... | 71 |
| Tabela 14. Relação sinal/ruído calculado para soluções padrão de agrotóxicos (10 ng mL ⁻¹) e limites de detecção e limite de quantificação estimados..... | 73 |
| Tabela 15. Resíduos dos agrotóxicos estudados (µg kg ⁻¹) encontrados em amostras de mel de diferentes regiões brasileiras..... | 74 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura molecular de agrotóxicos organoclorados..... | 28 |
| Figura 2. Estrutura molecular de agrotóxicos organofosforados | 29 |
| Figura 3. Estrutura molecular dos carbamatos..... | 29 |
| Figura 4. Estrutura molecular dos piretróides | 29 |
| Figura 5. Abelhas mortas em apiário – Foto enviada por colaborador. | 30 |
| Figura 6. Processo de contaminação com agrotóxicos..... | 31 |
| Figura 7. Representação esquemática de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) | 36 |
| Figura 8 Estrutura de clordimeforme e de seus dois produtos de degradação | 37 |
| Figura 9. Esquema do detector de captura de elétrons..... | 38 |
| Figura 10. Esquema do detector de ionização de chama..... | 38 |
| Figura 11. Esquema de um espectrômetro de massas típico | 39 |
| Figura 12. Caracterização das amostras de mel analisadas por estado e origem botânica..... | 56 |
| Figura 13. Cromatograma obtido por GC-MS no modo scan para os íons 164, 58 e 110 correspondentes ao isopropoxifenol, carbofurano deg e propomocarb, quando solubilizado em acetonitrila na concentração de 100 ng mL ⁻¹ | 58 |
| Figura 14. Cromatograma obtido por GC-MS no modo scan para os íons 164, 58 e 110 correspondentes ao isopropoxifenol, carbofurano deg e propomocarb, quando solubilizado em acetona na concentração de 100 ng mL ⁻¹ | 58 |
| Figura 15. Cromatograma obtido por GC-MS no modo scan para os íons 164, 58 e 110 correspondentes ao isopropoxifenol, carbofurano deg e propomocarb, | |

| | |
|--|----|
| quando solubilizado em acetato de etila na concentração de 100 ng mL ⁻¹ | 59 |
| Figura 16. Dispersão dos resultados dos rendimentos de extração para compostos organoclorados usando curva analítica em acetato de etila..... | 64 |
| Figura 17. Dispersão dos resultados dos rendimentos de extração para carbamatos e fenpropatrina (piretróide) usando curva analítica em acetato de etila..... | 65 |
| Figura 18. Dispersão dos resultados dos rendimentos de extração para clorotiazinas e dicarboximidias usando curva analítica em acetato de etila..... | 65 |
| Figura 19. Cromatogramas de íons (m/z 263) para Endrin em diferentes extratos..... | 67 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Métodos de análise de acordo com Instrução Normativa nº 11. MAPA | 22 |
| Quadro 2. Compilação de pesquisas relacionadas aos métodos cromatográficos para análise de agrotóxicos em mel..... | 41 |
| Quadro 3. Condições de análise de agrotóxicos por GC-MS | 52 |
| Quadro 4. Agrotóxicos permitidos pelo MAPA e culturas no entorno dos apiários fornecedores de amostras de mel de abelha para determinação de resíduos de agrotóxicos..... | 56 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| ANEXO A. Formulário de instruções para coleta de amostras..... | 83 |
| ANEXO B. Caracterização da amostras reais segundo informação dos colaboradores..... | 87 |
| ANEXO C. Agrotóxicos selecionados..... | 93 |
| ANEXO D. Curvas analíticas em acetato de etila..... | 99 |
| ANEXO E. Curvas analíticas no extrato da matriz..... | 108 |

ABREVIATURAS

AAS - espectrometria de absorção atômica.
AED - detector de emissão atômica.
AFB - American Foulbrood
APACAME - Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias.
APCI - ionização química em pressão atmosférica.
CA - análise de cluster.
CAP - cloranfenicol.
CC α - limite de decisão.
CC β - capacidade de detecção.
DAD - detector com arranjo de dados.
EC - detector amperométrico.
ECD - detector de captura de elétrons.
ESI/MS - ionização por elétron spray-espectrometria de massas.
FPD - detector de fotometria de chama.
GC-MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
GC-MS-EI-SIM - Cromatografia gasosa detector de espectrometria de massas ionização por elétrons modo de monitoramento de íons específicos.
GC-MS-NCI-SIM - Cromatografia gasosa detector de espectrometria de massas ionização química de íons negativos modo de monitoramento de íons específicos.
GC-ECD - Cromatografia gasosa detector de captura de elétrons
HMF - hidroximetilfurfural.
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência.
HPLC-MS-MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial – “tandem”.
LMR - limite máximo de resíduo.
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil.
MS - espectrometria de massas.
NIR - infravermelho próximo.
NMR - ressonância nuclear magnética.
NPD - detector de nitrogênio fósforo.
PCA - análise de componente principal.
RP-HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.
SCIRA/MS - análises por espectrometria de massas utilizando a relação isotópica entre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ com padrão interno.
SE - extração com solvente.
SFE - extração com fluido supercrítico.
SNIF-NMR - ressonância nuclear magnética do deutério em sítios específicos.
SPE - extração em fase sólida.
SPME - microextração em fase sólida.
TLC - cromatografia de camada fina.
UE - União Europeia.
UV - detector ultravioleta.
VOCs - compostos voláteis orgânicos.

RESUMO

Entre as questões relativas a qualidade do mel de abelhas, estão as características físico-químicas, a identificação da origem floral e geográfica, a ocorrência de adulterações e as contaminações, principalmente, com antibióticos e agrotóxicos. A adequação dessas características às legislações vigentes no país torna o produto mais competitivo para o mercado de exportação. O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de metodologia multirresíduo para a determinação de agrotóxicos em mel de abelhas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, modo de aquisição SIM usando ionização por elétrons (EI) a 70 eV. como contribuição para o aprimoramento das metodologias de análise de contaminantes descritos na Instrução Normativa nº 9, de 30 de março de 2007 do MAPA e sua aplicação em amostras de mel de diferentes regiões do Brasil. Foram avaliadas três técnicas de extração – extração líquido-líquido, SPE - C18 e fase sólida dispersiva “QuEChERS” modificado. Os resultados dos procedimentos de extração indicaram a interferência da matriz nas respostas cromatográficas, quando comparadas com a curva analítica obtida apenas em acetato de etila. Maiores respostas para os analitos foram obtidas para a extração líquido-líquido em acetato de etila. A metodologia utilizando extração líquido-líquido e curvas analíticas obtidas no extrato da matriz ressuspensa em acetato de etila foi desenvolvida e validada para 20 agrotóxicos das classes dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Neste trabalho, foram avaliados alguns parâmetros de validação do método. A linearidade das curvas analíticas (sete níveis de concentração e seis injeções cada). Foram obtidas curvas analíticas com ajuste para regressão quadrática e coeficientes de determinação superiores a 0,989. Os limites de detecção calculados variaram de 0,4 a 13,4 ng mL⁻¹ e os limite de quantificação apresentaram resultados entre 1,4 e 60,8 ng mL⁻¹. A precisão pelo estudo de repetibilidade (DPR entre 3,4 a 32,9%) e a exatidão pelo estudo dos índices de recuperação (92% a 115%). As fortificações das amostras foram realizadas em três níveis de concentração (1,0 µg kg⁻¹, 5,0 µg kg⁻¹, 10,0 µg kg⁻¹). A metodologia foi aplicada em 46 amostras de mel oriundas de diferentes regiões do Brasil. Foi detectada a presença de agrotóxicos em oito amostras. Em três delas, os compostos encontrados podem estar relacionados com o uso dos agrotóxicos nas culturas no entorno dos apiários.

Palavras-chave: mel, agrotóxicos, multirresíduo, cromatografia gasosa, espectrometria de massas.

ASBTRACT

Among the problems concerning the quality of honey, are the physical and chemical characteristics, the identification of the floral and geographical origin, the occurrence of adulteration and contamination, especially with antibiotics and pesticides. The adequacy of these features to existing laws in the country makes the product more competitive for the export market. This work aims the development of a multi residue methodology for the determination of pesticides in honey, as a contribution to the improvement of methodologies for the analysis of contaminants described in Normative Instruction No 9, March 30, 2007 to MAPA and its application in samples of honey from different regions of Brazil. The technique used was gas chromatography coupled to mass spectrometry, using SIM acquisition mode, electron ionization (EI) at 70 eV. Three techniques of extraction - liquid-liquid extraction, solid phase extraction (C18) and dispersive solid phase extraction modified "QuEChERS" was evaluated. The results of the extraction procedures indicated the interference of the matrix in the chromatographic responses when compared with the analytical curve obtained only in ethyl acetate. Best analyte responses were obtained for the liquid-liquid extraction with ethyl acetate. A method using liquid-liquid extraction and analytical curves obtained in the matrix extract resuspended in ethyl acetate was developed and validated for the 20 pesticides from the classes of organochlorine pesticides, organophosphates, carbamates and pyrethroids. In this work the following parameters were assessed for validation of the method. Linearity of analytical curves (7 concentration levels and six injections each). Analytical curves were obtained to adjustment for quadratic regression and determination coefficients higher than 0.989. Limit of detection (LOD) calculated ranged from 0,4 to 13,4 ng mL⁻¹ and limit of quantification (LOQ) performed between 1,4 and 60,8 ng mL⁻¹. The precision for the study of repetibilidade (% RSD between 3,4 and 32,9%) and accuracy (recovery rate - 92% a 115%). The fortifications of the samples were taken at three concentration levels (1,0 µg kg⁻¹, 5,0 µg kg⁻¹, 10,0 µg kg⁻¹). The methodology was applied to the analysis of 46 honey samples from different regions of Brazil. It was detected the presence of pesticides in 8 samples. In three of them, the compounds found may be related to the use of pesticides on crops in the neighborhood of apiaries.

Keywords: honey, pesticides, multiresidue, gas chromatography, mass spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

A mudança de hábitos da população, no sentido de manter uma vida mais saudável, faz crescer a procura por produtos genuinamente naturais. Dentre os produtos naturais, o mel é um alimento apreciado por seu sabor característico e considerável valor nutritivo, sendo por isso cada vez mais consumido. O mel é um produto muito valorizado no mercado externo e seu preço oscila em níveis altos se comparado a outros produtos. Por isso, a busca por rigorosos padrões de qualidade se torna necessária para atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente.

Problemas sanitários ocorridos em 2003 nos apiários da China e da Argentina, principais países exportadores de mel levaram à falta do produto no mercado internacional, aumentando a demanda pelo produto brasileiro. Em decorrência desse fato, houve um estímulo para que produtores brasileiros aprimorassem suas técnicas no trato com as abelhas, no processo produtivo e no controle de qualidade do mel, com a finalidade de aumentar o volume de produção e, conseqüentemente, o volume das exportações.

Entre as questões relativas à qualidade do mel, estão a identificação da origem floral e geográfica, a ocorrência de adulterações e as contaminações, principalmente com antibióticos e agrotóxicos.

Em março de 2006, a União Européia (UE) suspendeu a compra do mel brasileiro. A medida foi baseada em uma decisão da Federação Européia de Comércio de Produtos do Agronegócio, que teria constatado a persistência de falhas no sistema de monitoramento de resíduos no mel brasileiro, apontadas anteriormente por outra missão técnica em 2003 (IEA, 2006).

Para o fim do embargo europeu ao mel brasileiro, ocorrido em março de 2008,

houve a necessidade de se implantar Boas Práticas e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP/APPCC) nos entrepostos e casas de mel no país. Além disso, o cumprimento da exigência de registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Vários estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de novas metodologias que sejam mais efetivas no controle da qualidade do mel. Muitos desses estudos têm como objetivo principal o desenvolvimento e a validação de métodos que sejam capazes de determinar a presença de resíduos de contaminantes em alimentos de uma maneira rápida, simples e economicamente viável.

Os resíduos de agrotóxicos estão entre os compostos de interesse devido aos riscos à saúde humana e à saúde das abelhas. Apesar da discordância entre produtores de defensivos e cientistas, acredita-se que os agrotóxicos podem ser responsáveis pela perda de grande número de abelhas em algumas áreas estudadas. A mortalidade das abelhas está diretamente relacionada à presença de agrotóxicos no pólen, no favo, nas próprias abelhas e no mel (Rial-Otero et al., 2007).

Diante desta perspectiva, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de metodologia multirresíduo para a determinação de agrotóxicos em mel de abelhas (*Apis sp*) como contribuição para o aprimoramento das metodologias de análise de contaminantes descritos na Instrução Normativa nº 9, de 30 de março de 2007 do MAPA e sua aplicação em amostras de mel de diferentes regiões do Brasil. Como objetivos específicos a avaliação de diferentes metodologias para preparação de amostras (extração e concentração de analitos), a execução de estudos para validação de metodologia, a avaliação da presença de resíduos de agrotóxicos das classes dos organoclorados, dos

organofosforados, de carbamatos e de piretróides em méis produzidos em Estados brasileiros e o estabelecimento de correlações entre a contaminação por agrotóxicos e as culturas no entorno dos apiários.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE ASPECTOS RELACIONADOS À QUALIDADE DO MEL DE ABELHAS E TÉCNICAS APLICADAS NAS DETERMINAÇÕES DA AUTENTICIDADE E DE CONTAMINANTES

2.1 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO MEL

O mel é um alimento apreciado por seu sabor característico e pelo seu considerável valor nutritivo. De acordo com a legislação vigente no Brasil, entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia (Brasil, 2000).

O mel é conhecido desde a antiguidade. Estudos mostram que as abelhas já produziam mel há 50 milhões de anos, muito antes de o homem aparecer sobre a Terra. Os homens primitivos “caçavam” mel, assim como caçavam outros alimentos. Essa prática se desenvolveu e deu início à apicultura que permaneceu inalterada durante milhares de anos até que, na segunda metade do século XX, houve um maior desenvolvimento da técnica abrindo

caminho para o estabelecimento do mel como produto comercial.

No Egito Antigo, o mel era ofertado em cerimônias religiosas, usado para conservar corpos mumificados e como medicamento. Na Idade Média, o mel era considerado tão importante que há registros de testamentos destinando colméias para pessoas da família ou para a igreja (Crane, 1998).

O mel é classificado de acordo com sua origem em mel floral quando as abelhas utilizam néctar das plantas e mel de melato quando esse é obtido de secreções de líquidos açucarados, procurados e colhidos pelas abelhas como se fossem néctar (Anklam, 1998). Os dois tipos de méis passam por processos enzimáticos semelhantes, porém, suas características físico-químicas são diferentes quando se tornam o produto final. O mel floral é chamado monofloral, quando o néctar é coletado predominantemente de uma espécie floral e multifloral ou silvestre, quando é obtido a partir de diferentes origens florais (Campos, 1998).

O néctar é apanhado pelas abelhas operárias coletoras e carregado na vesícula nectarífera para a colônia, repassado a outra operária ou depositado diretamente no favo. Durante o transporte, é diluído por saliva onde são adicionadas enzimas (invertase, diastase e glicoseoxidase) provenientes das glândulas hipofaríngeas das abelhas. As enzimas atuam no processamento do néctar para transformá-lo em mel (Arauco, 2005).

De acordo com Crane (1998), o mel é o resultado da desidratação e da transformação desse néctar, portanto, a quantidade da substância elaborada a partir de uma determinada planta varia de acordo com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da

área e até com o número de dias que as flores estão secretando néctar.

Sendo assim, a composição do néctar de uma espécie produtora, que foi coletado pelas abelhas, contribui diretamente na composição do mel elaborado, conferindo-lhe características específicas. De acordo com Marchini e colaboradores (2004) as condições climáticas e o manejo do apicultor têm menos influência sobre essas características.

O mel de melato difere do mel floral em sua composição química; eles são mais escuros, tem pH mais alto, menor teor de glicose, razão pela qual usualmente não cristaliza e maior acidez (Campos, 1998; Castro-Vazquez et al., 2006).

Existem vários tipos de méis no mundo, no que se refere à espécie de abelha coletora. As abelhas do gênero *Apis* chamadas africanizadas são as principais: *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*. No Brasil, existem outras espécies, como as abelhas sem ferrão (meliponídeos) do gênero *Melipona*, conhecidas popularmente como urucu (*Melipona scutellaris*), tiúba (*Melipona compressipes*), jandaíra (*Melipona subnitida*), mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) (Vargas, 2006).

De maneira geral, o mel das espécies de meliponídeos tem como principal característica a diferenciação nos teores da sua composição, destacando-se o teor de água (umidade), que o torna menos denso que o mel das abelhas africanizadas (Campos, 1998).

2.2 PRODUÇÃO E EXPORTAÇÃO DE MEL NO BRASIL E NO MUNDO

A produção mundial de mel teve uma tendência crescente nos últimos 20 anos. O consumo também aumentou, sendo

atribuído ao aumento geral nos padrões de vida e também a um interesse maior da população por produtos naturais e saudáveis.

Restrições impostas ao produto dos dois maiores exportadores mundiais, China e Argentina, proporcionaram uma abrupta demanda pelo produto brasileiro nos últimos anos (Relatório Adeca, 2005). De acordo com FAOSTAT (2006), o Brasil representa 2,5 % da produção mundial em 2005, como apresentado na tabela 1.

A procura por produtos naturais sem contaminações de qualquer espécie coloca o Brasil como potencial fornecedor de mel para o mercado internacional. A biodiversidade de flora, a rusticidade das abelhas e as características do clima são condições favoráveis à produção de mel de qualidade. Uma outra característica que coloca o Brasil em vantagem é a possibilidade de produção de mel durante todo o ano, enquanto que em outros países as condições climáticas são limitantes. No Brasil, o avanço das técnicas de apicultura e a melhoria na qualidade do produto se tornaram necessárias diante das exigências do mercado de exportação.

Em março de 2006, a União Européia (UE) suspendeu a compra do mel brasileiro. A medida foi baseada em decisão da Federação Européia de Comércio de Produtos do Agronegócio, que teria constatado a persistência de falhas no sistema de monitoramento de resíduos no mel brasileiro que já tinham sido apontadas por outra missão técnica em 2003 (IEA, 2006).

Tabela 1. Produção mundial de mel em toneladas no ano de 2005

| País | 2005 |
|--------------------------------|------------------|
| China | 300.000 |
| Estados Unidos | 82.000 |
| Argentina | 80.000 |
| Turquia | 73.929 |
| Ucrânia | 60.502 |
| México | 53.000 |
| Rússia | 53.000 |
| Índia | 52.000 |
| Etiópia | 39.000 |
| Espanha | 37.000 |
| Irã | 36.000 |
| Brasil (12^b) | 33.749 |
| Canadá | 33.000 |
| Coréia | 29.000 |
| Tanzânia | 27.000 |
| Angola | 23.000 |
| Quênia | 21.500 |
| Alemanha | 17.000 |
| Austrália | 16.000 |
| Outros | 301.485 |
| Total | 1.368.165 |

Fonte: Adaptado de FAOSTAT (2006).

Avalia-se, no mercado, a possibilidade de o mel brasileiro ser reexportado para a Europa, via Estados Unidos, contrariando as previsões decorrentes do embargo europeu. Isto justificaria o aumento de 37% das exportações brasileiras para os Estados Unidos em 2006. Assim, o embargo por

parte da EU não teria acontecido pelo fato de o mel brasileiro ter apresentado traços de antibióticos, herbicidas ou agrotóxicos, mas sim por problemas no cumprimento do cronograma de análises, acertado entre europeus e brasileiros (IEA, 2007; Böhlke, 2006).

Para reverter essa situação, o governo brasileiro propôs, além do monitoramento do produto, o aumento no número de amostras a serem examinadas e mais empenho na fiscalização e controle dos resíduos. Segundo o presidente da Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias (APACAME), a decisão da UE foi de caráter burocrático, pois não tinha sido constatada qualquer contaminação no mel, tendo em vista que o apicultor brasileiro não usa medicamentos no manejo apícola (IEA, 2006).

Os dados sobre produção e exportação de mel no Brasil variam com as fontes consultadas. De acordo com MDIC / SECEX, os Estados Unidos foi o principal destino das exportações brasileiras em 2008. O país respondeu por 73,1% do total comercializado, com uma receita de US\$ 31,84 milhões, ao preço de US\$ 2,32/kg de mel. Com a Alemanha, o Brasil comercializou 16,5% das exportações. O terceiro mercado comprador do mel brasileiro foi o Canadá, que respondeu por 5,3% das vendas. A tabela 2 apresenta os dados de exportação da produção brasileira de mel entre os anos de 200 e 2006.

Tabela 2. Exportação da produção brasileira de mel – 2000 a 2006 (em US\$ e kg.)

| Ano | Exportação | |
|------|------------|------------|
| | US\$ | kg |
| 2000 | 331.060 | 268.904 |
| 2001 | 2.809.353 | 2.488.671 |
| 2002 | 23.141.221 | 12.640.487 |
| 2003 | 45.521.098 | 19.272.782 |
| 2004 | 42.303.289 | 21.029.045 |
| 2005 | 18.940.333 | 14.442.090 |
| 2006 | 23.358.927 | 14.599.908 |

Fonte: Adaptado de MDIC/SECEX – Aliceweb (2006).

2.3 LEGISLAÇÃO

Os parâmetros físico-químicos para méis brasileiros estão bem definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel, revoga a Portaria nº 367 de 04/09/1997. O regulamento estabelece a definição, a classificação, a designação, a composição, e os requisitos quanto às características físico-químicas, sensoriais, condições de acondicionamento, aditivos, contaminantes, condições higiênicas - critérios macroscópicos e microscópicos - pesos e medidas, rotulagem, amostragem e definição de métodos de análises que deverão ser seguidos (Brasil, 2000).

A Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando a rotulagem nutricional obrigatória, inclusive para o mel (Brasil, 2003).

A Portaria nº 50 de 20 de fevereiro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprova os

programas de controle de resíduos em vários produtos. O programa inclui o monitoramento de resíduos de vários antibióticos no mel (Brasil, 2006). A Instrução Normativa nº 9, de 30 de março de 2007 do MAPA aprova os programas para o ano de 2007 e prevê a execução de análises e, além dos antibióticos, determina o limite máximo de resíduos (LMR) para vários tipos de agrotóxicos como compostos halogenados, organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados (Brasil, 2007).

A composição e o beneficiamento do mel na EU são regulamentados pela Diretiva 2001/110/EC de 20 de Dezembro de 2001. A Diretiva estabelece os tipos de méis que podem ser comercializados na UE e dá informações sobre os níveis de umidade, hidroximetilfurfural, atividade enzimática e agrotóxico. Ainda exige que a origem floral e geográfica do mel seja indicada na sua embalagem (Nozal et al., 2005).

2.4 COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL

Os parâmetros físico-químicos de amostras de méis são importantes para a sua caracterização e são primordiais para garantir a qualidade desse produto. Além disso, a caracterização regional de méis é de fundamental importância levando-se em consideração a grande diversidade botânica e variação do solo e do clima das diversas regiões.

As análises físico-químicas e polínicas contribuem na fiscalização de méis importados e no controle da qualidade do mel produzido no país. Seus resultados devem ser comparáveis aos padrões estabelecidos por organismos internacionais protegendo o consumidor de adquirir um produto adulterado (Marchini et al, 2004).

Análises quantitativas dos componentes do mel que aparecem em menores teores vêm ganhando maior importância recentemente, dado que, variações nos teores desses componentes são mais apropriadas para diferenciar tipos de méis, quando comparado com as variações nos principais componentes (Nozal et al., 2005).

Os métodos de análises para os parâmetros correspondentes às características físico-químicas do produto são determinados pela

legislação vigente, conforme indicado no quadro abaixo.

A legislação vigente (Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000) estabelece como parâmetros mínimos de qualidade físico-química a determinação de indicadores de maturidade (açúcares redutores, sacarose aparente e umidade), de pureza (sólidos insolúveis em água e minerais) e de deterioração (acidez, atividade diastásica e hidroximetilfurfural) (Brasil, 2000).

Quadro 1. Métodos de análise de acordo com Instrução Normativa nº 11. MAPA

| Determinação | Referência |
|---------------------------------|--|
| Açúcares redutores | CAC/VOL. III, Supl. 2, 1990, 7.1 |
| Umidade (método refratométrico) | A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 969.38 B |
| Sacarose aparente | CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.2 |
| Sólidos insolúveis em água | CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.4. |
| Minerais (cinzas) | CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.5 |
| Acidez | A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 962.19 |
| Atividade diastásica | CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.7 |
| Hidroximetilfurfural (HMF) | A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th, 1998 - 980.23 |

(a) Codex Alimentarius Commission – CAC. Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação - FAO e da Organização Mundial da Saúde – OMS

(b) A.O.A.C - Association of Official Analytical Chemists

Fonte: Adaptado da Instrução Normativa nº 11. MAPA

Tabela 3. Parâmetros e valores máximos e mínimos para méis permitidos pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000

| Parâmetro | Mel floral | Mel de melato |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| Maturidade | | |
| Açúcares redutores | Mínimo 65 g/100 g | Mínimo 60 g/100 g |
| Umidade | Máximo 20 g/100 g | |
| Sacarose aparente | Máximo 6 g/100 g | Máximo 15 g/100 g |
| Pureza | | |
| Sólidos insolúveis em água | Máximo 0,1 g/100 g | |
| Cinzas | Máximo 0,6 g/100 g | Máximo 1,2 g/100 g |
| Pólen | presença | |

| Parâmetro | Mel floral | Mel de melato |
|-------------------------------------|-----------------|---------------|
| Deterioração | | |
| Acidez | Máxima 50 meq/g | |
| Atividade diastásica (escala Gothe) | Mínimo 8 | |
| Hidroximetilfurfural | Máximo 60 mg/kg | |

Fonte: Adaptado da Instrução Normativa nº 11, MAPA.

A tabela 4 mostra os valores característicos para a composição do mel.

Tabela 4. Caracterização e composição do mel

| Nutrientes | Média em 100 g |
|-------------------------|--|
| Água | 17,1 g |
| Total de carboidratos | 82,4 g |
| Frutose | 38,5 g |
| Sacarose | 1,5 g |
| Proteínas e aminoácidos | 0,5 g |
| Minerais | Média em 100 g |
| Cálcio | 4,8 mg |
| Ferro | 0,25 mg |
| Potássio | 50,0 mg |
| Fósforo | 5,0 mg |
| Magnésio | 2,0 mg |
| Cobre | 0,05 mg |
| pH | 3,9 |
| Cor | Branco água (<8 mm escala Pfund) a âmbar escuro(>114 mm escala Pfund) |

Fonte: Adaptado de Arvanitoyannis (2005).

Em seu trabalho, Almeida (2002) mostra a grande variação entre os resultados encontrados por vários autores para

algumas características físico-químicas do mel (Tabela 5).

Tabela 5. Variação entre resultados para algumas características físico-químicas em mel de abelhas

| Parâmetro | Índices (unidades) |
|--------------------|--------------------|
| Açúcares redutores | 56,2 a 95 (%) |
| Sacarose aparente | 0,4 a 11 (%) |
| Umidade | 13 e 30,5 (%) |

| Parâmetro | Índices (unidades) |
|-------------------------|---------------------|
| Cinzas | 0,02 a 0,09 (%) |
| Acidez | 8,2 a 50,0 (meq/kg) |
| Hidroximetilfurfural | 0,5 a 241 (mg/kg) |
| Proteínas e aminoácidos | 0,2 a 2,8 (%) |
| Condutividade elétrica | 90 e 2112 (uS) |

Fonte: Adaptado de Almeida (2002).

2.5 PRINCIPAIS FONTES DE ADULTERAÇÃO

A grande valorização do mel no mercado internacional tem suscitado um maior controle da sua qualidade, principalmente no que se refere ao produto que será importado ou exportado. Em igual proporção, crescem os mecanismos utilizados por produtores para burlar as legislações onde estão fixados os padrões de identidade e qualidade do mel.

As adulterações podem ser explicadas pelo valor econômico envolvido, já que o custo de um produto sintético é mais baixo que o de produtos naturais. Além de prejudicarem economicamente os produtores que seguem a legislação, as adulterações podem ter efeitos catastróficos para a saúde pública se forem adicionados ao produto elementos que podem ser tóxicos.

Vários estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de novas metodologias que sejam mais efetivas no controle de qualidade do mel. Muitos desses estudos têm como objetivo principal apontar mecanismos que possam, efetivamente, inibir a prática das adulterações.

Métodos mais novos, rápidos e precisos como espectrometria de absorção atômica (AAS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), ionização por “eletronspray”-espectrometria de massas (ESI/MS), cromatografia de camada fina (TCL), ressonância nuclear magnética (NMR),

transformada de Fourier-Raman (FT-Raman) e infravermelho próximo (NIR) têm enriquecido as ferramentas do químico analítico para a solução de fraudes (Arvanitoyannis et al., 2005; Karoui et al., 2007).

2.5.1 Adulteração com xaropes

Adoçantes e xaropes disponíveis no comércio são um potencial meio de adulteração em méis. Os mais amplamente usados são xarope com alto teor de frutose e açúcar invertido. Uma prática comum de adulteração é a adição de xarope ao mel depois da colheita ou a alimentação das abelhas com líquidos açucarados que são dispostos em locais estratégicos próximos às colméias.

2.5.2 Certificação da origem botânica

Os trabalhos executados para atestar autenticidade pela certificação da origem botânica e geográfica e sua relação com a composição físico-química do mel de abelhas utilizam técnicas que exploram componentes que estão presentes no produto em diminutas concentrações. Esses componentes parecem ser mais apropriados para se evidenciar diferenças significativas entre os vários tipos de méis que são produzidos pelas abelhas (Anklam, 1998; Crane, 1998; Bastos, 2002; Arruda, 2003; Arvanitoyannis et al., 2005; Vargas, 2006; Karoui et al., 2007). Vários autores estudaram a presença de aminoácidos e proteínas e sua relação com a origem

botânica e geográfica (Pirini et al., 1992; Conte et al., 1998; Hermosin et al., 2003; Bernal et al., 2005; Patzold et al., 2006; Perez et al., 2007).

As proteínas são os componentes que aparecem em menores teores no mel, sendo assim, elas podem ser usadas como padrão interno para avaliação de adulteração pela relação isotópica do carbono. Considerando que as proteínas das abelhas devam ser comuns a todos os tipos de méis, Baroni et al. (2002) verificaram a utilidade das proteínas de pólen como marcadores da origem floral.

Azeredo (2003) determinou o conteúdo de proteínas em amostras de méis de diferentes origens florais, além de outros parâmetros físico-químicos e análise do espectro polínico, com o objetivo de fazer uma correlação entre a origem botânica das espécies e o conteúdo de proteínas. Seus resultados indicam que a determinação pelo método colorimétrico para conteúdo de proteínas foi eficiente e permitiu a detecção de altos valores em duas amostras de *Borreria verticillata*, conhecida como “vassourinha” no Estado do Piauí.

2.5.3 Compostos voláteis

Os compostos voláteis orgânicos (VOCs) contribuem significativamente para o “flavor” do mel e para suas variações em relação à sua origem. A identificação dos compostos voláteis é importante para o entendimento das diferenças de flavor que podem existir entre os tipos de méis. A presença de alguns compostos como álcoois, aldeídos e furanos reflete a ausência de microrganismos e as condições de processamento e estocagem do mel. Alguns compostos voláteis estão presentes no néctar ou no melato coletados pelas abelhas e podem estar relacionados com as plantas, outros se originam durante o

processamento e estocagem do mel (Anklam, 1998; Castro-Vazquez et al., 2006).

Méis monoflorais têm muitas características aromáticas, presumidamente derivadas do néctar, indicando a presença de compostos voláteis responsáveis pelas suas fragrâncias características. Em razão do grande número de compostos voláteis, estes perfis representam uma impressão digital dos produtos, a qual pode ser usada para determinar a origem do mel (Baroni et al., 2006).

O “flavor” do mel deve estar diretamente correlacionado com o processamento, com a estocagem e com a fonte botânica. Uma cuidadosa análise dos componentes voláteis em mel pode ser uma ferramenta útil para a caracterização da origem botânica. Porém, compostos típicos podem ser identificados para méis de alguma fonte floral se essas análises forem sempre combinadas com métodos de determinação de outros constituintes (Anklam, 1998).

2.6 CONTAMINAÇÃO DO MEL POR ANTIBIÓTICOS

A avaliação de alguns contaminantes do mel é de extrema importância devido aos riscos para saúde humana e das abelhas. Os resíduos de antibióticos estão entre os compostos de interesse, pois, quando presentes no mel, podem levar à seleção de microorganismos patogênicos resistentes.

Os antibióticos, como fonte de contaminação em mel, tiveram maior atenção quando foram encontrados em produtos da Ásia, maior exportador de mel para os Estados Unidos, Alemanha e outros países da UE. A detecção de cloranfenicol (CAP) foi evidenciada no produto da China e as importações de mel daquele país foram suspensas. Essas substâncias podem ser encontradas em méis por causa da sua

aplicação nas colméias com objetivo de combater o crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios reduzindo a incidência de doenças nas colônias (US-FDA, 2002).

Sua detecção é importante porque esses medicamentos podem causar reações adversas severas em humanos, principalmente a anemia plasmática - diminuição dos glóbulos vermelhos por toxicidade aguda da medula óssea. O CAP é um composto lipossolúvel que se difunde através da membrana celular e atua na inibição da síntese de proteínas (Júnior, 2006).

A UE incluiu o CAP como substância de tolerância zero, não aceitando sua presença

mesmo que residual em tecido animal. A Comissão de Decisão 2003/181/EC estabeleceu o limite máximo de detecção requerido para um método analítico na determinação de CAP de $0,30 \mu\text{g kg}^{-1}$.

No Brasil, apesar de proibido, o CAP tem sido usado na produção de mel por aumentarem a produtividade a baixo custo. A Portaria nº 50, de 06 de fevereiro de 1986 do MAPA, instituiu o Plano de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal. Na Instrução Normativa Nº 9, de 30 de março de 2007 do MAPA são estabelecidos o método de análise e novos limites de quantificação para antibióticos (Brasil, 2007).

Tabela 6. Limites máximos de resíduos de antibióticos permitidos para mel no Brasil

| Grupo | Analito | Técnica | LQ ($\mu\text{gkg/L}$) | LMR/NA* ($\mu\text{g/kg/L}$) | Nº de Itens de ensaio |
|-----------------|---|--------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Antimicrobianos | Clortetraciclina (a) Oxitetraciclina (a) Tetraciclina (a) | HPLC – UV | 25 | 200 | 60 |
| | Sulfatiazol (b) Sulfametazina (b) Sulfadimetoxina (b) Sulfadiazina Sulfaquinoxalina Sulfaclorpiridazina | HPLC – UV | 25 | 100 | 60 |
| | Nitrofurazona Furazolidona Furaladona Nitrofurantoina | LC/MS- MS | 0,5 | 1(1)* | 30 |
| | Tilosina | LC/MS- MS | 0,5 | 10 | 10 |

(a) O LMR refere-se ao somatório de todas as Tetraciclinas.

(b) O LMR refere-se ao somatório de todas as Sulfonamidas.

(*) NA - Nível de Ação

HPLC – UV – Cromatografia líquida de alta eficiência e detector ultravioleta visível

LC/MS-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem

Fonte: Instrução Normativa nº 9 de 30 de março de 2007. MAPA

Os estudos para separação, determinação e confirmação de resíduos de CAP são executados com os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência e detector ultravioleta visível (HPLC-UVD), cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com ionização por elétrons (EI), ionização química de íons negativos (NCI) e monitoramento de íons selecionados (SIM). Em muitos casos, HPLC, GC e GC-MS podem ser aplicados para determinar e confirmar concentração de resíduo de CAP dependendo do nível de resíduos em amostras suspeitas. HPLC quantifica níveis de resíduos acima de 10 µg kg⁻¹, GC-ECD ou GC/MS-EI-SIM níveis entre 1-10 µg kg⁻¹. GC/MS-NCI-SIM podem ser usados para detectar resíduos de CAP até 0,1 µg kg⁻¹ (Shen et al., 2005).

Vários antibióticos têm sido usados no controle da American Foulbrood (AFB) ou cria pútrida americana uma doença grave que afeta as colméias, causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*. Os antibióticos usados no controle da AFB foram sulfatiazol (desde 1946) e depois oxitetraciclina (OTC), e tetraciclina (TCA), (desde 1950). Recentemente, foram evidenciadas resistência ao tratamento com estes antibióticos (Benetti et al., 2006). Moeller et al. (2007) descreveram o desenvolvimento de teste baseado num biossensor específico para tetraciclina em produtos animais, dentre eles o mel.

2.7 CONTAMINAÇÃO DO MEL POR AGROTÓXICOS

Uma outra classe de compostos de interesse são resíduos de agrotóxicos, que além de danos à população das abelhas, podem acarretar danos à saúde humana. Outro enfoque para a importância do estudo dos resíduos de agrotóxicos é o monitoramento

ambiental (Rissato, 2006; Balayiannis, 2007).

2.7.1 Histórico e definição

Desde a antiguidade quando o homem iniciou as primeiras atividades agrícolas cultivando plantas de uma mesma espécie ao seu redor deu-se o início, também, do desenvolvimento das pragas e das doenças. A preocupação com o seu controle é, portanto, um problema tão antigo quanto a própria agricultura. Segundo Newman (1979), os primeiros esforços para controlar quimicamente as pragas se deram pelo uso de substâncias tóxicas de ocorrência natural como mercúrio, enxofre e extratos de plantas como nicotina e piretro. Os agrotóxicos têm uma utilização bastante ampla, incluindo herbicidas, inseticidas, acaricidas, nematocidas, raticidas, fungicidas e bactericidas (Newman, 1979 citado por Vaz, 1996).

O Decreto nº 4.074, regulamenta a Lei nº 7802/1989 do Ministério da Agricultura e Pecuária, e estabelece que os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Brasil, 2002).

2.7.2 Classificação

Existem muitas formas de classificar os agrotóxicos, entre elas a finalidade, o modo de ação, a persistência no ambiente, tipo de deslocamento, a duração do efeito do tratamento, a origem, a natureza química e a toxicidade.

2.7.2.1 Natureza química

Os agrotóxicos são classificados como compostos inorgânicos ou orgânicos. Os inorgânicos, à base de bário, boro, flúor, antimônio, tálio, chumbo, cádmio, mercúrio, além da calda sulfocálcica e os óleos minerais têm como desvantagens sua acumulação nos tecidos orgânicos, estabilidade e longa persistência no ambiente por serem à base de metais. Sua importância reduziu-se bastante com o aparecimento dos agrotóxicos orgânicos; hoje não totalizam 10% dos produtos em uso. Os orgânicos (denominados assim devido à presença do átomo de carbono na fórmula) constituem o grupo de maior importância. São divididos em sintéticos (compostos produzidos pelo homem) e naturais. O desenvolvimento dos compostos orgânicos sintéticos possibilitou a geração de imensa gama de produtos orgânicos, classificados como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (Sucen, 1990).

Os agrotóxicos organoclorados são, relativamente inertes, e sua alta estabilidade está relacionada às ligações carbono-cloro. Seu uso está proibido em muitos países devido à resistência e efeito acumulativo que causam ao meio ambiente e na cadeia alimentar

Os agrotóxicos classificados como organofosforados são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo (ácido fosfórico, ácido tiosfosfórico, ácido ditiosfosfórico e outros), contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. Os organofosforados possuem vários grupos segundo sua estrutura, estando entre os mais numerosos os fosfatos, fosforotioatos e fosforoditioatos (Sucen, 2000)

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico e podem ser inseticidas, herbicidas e fungicidas.

Os piretróides foram descobertos a partir da modificação de piretrinas naturais e são muito utilizados devido a sua alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações. São compostos sintéticos análogos aos componentes obtidos a partir dos piretros, extraídos do crisântemo.

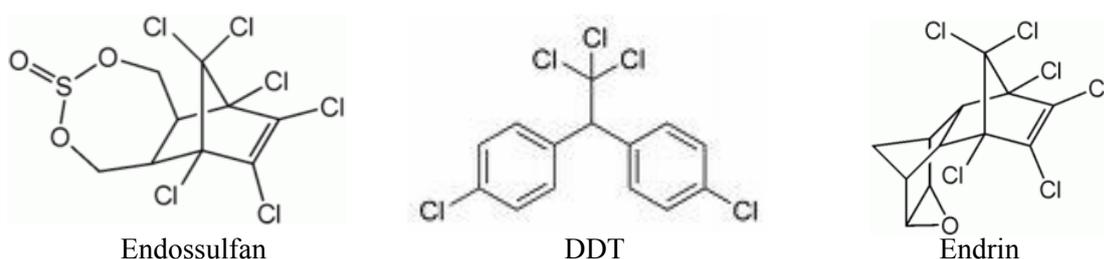


Figura 1. Estrutura molecular de agrotóxicos organoclorados

Fonte: ANVISA

intoxicações acontecem pela ingestão gradativa destes produtos que contaminam a água, o solo e uma variedade de alimentos. A crescente preocupação da população sobre os riscos dos resíduos de agrotóxicos para a dieta tem modificado, profundamente, a estratégia para proteção da colheita, com ênfase na qualidade e segurança alimentar (Rissato, 2004b).

Ao longo das duas últimas décadas, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil foi marcado por uma série de esforços isolados de órgãos estaduais de saúde, agricultura e instituições de pesquisas. Esse fato sempre impediu que o País tivesse uma noção clara dos níveis de agrotóxicos encontrados em seus produtos agrícolas (Anvisa, 2006).

O uso de agrotóxicos na agricultura é aplicado em áreas muito extensas. A contaminação por resíduos de agrotóxicos pode ocorrer acidentalmente, devido a manejo inadequado de agrotóxicos utilizados na agricultura em geral. Por esse motivo, esta prática pode causar poluição e sua presença pode ser mascarada pela dispersão em diferentes locais no ambiente (Fernández, 2001).

Em alguns casos, os produtos químicos utilizados no controle das pragas permanecem nas plantas e afetam outros insetos, diferentes daqueles para os quais os produtos químicos foram desenvolvidos. Assim, diferentes agrotóxicos podem ser introduzidos na cadeia alimentar pelas abelhas produtoras de mel, afetando a saúde humana (Rial-Otero, 2007).

O uso de agrotóxicos é a principal estratégia utilizada no campo para a prevenção e o controle de pragas. Estes compostos, porém, são potencialmente tóxicos ao homem e às abelhas, além de serem uma importante fonte de contaminação em alimentos.

O controle de agrotóxicos em mel é importante devido as suas implicações para a saúde humana. Apesar da discordância entre produtores de defensivos e cientistas, acredita-se que os agrotóxicos são responsáveis pela perda de abelhas em algumas áreas. A mortalidade das abelhas está diretamente relacionada com a presença de agrotóxicos no pólen, no favo, nas próprias abelhas e no mel (Rial-Otero et al., 2007).



Figura 5. Abelhas mortas em apiário – Foto enviada por colaborador.

A produção de mel oriundo de flora silvestre está se tornando cada vez mais escassa no Brasil e no mundo. Por esse motivo, atualmente o desenvolvimento da apicultura está cada vez mais dependente das culturas agrícolas e florestais nas quais, em alguns casos, são utilizados agrotóxicos de maneira inadequada (Rissato, 2006).

Em seu vôo, as abelhas percorrem aproximadamente 7 km² para o recolhimento de néctar e do pólen. Durante este processo, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados ficando retidos nos pelos superficiais de seu corpo ou são inalados e unidos em seu aparelho respiratório. Devido a estes fatores, as abelhas podem ser usadas como bioindicadores para monitoramento de impacto ambiental causado por fatores biológicos, químicos e físicos, tais como,

parasitas, contaminações industriais ou agrotóxicos (Rissato, 2006).

Os resíduos de agrotóxicos podem ser encontrados no mel preferencialmente por duas rotas de contaminação, indireta e direta. De maneira indireta, quando as abelhas entram em contato com o néctar e com o pólen de flores provenientes de terras previamente pulverizadas. Se a abelha morrer e não retornar à colméia, a rainha e

as outras abelhas não estarão contaminadas e a colméia sobreviverá. Por outro lado, quando as abelhas entram em contato com o agrotóxico e o transportam para a colméia no seu próprio corpo ou em forma de néctar e pólen contaminados, pode ocorrer a contaminação do mel. De forma direta, por tratamento das colméias para controlar pestes e doenças que elas sofrem (Albero, 2004; Rissato, 2004a).

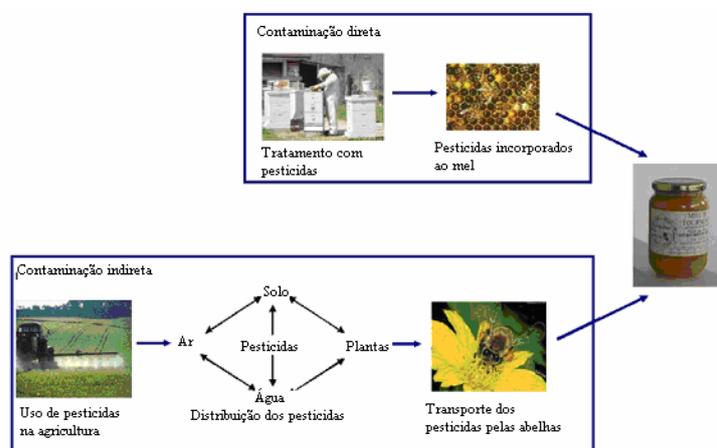


Figura 6. Processo de contaminação com agrotóxicos
Fonte: Rial-Otero (2007).

As principais doenças que afetam as larvas das abelhas são American foulbrood (*Paenibacillus larvae*), European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) e Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) ou podem ser infestações por parasitas como nosema (*Nosema apis*), amoeba (*Malpighamoeba mellifica*), varroa mites (*Varroa jacobsoni*), e tracheal mites (*Acarapis woodi*). Essas doenças têm forçado os apicultores a usar tratamentos terapêuticos diretamente nas colméias. (Rial-Otero, 2007).

O uso de acaricidas implica em risco de poluição direta no mel e nos outros produtos das colméias. Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinação de resíduos de acaricidas em amostras de mel.

Os níveis de concentração de resíduos são influenciados pelo seu uso em condições e quantidades adequadas, pela estação do ano e pela polaridade e estabilidade das substâncias químicas (Martel, 2002).

Muitos trabalhos para determinação de resíduos dos agrotóxicos no mel são concentrados na determinação de substâncias que são usadas como tratamento de apiários para controlar o *Varroa jacobsoni*, um ácaro parasítico que afeta as colônias da abelha doméstica (Bernal, 2000; Jimenez, 2000, Korta, 2001; 2002; Martel, 2002).

Outros estudos foram focalizados nos agrotóxicos usados para a proteção de

plantações e introduzidos em colméias pelas abelhas e por cera contaminada (Albero, 2004; Blasco, 2003, 2004a, 2004b; Rissato, 2006; Campilo, 2006; Pirard, 2007).

Pelos resultados obtidos por Rissato e colaboradores (2006), foi possível constatar que a contaminação das áreas vizinhas ao apiário, as quais distavam cerca de 3 km, determinaram o tipo e a concentração de agrotóxicos encontrados nas amostras do mel estudado. O trabalho mostra o potencial do mel como bioindicador, podendo ser aplicado a qualquer outra região e fontes de poluição.

A determinação de resíduos para monitoramento de mel é concentrada na determinação dos resíduos de algumas classes de agrotóxicos tais como piretróides, organoalogenados, organonitrogenados e organofosforados (Albero, 2004).

2.7.5 Limites Máximos de Resíduos (LMR's)

Devido ao risco em potencial desses resíduos para a saúde humana, a determinação de um limite máximo de resíduos (LMR) tornou-se necessária a fim de garantir a segurança alimentar.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), LMR é a quantidade máxima de agrotóxico

legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg kg^{-1}).

A concentração máxima de resíduos de agrotóxicos permitida legalmente no mel, LMR, foi estabelecida por regulamentos de diferentes países. Alemanha, Itália, e Suíça ajustaram o LMR para amitraz, bromopropilato, coumafós, ciamizol, flumetrina e fluvalinato, que oscilaram entre 0,01 e 0,1 mg kg^{-1} na Alemanha, 5 e 500 mg kg^{-1} na Suíça, e 10 mg kg^{-1} na Itália. A legislação da união européia (EU) regulou o LMR para três acaricidas, amitraz, coumafós e ciamizol, em 0,2, 0,1, e 1 mg kg^{-1} , respectivamente, e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA estabeleceu LMR para amitraz (1 mg kg^{-1}), coumafós (0,1 mg kg^{-1}) e fluvalinato (0,05 mg kg^{-1}). Até agora, os limites máximos de resíduos de agrotóxicos no mel não foram incluídos no Codex Alimentarius (Rissato, 2006).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), incluiu o mel no Programa de controle de resíduos e contaminantes (PNCR) no ano de 2007. O programa, que foi regulamentado pela Instrução Normativa nº 9 de 30 de março de 2007, prevê a execução de análises e determina o LMR para vários tipos de compostos halogenados, organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados (Brasil, 2007).

Tabela 7. Programa de controle de resíduos e contaminantes em mel – PNCR/2007. Plano de Controle

| Grupo | Analito | Matriz | Técnica | LQ (µg/kg ou µg/L) | LMR/NA* (µg/kg ou µg/L) | Nº de Itens de ensaio |
|--|---------------------|--------|---------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Compostos Halogenados e Organoclorados | Aldrin | Mel | CG/EM | 10 | 10 | 15 |
| | Alfa- endosulfan | | | 10 | 10 | |
| | 4,4-DDE | | | 10 | 10 | |
| | 4,4-DDD | | | 10 | 10 | |
| | 4,4 DDT | | | 10 | 10 | |
| | Dodecacloro | | | 10 | 10 | |
| | Endrin | | | 10 | 10 | |
| | Iprodiona | | | 50 | 50 | |
| | Tetradifona | | | 20 | 20 | |
| | Captana | | | 50 | 50 | |
| | Lindane | | | 10 | 10 | |
| | Vinclozolina | | | 20 | 20 | |
| Carbamatos e Piretróides | Permetrina | Mel | CG/EM | 64,6 | 64,6 | 15 |
| | Ciflutrina | | | 44 | 44 | |
| | Fenpropatrina | | | 10 | 10 | |
| | Deltametrina | | | 33,8 | 33,8 | |
| | Carbofurano | | | 82 | 82 | |
| | Carbaril | | | 37 | 37 | |
| Organofosforados | Pirimifós metil | Mel | CG/EM | 36 | 36 | 30 |
| | Clorpirifós | | | 24,3 | 24,3 | |
| | Dimetoato | | | 20 | 20 | |
| | Dissulfoton | | | 10 | 10 | |
| | Paration | | | 36,9 | 36,9 | |
| | Fenamifós | | | 17,1 | 17,1 | |
| | Terbufós | | | 13 | 13 | |
| | Profenofós | | | 36 | 36 | |

LQ – Limite de quantificação

LMR – Limite máximo de resíduo

(*) NA - Nivel de Ação

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Fonte: Instrução Normativa nº 9, de 30 de março de 2007. MAPA.

2.7.6 Análises multirresíduo para detecção de agrotóxicos

O uso de agrotóxicos na agricultura tem resultado na ocorrência destes compostos em produtos agrícolas. O monitoramento destes produtos quanto à presença de contaminantes se torna indispensável devido aos riscos à saúde do consumidor. Contudo, para um determinado número de produtos como o mel, há uma limitação no número de métodos de análise multirresíduo de agrotóxicos. Um dos fatores limitantes para que isso aconteça, é a grande diversidade de propriedades físico-químicas apresentada pelos agrotóxicos, assim como a complexidade da matriz a ser analisada.

Vários métodos para a análise multirresíduos já foram desenvolvidos, porém muitos destes apresentam etapas laboriosas que demandam tempo, dinheiro e acabam gerando uma grande quantidade de resíduos tóxicos (Lehotay, 2004).

Os extratos provenientes de alimentos são normalmente matrizes muito complexas por possuírem um grande número de interferentes que resultam em problemas durante as análises. Sendo assim, a etapa de preparação das amostras é de vital importância para o estabelecimento da metodologia. Etapas de pré-tratamento e "clean up" das amostras são laboriosas e exigem uma grande demanda de tempo, uso de grandes quantidades de solventes (Campilo, 2006; Rial-Otero, 2007).

2.7.7 Técnicas de extração e concentração

A extração e a concentração dos analitos das amostras para as análises cromatográficas são de vital importância para o desempenho dos métodos, pois

propiciam a concentração dos analitos e a eliminação de possíveis interferentes da matriz.

Rial-Otero et al. (2007) descrevem, em uma revisão, o estado da arte para a determinação de agrotóxicos em mel, focado no tratamento das amostras e na instrumentação usada. Para o tratamento das amostras, são descritas várias técnicas como o uso de extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) entre outras.

A extração do tipo LLE é também conhecida como extração com solvente ou particionamento. É um método para separar compostos baseados na suas afinidades por dois diferentes líquidos imiscíveis que são, normalmente, a água e um solvente orgânico. O processo consiste na extração de uma substância de uma fase líquida para uma outra de maior semelhança físico-química. A extração LLE é um procedimento básico em laboratórios químicos e é realizada usando funis de separação. É, também, usada em escala industrial para a separação de compostos derivados de reações químicas.

Segundo Rial-Otero (2007), o procedimento de extração em fase sólida (SPE) é um método de separação que utiliza uma fase sólida ou uma fase líquida sob um suporte sólido para isolar um determinado analito de uma solução. A SPE é baseada na afinidade preferencial dos solutos desejáveis e indesejáveis por um material sólido ou um sólido revestido com um filme líquido ou que apresente cargas superficiais. A SPE pode ser usada nas etapas de concentração e "clean up" de uma amostra antes da análise cromatográfica ou outros métodos analíticos para quantificar os analitos presentes. A fase sólida adsorvente deve ser condicionada e ativada com um solvente apropriado para que os analitos sejam efetivamente separados da fase líquida. Para a extração e concentração

de compostos hidrofóbicos, usam-se normalmente fases sólidas revestidas com compostos contendo 8, 12 ou 18 átomos de carbono (cartuchos C-8, C-12 ou C-18). Além destas, várias outras fases sólidas são disponíveis, dentre elas as de resinas de troca iônica para a separação de cátions e ânions fracos e fortes. Fases sólidas de sílica gel ativada e alumina são usadas para a retenção de compostos polares na etapa de limpeza de extratos.

Uma metodologia para extração de resíduos de agrotóxicos usando fase sólida dispersiva, denominado “QuEChERS (do inglês, quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) foi desenvolvida entre 2000 e 2002 e foi introduzida recentemente por Anastassiades e colaboradores (2003). Embora seja um método muito novo, já foi amplamente aceito pela comunidade internacional de analistas de resíduos de agrotóxicos e uma série de publicações já reportam este método na sua forma original ou com modificações (Lehotay, 2004).

O procedimento envolve uma extração inicial com acetonitrila seguido por uma extração / separação após a adição de uma mistura de sais – sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Uma alíquota é transferida para um novo tubo e o procedimento é repetido. O extrato final em acetonitrila poderá ser analisado por LC ou GC. O “QuEChERS” tem alcance amplo, incluindo agrotóxicos altamente polares bem como altamente ácidos e básicos. Como vantagens, estão a baixa quantidade de solvente, vidraria, bancada e espaço necessários (Payá, 2007).

2.7.8 Técnicas para determinação de resíduos de agrotóxicos

Várias metodologias utilizadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos são baseadas em métodos cromatográficos.

Cromatografia é uma técnica utilizada para a separação dos componentes de uma mistura. A separação cromatográfica é baseada na distribuição dos componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Esta separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel devido às diferentes interações com a fase estacionária (Peres, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) são técnicas tradicionalmente empregadas nas análises de resíduos de agrotóxicos. São utilizadas para separação e quantificação de substâncias diversas, podendo também ser utilizadas como técnica de identificação quando acopladas a um espectrômetro de massas ou outro detector qualitativo. Suas resoluções são excelentes, sendo possível analisar várias substâncias em uma mesma amostra (multirresíduos). A sensibilidade da cromatografia é bastante elevada. Dependendo do tipo de substância analisada e detector empregado, podem-se obter resultados quantitativos em valores que variam de picogramas a miligramas (Collins, 1997).

Os agrotóxicos são agrupados por técnicas de análise e detecção sendo os organoclorados normalmente analisados por cromatografia gasosa e detector de captura de elétrons (GC-ECD), os organofosforados e nitrogenados por cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama (GC-FPD) ou nitrogênio-fósforo (NPD) e para os carbamatos o uso de HPLC com detector no UV/Vis ou fluorescência (Rial-Otero, 2007).

2.7.8.1 Cromatografia líquida

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é comumente empregada para análise de componentes não voláteis e foi

utilizada por alguns autores para análise de resíduos de agrotóxicos.

A separação por HPLC é baseada na interação e na partição diferencial da amostra entre uma fase líquida móvel e uma fase estacionária. Os métodos cromatográficos comumente utilizados podem ser classificados como: quiral, troca iônica, afinidade/ion par, fase normal, fase reversa e exclusão molecular (US-FDA, 1994).

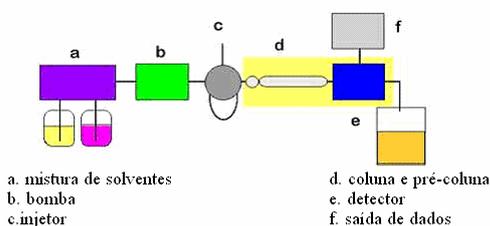


Figura 7. Representação esquemática de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Fonte:

<http://ull.chemistry.uakron.edu/analytical/lc>
- Hardy, J. K (2000).

Para determinação de resíduos de agrotóxicos em mel são utilizadas técnicas de HPLC em fase reversa usando colunas do tipo C18 ou octadecilsilano como Novapak-ODS (150mm x 3,9 mm) (Bernal, 1997); Hypersil (250mm x 4,6mm) (Jiménez, 2000); C18 (150 mm x 3,9 mm., 4 µm) (Korta, 2001); Li-Chrospher 100 RP-18, (250mm x 4,0 mm, 5 µm) (Martel, 2002); Luna C18 (250mm x 4,6mm, partícula: 5µm) coluna de guarda C18 (4mm x 2mm.) (Blasco, 2003 e 2004a); Polaris C18-A (150 mm x 2,0 mm, 3µm, 200 A°) (Pirard, 2007); ODS (3,5 µm, 150 x 2.1 mm) (Lopez, 2007).

A cromatografia em fase reversa com detector ultravioleta-visível (UV-Vis) é a técnica mais comum de detecção de analitos, em que a fase normal usa água

como solvente básico. Normalmente, o componente mais polar elui mais depressa que o componente menos polar. A detecção por UV-Vis pode ser utilizada para todas as técnicas cromatográficas. No entanto, a sensibilidade depende da absorvidade molar dos analitos.

Bernal (1997) adaptou procedimentos utilizados para análise de resíduos em vegetais com extração com solventes e “clean up” para análises em produtos de apiários como mel, cera de abelha, larvas e pólen. Dois tipos de detectores foram utilizados para determinar e confirmar a presença dos resíduos de um tipo de fungicida nas amostras previamente contaminadas, detector de fluorescência e espectrometria de massas. Outros tipos de detectores foram utilizados como detector de ultravioleta/visível (UV/vis) na faixa de 210 nm. (Jiménez, 2000) e 210 a 250nm (Korta, 2001), arranjo de diodos (Martel, 2002), espectrometria de massas com ionização química em pressão atmosférica (APCI-MS) (Blasco, 2003, Blasco, 2004a). Para o estudo de estabilidade de alguns tipos de acaricidas, Korta (2001) utilizou amostras contaminadas com soluções em concentrações de 10 a 25 µg g⁻¹ que ficaram estocadas em temperatura ambiente por nove meses sem exposição direta ao sol. O HPLC/UV-vis foi utilizado no estudo da cinética para mensurar a diminuição da área do pico dos acaricidas em função do tempo.

De acordo com Martel (2002), o HPLC em fase reversa mostrou ser uma alternativa rápida, econômica e simples se comparada ao GC para separação e determinação de acaricidas. Com o uso da coluna C18 e detector de arranjo de diodos, o autor obteve limites de detecção comparados aos obtidos por GC com detectores de captura de elétrons, nitrogênio-fósforo ou ionização de chama.

Os sistemas de análise de multirresíduos, baseados no uso de HPLC com detectores

específicos têm a grande vantagem de proporcionarem evidências de identidade e meios de medir um ou mais agrotóxicos de uma ampla gama de resíduos. Pirard (2007) utilizou a técnica de extração líquido-líquido em coluna de terra diatomácea seguida da análise por HPLC e espectrometria de massas/massas. A técnica foi desenvolvida e validada segundo os critérios da ISO 17025 para a identificação e quantificação de 17 diferentes inseticidas em méis da Bélgica.

2.7.8.2 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa é utilizada por vários autores para análise de resíduos de agrotóxicos em mel. O nitrogênio e o hélio são usados como gás de arraste e as rampas de temperatura variaram de acordo com a coluna escolhida.

As colunas comumente utilizadas para determinação dos resíduos são de média e baixa polaridade. Apesar das variações em comprimento, diâmetro interno e espessura dos filmes os autores utilizam colunas capilares com fases estacionárias com 5% fenilmetilpolisiloxano ou 50% fenilmetilpolisiloxano na maioria dos trabalhos (Bernal, 1996; Lanças, 1997; Jimenez, 1998a, 1998b; Bernal, 2000; Russo, 2002; Blasco, 2003; Albero, 2004; Blasco, 2004b; Campillo, 2006; Rissato, 2006).

Os detectores de captura de elétrons – ECD (Bernal, 1996; Lanças, 1997; Jimenez, 1998a; Jimenez, 1998b; Russo, 2002; Blasco, 2004b; Rissato, 2004), nitrogênio-fósforo – NPD (Jimenez, 1998b), ionização de chama (Bernal, 2000), emissão atômica AED (Jimenez, 2002) e a espectrometria de massas - MS (Jimenez, 2002; Russo, 2002; Blasco, 2003; Albero, 2004; Blasco, 2004b; Rissato, 2004; Rissato, 2006) podem ser utilizados para análise de vários tipos de resíduos de agrotóxicos.

Em seu trabalho, Jimenez (2002) concluiu que a combinação de GC-MS e GC-AED facilitou a procura e a identificação de produtos de degradação de clordimeforme em mel.

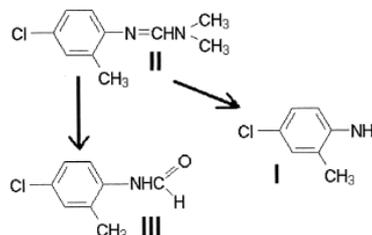


Figura 8. Estrutura de clordimeforme e de seus dois produtos de degradação (I) 4-chloro-o-toluidine (II) Clordimeforme (III) N-formyl-4-chloro-o-toluidine
Fonte: Jimenez, 2002.

De acordo com Blasco (2004b) a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons tem sido aplicada como técnica preferencial para identificação e quantificação de agrotóxicos organoclorados devido a sua alta sensibilidade por moléculas que contém átomos eletronegativos, entretanto, a técnica requer subsequente confirmação por um detector de espectrometria de massas.

A utilização de detector de captura de elétrons requer atenção na etapa de extração e concentração das amostras. A etapa de “clean-up” ou limpeza das amostras para análises de resíduos de agrotóxicos é muito importante devido à presença de compostos com alto peso molecular que podem contaminar os sistemas cromatográficos quando é utilizado esse tipo de detector. Os interferentes tornam a interpretação dos cromatogramas difícil por causa dos picos sobrepostos (Rissato, 2004).

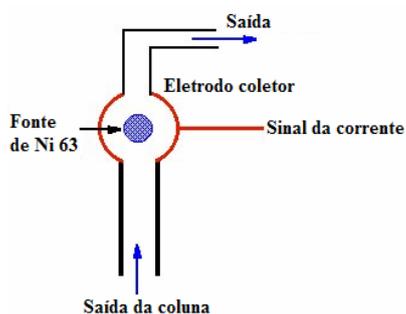


Figura 9. Esquema do detector de captura de elétrons

Fonte: www.chemistry.adelaide.edu.au

Bernal (2000) estudou a presença de resíduos do piretróide acrinatrina e o principal produto de sua degradação em amostras de mel previamente contaminadas. Este tipo de agrotóxico é utilizado para o tratamento de colméias infestadas por *Varroa jacobsoni* como tratamento alternativo ao acaricida flavulinato. As análises foram executadas com equipamento de cromatografia gasosa e detector de ionização de chama. Foram comparados três tipos de extração para os analitos. Os índices de recuperação para os analitos com extração em florisil foram superiores às extrações com cartuchos de ODS e a extração com solvente.

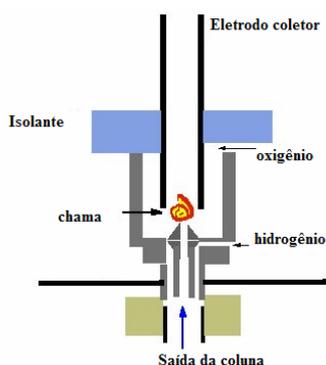


Figura 10. Esquema do detector de ionização de chama

Fonte: www.chemistry.adelaide.edu.au

2.7.8.3 Detecção por espectrometria de massas

A espectrometria de massas pode ser considerada como uma das técnicas analíticas de maior importância por permitir a elucidação estrutural de compostos desconhecidos pelos espectros de massas característicos e a quantificação de moléculas conhecidas pelas intensidades dos íons produzidos.

Os detectores por espectrometria de massas são usados para a produção de íons (positivos ou negativos) e a subsequente separação dos íons de acordo com a relação entre suas massas/cargas (m/z). Os espectrômetros de massas podem ser usados em combinação com as técnicas de separação do tipo cromatografia gasosa e líquida (GC e HPLC). Estes instrumentos combinados são chamados de instrumentos acoplados (hyphenates); por exemplo, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) ou cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

Os espectrômetros de massas consistem de uma interface para a introdução dos analitos, uma região de produção de íons (ionização), uma região de separação dos íons – analisador (m/z) e um detector. As regiões do analisador e do detector trabalham sobre pressões reduzidas (vácuo). Em alguns casos, a interface e a região de ionização são localizadas no mesmo espaço, isto é particularmente verdadeiro para as técnicas acopladas à cromatografia líquida - “electrospray, Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)”.

Atualmente, os equipamentos apresentam, mesmo com variações, uma configuração básica como mostrado na Figura 11.

A fonte de ionização mais comum em espectrometria de massas é a ionização por elétrons (EI - electrons ionization), a qual entrega um filamento aquecido para gerar

elétrons com energia suficiente para provocar ionização nos analitos de interesse. Os íons formados são direcionados para o analisador, cuja função é separá-los de acordo com sua relação massa/carga (m/z). Os analisadores de

massas mais utilizados no presente são os quadrupolos e os íons “trap”, sendo que analisadores do tipo “time-of-flight” começaram a se tornar mais popular (Lanças, 2004).

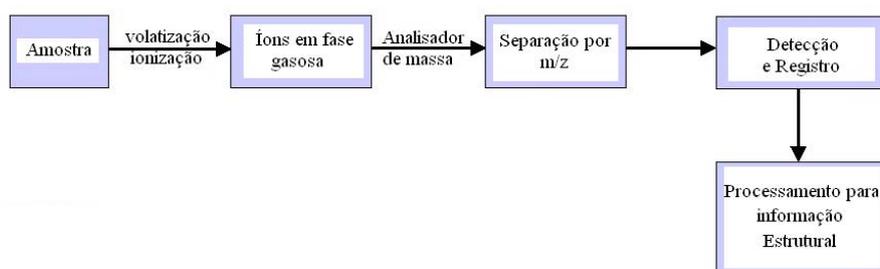


Figura 11. Esquema de um espectrômetro de massas típico

Fonte: www.chemistry.adelaide.edu.au

Em equipamentos de cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas, utilizam-se como interfaces e fonte de ionização técnicas de ionização em pressão atmosférica (API). Dentre elas, a ionização por “eletrospray”, onde para a formação dos íons em fase gasosa, uma solução contendo os analitos é bombeada por um capilar muito fino e, na sua extremidade, uma alta voltagem (em torno de 4000 V) é aplicada. Há a formação de gotas (spray eletrolítico), contendo um excesso de cargas positivas (analito ionizado). As gotas são atraídas para o contra eletrodo e diminuem de tamanho, devido à evaporação do solvente pela passagem de um gás inerte aquecido como o nitrogênio. As moléculas ionizadas, protonadas ou deprotonadas, são introduzidas no analisador de massas e suas razões m/z determinadas. Poderão ser analisados íons positivos ou negativos. Espectros de massas obtidos nos modos positivo e negativo são representados pelas siglas ESI(+)-MS e ESI(-)-MS, respectivamente.

Rissato (2006) desenvolveu um método multirresíduo para determinação e confirmação de 48 agrotóxicos de

diferentes classes (organoalogenados, organofosforados, piretróides e organonitrogenados) em mel utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, operando em modo de íon seletivo (GC-MS-SIM) para monitoramento da contaminação regional usando o mel como bioindicador. As amostras foram coletadas na região de Baurú no Estado de São Paulo entre 1999 e 2004.

Pang, (2006) desenvolveu e utilizou um método multirresíduo empregando SPE, seguida de GC-MS e LC-MS-MS para a determinação de 450 agrotóxicos em mel, sucos de fruta e vinhos. O limite de detecção do método apresentou uma faixa entre 1,0 – 300 ng g⁻¹ dependendo do agrotóxico analisado. Avaliou-se três níveis de fortificação entre 2,0 – 3000 ng g⁻¹ e os 450 compostos analisados apresentaram recuperações médias entre 59 – 123%, sendo que 97% do total de compostos analisados apresentaram desvio padrão relativo (DPR) abaixo de 25%, os outros 3% apresentaram DPR entre 25,0 – 30,4% .

Na literatura são descritas várias metodologias baseadas em análises

cromatográficas objetivando a
determinação de teores de agrotóxicos em
mel e que foram resumidos no quadro 2.

Quadro 2. Compilação de pesquisas relacionadas aos métodos cromatográficos para análise de agrotóxicos em mel

| Autor/ano | Extração | TIPO | Detector | Coluna | classe | composto |
|------------------|--------------------------|-------------|---------------------------------|--|----------------------------------|---|
| Fernández, 1995 | Líquido-líquido | GC | ECD | 25 m x 0,22 mm x 0,25 µm | organoclorados | multirresíduo |
| Bernal, 1996 | Líquido-líquido SPE/ ODS | GC | MS | 50% fenilmetilpolisiloxano 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, | dicarboximida | vinclozolina |
| | Limpeza: Florisil/ODS | | Captura de elétrons | 50% fenilmetilpolisiloxano 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm | | |
| Bernal, 1997 | Líquido-líquido | HPLC | Detector de fluorescência MS | Novapak-ods 150 mm x 3,9 mm spherisorb ODS-2 250x2 mm | fungicidas | benomil, carbendazina |
| Lanças, 1997 | Sistema "home-made" | GC | Captura de elétrons | 5% fenilmetilpolisiloxano 28 m x 0,25 mm x 0,4 µm | organofosforado | dimetoato, malationa, metidationa, pirazofôs, parationa |
| | | | | | piretróide, | trans-permetrina |
| Jimenez, 1998a | SPME | GC | Captura de elétrons | 50% fenilmetilpolisiloxano 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm | organoclorado organofosforado | multirresíduo |
| Jimenez, 1998b | Florisil | GC | Captura de elétrons NPD | 50% fenilmetilpolisiloxano 60 m x 0,25 mm 0,25 µm | | multirresíduo |

| Autor/ano | Extração | TIPO | Detector | Coluna | classe | composto |
|----------------------|---|-------------|------------------------------|--|---|---|
| Tsipi, 1999 | SPE - C18 | GC | ECD | HP-coluna capilar 30 m×0,25 mm x 0,25 µm | organoclorado | multirresíduo |
| Bernal, 2000 | Líquido- líquido SPE/ ODS/florisil | GC | Ionização de chama | Fenilmetilpolisiloxano 25m x 25 mm x 0,25mm | piretróide acaricida inseticida | acrinatrina 3-fenixi- benzaldeido (pba) |
| Jimenez, 2000 | Líquido- líquido SPE/ ODS/florisil | HPLC | UV | Hypersil 250 x 4,6mm | inseticida | rotenona |
| Volante, 2001 | SPME | GC | MS | Restek RTX5MS 5% difenil 95% dimetil polisiloxano) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm | acaricida | amitraz, coumaphos, cimiazole, bromopropylate and fluvahate, |
| Korta, 2001 | Líquido- líquido | HPLC | UV | C18 15 cm x 3,9 mm x 4 µm | acaricida organoalogenado organofosforado piretróide | amitraz clordimeforme, cymiazole, flumetrina bromopropilato coumafós, tau-fluvalinato |
| Jimenez, 2002 | Líquido- líquido | GC | MS Emissão atômica | Db-17 50% fenilmetilpolisiloxano 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm | acaricida | produtos da degradação de clordimeforme |
| Piasenzotto, 2002 | SPME | GC | Ionização de chama | Hp-innowax 30 m ×0,32 mm x 0,5 µm | acaricida | thimol |
| Fernández, 2002 | SPE - C18 | LC | MS | Spherisorb CLS | organofosforado | multirresíduo |

| Autor/ano | Extração | TIPO | Detector | Coluna | classe | composto |
|------------------|------------------------------|-------------|-----------------------------|---|---|--|
| Martel, 2002 | Líquido-líquido | HPLC | “Photodiode array detector” | Li-chrospher 100 rp- 18,5 µm, 250 mm x 4.0 mm | acaricida | coumafós; bromopropilato amitraz; fluvalinato |
| Russo, 2002 | Líquido-líquido SPE - C18 | GC | Captura de elétrons MS | Se-54 5% fenil 1% vinil Metilpolisiloxano 12m x 0,2 mm x 0,3 µm | piretróide | flavulinato |
| Blasco, 2003 | SPE/ODS | GC | MS | Db-5 fase ligada 5% fenilmetilpolisiloxano 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm | organoclorado | multirresíduo |
| | | HPLC | APCI-MS | Luna c18 250mm x 4.6 mm x 5 µm C18 (4 x 2 mm i.d) | organofosforado carbamato | multirresíduo |
| Albero, 2004 | SPE - C18 Sílica bondesil | GC | MS | Zb-5MS 5% fenilmetilpolisiloxano 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm | | multirresíduo |
| Blasco, 2004a | SPME SBSE | HPLC | APCI-MS | Luna C18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm coluna de guarda C18 (4mm x 2mm i.d.) | organofosforado | clorpirifós-metil, diazinona, fonofós, “phenthoate”, “phosalone”, e pirimifós-etil |
| Blasco, 2004b | Líquido-líquido | GC | Captura de elétrons MS | Db-5 5% fenilmetilpolisiloxano 30 m x 0,2 5mm x 0,25 µm | organoclorado | hexaclorociclohexano, hexaclorobenzeno, aldrin |
| Rissato, 2004 | Fluido super crítico | GC | Captura de elétrons MS | 30 m x 25 mm x 0,25 µm Lm-5-5% fenil 95% metilpolisiloxano 35 m x 0,25 mm x 0,25 µm. | organoclorado, organofosforado, organonitrogenado piretróide | multirresíduo |

| Autor/ano | Extração | TIPO | Detector | Coluna | classe | composto |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------|--------------------|---|---|-----------------|
| Herrera, 2005 | SPE | GC | ECD NPD | 007-2 Coluna capilar 50 m x 0,25 mm x 0,25 µm | organoclorado | multirresíduo |
| Sanchez- Brunete, 2005 | SPE - C18 | GC | MS | | organoclorado, organofosforado piretróide | multirresíduos |
| Campillo, 2006 | SPME | GC | Emissão atômica | Hp-5 5% Fenilmetilpolisiloxano 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm | organoclorado, organofosforado, organonitrogenado piretróide | multirresíduos |
| Rissato, 2006 | Líquido- líquido / florisil | GC | MS | Lm-5 5% Fenilmetilpolisiloxano 35 m x 0,25 mm x 0,25 µm | organoalogenado organonitrogenado organofosforado | multirresíduo |
| Zhen, 2006 | Líquido- líquido | GC | MS | Coluna capilar sílica fundida 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm | carbamato organofosforado piretróide | multirresíduo |
| Pang, 2006 | Líquido- líquido/SPE | GC HPLC | MS MS | Coluna capilar DB-1701 30m x 0,25mm x 0,25 µm Atlantis TM d C18 3 µm x 2,1mm x 150mm | organoalogenado organonitrogenado organofosforado piretróide | multirresíduo |
| Erdogru, 2007 | | GC | ECD MS | Zb-5- 5%fenil polisiloxano 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm | organoclorado organofosforado piretróide | multirresíduo |

| Autor/ano | Extração | TIPO | Detector | Coluna | classe | composto |
|-----------------------|--|-------------|-----------------|---|---|-----------------|
| Rissato, 2007 | Líquido-líquido | GC | MS | Lm-5-5% fenil 95% dimetilpolisiloxane 35 m x 0,25 mm x 25 µm) | organoalogenado organonitrogenado organofosforado piretróide | multirresíduo |
| Pirard, 2007 | Líquido-líquido Terra diatomácea | HPLC | MS/MS | Polaris C18 50 mm × 2,0 mm x 3µm | inseticida herbicida fungicida | multirresíduo |
| Barakat, 2007 | Quechers | GC | ECD NPD | HP- PAS5 coluna capilar 25 m x 0,32 mm x 0,52 mm | organofosforados organoclorados piretróides | multirresíduo |
| Sanchez-Brunete, 2008 | SPE - C18 | GC | ECD MS | Hp-1Coluna 30 m × 0,25 mm x 0,25 µm | inseticida | fipronil |

2.7.9 Efeito matriz

A complexidade das amostras e o número de compostos que co-eluem durante a análise cromatográfica acabam interferindo na detecção dos analitos – o chamado efeito matriz. Os compostos podem competir com os sítios ativos na coluna cromatográfica diminuindo a interação entre os sítios ativos e os analitos. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais extensivas de “clean-up” devem ser desenvolvidos (Picó, 2004). De acordo com Sanchez-Brunete (2005) esse procedimento nem sempre é eficiente, pois aumenta o tempo e o trabalho de preparação das amostras e pode significar, em muitos casos, a supressão de sinal na resposta do detector. Este efeito pode ser notado pela significativa diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz, quando uma boa precisão é obtida diz-se que o efeito foi eliminado ou compensado.

De acordo com Alder (2006), o efeito matriz que ocorre na transmissão do analito do injetor do GC para a coluna é um fenômeno bastante conhecido. Neste caso, a utilização de padrões preparados no extrato da matriz reduz esse efeito, porém, a preparação destes padrões também é laboriosa e, geralmente, amostras “branco” sem a presença de agrotóxicos não estão disponíveis no mercado.

O efeito causado pela interferência da matriz não foi discutido profundamente nos artigos científicos específicos para determinação de resíduos de agrotóxicos em mel (Blasco, 2003; Albero, 2004; Herrera, 2005; Erdogrul, 2007). Alguns autores citam que a preparação das curvas analíticas nos extratos da matriz foi obtida

para minimizar esse efeito (Sanchez-Brunete, 2005; Rissato, 2006).

Entre as maneiras utilizadas para compensar o efeito matriz em GC, podemos citar (i) o uso do método da adição padrão, (ii) o uso de padrão interno deuterado, (iii) o preparo das soluções analíticas no extrato da matriz, (iv) uso de analitos protetores (Alder, 2006).

2.8 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

A validação da metodologia analítica em geral é realizada para garantir que a mesma seja exata, específica e reprodutível. A validação envolve a interação entre o princípio ativo e a matriz dentro de uma marcha analítica que resulta na quantificação por métodos instrumentais. Assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método atende os objetivos e necessidades para os quais é proposto (Lanças, 2004).

Alguns dos parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação e seletividade.

2.8.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a habilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2003).

A linearidade é determinada pelas curvas analíticas, que são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento

em função das diferentes concentrações do analito. Para obter-se a curva analítica são necessárias soluções padrão de concentrações definidas obtidas através de padrões de referência (Lanças, 2004).

Para a maioria das técnicas cromatográficas, observa-se uma relação linear de primeira ordem entre a resposta instrumental medida (eixo y - variável dependente) e a concentração do analito (eixo x - variável independente). Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y e gera os coeficientes de regressão a (inclinação da curva) e b (interseção da curva analítica com o eixo y, quando $x = 0$). Essa equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito, independente da técnica instrumental utilizada. Também é possível calcular o coeficiente de correlação r, que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o valor de r. Valores de r iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003a) e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003).

Segundo o INMETRO (2003), alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função adequada da concentração do analito na amostra.

2.8.2 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A exatidão é expressa

como o percentual de resposta obtida através da fortificação de uma amostra testemunha. A fortificação consiste na adição de uma solução padrão de princípios ativos de agrotóxicos de concentração conhecida em uma amostra testemunha, e pela análise desta amostra pode-se verificar se a marcha analítica determina estes princípios ativos quantitativamente. O Codex Alimentarius (2001) aceita recuperações de 70 a 120% para análise de resíduos de agrotóxicos.

2.8.3 Precisão

A precisão é o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas (INMETRO, 2003). Normalmente é expressa pelo desvio padrão relativo em um número estatisticamente significativo de amostras (Codex Alimentarius, 2001).

2.8.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação (LQ) representa a mais baixa concentração do analito que pode ser quantificado com certa confiabilidade, utilizando uma marcha analítica específica (FAO, 1998). O LQ engloba uma relação entre a concentração, precisão e exatidão.

2.9 SÍNTESE DA REVISÃO DA LITERATURA

De forma geral, a revisão bibliográfica sobre o tema permite indicar as seguintes conclusões:

Dentre os aspectos relacionados à qualidade do mel estão os parâmetros físico-químicos e as fontes de adulteração. Estas características estão de alguma forma, relacionadas com a questão econômica que envolve a cadeia de produção.

Os parâmetros e as metodologias de análise físico-químicas para o controle de qualidade do mel de abelhas estão bem definidos de acordo com Instrução Normativa nº 11 pelo MAPA.

A determinação de resíduos de contaminantes, sejam eles antibióticos ou agrotóxicos, adquiriram um maior nível de importância por estarem diretamente ligados aos riscos que podem trazer à saúde humana, à saúde das abelhas e à comercialização do mel. A avaliação de contaminantes em mel é também utilizada como indicadores de qualidade ambiental.

Na literatura, são encontradas algumas metodologias multirresíduo para a determinação de contaminação por resíduos de agrotóxicos, inclusive para méis brasileiros. No entanto, na maioria dos estudos, as metodologias atendem a somente uma classe de agrotóxicos ou a poucas substâncias. As características da matriz e a grande diversidade de agrotóxicos encontrados no mercado tornam a análise bastante complexa. Diante disso, existe a necessidade de se aprimorar os métodos de análise multirresíduo.

Não foi encontrada metodologia oficial para a determinação de resíduos de agrotóxicos em mel apesar da publicação da Instrução Normativa nº 9 de 30 de março de 2007 pelo Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento.

Os estudos reportam várias metodologias para preparação das amostras com uma

grande diversificação de procedimentos e solventes utilizados. Esta diversidade de procedimentos pode ser explicada, pois, a etapa de preparação de amostras deve ser adequada para obtenção dos maiores índices de recuperação dos analitos de interesse e, ao mesmo tempo, para minimizar a co-eluição de compostos indesejados.

As técnicas cromatográficas utilizadas para análises de agrotóxicos em méis compreendem a cromatografia gasosa com detectores de captura de elétrons (ECD), nitrogênio-fósforo (NPD) e espectrometria de massas para compostos voláteis e semivoláteis de diversas classes. Também são reportados a utilização da cromatografia em fase líquida com detectores de espectrometria de emissão molecular (fluorescência); absorção molecular na região do ultravioleta/ visível e espectrometria de massas com ionização por “eletrospray”(ESI) e ionização química em pressão atmosférica (APCI).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes, acetona, acetonitrila, acetato de etila de grau pesticida foram adquiridos da Mallinckrodt e os sais, sulfato de magnésio e cloreto de sódio da JT Baker.

A água foi obtida em um sistema de purificação de água deionizada da MilliPore (EUA), com resistividade de 18,2 MΩ.cm. Para a extração em fase sólida foram utilizados os cartuchos C18 (Phenomenex – 500mg/3mL) e Florisil (Phenomenex – 500mg/3mL).

Toda a vidraria e materiais utilizados foram lavados com Extran neutro, enxaguados com água destilada, mergulhados em solução de HNO₃ 2,5% e enxaguados exaustivamente com água Milli-Q.

3.2 AMOSTRAS

As amostras de mel de abelhas do gênero *Apis* foram coletadas nos anos de 2007 e 2008 e enviadas por apicultores voluntariamente. O contato com os produtores foi feito diretamente, por meio das Federações, Associações de Apicultura e Cooperativas de Produtores ou por meio de profissionais ligados ao setor apícola.

Foram obtidas 74 amostras de méis provenientes de vários estados brasileiros. O formulário de instrução para coleta de amostras e as informações dos apicultores sobre a coleta das amostras e as suas características - tipo de mel, pólen predominante, tipos de agrotóxicos utilizados nas colméias, tipos de culturas predominantes no entorno dos apiários e agrotóxicos utilizados nessas culturas - estão apresentadas no anexo A (Formulário de instruções para coleta de amostras) e no anexo B (Caracterização da amostras reais segundo informação dos colaboradores).

Para a realização dos experimentos, foi preparada uma amostra composta a partir de 60 amostras recebidas contendo 10 g de cada amostra de mel coletada nas diferentes regiões do Brasil e em diversas floradas. Tanto as amostras enviadas pelos colaboradores como a amostra composta foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas da luz.

3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

A seleção dos agrotóxicos se baseou, principalmente, nos parâmetros exigidos no Plano Nacional de Controle de Resíduos – PNCR/2007 (Instrução Normativa nº 9 de 30 de março de 2007 - MAPA). Além disso, foram acrescentados outros compostos de várias classes.

Os padrões dos agrotóxicos estudados foram obtidos a partir de soluções preparadas nos laboratórios de resíduos de agrotóxicos do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e da Souza Cruz (RS). Os padrões de carbamatos foram adquiridos da Sigma Aldrich. Os padrões enviados foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massas para confirmação da pureza e dos compostos presentes. As concentrações nas soluções foram confirmadas por calibrações cruzadas, entre as duas fontes. Esses padrões foram obtidos em soluções individuais de cada composto, nas concentrações de 1000 µg mL⁻¹ ou 100 µg mL⁻¹.

Os agrotóxicos selecionados para este estudo estão listados na tabela 8. No anexo C, são apresentadas as informações sobre o grupo químico, a fórmula química e estrutural e a massa molecular dos agrotóxicos avaliados.

Tabela 8. Concentração das soluções estoque de padrões de agrotóxicos preparadas no IMA e na Souza Cruz/RS

| Nº | Agrotóxicos | Concentração (µg mL ⁻¹) | Nº | Agrotóxicos | Concentração (µg mL ⁻¹) |
|----|----------------|-------------------------------------|----|--------------------|-------------------------------------|
| 1 | 4,4-DDD | 122,77 | 23 | Heptacloro | 99,46 |
| 2 | 4,4-DDE | 1177,00 | 24 | Heptacloro Epoxide | 122,54 |
| 3 | 4,4-DDT | 1143,00 | 25 | Hexaclorobenzeno | 1000,00 |
| 4 | Aldicarb | 1000,00 | 26 | Iprodiona | 1026,00 |
| 5 | Atrazina | 130,00 | 27 | Lindane | 1008,00 |
| 6 | Azinphos metil | 1119,00 | 28 | Malationa | 112,51 |
| 7 | Captana | 408,29 | 29 | Metoxicloro | 108,87 |

| Nº | Agrotóxicos | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Nº | Agrotóxicos | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|----|-------------------------|---|----|--------------------|---|
| 8 | Carbaril | 1000,00 | 30 | Oxamil | 1000,00 |
| 9 | Carbofurano | 102,49 | 31 | Paration Metilico | 110,93 |
| 10 | Ciflutrina | 202,00 | 32 | Pentaclorofenol | 110,29 |
| 11 | Cipermetrina | 129,81 | 33 | Phorate | 118,19 |
| 12 | Deltametrina | 120,88 | 34 | Pirimifos Metilico | 121,80 |
| 13 | cis-Permetrina | 93,01 | 35 | Profenofos | 99,04 |
| 14 | Clorotalonil | 93,59 | 36 | Propamocarb | 1000,00 |
| 15 | Clorpirifos Metilico | 206,00 | 37 | Propoxur | 1000,00 |
| 16 | Dieldrin | 120,89 | 38 | Simazina | 110,00 |
| 17 | Dimetoato | 101,97 | 39 | Terbufos | 109,26 |
| 18 | Dissulfoton | 103,44 | 40 | Tetradifona | 200,00 |
| 19 | Alfa endossulfan | 114,29 | 41 | trans-Permetrina | 98,93 |
| 20 | Endrin | 97,03 | 42 | Vinclozolina | 204,00 |

3.4 TESTE DE SOLVENTES PARA PREPARO DE SOLUÇÕES ANALÍTICAS DE AGROTÓXICOS

A literatura descreve a utilização de diferentes solventes para os padrões de agrotóxicos dependendo do grupo a ser analisado (Bernal, 2000; Albero, 2004; Sanchez-Brunete, 2005; Rissato, 2006). Por se tratar do desenvolvimento de um método multirresíduo envolvendo várias classes de compostos, foi avaliada a utilização de acetonitrila, acetona e acetato de etila para o preparo dessas soluções com o objetivo de verificar o solvente com a melhor resposta cromatográfica para a preparação de soluções de padrão de agrotóxicos e para a ressuspensão dos extratos.

Para os três solventes utilizados, acetonitrila, acetato de etila e acetona, foram preparadas soluções em volume final de 10 mL onde foram adicionadas quantidades apropriadas das soluções estoque para uma concentração final de 100 ng mL^{-1} de cada agrotóxico e pela adição de antraceno D¹⁰ como padrão interno na concentração final de 50 ng mL^{-1} .

As soluções foram injetadas em cromatógrafo à gás acoplado à espectrometria de massas a 70 eV de energia de ionização, no modo varredura para as relações massa/carga entre 45 e 550 m/z. O comportamento e as áreas dos picos foram avaliados utilizando software GCMS Solutions – Shimadzu.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS EM SOLVENTE

Durante a avaliação de diferentes solventes, observou-se o desdobramento dos picos com a utilização de acetonitrila e acetona para agrotóxicos de menor temperatura de ebulição e menor interação com a coluna. O acetato de etila, utilizado por Albero (2004) e Rissato (2006), apresentou picos bem resolvidos sendo selecionado para o estabelecimento das curvas analíticas e para a ressuspensão das amostras.

A partir das soluções estoque, foram preparadas as soluções de trabalho na concentração 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, contendo todos os agrotóxicos estudados (multirresíduo). Para

isso, volumes apropriados de cada solução estoque foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, já contendo um pequeno volume de acetato de etila, sendo, posteriormente, o volume completado com este mesmo solvente. A mistura das soluções de trabalho ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi armazenada em frascos âmbar (tampa contendo batoque de polietileno de alta densidade - PE) evitando-se contaminação e/ou evaporação.

As soluções analíticas foram preparadas a partir das soluções de trabalho, de forma a obter-se soluções nas concentrações entre 10 ng mL^{-1} e 500 ng mL^{-1} .

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS EM EXTRATOS DA MATRIZ COMPOSTA

Na avaliação dos índices de recuperação dos agrotóxicos em diferentes procedimentos de extração, observou-se grande influência da matriz na resposta dos agrotóxicos. Este efeito da matriz foi observado e discutido por Poole (2007). Dependendo da condição, a matriz aumenta ou diminui as respostas dos agrotóxicos em análises por cromatografia gasosa. Como alternativa ao uso de curvas analíticas em solvente, foram preparadas curvas analíticas em extratos da amostra composta (item 3.2) preparados por extração líquido/líquido em acetato de etila, conforme item 3.8.3.

As soluções para a curva analítica foram preparadas a partir das soluções de trabalho ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). As soluções foram obtidas para as concentrações finais entre 10 ng mL^{-1} e 500 ng mL^{-1} em volume final de 1 mL de acetato de etila.

3.7 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram executadas em equipamento GC/-MS Shimadzu QP2010 – Plus, equipado com amostrador automático e controle eletrônico de fluxo.

As condições cromatográficas foram estabelecidas, baseado em dados da literatura, visando uma maior sensibilidade para identificação dos agrotóxicos selecionados. Foram injetadas no cromatógrafo, soluções padrão dos agrotóxicos em diferentes concentrações ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as seguintes variáveis foram estudadas: tamanho da coluna cromatográfica, volume de injeção, temperatura do injetor, temperatura da interface, temperatura da fonte de ionização do espectrômetro de massa, modo de injeção (splitless e split), velocidade linear do gás de arraste, rampa de temperatura. Após este estudo, a melhor relação sinal/ruído para os compostos analisados foi obtida conforme descrito no quadro 3.

Quadro 3. Condições de análise de agrotóxicos por GC-MS

| | |
|-------------------------------------|---|
| Equipamento | GC/MS - Shimadzu QP2010S – Plus, equipado com amostrador automático e controle eletrônico de fluxo. |
| Coluna | RTX5 MS – (5 % fenil metil polidimetilsiloxano) Comprimento: 30 m e 60 m Diâmetro interno: 0,25 mm Espessura do filme: 0,25 µm |
| Gás de arraste | Hélio |
| Velocidade linear do gás de arraste | 40,0 cm/seg |
| Injeção | 1 µL, modo splitless por 0,50 min e 50/1 split ; purga do septo a 10 mL/min |
| Temperatura do injetor | 250 °C e sobre pressão 250 kpa |
| Temperatura da interface | 250 °C |
| Temperatura da fonte | 200 °C |
| Voltagem do detector | 750 V – Obtidos pelo autotune |
| Energia de ionização | 70 eV |
| Programação da temperatura | 80 °C por 2 min; 80 a 280 °C a 5 °C/min; estabilizando a 280 °C por 15 minutos Tempo total: 57 minutos |

O estabelecimento das condições cromatográficas foi realizado em colaboração no Laboratório de Caracterização Molecular/espectrometria de massas da UFOP, visando a obtenção da maior separação dos compostos para o maior número de agrotóxicos possível.

Os tempos de retenção dos compostos foram obtidos a partir da confirmação dos espectros dos vários agrotóxicos na concentração de 100 ng mL⁻¹ usando o modo de varredura (40 a 550 m/z) e comparação com bibliotecas de espectros do National Institute of Standards and Technology (NIST) e SHIMADZU. A confirmação dos compostos também foi realizada pelos seus respectivos valores dos índices de retenção obtidos das bibliotecas da Shimadzu e do NIST.

Para o estabelecimento das curvas analíticas e análises das amostras, os cromatogramas foram obtidos em vários segmentos para no mínimo três íons no modo de aquisição por monitoramento de íons específicos (“single ion monitoring” - SIM) usando ionização por elétrons (EI) a 70 eV.

O Antraceno D¹⁰ foi utilizado como padrão interno adicionado soluções analíticas e às amostras na concentração final de 50 ng mL⁻¹ usando o íon m/z 188 e tempo de retenção de 27.560 minutos para a coluna RTX5 MS – (5 % fenil metil polidimetilsiloxano), 60 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm espessura da fase.

3.8 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Devido à complexidade da matriz mel, a preparação das amostras se torna uma importante etapa da análise para a obtenção de resultados confiáveis (Rial-Otero, 2007). Foi avaliada a eficiência de três procedimentos de extração e concentração de amostras utilizando amostra preparada conforme item 3.2.

3.8.1 Extração em fase sólida com cartucho C18 (SPE – C18)

Cerca de 10,0 g de mel foram diluídas em 10,0 mL de H₂O e agitadas em vórtex. A amostra foi eluída em cartucho C18, previamente condicionado com 10,0 mL de metanol e 10,0 mL de H₂O, utilizando um equipamento tipo “manifold” desenvolvido no laboratório. Após a eluição da amostra, o cartucho foi lavado com mais 10,0 mL de H₂O. A operação se deu sob vácuo.

Para a etapa de “clean up”, o cartucho C18 foi acoplado a um cartucho de florissil previamente condicionado com 10 mL de solução de isopropanol/n-hexano (5:4 v/v). Os analitos foram eluídos do cartucho C18 com 10 mL de isopropanol/n-hexano (5:4 v/v) em sistema “manifold” sem a utilização de vácuo. A amostra foi recolhida em frasco âmbar e o extrato foi levado à seco sob leve fluxo de nitrogênio.

3.8.2 Extração “QuEChERS” modificado:

O procedimento “QuEChERS” utiliza a extração em fase sólida dispersiva e um adsorvente contendo aminas primárias e secundárias (PSA) na etapa de limpeza dos extratos (“clean-up”). Alternativamente ao

uso do PSA, foi recomendado pelo autor (Michelangelo Anastassiades*), a utilização do dobro de MgSO₄ por mL de extrato para a eliminação de alguns açúcares pela remoção da água.

O protocolo original (Anastassiades, 2003) foi modificado da seguinte maneira: 10,0 g de amostra composta de mel foram diluídos com 10,0 mL de H₂O em tubos de centrifugação. Foram adicionados 10,0 mL de acetonitrila e agitados em vórtex por 1 minuto. À solução foram adicionados 4,00 g ± 0,2 g MgSO₄ anidro e 1,00 g ± 0,05 g de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex por 1 min e centrifugada (Beckman J2-MI) a 5000 rpm por 10 minutos a -10 °C. Os tubos foram congelados por 12 horas e centrifugados novamente. Foram retirados 8 mL do sobrenadante que foram transferidos para novo tubo e a eles foram adicionados 2,4 g de MgSO₄ anidro que, após agitação vigorosa, foram submetidos a nova centrifugação (5000 rpm/10min/-10 °C). Após essa etapa, 4 mL do extrato sobrenadante foram obtidos e levados à seco sob leve fluxo de nitrogênio.

3.8.3 Extração líquido-líquido:

O protocolo baseado em Rissato (2006) foi adaptado como descrito a seguir, 10,0 g de mel foram diluídos em 10,0 mL de H₂O, adicionados 10,0 mL de acetato de etila e agitados em vórtex por 10 minutos. A solução foi centrifugada a 15000 rpm por 10 min (Beckman J2-MI) a temperatura de -10 °C. O sobrenadante foi recolhido e a operação foi repetida três vezes com 5,0 mL de acetato de etila. Os extratos combinados (25,0 mL) foram eluídos em conjunto de cartucho florissil e sulfato de magnésio previamente condicionados com 10,0 mL de acetato de etila e levados à seco sob leve fluxo de nitrogênio.

3.9 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS RENDIMENTOS DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Para cada procedimento de extração citado anteriormente foram obtidos extratos da amostra sem fortificação e pela fortificação da amostra de mel com 100 μL de solução padrão de agrotóxicos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os extratos obtidos foram ressuspensos para o volume final de 1,0 mL de acetato de etila com a adição de 50 μL da solução de padrão interno (Antraceno D^{10} a 50 ng mL^{-1}). Os extratos em triplicata foram injetados em GC-MS com coluna de 30 m aleatoriamente.

As concentrações foram calculadas com base em curva analítica em solvente. As soluções para a curva analítica foram preparadas adicionando-se volumes de solução padrão de agrotóxicos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) em acetato de etila para as concentrações finais de 10 ng mL^{-1} a 500 ng mL^{-1} . Nesta etapa do trabalho foi avaliada a utilização de uma coluna cromatográfica RTX5 MS – (5 % fenil metil polidimetilsiloxano) 30 m x 0,25 mm – ID x 0,25 μm .

Desta forma, puderam ser avaliados os rendimentos de extração preliminares e a interferência da matriz na resposta cromatográfica.

3.10 ESTABELECIMENTO DE CURVAS ANALÍTICAS NA MATRIZ

As características da matriz tornam a detecção de resíduos de agrotóxicos em mel um desafio para os analistas. As variedades de classes de agrotóxicos que se encontram disponíveis no mercado e a complexidade de suas estruturas é outro problema.

Segundo Sanches-Brunnet (2005), as alternativas para minimizar estes efeitos são

(i) a melhoria nos processos de limpeza dos extratos (“clean up”), (ii) diluições isotópicas pelo uso de padrões com isótopos marcados e (iii) a adição de padrões em extratos brancos para o estabelecimento de curvas analíticas na matriz similar as amostras.

Pela complexidade dos extratos de mel, mesmo após as etapas de limpeza com florasil e a indisponibilidade de padrões com isótopos marcados para todos os agrotóxicos, optou-se pelo uso de curvas analíticas com adição dos padrões em extratos de uma amostra composta de diferentes origens e composição. Apesar de não ser uma amostra “branco” conhecidamente isenta de agrotóxicos, as possíveis contaminações estariam diluídas na relação de 1/60 e as áreas de seus picos puderam ser avaliadas nos extratos sem adição de padrão.

Aos extratos produzidos por extração líquido/líquido, conforme o protocolo citado anteriormente no item 3.8.3, foram adicionados quantidades adequadas de solução de trabalho em acetato de etila e feita a adição de 50 μL da solução de padrão interno (antraceno D^{10} a 50 ng mL^{-1}) para que quando ressuspensos para o volume final de 1,0 mL de acetato de etila estivessem nas concentrações entre 10 ng mL^{-1} e 500 ng mL^{-1} . As áreas dos picos dos agrotóxicos no extrato “branco” foram avaliadas para que sua concentração, se presente na amostra composta, fosse estimada pelo método de curva analítica por adição.

As curvas analíticas obtidas desta forma foram utilizadas para o estabelecimento de índice de recuperação, limite de detecção e limite de quantificação e para as análises das amostras reais.

3.11 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Para garantir que a metodologia gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, o método foi submetido a uma validação. Neste trabalho, foram avaliados a seletividade com o estudo dos tempos de retenção de cada composto. Seus espectros de massas e índices de retenção foram confirmados com bibliotecas NIST e Shimadzu, destes foram selecionados íons específicos e respectivas intensidades. As curvas analíticas nos extratos da matriz composta, por padronização interna (Antraceno D¹⁰), foram obtidas para os íons selecionados com sete pontos, no mínimo em triplicatas. Por não apresentar linearidade aparente na faixa de trabalho, o ajuste da curva foi feito por regressão quadrática (INMETRO, 2003). A exatidão do método foi estabelecida pelo índice de recuperação em três níveis de concentração dos agrotóxicos na amostra composta. A precisão do método foi estabelecida com base na repetibilidade pela análise de sete replicatas de amostra composta na qual foi adicionada solução de padrões para uma concentração final nos extratos de 100 ng mL⁻¹. Os limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos para os agrotóxicos utilizando o aplicativo do software GC-MS Solution em soluções padrões no extrato. O limite de detecção foi calculado como o menor nível de concentração no qual o agrotóxico foi consistentemente identificado para todos os íons selecionados com uma razão sinal-ruído (S/N) ≥ 3 . O limite de quantificação foi calculado como o menor nível de concentração onde os compostos estudados foram quantificados com confiabilidade e razão sinal/ ruído (S/N) ≥ 10 .

3.11.1 Testes de índice de recuperação

Foram preparados extratos fortificados partindo da amostra composta. A amostra diluída com 10,0 mL de H₂O foi fortificada em três níveis adicionando-se 10 ng mL⁻¹, 50 ng mL⁻¹ e 100 ng mL⁻¹. Foi utilizado procedimento de extração líquido-líquido (item 3.8.3). Os extratos foram injetados em GC-MS em triplicata e as áreas dos picos foram avaliadas utilizando software GC-MS Solutions.

3.12 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS

A determinação de resíduos de agrotóxicos nas amostras enviadas por colaboradores foi feita com a utilização do protocolo de extração líquido-líquido utilizando curva analítica na matriz. Foram analisadas 46 amostras de mel de diferentes regiões do Brasil e vários tipos de floradas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O mel de abelhas pode ser caracterizado de acordo com sua origem polínica e, apesar de controversa, a análise do pólen presente no mel identifica as floradas visitadas pelas abelhas para o recolhimento do néctar necessário para a produção do mel. O interesse pela classificação do mel, neste estudo, se deve ao conhecimento das culturas predominantes presentes no entorno dos apiários. Entretanto, a caracterização das amostras de mel analisadas foi feita de acordo com o preenchimento do formulário de instruções para coleta de amostras, enviado aos colaboradores, e com as informações constantes neles. O número de amostras analisadas permitiu a realização de um

levantamento preliminar sobre resíduos de agrotóxicos encontrados em méis brasileiros que será apresentado ao final deste capítulo.

A tabela geral das amostras analisadas está apresentada no anexo B (Caracterização das amostras reais segundo informação dos colaboradores).

O número de amostras analisadas, seus estados de procedência e a classificação quanto à origem floral está representada na figura 12.

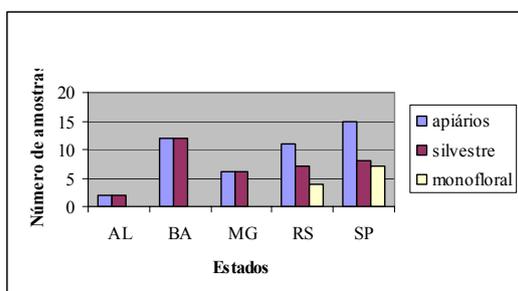


Figura 12. Caracterização das amostras de mel analisadas por estado e origem botânica

Como citado anteriormente, as culturas presentes em um raio de aproximadamente 7 km² dos apiários são os locais mais prováveis de serem visitados pelas abelhas para o recolhimento de néctar e do pólen. Este fato pode estar relacionado com a pulverização produtos químicos nas plantações, feita de maneira incorreta. Além disso, a grande toxicidade de algumas

classes de agrotóxicos pode levar a mortalidade de abelhas ou à contaminação do mel como discutido recentemente (Malaspina, 2008). Quando as abelhas não morrem e voltam para as colméias, pode ocorrer de partículas suspensas no ar serem interceptadas ficando retidas nos pelos superficiais de seu corpo ou serem inaladas e unidas em seu aparelho respiratório. De acordo com Hassani (2005), alguns produtos podem ocasionar efeitos subletais nas abelhas, causando distúrbios no olfato e na percepção de açúcares.

De acordo com informações contidas nos formulários de instrução para coleta de amostras, a distância entre as culturas do entorno e os apiários se mostraram próximas na maioria das amostras enviadas e variaram de 40 m a 2 km em 28 apiários, de 2 km a 10 km em 14 apiários e acima de 10 km em apenas um.

A maioria dos produtores não soube relatar as substâncias que são utilizadas nas culturas no entorno dos apiários (70%). Possivelmente, não existe uma preocupação em relação ao uso de agrotóxicos nas regiões próximas aos apiários. O quadro 4 relaciona os agrotóxicos permitidos pelo MAPA com as culturas predominantes no entorno dos apiários que foram informadas pelos colaboradores no formulário de instruções para coleta das amostras.

Quadro 4. Agrotóxicos permitidos pelo MAPA e culturas no entorno dos apiários fornecedores de amostras de mel de abelha para determinação de resíduos de agrotóxicos

| Agrotóxico | Culturas | Agrotóxico | Culturas |
|------------|--|---------------|---|
| Aldicarb | Arroz; Batata; Café; Cana de açúcar; Laranja | Fenpropatrina | Feijão; Laranja; Milho; Tomate |
| Atrazina | Cana de açúcar Milho; Pinus; Sorgo | Iprodiona | Batata; Feijão; Tomate |
| Captana | Batata; Feijão; Laranja; Milho; Sorgo | Malationa | Arroz; Café; Feijão; Laranja; Milho; Pastagem; Soja |

| Agrotóxico | Culturas | Agrotóxico | Culturas |
|----------------------|---|--------------------|--|
| | | | transgênica; Sorgo; |
| Carbaril | Batata; Feijão; Pastagem; Soja transgênica; Tomate | Paration Metilico | Arroz; Batata; Feijão |
| Carbofurano deg | Arroz; Batata; Café; Cana de açúcar; Laranja; Milho; Tomate | Phorate | Batata; Café; Feijão |
| Cipermetrina | Arroz; Batata; Café; Feijão; Soja; Tomate | Pirimifós Metilico | Arroz; Feijão; Laranja; Milho |
| Clorotalonil | Arroz; Batata; Café; Feijão; Laranja; Pimentão; Tomate | Profenofós | Batata; Café; Feijão; Milho; Tomate |
| Clorpirifós Metilico | Batata; Café; Feijão; Laranja; Milho; Pastagem; Soja transgênica; Sorgo | Simazina | Café; Cana de açúcar; Milho ; Pinus; Sorgo |
| Dimetoato | Tomate | Terbufós | Café; Cana de açúcar; Feijão; Milho |
| Dissulfotom | Café | Tetradifona | Feijão; Pimentão; Tomate |

4.2 TESTE DE SOLVENTES PARA OS PADRÕES DE AGROTÓXICOS

A escolha dos solventes é uma decisão importante para o desenvolvimento de metodologia multirresíduo devido às diferenças nas polaridades dos agrotóxicos e dos solventes envolvidos (Zhen, 2006). Além da solubilidade dos analitos é também importante a solubilidade da matriz.

Foram preparadas e injetadas soluções padrões em três solventes (acetona, acetato de etila e acetonitrila). Vários artigos na literatura utilizam acetona como solventes para agrotóxicos nas análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Bernal, 1996; Volante, 2001; Rissato 2004, 2006, 2007). Padrões em acetato de etila para GC-MS são descritos por Albero, 2004; Sanchez-Brunete, 2005 e 2008. A acetonitrila foi

testada por ser o solvente utilizado no procedimento de extração “QuEChERS”.

Os resultados das injeções em GC-MS para os padrões de agrotóxicos preparados nos diferentes solventes mostraram comportamentos distintos. Foi observada a divisão dos picos nos primeiros segmentos dos cromatogramas para os padrões preparados em acetona e em acetonitrila.

Como exemplo dos resultados obtidos, os cromatogramas de íons selecionados nas figuras 13 e 14 mostram a formação de picos adjacentes ao pico principal dos agrotóxicos isopropoxifenol, carbofurano deg e propomocarb quando dissolvidos em acetonitrila e acetona. Os espectros e as relações entre as intensidades dos íons selecionados indicaram se tratar da mesma substância dividida em vários picos. Observou-se que o efeito foi mais acentuado nos padrões preparados em acetonitrila (figura 13).

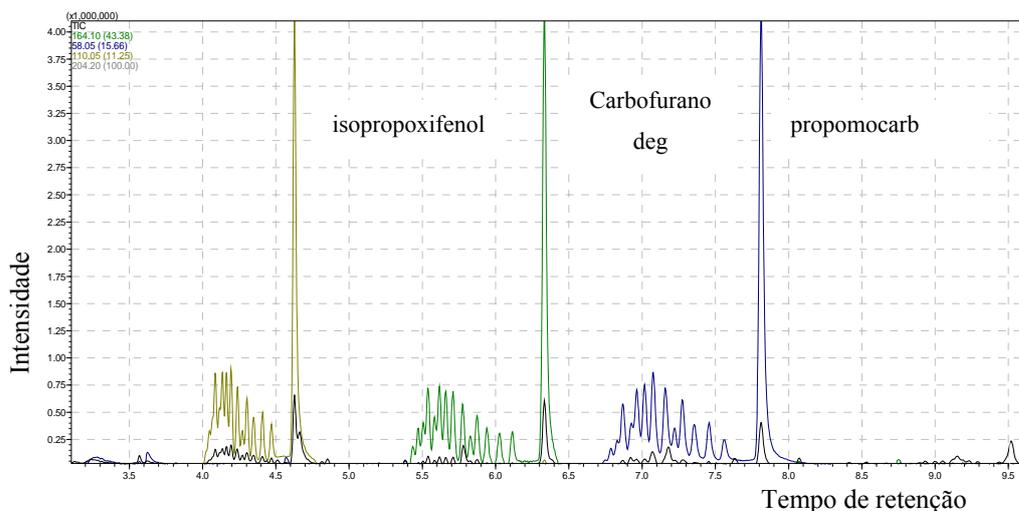


Figura 13. Cromatograma obtido por GC-MS no modo scan para os íons 164, 58 e 110 correspondentes ao isopropoxifenol, carbofurano deg e propomocarb, quando solubilizado em acetonitrila na concentração de 100 ng mL^{-1} .

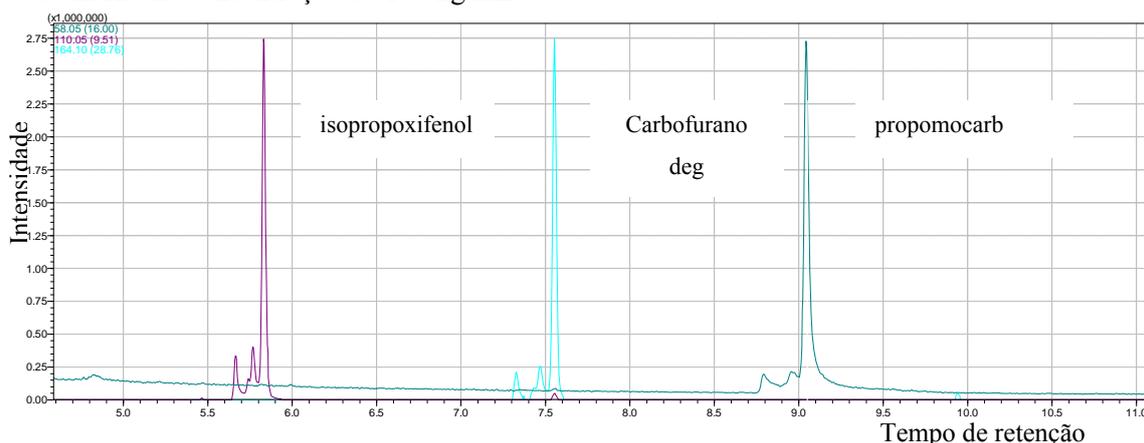


Figura 14. Cromatograma obtido por GC-MS no modo scan para os íons 164, 58 e 110 correspondentes ao isopropoxifenol, carbofurano deg e propomocarb, quando solubilizado em acetona na concentração de 100 ng mL^{-1} .

A divisão dos picos dos analitos com menor temperatura de ebulição e menor afinidade pela coluna, pode ser explicada, provavelmente, em decorrência da pouca interação entre os solventes mais polares e a coluna cromatográfica dificultando a condensação uniforme destes no início da coluna. Neste caso, o efeito concentrador, devido à condensação do solvente no início da coluna, pode ter levado à formação de filmes em diferentes regiões no início da

coluna. A divisão de picos é observada também quando as soluções são preparadas em misturas de solventes de diferentes polaridades.

O cromatograma da figura 15 mostra que os padrões preparados em acetato de etila apresentaram melhor comportamento dos picos. Estes resultados levaram à escolha desse solvente para a preparação das

soluções de padrões de agrotóxicos e para ressuspensão dos extratos das amostras.

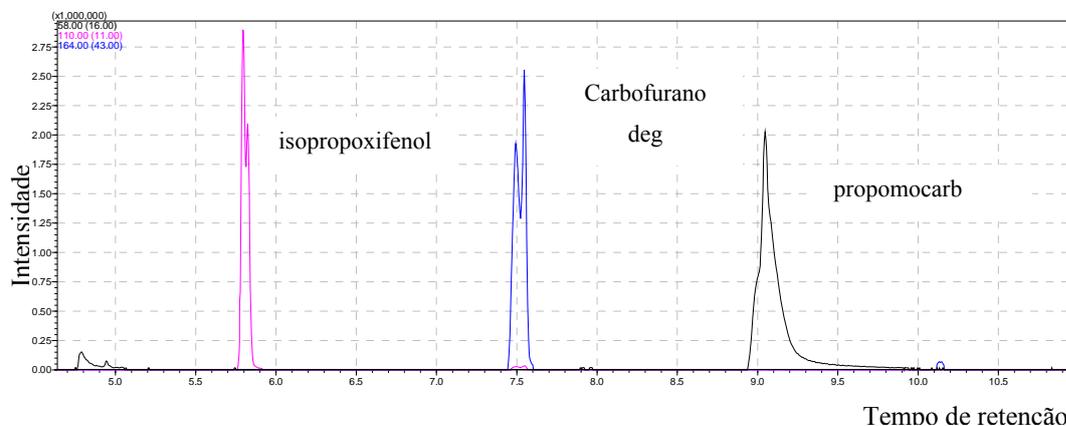


Figura 15. Cromatograma obtido por GC-MS no modo scan para os íons 164, 58 e 110 correspondentes ao isopropoxifenol, carbofurano deg e propomocarb, quando solubilizado em acetato de etila na concentração de 100 ng mL^{-1} .

4.3 OBTENÇÃO DOS TEMPOS DE RETENÇÃO DOS COMPOSTOS ANALISADOS

Para determinação dos resíduos de agrotóxicos por GC-MS, a relação de íons monitorados, os tempos de retenção e os segmentos foram estabelecidos e estão listadas na tabela 9.

Os índices de retenção foram obtidos de bibliotecas do NIST e da SHIMADZU.

Tabela 9. Agrotóxicos analisados por GC-MS; íons monitorados; valores de tempo de retenção (tr), íons monitorados/intensidade relativa, segmento e janela de tempo de aquisição

| Nº | Agrotóxico | Íon monitorado | tr (min) | Índice de retenção | Ions monitorados/intensidade relativa (%) | Segmento | Janela de tempo de aquisição (min) |
|----|---------------------------|----------------|----------|--------------------|---|----------|------------------------------------|
| 1 | Isopropoxur | 110.00 | 12.078 | 1225 | 110 (100) -152 (18) | 1 | 11.12 – 13.50 |
| 2 | Carbofurano | 164.00 | 15.528 | 1313 | 164 (100) -149 (88) -131 (39) | 2 | 13.50 – 16.50 |
| 3 | Dissulfoton | 97.00 | 16.869 | 1339 | 97 (100) -125 (56) -153 (25) | 3 | 16.50 – 19.00 |
| 4 | Carbaril | 144.00 | 20.940 | 1926 | 115 (100) -116 (56) -144 (92) | 4 | 19.00 – 22.00 |
| 5 | Propoxur | 110.00 | 23.453 | 1629 | 110 (100) - 81 (67) -152 (34) | 5 | 22.00 – 24.96 |
| 6 | Phorate | 75.00 | 25.320 | 1713 | 75 (100) - 97 (22) -121 (32) | | |
| 7 | Hexaclorobenzeno | 284.00 | 25.900 | 1740 | 284 (100) - 286 (77) - 282 (58) | 6 | 24.96 – 26.00 |
| 8 | Dimetoato | 87.00 | 26.227 | 1750 | 87(100) - 93 (58) -125 (43) | | |
| 9 | Simazina | 201.00 | 26.356 | 1757 | 201 (100) -186 (59) -173(52) | 7 | 26.00 – 27.30 |
| 10 | Atrazina | 200.00 | 26.557 | 1767 | 200 (100) -215 (64) - 58 (61) | | |
| 11 | Lindane | 181.00 | 27.630 | 1718 | 181 (100) -183 (96) -219 (71) | | |
| 12 | Terbufos | 57.00 | 27.987 | 1795 | 57 (100) - 231 (55) -103 (24) | 8 | 27.30 – 28.50 |
| 13 | Antraceno D ¹⁰ | 188.00 | 27.560 | 0?? | 188 (100) | | |
| 14 | Clorotalonil | 266.00 | 28.913 | 1849 | 266 (100) - 264 (65) - 268 (61) | 9 | 28.50 –29.39 |
| 15 | Vinclozolina | 212.00 | 29.567 | 1914 | 212 (100) - 285 (91) - 214 (70) | | |
| 16 | Paration Metilico | 109.00 | 29.603 | 1916 | 109 (100) -125 (77) - 263 (56) | 10 | 29.39- 30.35 |
| 17 | Heptacloro | 100.00 | 29.900 | 1932 | 100 (100) - 272 (31) - 274 (21) | | |
| 18 | Pirimifos Metilico | 290.00 | 30.704 | 1973 | 290 (100) - 305 (75) -276 (72) | | |
| 19 | Malationa | 127.00 | 31.040 | 1990 | 127 (100) – 173 (95) – 125 (77) - 93 (65) | 11 | 30.35 - 32.00- |
| 20 | Clorpirifos Metilico | 97.00 | 31.500 | 2013 | 97 (100) - 197 (93) - 199 (90) - 314 (79) | | |
| 21 | Heptacloro Epoxide | 81.00 | 32.920 | 2087 | 81 (100) - 353 (73) - 355 (71) | 12 | 32.00 - 33.40 |
| 22 | Captana | 79.00 | 33.560 | 2104 | 79 (100) - 149 (32) - 80 (23) | 13 | 33.40 – 35.05 |
| 23 | Alfa-endossulfan | 195.00 | 34.500 | 2164 | 195 (86) - 241 (82) - 239 (70) | | |
| 24 | Fenamifos | 154.00 | 34.580 | 2178 | 154 (100) - 303 (77) - 195 (33) | | |

| Nº | Agrotóxico | Íon monitorado | tr (min) | Índice de retenção | Ions monitorados/intensidade relativa (%) | Segmento | Janela de tempo de aquisição (min) |
|----|---------------|----------------|----------|--------------------|---|----------|------------------------------------|
| 25 | Profenofos | 139.00 | 34.900 | 2202 | 139 (100) - 97 (91) | | |
| 26 | 4,4-DDE | 246.00 | 35.170 | 2211 | 246 (100) - 248 (62) - 318 (62) | 14 | 35.05 – 36.50 |
| 27 | Dieldrin | 79.00 | 35.300 | 2220 | 79 (100) - 263 (19) - 277 (17) | | |
| 28 | Endrin | 81.00 | 35.806 | 2269 | 81(100) - 263 (97) - 67 (81) | | |
| 29 | 4,4-DDD | 235.00 | 36.761 | 2311 | 235 (100) - 237 (63)-165 (54) | 15 | 36.50 – 39.50 |
| 30 | 4,4-DDT | 235.00 | 38.140 | 2311 | 235 (100) - 237 (63)-165 (54) | | |
| 31 | Iprodiona | 314.00 | 40.084 | 2476 | 314 (100) -316 (65) - 56 (59) | 16 | 39.50 - 40.90 |
| 32 | Fenpropatrina | 97.00 | 40.170 | 2518 | 97 (100) - 55 (59) -181 (69) | | |
| 33 | Metoxicloro | 227.00 | 40.191 | 2517 | 227 (100) - 228 (15) - 212 (6) | 17 | 40.90 - 43.00 |
| 34 | Tetradifona | 159.00 | 41.000 | 2569 | 159 (100) - 227 (60) - 111 (75) | | |
| 35 | Permetrina | 183.00 | 43.440 | 2748 | 183 (100) - 163 (95) - 165 (77) | | |
| 36 | 1Ciflutrina | 163.00 | 44.860 | 2812 | 163 (100) - 165 (65) - 206 (60) | | |
| 37 | 2Ciflutrina | 163.00 | 45.100 | 2824 | 163 (100) - 165 (65) - 206 (60) | | |
| 38 | 3Ciflutrina | 163.00 | 45.300 | 2837 | 163 (100) - 165 (65) - 206 (60) | | |
| 39 | 4Ciflutrina | 163.00 | 45.400 | 2840 | 163 (100) - 165 (65) - 206 (60) | | |
| 40 | 1Cipermetrina | 163.00 | 45.700 | 2858 | 163 (100) - 165 (58) - 181 (51) | 18 | 43.00 -55.00 |
| 41 | 2Cipermetrina | 163.00 | 46.000 | 2862 | 163 (100) - 165 (58) - 181 (51) | | |
| 43 | 3Cipermetrina | 163.00 | 46.220 | 2883 | 163 (100) - 165 (58) - 181 (51) | | |
| 43 | 4Cipermetrina | 163.00 | 46.330 | 2887 | 163 (100) - 165 (58) - 181 (51) | | |
| 44 | 1Deltametrina | 181.00 | 50.800 | 3070 | 181 (100) - 253 (58) - 251 (30) | | |
| 45 | 2Deltametrina | 181.00 | 51.700 | 3102 | 181 (100) - 253 (58) - 251 (30) | | |

4.4 OBTENÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS EM ACETATO DE ETILA

Após a avaliação dos solventes, foram preparadas curvas analíticas em acetato de etila. As curvas adotadas foram quadráticas para os níveis de concentração analisados (10 ng mL⁻¹, 50 ng mL⁻¹, 100 ng mL⁻¹, 200

ng mL⁻¹, 350 ng mL⁻¹ e 500 ng mL⁻¹) (Tabela 10).

Não foram obtidas curvas analíticas para 18 agrotóxicos inicialmente listados na tabela 8. Agrotóxicos analisados por GC-MS; íons monitorados; valores de tempo de retenção (tr), íons monitorados/intensidade relativa, segmento e janela de tempo de aquisição.

Tabela 10. Parâmetros das curvas analíticas obtidos para os agrotóxicos analisados por GC-MS modo SIM, a partir das soluções 10 ng mL⁻¹, 50 ng mL⁻¹, 100 ng mL⁻¹, 200 ng mL⁻¹, 350 ng mL⁻¹ e 500 ng mL⁻¹ em acetato de etila

| Nº | Agrotóxico | m/z | R ² | Equação da curva |
|----|-------------------|-----|----------------|--|
| 1 | Isopropoxifenol | 110 | 0.9997 | $Y = 2.230774e-002X^2 + 73.7912 X + 552.7515$ |
| | | 152 | 0.9998 | $Y = 1.521829e-003 X^2 + 13.03259 X + -208.2643$ |
| | | 164 | 0.9997 | $Y = 9.142763e-002 X^2 + 126.3212 X + -1018.24$ |
| 2 | Carbofurano | 149 | 0.9998 | $Y = 5.906634e-002 X^2 + 93.17393 X + -728.4111$ |
| | | 131 | 0.9999 | $Y = 2.015729e-002 X^2 + 33.79414X + -281.9116$ |
| 3 | Propomocarb | 58 | 0.9999 | $Y = 0.1272525 X^2 + 238.3193 X + -8156.582$ |
| | | 129 | 0.9997 | $Y = 6.604156e-003 X^2 + 4.353974 X + 30.03285$ |
| | | 188 | 0.9998 | $Y = 6.377679e-003 X^2 + 3.904575 X + -24.76413$ |
| 4 | Carbaril | 115 | 0.9999 | $Y = 0.1063263 X^2 + 20.29067 X + -528.6909$ |
| | | 116 | 0.9999 | $Y = 0.183931 X^2 + 33.33956 X + -749.1858$ |
| | | 144 | 0.9999 | $Y = 0.1831035 X^2 + 34.14666 X + -723.6212$ |
| 5 | Propoxur | 110 | 0.9999 | $Y = 0.2161211 X^2 + 191.7891 X + -1253.769$ |
| | | 152 | 0.9999 | $Y = 3.728761e-002 X^2 + 35.44118 X + -502.1257$ |
| 6 | Phorate | 260 | 0.9995 | $Y = 5.880185e-002 X^2 + 2.826317 X + 223.1855$ |
| | | 284 | 0.9999 | $Y = 7.248673e-003 X^2 + 20.83888 X + -257.692$ |
| 7 | Hexacloro-benzeno | 249 | 0.9999 | $Y = 3.25e-004 X^2 + 6.7925 X + 369.5$ |
| | | 142 | 0.9999 | $Y = 1.5e-003 X^2 + 8.86 X + -252.0$ |
| 8 | Dimetoato | 87 | 0.9999 | $Y = 0.2861422 X^2 + 26.54016 X + -104.7864$ |
| | | 201 | 0.9999 | $Y = 0.1084363 X^2 + 39.93705 X + -1312.618$ |
| 9 | Simazina | 173 | 0.9999 | $Y = 8.288791e-002 X^2 + 28.63998 X + -941.3941$ |
| | | 186 | 0.9999 | $Y = 7.948761e-002 X^2 + 30.95518 X + -1152.726$ |
| 10 | Atrazina | 200 | 0.9996 | $Y = 0.2131568 X^2 + 94.86058 X + -1660.472$ |
| | | 215 | 0.9999 | $Y = 0.1026454 X^2 + 56.50602 X + -1864.339$ |
| 11 | Lindano | 109 | 0.9996 | $Y = 0.4112094 X^2 + 0.4112094 X + -10087.04$ |
| | | 219 | 0.9997 | $Y = 0.3900537 X^2 + 499.9221 X + -5535.661$ |
| | | 183 | 0.9997 | $Y = 0.5235871 X^2 + 1061.422 X + -10249.69$ |
| 12 | Tebufôs | 57 | 0.9997 | $Y = 0.5208028 X^2 + 37.2794 X + 1587.56$ |
| | | 231 | 0.9998 | $Y = 0.2209024 X^2 + -4.990558 X + 1224.253$ |
| | | 288 | 0.9999 | $Y = 3.474454e-002 X^2 + -1.947398 X + 110.2661$ |
| 13 | Clorotalonil | 266 | 0.9999 | $Y = 0.2572343 X^2 + 71.82758 X + 28.43542$ |
| | | 264 | 0.9998 | $Y = 0.1729363 X^2 + 39.78502 X + 105.4692$ |
| 14 | Vinclozolina | 178 | 0.9995 | $Y = 0.1988133 X^2 + 95.32105 X + -1630.202$ |
| | | 124 | 0.9995 | $Y = 0.1432913 X^2 + 84.94844 X + -1370.119$ |
| | | 285 | 0.9996 | $Y = 0.2102673 X^2 + 84.98407 X + -1474.239$ |
| 15 | Paration Metilico | 109 | 0.9999 | $Y = 0.1945534 X^2 + 51.36676 X + -1078.787$ |

| Nº | Agrotóxico | m/z | R ² | Equação da curva |
|----|----------------------|-----|----------------|--|
| 16 | Heptacloro | 125 | 0.9999 | $Y = 0.1255024 X^2 + 33.00344 X + -769.3475$ |
| | | 263 | 0.9999 | $Y = 0.1071791 X^2 + 12.24882 X + -275.541$ |
| | | 100 | 0.9998 | $Y = 0.1346096 X^2 + 80.78452 X + -951.3135$ |
| | | 272 | 0.9999 | $Y = .819794e-002 X^2 + 40.73036 X + -917.9209$ |
| | | 337 | 0.9998 | $Y = 2.219941e-002 X^2 + 12.56039 X + -438.6631$ |
| 17 | Pirimifos Metílico | 290 | 0.9999 | $Y = 0.2731713 X^2 + 33.26538 X + -459.3741$ |
| | | 125 | 0.9999 | $Y = 0.1326882 X^2 + 22.70479 X + -537.0625$ |
| 18 | Malationa | 276 | 0.9999 | $Y = 0.2412326 X^2 + 29.06376 X + -406.1663$ |
| | | 127 | 0.9999 | $Y = 0.3396949 X^2 + 50.31949 X + -479.0874$ |
| | | 173 | 0.9999 | $Y = 0.439972 X^2 + 24.77809 X + -210.535$ |
| 19 | Clorpirifos Metílico | 193 | 0.9999 | $Y = 0.2855744 X^2 + 35.66999 X + -378.0008$ |
| | | 97 | 0.9992 | $Y = 0.4509383 X^2 + 232.1217 X + -4617.314$ |
| | | 197 | 0.9994 | $Y = 0.3078267 X^2 + 124.411 X + -2443.759$ |
| 20 | Heptacloro Epoxide | 314 | 0.9992 | $Y = 0.3081624 X^2 + 124.0428 X + -2617.957$ |
| | | 237 | 0.9999 | $Y = 2.02174e-002 X^2 + 11.67951 X + -176.8378$ |
| | | 263 | 0.9999 | $Y = 2.894159e-002 X^2 + 16.61855 X + -327.6496$ |
| 21 | Captana | 81 | 0.9998 | $Y = 9.843124e-002 X^2 + 110.7054 X + -1148.995$ |
| | | 79 | 0.9997 | $Y = 1.9463 X^2 + 586.898 X + -9778.359$ |
| | | 149 | 0.9999 | $Y = 0.5081221 X^2 + 42.45089 X + -762.7027$ |
| 22 | 4,4-DDE | 117 | 0.9999 | $Y = 0.274136 X^2 + 32.43325 X + -988.3493$ |
| | | 246 | 0.9997 | $Y = 0.3187308 X^2 + 267.8553 X + -3044.306$ |
| | | 176 | 0.9996 | $Y = 0.1175234 X^2 + 125.2947 X + -1485.605$ |
| 23 | Dieldrin | 318 | 0.9997 | $Y = 0.222574 X^2 + 207.305 X + -2478.443$ |
| | | 79 | 0.9997 | $Y = 0.2871491 X^2 + 252.53 X + -2671.825$ |
| | | 235 | 0.9999 | $Y = 0.5669537 X^2 + 121.295 X + -1313.383$ |
| 24 | 4,4-DDD | 237 | 0.9996 | $Y = 0.2799908 X^2 + 100.462 X + -1438.303$ |
| | | 165 | 0.9995 | $Y = 0.2826901 X^2 + 131.2485 X + -1933.75$ |
| 25 | 4,4-DDT | 165 | 0.9989 | $Y = 1.648225 X^2 + 1072.469 X + -22002.25$ |
| 26 | Fenpropatrina | 181 | 0.9996 | $Y = 0.4851762 X^2 + 88.07104 X + -1961.68$ |
| 27 | Metoxicloro | 227 | 0.9999 | $Y = 0.6560076 X^2 + 0.6560076 X + -710.4217$ |
| | | 274 | 0.99997 | $Y = 2.666401e-002 X^2 + 8.402752 X + -212.0507$ |

4.5 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS RENDIMENTOS DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Devido à complexidade da matriz e aos baixos níveis de concentração em que os agrotóxicos são encontrados, a preparação das amostras se torna uma importante etapa da análise para a obtenção de resultados confiáveis (Rial-Otero, 2007). A preparação das amostras demanda técnicas de extração e concentração dos analitos para se atingir os limites de sensibilidade dos equipamentos e/ou a eliminação dos possíveis interferentes.

Nos procedimentos para análises de mel, usando cromatografia gasosa e espectrometria de massas descritos na literatura, foi relatado o uso de extrações em fase sólida (SPE - C18) por Alberio (2004); Bernal (1996); Pang (2006) e Sanchez-Brunete (2005 e 2008). Procedimentos usando extração líquido-líquido foram reportados por Bernal (1996); Jimenez (2002); Russo (2002); Blasco (2004 a, b); Rissato (2006 e 2007); Zhen (2006); Erdogrul (2007). O solvente mais utilizado por estes autores para o procedimento de extração líquido-líquido foi o acetato de etila. O procedimento “QuEChERS” foi utilizado para a determinação de agrotóxicos em mel por Barakat (2007).

Uma amostra de mel, adicionada de uma mistura de padrões em concentração final aproximada no extrato de 100 ng mL⁻¹ de cada agrotóxico, foi submetida aos três procedimentos de extração (líquido-líquido, SPE - C18 e “QuEChERS” modificado descritos no item 3.8 na tentativa de se avaliar o procedimento mais adequado para a etapa de extração dos agrotóxicos. Os procedimentos de extração foram realizados em triplicatas e obtidos extratos de uma amostra de mel com adição e sem do padrão antes da extração.

Os resultados preliminares com a coluna de 30 metros mostraram que alguns agrotóxicos não puderam ser analisados nos extratos por GC-MS, nas condições cromatográficas utilizadas devido à sobreposição de picos de componentes da matriz com os mesmos íons dos padrões, nos respectivos tempos de retenção. Os resultados dos rendimentos obtidos para os agrotóxicos para os íons selecionados nos tempos de retenção estabelecidos foram comparados usando gráficos de dispersão dos resultados tipo “boxplot” como representado nas figuras 17, 18 e 19.

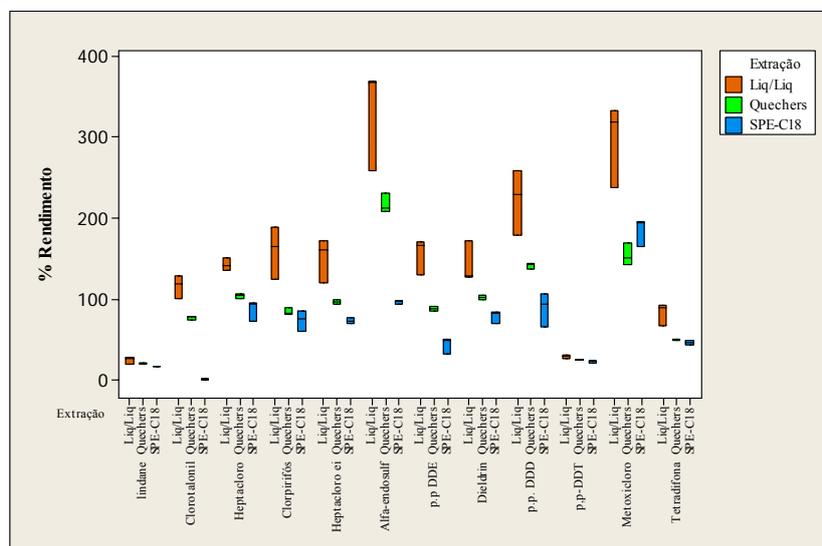


Figura 16. Dispersão dos resultados dos rendimentos de extração para compostos organoclorados usando curva analítica em acetato de etila

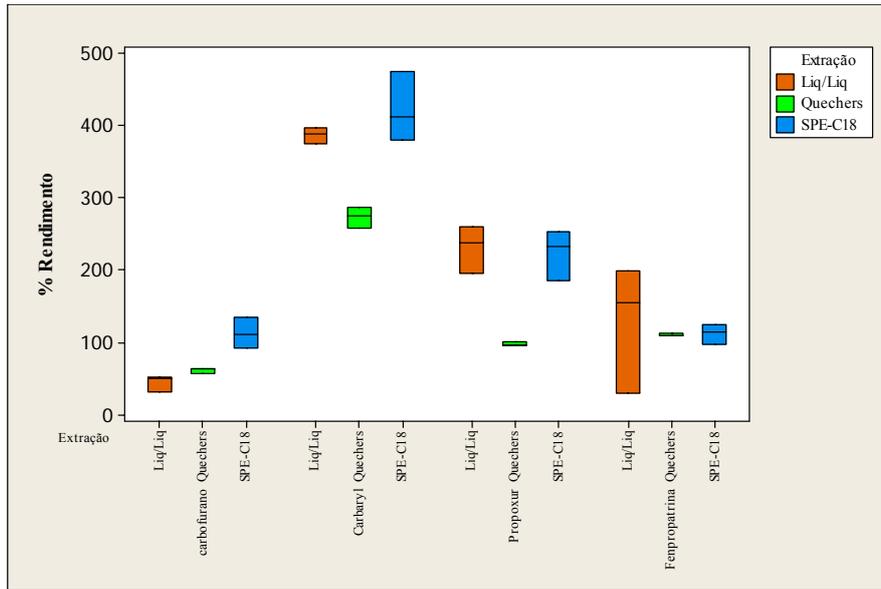


Figura 17. Dispersão dos resultados dos rendimentos de extração para carbamatos e fenpropratina (piretróide) usando curva analítica em acetato de etila

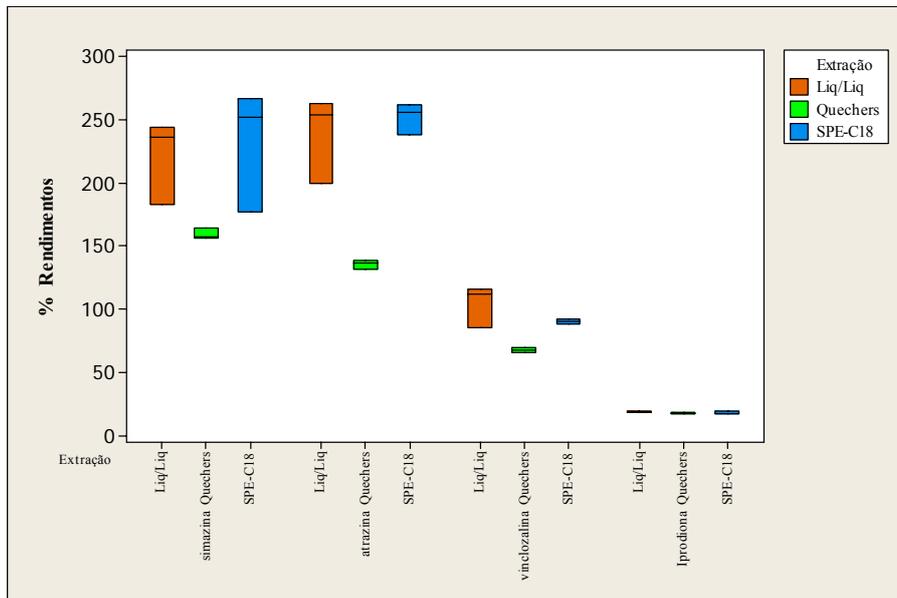


Figura 18. Dispersão dos resultados dos rendimentos de extração para clorotiazinas e dicarboximidas usando curva analítica em acetato de etila

Vários dos resultados, usando curva analítica em solvente, apresentaram rendimentos superiores a 120% para os agrotóxicos avaliados. De forma geral, os resultados para o procedimento de extração líquido-líquido em acetato de etila apresentaram valores de concentração maiores que os outros procedimentos de extração avaliados, particularmente, para os compostos organoclorados. Observou-se, também, uma maior variação entre os resultados das triplicatas nas extrações líquido-líquido em acetato de etila (figura 16). O procedimento de extração “QuEChERS” modificado apresentou % de rendimento mais baixos que o procedimento líquido-líquido e valores superiores aos da extração SPE-C18 para alguns compostos. Os resultados da SPE-C18 apresentaram uma menor variação entre as triplicatas. Apesar disso, os piores rendimentos obtidos foram para o procedimento de extração SPE-C18.

Independentemente dos rendimentos obtidos, a dispersão dos resultados das triplicatas pode ser explicado pelo tipo de matriz e pela dificuldade operacional das técnicas utilizadas.

No procedimento de extração SPE - C18 foram encontradas dificuldades, tais como, a saturação e a obstrução do cartucho.

Líquidos muito viscosos, como o mel, dependem da diluição em água ou da mistura de água e solventes orgânicos para facilitar a passagem da amostra pela fase estacionária do cartucho.

Nesta etapa inicial do trabalho, o procedimento de extração líquido-líquido apresentou algumas dificuldades. Particularmente, pela formação de emulsões, que foram posteriormente resolvidas pelo aumento da rotação na centrifugação.

O procedimento de extração “QuEChERS” foi o que apresentou maior facilidade operacional. A utilização de menores quantidades de solventes, de materiais e de etapas durante a extração torna o procedimento mais rápido e muito mais simples. Talvez por isto, tenha sido encontrada a menor dispersão dos resultados.

Uma vez que não foram detectados agrotóxicos nos extratos da amostra sem adição de padrão, conforme pode ser observado na figura 20, abaixo, os altos rendimentos de extração encontrados podem ser explicados pelo efeito da matriz na transferência de massa dos analitos do injetor para a coluna, conforme será discutido a seguir.

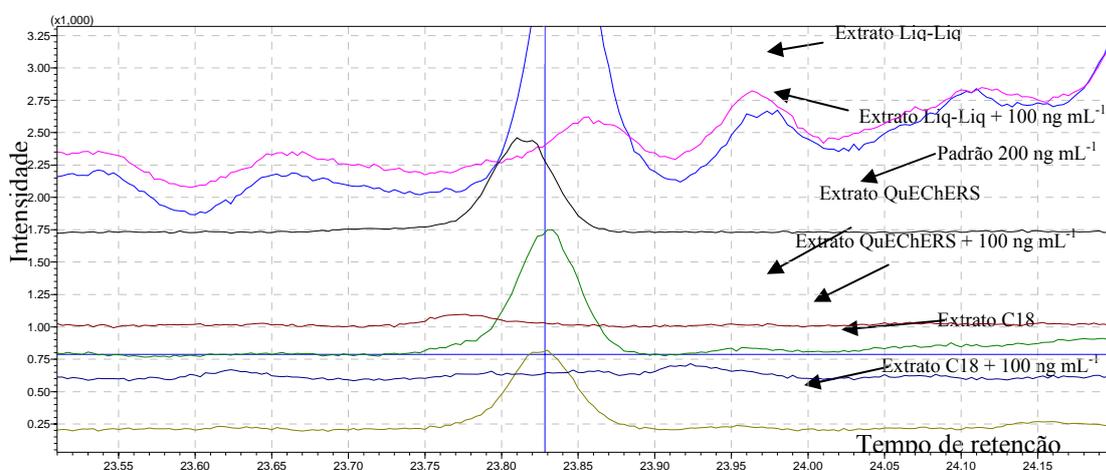


Figura 19. Cromatogramas de íons (m/z 263) para Endrin em diferentes extratos

O procedimento “QuEChERS” foi modificado neste trabalho. A modificação sugerida pelo autor que desenvolveu a técnica (Anastassiades, 2003) foi a utilização do dobro de sulfato de magnésio na etapa de limpeza, para remover os ácidos orgânicos e outros potenciais interferentes da matriz e, assim, melhorar os índices de recuperação nos extratos fortificados. A não utilização do adsorvente (PSA) pode ter influenciado nos resultados obtidos. A outra modificação foi a secagem em atmosfera de nitrogênio do solvente acetonitrila e a ressuspensão dos extratos em acetato de etila. A menor volatilidade da acetonitrila pode ter levado a perdas dos analitos na etapa de secagem dos extratos.

Com base nos dados obtidos, não foi possível afirmar qual dos procedimentos é mais eficiente na etapa de extração dos analitos, uma vez que os extratos obtidos podem ser diferentes na sua composição e os dois fatores, eficiência da extração e transferência de massa do injetor para a coluna, podem estar influenciando nas respostas. No entanto, do ponto de vista prático, a extração líquido-líquido usando acetato de etila apresentou melhores respostas cromatográficas que as outras

duas técnicas. Por isto, esse procedimento de extração foi escolhido para as análises das amostras.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ NAS RESPOSTAS DOS AGROTÓXICOS

O efeito matriz é descrito como a principal fonte de erros nos métodos de análise multirresíduos (Sanchez–Brunete, 2005). No caso do mel, os interferentes mais comuns são pigmentos e carboidratos. Os açúcares compõem cerca de 82% do mel, e, em razão de sua solubilidade parcial em solventes orgânicos, podem ser co-extraídos indesejadamente com os agrotóxicos durante a preparação das amostras (Fernandez, 2001).

Os altos índices de recuperação obtidos em extratos de amostras com o uso de curvas analíticas em solvente foram relatados na literatura. Segundo Erney (1993), a matriz pode proteger os compostos organoclorados da adsorção e decomposição na etapa de vaporização no injetor aquecido, garantindo uma maior transferência de massa do injetor para a coluna quando comparado

com os resultados observados quando os padrões são dissolvidos apenas nos solventes. Em decorrência desse fato, observam-se altos índices de recuperação, com valores bem maiores do que os esperados. Quando as respostas do detector para a solução padrão em solvente são comparadas com a resposta do analito na matriz ocorre um aumento exagerado nos índices de recuperação (Sanchez-Brunete, 2005; Alder, 2006). Os resultados dos procedimentos de extração indicaram esse efeito nas respostas cromatográficas, quando comparadas com a curva analítica obtida apenas em acetato de etila.

Para corrigir o efeito da matriz nas respostas para os testes de validação do método e análise das amostras, novas curvas analíticas foram preparadas em extratos de uma amostra composta contendo cerca de 60 méis diferentes.

Optou-se também pelo uso de uma coluna com a mesma fase estacionária, porém de maior comprimento (60 m) para melhorar a resolução e minimizar a sobreposição de picos de íons de outros compostos presentes na matriz.

4.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

4.7.1 Especificidade

A especificidade do método foi atribuída aos tempos de retenção a aos índices de retenção estabelecidos para os compostos estudados de acordo com a tabela 8. Agrotóxicos analisados por GC-MS; íons monitorados; valores de tempo de retenção (t_r), íons monitorados/intensidade relativa, segmento e janela de tempo de aquisição apresentada no item 3 - Material e métodos.

4.7.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pelas curvas analíticas em extrato da matriz na faixa de 10 ng mL⁻¹ a 300 ng mL⁻¹, utilizando sete níveis de concentração. Foi adicionado a cada amostra antraceno D¹⁰ (50 ng mL⁻¹). Após a análise cromatográfica, as curvas analíticas foram construídas relacionando a razão das áreas dos picos no cromatograma (padrão de agrotóxicos/padrão interno) com a concentração dos agrotóxicos (ng mL⁻¹).

Foram obtidas regressões quadráticas como apresentado na tabela 11. O coeficiente de correlação (R^2) apresentou-se > 0,989 para todos os compostos. As curvas analíticas são apresentadas nos Anexo D.

Dos agrotóxicos selecionados inicialmente na tabela 8, não foram obtidas curvas analíticas adequadas para lindane, dissulfotom, terbufós, clorotalonil, heptacloro, captana, alfa-endossulfan, fenamifós, profenofós, endrin, iprodiona, tetradifona, permetrina, ciflutrina e deltametrina e estes princípios ativos foram descartados do estudo. Os piretróides, por eluírem em altas temperaturas, apresentam íons que são abundantes no “background” pelo sangramento da coluna. Além disto, as soluções padrão foram preparadas nas concentrações da mistura de seus isômeros e não de compostos individuais.

Tabela 11. Parâmetros das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos analisados por GC-MS modo SIM, a partir das soluções 10 ng mL⁻¹; 20 ng mL⁻¹; 50 ng mL⁻¹; 75 ng mL⁻¹; 100 ng mL⁻¹; 150 ng mL⁻¹ e 300 ng mL⁻¹ no extrato da matriz.

| Nº | Agrotóxico | m/z | R ² | Equação da curva |
|----|----------------------|-----|----------------|--|
| 1 | Isopropoxifenol | 110 | 0.9995 | $Y = 9.337529e-006 X^2 + 4.671717e-003 X + -5.095594e-003$ |
| | | 152 | 0.9996 | $Y = 1.572962e-006 X^2 + 8.439833e-004 X + 1.390073e-003$ |
| 2 | Carbofurano deg | 164 | 0.9994 | $Y = 3.620278e-006 X^2 + 1.722257e-003 X + -3.14639e-003$ |
| | | 149 | 0.9997 | $Y = 3.576135e-006 X^2 + 1.306252e-003 X + -6.244584e-004$ |
| | | 131 | 0.9980 | $Y = 1.364112e-006 X^2 + 5.932471e-004 X + 9.257923e-004$ |
| 3 | Carbaril | 116 | 0.9995 | $Y = 3.269874e-006 X^2 + 1.14392e-003 X + -1.723634e-003$ |
| | | 144 | 0.9988 | $Y = 4.894275e-006 X^2 + 2.71835e-003 X + -4.010673e-003$ |
| 4 | Propoxur | 110 | 0.9993 | $Y = -6.281758e-006 X^2 + 9.597525e-003 X + -9.613717$ |
| | | 152 | 0.9964 | $Y = -8.780038e-007 X^2 + 1.819316e-003 X + 3.248855e-002$ |
| 5 | Hexacloro-benzeno | 284 | 0.9930 | $Y = 1.476088e-006 X^2 + 1.836222e-004 X + 5.06086e-003$ |
| | | 282 | 0.9929 | $Y = 8.34585e-007 X^2 + 9.911078e-005 X + 2.912564e-003$ |
| | | 286 | 0.9928 | $Y = 1.08541e-006 X^2 + 1.37215e-004 X + 3.688854e-003$ |
| 6 | Dimetoato | 87 | 0.9974 | $Y = 4.431324e-006 X^2 + 4.133711e-003 X + 5.203642e-002$ |
| | | 201 | 0.9994 | $Y = 1.248198e-006 X^2 + 1.731353e-003 X + 5.646376e-003$ |
| 7 | Simazina | 173 | 0.9958 | $Y = 1.414335e-006 X^2 + 6.928158e-004 X + 1.712776e-002$ |
| | | 186 | 0.9946 | $Y = 4.467509e-007 X^2 + 1.070892e-003 X + 2.632376e-003$ |
| 8 | Atrazina | 200 | 0.9995 | $Y = 3.140883e-006 X^2 + 3.447154e-003 X + 9.097277e-003$ |
| | | 215 | 0.9995 | $Y = 6.96693e-007 X^2 + 2.334627e-003 X + 3.84007e-003$ |
| | | 212 | 0.9892 | $Y = 7.586994e-007 X^2 + 2.523243e-003 X + 7.230573e-002$ |
| 9 | Vinclozolina | 214 | 0.9995 | $Y = 1.409259e-006 X^2 + 1.555339e-003 X + 1.787657e-004$ |
| | | 285 | 0.9996 | $Y = 1.711894e-006 X^2 + 2.210848e-003 X + 1.266449e-003$ |
| 10 | Paration Metilico | 263 | 0.9980 | $Y = 3.136055e-007 X^2 + 2.119796e-003 X + 8.489171e-003$ |
| 11 | Pirimifos Metilico | 290 | 0.9998 | $Y = 2.683077e-006 X^2 + 4.990817e-003 X + 1.771397e-002$ |
| | | 305 | 0.9998 | $Y = 1.459851e-006 X^2 + 3.846907e-003 X + 1.812993e-003$ |
| 12 | Malationa | 127 | 0.9946 | $Y = -3.580486e-006 X^2 + 1.389809e-002 X + 5.959145e-003$ |
| | | 173 | 0.9996 | $Y = 1.251843e-006 X^2 + 1.084276e-002 X + 3.822702e-002$ |
| | | 125 | 0.9929 | $Y = -4.56406e-006 X^2 + 1.20327e-002 X + 9.429846e-002$ |
| 13 | Clorpirifós Metilico | 314 | 0.9995 | $Y = 2.031152e-006 X^2 + 2.083718e-003 X + 8.882846e-003$ |
| | | 199 | 0.9772 | $Y = 6.548323e-007 X^2 + 2.148045e-003 X + 0.4944579$ |
| 14 | Heptacloro Epoxide | 355 | 0.9976 | $Y = 5.182469e-007 X^2 + 1.747613e-004 X + 2.062046e-003$ |
| | | 353 | 0.9897 | $Y = 2.320095e-007 X^2 + 1.736151e-004 X + 3.016223e-003$ |
| | | 246 | 0.9994 | $Y = 5.559583e-006 X^2 + 7.514799e-003 X + 3.935222e-002$ |
| 15 | 4,4-DDE | 248 | 0.9994 | $Y = 3.606233e-006 X^2 + 4.697427e-003 X + 2.868126e-002$ |
| | | 318 | 0.9995 | $Y = 4.874561e-006 X^2 + 3.024065e-003 X + 1.909515e-002$ |
| 16 | Dieldrin | 79 | 0.9964 | $Y = 3.168159e-006 X^2 + 4.506676e-003 X + -4.258014e-003$ |
| | | 235 | 0.9992 | $Y = 6.933184e-006 X^2 + 7.895577e-003 X + 4.537951e-002$ |
| 17 | 4,4-DDD | 237 | 0.9976 | $Y = 1.11376e-005 X^2 + 3.631956e-003 X + 1.905128e-002$ |
| | | 165 | 0.9972 | $Y = 1.492265e-005 X^2 + 2.359342e-003 X + 7.714757e-002$ |
| 18 | 4,4-DDT | 165 | 0.9903 | $Y = -3.781077e-007 X^2 + 1.557289e-003 X + 3.39819e-002$ |
| 19 | Fenpropatrina | 181 | 0.9925 | $Y = 2.47422e-006 X^2 + 3.220815e-003 X + 4.114356e-002$ |
| | | 227 | 0.9986 | $Y = -1.129384e-006 X^2 + 1.00243e-002 X + 4.434129e-002$ |
| 20 | Metoxicloro | 212 | 0.9980 | $Y = -1.199333e-007 X^2 + 7.211745e-004 X + 1.848399e-003$ |

4.7.3 Estudos dos índices de recuperação

A exatidão do método de análise foi determinada pelo estudo dos índices de recuperação para três níveis de fortificação de amostras (1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas nos extratos da matriz, de acordo com o método de extração utilizado conforme item 3.8.3.

Para as amostras analisadas por GS-MS, os resultados foram obtidos pelo monitoramento dos respectivos íons de cada composto (m/z) no modo SIM.

Os melhores índices de recuperação foram obtidos para os agrotóxicos organoclorados e organofosforados. Os resultados dos índices de resposta para os extratos fortificados variaram entre 41,19% a 120,45% da quantidade adicionado dependendo da classe dos agrotóxicos estudados, indicando variações na composição dos extratos obtidos e sua influência nas respostas do espectrômetro de massas. O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação foi menor que 11% para todos os compostos analisados.

Para o hexaclorobenzeno e heptacloro epoxide foram obtidos resultados de índice de recuperação para a concentração de 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 12. Índice de recuperação (%) de agrotóxicos obtidos pela curva analítica em extrato da matriz, íon monitorado, média e DPR de mel fortificado em diferentes níveis de concentração

| N° | Agrotóxico | tr | Íon | Níveis de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | |
|-------------------------|----------------------|--------|-----|--|---------|------------|---------|------------|---------|
| | | | | 1,0 | | 5,0 | | 10,0 | |
| | | | | Média* (%) | DPR (%) | Média* (%) | DPR (%) | Média* (%) | DPR (%) |
| Organoclorados | | | | | | | | | |
| 1 | 4,4-DDE | 35.132 | 246 | nd | nd | 109 | 3 | 101 | 3 |
| | | | 248 | nd | nd | 106 | 2 | 101 | 3 |
| | | | 318 | nd | nd | nd | nd | 109 | 2 |
| 2 | 4,4-DDD | 36.726 | 235 | nd | nd | 102 | 3 | 100 | 5 |
| | | | 237 | nd | nd | 102 | 4 | 110 | 6 |
| | | | 165 | nd | nd | 100 | 8 | 115 | 3 |
| 3 | 4,4-DDT | 38.105 | 165 | nd | nd | 97 | 5 | 92 | 10 |
| 4 | Dieldrin | 35.318 | 79 | nd | nd | 111 | 11 | 98 | 5 |
| 5 | Hexacloro-benzeno | 25.881 | 284 | nd | nd | nd | nd | 99 | 2 |
| | | | 282 | nd | nd | nd | nd | 98 | 6 |
| | | | 286 | nd | nd | nd | nd | 99 | 2 |
| 6 | Heptacloro Epoxide | 32.900 | 355 | nd | nd | nd | nd | 105 | 9 |
| | | | 353 | nd | nd | nd | nd | 114 | 9 |
| 7 | Metoxicloro | 40.157 | 227 | nd | nd | 97 | 3 | 92 | 7 |
| | | | 212 | nd | nd | nd | nd | 95 | 4 |
| 8 | Vinclozolina | 29.525 | 212 | nd | nd | nd | nd | 97 | 3 |
| | | | 214 | nd | nd | 110 | 5 | 102 | 2 |
| | | | 285 | 111 | 3 | 110 | 4 | 101 | 3 |
| Organofosforados | | | | | | | | | |
| 9 | Clorpirifos metílico | 31.470 | 314 | nd | nd | 115 | 6 | 99 | 1 |
| | | | 199 | nd | nd | nd | nd | 97 | 9 |
| 10 | Dimetoato | 26.148 | 87 | nd | nd | 114 | 5 | 104 | 4 |
| 11 | Malationa | 31.012 | 127 | nd | nd | 92 | 5 | 90 | 5 |
| | | | 173 | nd | nd | 97 | 5 | 92 | 4 |

| N° | Agrotóxico | tr | Íon | Níveis de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------|-----|--|---------|------------|---------|------------|---------|
| | | | | 1,0 | | 5,0 | | 10,0 | |
| | | | | Média* (%) | DPR (%) | Média* (%) | DPR (%) | Média* (%) | DPR (%) |
| | | | 125 | nd | nd | nd | nd | 91 | 6 |
| 12 | Paration Metílico | 29.579 | 263 | nd | nd | nd | nd | 95 | 4 |
| 13 | Pirimifos Metílico | 30.663 | 290 | 117 | 3 | 108 | 1 | 101 | 4 |
| | | | 305 | 120 | 2 | 110 | 4 | 100 | 3 |
| 14 | Phorate | 25.282 | 75 | nd | nd | nd | nd | 72 | 4 |
| Carbamatos | | | | | | | | | |
| 15 | Carbaril | 20.993 | 116 | nd | nd | 98 | 1 | 99 | 8 |
| | | | 144 | 92 | 5 | 89 | 4 | 90 | 7 |
| 16 | Carbofurano deg | 15.490 | 164 | nd | nd | 90 | 6 | 85 | 10 |
| | | | 149 | 101 | 9 | 97 | 6 | 88 | 8 |
| | | | 131 | 75 | 9 | nd | nd | 84 | 9 |
| 17 | Isopropoxifenol | 12.038 | 110 | 51 | 9 | 50 | 7 | 41 | 5 |
| | | | 152 | nd | nd | 53 | 6 | 46 | 6 |
| 18 | Propoxur | 23.411 | 110 | nd | nd | 103 | 1 | 98 | 2 |
| | | | 152 | nd | nd | nd | nd | 111 | 2 |
| Clortriazinas | | | | | | | | | |
| 19 | Atrazina | 26.508 | 200 | 100 | 9 | 107 | 7 | 102 | 8 |
| | | | 215 | nd | nd | 107 | 4 | 106 | 10 |
| | | | 201 | 94 | 3 | 105 | 5 | 102 | 7 |
| 20 | Simazina | 26.301 | 173 | nd | nd | nd | nd | 101 | 9 |
| | | | 186 | nd | nd | 102 | 4 | 98 | 9 |
| Piretróides | | | | | | | | | |
| 21 | Fenpropatrina | 40.153 | 181 | nd | nd | nd | nd | 95 | 6 |

4.7.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada com relação à repetibilidade pela determinação do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação, mediante o estudo das amostras fortificadas a $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. As amostras foram injetadas e os resultados

obtidos pela média das concentrações (Tabela 13). O desvio padrão relativo (DPR) variou entre 3,4% e 32,9%. Para algumas substâncias, hexaclorobenzeno, e heptacloro epoxide, além de valores bem acima dos esperados, não houve uma boa repetibilidade.

Tabela 13. Média das concentrações de 7 injeções e DPR (%), de solução de $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de agrotóxicos preparada em extrato da matriz analisados por GC-MS no modo SIM

| N° | Agrotóxico | Íon | Nível de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | |
|----|-----------------|-----|---|---------|
| | | | 10,0 | |
| | | | Média | DPR (%) |
| 1 | Isopropoxifenol | 110 | 7,7 | 6,2 |
| | | 152 | 7,7 | 6,0 |
| | | 164 | 12,5 | 6,9 |
| 2 | Carbofurano deg | 149 | 12,6 | 3,4 |
| | | 131 | 12,8 | 6,2 |

| Nº | Agrotóxico | Íon | Nível de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | |
|----|----------------------|-----|---|---------|
| | | | 10,0 | |
| | | | Média | DPR (%) |
| 3 | Carbaril | 116 | 12,9 | 5,8 |
| | | 144 | 11,4 | 4,7 |
| 4 | Propoxur | 110 | 6,2 | 10,2 |
| | | 152 | 5,8 | 13,6 |
| 5 | Phorate | 75 | 7,0 | 8,9 |
| | | 284 | 29,0 | 96,2 |
| 6 | Hexaclorobenzeno | 282 | 28,6 | 88,4 |
| | | 286 | 29,5 | 104,1 |
| 7 | Dimetoato | 87 | 9,4 | 5,7 |
| | | 201 | 11,2 | 7,1 |
| 8 | Simazina | 173 | 14,3 | 9,7 |
| | | 186 | 11,6 | 6,3 |
| 9 | Atrazina | 200 | 11,1 | 9,7 |
| | | 215 | 11,2 | 4,5 |
| 10 | Vinclozalina | 212 | 9,0 | 9,9 |
| | | 214 | 11,8 | 5,9 |
| 11 | Paration Metílico | 285 | 10,9 | 4,4 |
| | | 263 | 7,5 | 8,7 |
| 12 | Pirimifos Metílico | 290 | 9,1 | 4,6 |
| | | 305 | 8,8 | 4,4 |
| 13 | Malationa | 127 | 7,8 | 3,8 |
| | | 173 | 8,1 | 4,9 |
| 14 | Clorpirifos Metílico | 125 | 9,4 | 5,5 |
| | | 314 | 11,5 | 7,6 |
| 15 | Heptacloro Epoxide | 199 | 3,4 | 32,9 |
| | | 355 | 41,8 | 157,8 |
| 16 | 4,4-DDE | 353 | 40,2 | 142,3 |
| | | 246 | 11,0 | 8,3 |
| 17 | Dieldrin | 248 | 11,2 | 8,99 |
| | | 318 | 13,7 | 13,4 |
| 18 | 4,4-DDD | 79 | 12,6 | 10,9 |
| | | 235 | 10,7 | 6,9 |
| 19 | 4,4-DDT | 237 | 12,1 | 7,7 |
| | | 165 | 12,3 | 9,7 |
| 20 | Fenpropatrina | 165 | 5,2 | 8,5 |
| | | 181 | 10,1 | 26,9 |
| 21 | Metoxicloro | 227 | 6,8 | 5,7 |
| | | 212 | 9,0 | 7,9 |

4.7.5 Estimativa dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos para os agrotóxicos utilizando o aplicativo do software GC-MS Solution em soluções padrões no extrato. Os resultados são descritos na tabela 13.

As razões entre sinal/ruído foram calculadas para o menor nível de

concentração de padrões no qual o agrotóxico foi consistentemente identificado para todos os íons selecionados, com razão sinal/ruído (S/N) ≥ 3 . Baseado nas razões S/R obtidas nas respectivas concentrações dos padrões, os limites de detecção e quantificação foram calculados para concentrações estimadas como $S/R \geq 3$ e $S/R \geq 10$ respectivamente. Não foram considerados os índices de recuperação no estabelecimento dos limites de detecção e quantificação.

Tabela 14. Relação sinal/ruído calculado para soluções padrão de agrotóxicos (10 ng mL⁻¹) e limites de detecção e limite de quantificação estimados.

| Nº | Agrotóxico | m/z | S/R | LD (ng mL ⁻¹) | LQ (ng mL ⁻¹) |
|----|----------------------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | Isopropoxifenol | 110 | 7,58 | 4,0 | 13,2 |
| | | 152 | 59,60 | 0,5 | 1,7 |
| | | 164 | 18,27 | 1,6 | 5,5 |
| 2 | Carbofurano | 149 | 14,38 | 2,1 | 7,0 |
| | | 131 | 4,13 | 7,3 | 24,2 |
| | | 116* | 5,0 | 6,0 | 40,0 |
| 3 | | | 17,6 | 3,4 | 11,4 |
| | | 110 | 14,42 | 2,1 | 6,9 |
| 4 | Propoxur | 152 | 10,95 | 2,7 | 9,1 |
| | | 284 | 6,63 | 4,5 | 15,1 |
| 5 | Hexacloro-benzeno | 282 | 3,29 | 9,1 | 30,4 |
| | | 286 | 5,07 | 5,9 | 19,7 |
| | | 87* | 7,91 | 7,6 | 25,3 |
| 6 | Dimetoato | 201 | 13,33 | 2,3 | 7,5 |
| | | 173* | 4,85 | 12,4 | 41,2 |
| 7 | Simazina | 186 | 15,72 | 1,9 | 6,4 |
| | | 200 | 26,29 | 1,1 | 3,8 |
| | | 215 | 2,56 | 11,7 | 39,1 |
| 8 | Atrazina | 212 | 28,38 | 1,1 | 3,5 |
| | | 214* | 17,89 | 3,4 | 11,2 |
| | | 285 | 70,25 | 0,4 | 1,4 |
| 9 | Vinclozolina | | | | |
| 10 | Paration Metilico | 263 | 23,00 | 1,3 | 4,3 |
| | | 290 | 20,21 | 1,5 | 4,9 |
| 11 | Pirimifos Metilico | 305 | 34,20 | 0,9 | 2,9 |
| | | 127* | 5,32 | 11,3 | 37,6 |
| 12 | Malationa | 173 | 20,15 | 1,5 | 5,0 |
| | | 125* | 8,74 | 6,9 | 22,9 |
| 13 | Clorpirifos Metilico | 314 | 22,55 | 1,3 | 4,4 |
| | | 199 | 15,62 | 1,9 | 6,4 |
| 14 | Heptacloro | 355** | 11,22 | 13,4 | 44,6 |

| Nº | Agrotóxico | m/z | S/R | LD (ng mL ⁻¹) | LQ (ng mL ⁻¹) |
|----|----------------|------|-------|---------------------------|---------------------------|
| | Epoxide | 353* | 9,69 | 6,2 | 20,6 |
| 15 | 4,4-DDE | 246 | 17,40 | 1,7 | 5,7 |
| | | 248 | 9,08 | 3,3 | 11,0 |
| | | 318 | 22,47 | 1,3 | 4,5 |
| 16 | Dieldrin | 79** | 8,22 | 18,2 | 60,8 |
| 17 | 4,4-DDD | 235 | 26,97 | 1,1 | 3,7 |
| | | 237* | 10,83 | 5,5 | 18,5 |
| | | 165 | 12,87 | 2,3 | 7,8 |
| 18 | 4,4-DDT | 165 | 28,47 | 1,1 | 3,5 |
| 19 | Fenpropratrina | 181 | 4,34 | 6,9 | 23,0 |
| 20 | Metoxicloro | 227 | 72,82 | 0,4 | 1,4 |
| | | 212* | 7,45 | 4,0 | 13,4 |

*S/R calculado para soluções de 20 ng mL⁻¹

**S/R calculado para soluções de 50 ng mL⁻¹

4.8 DETERMINAÇÃO RESÍDUOS AGROTÓXICOS AMOSTRAS

DE
DE
EM

Foram analisadas 46 amostras de mel procedentes de vários estados brasileiros (Anexo B) para determinação de resíduos de agrotóxicos. Foram detectados compostos em oito amostras conforme os resultados apresentados na tabela 14.

Tabela 15. Resíduos dos agrotóxicos estudados ($\mu\text{g kg}^{-1}$) encontrados em amostras de mel de diferentes regiões brasileiras

| Agrotóxico | Nível de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | |
|----------------------|--|-------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| | A002* | A006* | A014* | A033* | A052* | A054* | A069* | A073* |
| Carbaril | nd | 1,2 | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| Dimetoato | nd | nd | nd | nd | nd | nd | <2,53 | 5,5 |
| Simazina | nd | nd | nd | <0,64 | <0,64 | <0,64 | nd | nd |
| Clorpirifos metílico | nd | 11,0 | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| Dieldrin | 6,4 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd |
| Fenpropratrina | nd | nd | 2,0 | nd | nd | nd | nd | nd |

* Código das amostras analisadas

nd: não detectado

Todos os compostos foram encontrados em muito baixas concentrações e, para algumas amostras, estavam abaixo do limite de quantificação estabelecido neste trabalho.

Os compostos encontrados nas amostras, dieldrin (A002), carbaril (A006), fenpropratrina (A014), clorpirifós metílico (A006) e dimetoato (A069 e A073), são

regulamentados pela Instrução Normativa nº 9. Entretanto, os valores encontrados nas amostras estão abaixo dos limites estabelecidos pela legislação cujos valores permitidos para os limites de quantificação são 10 µg kg⁻¹ para dieldrin (aldrin), 37 µg kg⁻¹ para carbaril, 10 µg kg⁻¹ para fenprotrina, 24,3 µg kg⁻¹ para clorpirifós e 20 µg kg⁻¹ para dimetoato.

Para os outros compostos, simazina (A033, A052 e A054), não existem limites de quantificação estabelecidos pela legislação brasileira.

Apesar da amostra A002 ser proveniente de um apiário localizado a 800 m de área de mata nativa, foi detectado a presença de dieldrin. O composto, da classe dos organoclorados, tem sua utilização restrita sendo somente permitido para órgãos públicos. Seu uso foi diminuído por sua persistência ambiental, tendência a acúmulo no organismo e o aumento da resistência dos insetos.

A amostra A006 é identificada como monofloral com predominância de pólen de laranja e o apiário está localizado a 500 m de plantação de cana de açúcar e laranjeira. Nesta amostra, foi detectada a presença de carbaril. De acordo com o MAPA, este composto é permitido para as culturas de batata, feijão, soja, tomate e em pastos. O outro composto detectado foi o clorpirifós metílico que é permitido para a cultura de laranja indicando que a contaminação do mel pode estar relacionada com a proximidade da cultura.

O apiário correspondente à amostra 14, identificada como monofloral, está localizado junto à plantação de girassol. O piretróide da classe dos inseticidas, fenprotrina, foi detectado nesta amostra e apesar de seu uso não ser específico para a cultura de girassol sua modalidade de emprego está relacionada com as culturas de algodão, café, cebola, citros, crisântemo, feijão, gladiolo, maçã, mamão, milho,

morango, repolho, rosa, soja e tomate. O agrotóxico simazina foi detectado em três amostras. A amostra A054 é proveniente de área de plantação de café onde o uso da simazina é permitido como herbicida. A presença de simazina nas amostra A052, identificada como silvestre e próxima a plantações de tomate e pimentão, não era esperada. Porém, de acordo com os resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA da ANVISA, é comum a prática de utilização de agrotóxicos não autorizados para as culturas de tomate e pimentão (ANVISA, 2008).

Nas amostra A069 e A073 foi detectado o composto dimetoato. A presença de pastos e plantação de eucalipto próxima à amostra A069 pode não estar relacionada com o composto encontrado. Para a amostra A073, a presença do dimetoato pode estar relacionada com o possível uso deste agrotóxico já que ele é permitido para a cultura de frutíferas junto ao apiário.

5 CONCLUSÕES

Foi desenvolvida metodologia analítica multirresíduos para a determinação de 20 agrotóxicos de diferentes classes (organoclorados, carbamatos, organofosforados, clorotriazinas e piretróides) em amostras de mel de abelhas (*Apis sp*) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Foram avaliadas três metodologias de extração e concentração de agrotóxicos descritas na literatura, extração SPE - C18, extração em fase sólida dispersiva (“QuEChERS”) e extração em solvente (líquido-líquido). Das metodologias avaliadas para preparação de amostras, a técnica de extração e concentração de analitos que envolveu a extração por solvente com a utilização de acetato de etila e posterior “clean up” com cartucho florisil foi a técnica que apresentou melhores respostas para os analitos na cromatografia

gasosa/espectrometria de massas. Desta forma, foi escolhida para as etapas de validação e análises de amostras.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) utilizada como técnica para a determinação de resíduos de agrotóxicos se mostrou eficiente para o monitoramento de vários compostos. O modo de aquisição por monitoramento de íons específicos (“single ion monitoring” - SIM) mostrou ser essencial devido à alta sensibilidade e especificidade que confere à análise suplantando, em parte, os problemas encontrados em relação à complexidade da matriz e à co-eluição de compostos indesejáveis. Por outro lado, a complexidade da matriz nos extratos de mel impossibilitou a análise de vários outros agrotóxicos devido a co-eluição de substâncias presentes em altas concentrações na matriz e que continham os mesmos íons fragmentos dos analitos.

Foi constatado o aumento na intensidade dos íons dos analitos em soluções nos extratos da matriz mel quando comparados com soluções em solvente nas mesmas concentrações. O estabelecimento de curvas analíticas obtidas em extratos da matriz foi determinante no sentido de corrigir o seu efeito na resposta dos analitos. Foram obtidas curvas analíticas com ajuste para regressão quadrática, os valores dos coeficientes de determinação para todos os agrotóxicos avaliados foram superiores 0,989.

Os estudos de validação demonstram que a metodologia utilizada apresentou excelente repetibilidade (% RSD entre 3,4 a 13,6) e que os índices de recuperação para todos os agrotóxicos ficaram entre 92% a 115%, exceto para o isoproxyfenol (41%) e phorato (72%) para a concentração no menor limite de quantificação ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) descrito na Instrução Normativa nº 9 do MAPA.

Os limites de detecção calculados variaram de 0,4 a $13,4 \text{ ng mL}^{-1}$ dependendo do composto e do íon monitorado. Da mesma forma, o limite de quantificação apresentou resultados entre 1,4 e $60,8 \text{ ng mL}^{-1}$.

Apesar da recomendação da Instrução Normativa nº 9 para utilização da técnica GC-MS para a determinação de agrotóxicos em mel, a utilização de detectores mais específicos como captura de elétrons e nitrogênio-fósforo deveriam ser consideradas para o monitoramento de classes específicas de agrotóxicos devido às características químicas dos compostos. Por exemplo, na análise de piretróides (deltametrina, cipermetrina e ciflutrina) que eluem em altas temperaturas, os íons presentes como sangramento da coluna podem mascarar os íons fragmentos específicos dos analitos.

Foram encontrados agrotóxicos em oito amostras das 46 amostras analisadas. Apesar de ser encontrados em baixas concentrações, menores que os limites da legislação, alguns agrotóxicos podem estar relacionados com a sua aplicação nas culturas do entorno dos apiários.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERO, B., SANCHEZ-BRUNETE, C. e TADEO, J. L. Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.*, v.52, p.5828-5835, 2004.

ALMEIDA, D. *Espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em área de cerrado do município de Pirassununga, Estado de São Paulo*. 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., ŠTAJNBAHER, D., et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC*. v. 86, p 412-431. 2003.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.*, v.63, p. 549-562, 1998.

ANVISA. Agrotóxicos e toxicologia. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias>. Acessado em 04/04/2009.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Nota técnica. 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/NOTICIAS/2008/230408.htm>. Acessado em 04/04/2009.

ANVISA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos Pesticide residues in food. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Rev. Saúde Pública*, v. 40, p. 361-363, 2006.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; et al. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC–MS or LC–MS/MS?. *Mass Spectrom. Rev.* v.25, p. 838– 865. 2006.

ARAUCO, E.M.R. *Avaliação da qualidade do mel e atividade da enzima invertase em Apis melifera L. africanizada*. 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu, Botucatu.

ARRUDA, C.M.F. Características físico-químicas e polínicas de amostras de méis de *Apis melifera L.*, 1758 (Hymenoptera, Apidae) da região da Chapada do Araripe, município de Santana do Cariri, Estado do

Ceará. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba.

ARVANITOYANNIS, I. S.; CHALHOUB, C.; GOTSIOU, P.; et al. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.45, p.193-203, 2005.

AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A., SOUZA, S. R.; et al. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chem.*, v.80, p.249-254, 2003.

BALAYIANNIS, G.E BALAYIANNIS, P. Bee Honey as an Environmental Bioindicator of Pesticides’ Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece. *Arch Environ Contam. Toxicol.* 2007.

BARAKAT A. A.; BADAWY H. M. A.; SALAMA E.; et al. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. *J. Food Agr. Environ.*, v.5, p.97-100, 2007

BARONI, M. V.; CHIABRANDO, G. A.; COSTA, C.; et al. Assessment of the floral origin of honey by SDS-page immunoblot techniques. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.1362-1367, 2002.

BARONI, M. V.; NORES, M. L.; DIAZ, M. D.; et al. Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*, v.54, p.7235-7241, 2006.

- BASTOS, D. H. M.; FRANCO, M.; SILVA, M. et al. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.22, p.2002.
- BENETTI, C.; PIRO, R.; BINATO, G.; et al. Simultaneous determination of lincomycin and five macrolide antibiotic residues in honey by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Addit. Contam.*, v.23, p.1099-1108, 2006.
- BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J. A.; RTVERA, J.M et al. Determination of the fungicide vinclozolin in honey and bee larvae by solid-phase and solvent extraction with gas chromatography and electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. .*, v.754, p.507-513, 1996.
- BERNAL, J. L.; JIMÈNEZ, J. J. DEL NOZAL, M. J. A et al. Gas chromatographic determination of acrinathrine and 3-phenoxybenzaldehyde residues in honey. *J. Chromatogr. .*, v.882, p.239-243, 2000.
- BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; TORIBIO, L.; et al. High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples. *J. Chromatogr. .*, v.787, p.129-136, 1997.
- BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; TORIBIO, L.; et al. A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. *J. Sep. Sci.*, v.28, p.1039-1047, 2005.
- BLASCO, C.; FERNNDEZ, M.; PENA, A.; et al. Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.8132-8138, 2003.
- BLASCO, C.; LINO C.M.; PICÓ, Y.; et al. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v.1030, p.77-85, 2004a.
- BLASCO, C.; LINO C.M.; PICÓ, Y.; et al. Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. *J. Chromatogr. A*, v.1049, p.155-160, 2004b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11/07/1989. *Diário Oficial da União*. Brasília 08/01/2002. Seção 1, Página 1, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. *Diário Oficial da União*; Poder Executivo, Brasília, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. *Diário Oficial da União*. Brasília, Seção 1 p. 16-17, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 50. Programas de Controle de Resíduos em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2006. *Diário Oficial da União*. Brasília, 1, 3-3, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 30 de março de 2007. Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2007. *Diário*

Oficial da União Brasília 04/04/2007 Seção 1, p. 7, 2007.

CAMPILLO, N.; PENALVER, R.; AGUINAGA, N.; ET.AL. Solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection for multiresidue determination of pesticides in honey. *Analytica Chimica Acta*, v. 562, p. 9–15, 2006.

CAMPOS, G. *Melato no mel e sua determinação através de diferentes metodologia*. 1998. 178 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASTRO-VAZQUEZ, L., DIÁAZ-MAROTO, M. C.e REZ-COELLO, S. P. Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 4809-4813, 2006.

COLLINS, C. H. Introdução a métodos cromatográficos Ed.UNICAMP, Campinas, 1997.

CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; et al. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. *J. Agric. Food Chem.*, v.46, p.1844-1849, 1998.

CRANE, E. *O livro do mel*. 2a ed. São Paulo: Nobel, 1998.

CODEX ALIMENTARIUS METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.

EMPREENDEDOR. Disponível em <http://www.empreendedor.com.br/?pid=28&cid=2019>. Acessado em 20 de janeiro de 2007.

ERNEY, D. R.; GILLESPIE, A. M E GILVYDIS D. M. Matrix-induced peak enhancement of pesticides in gas chromatography: Is there a solution? *Journal of Chromatography A*, v. 638, p.57-63, 1993.

FERNÁNDEZ, M., et al Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, p. 257–265, 2001.

FERNÁNDEZ M.; PICÓ, Y.; MANES, J. Rapid Screening of Organophosphorus Pesticides in Honey and Bees by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatographia*, v., 56, p. 577-583, 2002. FERNÁNDEZ, M. SANCHO, M. T.; GÁNDARA, J S.; et al. Organochlorine pesticide residues in Galician (NW Spain) Honeys *Apidologie*. v.26. p. 33 – 38. 1995.

HERMOSIN, I.; CHICON, R. M. e CABEZUDO, M. D. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chem.*, v.83, p.263-268, 2003.

HASSANI, A. K. E.; DACHER M. ; GAUTHIER M.; et al. Effects os sublethal doses of fipronil on the bahavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharm. Biochem. Behav.*, Oxford, v. 82, n. 1, p. 30-39. 2005.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Portal do Governo de Estado de São Paulo. *Mel: Câmbio E Embargo Europeu Podem Prejudicar Exportações* Em 2006. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=5209>. Acessado em 29 de janeiro de 2007.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. 2nd Edition, 1997.

JIMÈNEZ J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M.J.; et al. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A*, v.829, p. 269–277, 1998a.

JIMÈNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; et al. Capillary gas chromatography with mass spectrometric and atomic emission detection for characterization and monitoring chlordimeform degradation in honey. *J. Chromatogr. A*, v.946, p.247-253, 2002.

JIMÈNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M.J.; et al. Determination of rotenone residues in raw honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v.871, p.67-73, 2000.

JIMÈNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M.J.; et al. Gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil column. Influence of the honey matrix on the quantitative results. *J. Chromatogr. A*, v.823, p.381-387, 1998b.

JÚNIOR, H. A. M.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. P.; et al. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). *Quim. Nova*, v.29, p.2006.

KAROUI, R.; DUFOUR, E.; BOSSET, J. O.; et al. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chem.*, v.101, p.314-323, 2007.

KORTA, E.; BAKKALI, A. L.; BERRUETA, A.; et al. Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. *J. Agric. Food Chem.*, v.49, p.5835-5842, 2001.

LANÇAS, F. M., *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*, v.6, São Carlos, Editora RiMa, 2004.

LEOTHAY, S. J. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticide Residues. In Press Pesticide Analysis in Methods in Biotechnology, Eds. J.L. Vidal Martinez and A. Garrido Frenich, Humana Press, USA. Nov, 2004.

LOPEZ, M.; FELDLAUFER, M.; WILLIAMS, A. D.; et al. Determination and confirmation of Nitrofurans Residues in Honey Using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* v. 55, p. 1103-1108, 2007.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F. et al. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a agricultura brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 17 E DE MELIPONICULTURA, 3, Belo Horizonte, MG, CD-ROM .2008.

MARCHINI, L.C., SODRÉ, G. S.; MORETI, A. C.; et al. Composição físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera L.* do Estado do Tocantins, Brasil. *Bol. Ind. Anim.*, p.101-114, 2004.

MARTEL, A. C. e ZEGGANE, S. Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J. Chromatogr. A*, v.954, p.173-180, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Sistema Agrofit. Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_con

[s/principal_agrofit_cons.](#) Acessado em 05/04/2009.

MDIC/SECEX. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR/SECRETARIA DO COMÉRCIO EXTERIOR. Disponível em www.desenvolvimento.gov.br. Acessado em 07/01/2009.

MOELLER, N.; MUELLER-SEITZ, E.; SCHOLZ, O.; et al. A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor. *Eur. Food Res. Technol.*, v.224, p.285-292, 2007.

NEWMAN, J.F. Pesticides. In: Pesticides application methods. Singapore: Logman & Technical. Cap.1, p.1-16, 1979.

NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; et al. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p.3095-3100, 2005.

PANG, G. F; et al. Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, v. 23, No 8, p. 777–810, 2006.

PATZOLD, R. e BRUCKNER, H. Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as result of the Maillard reaction. *Eur. Food Res. Technol.*, v.223, p.347-354, 2006.

PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MARK, D.; et. Al. 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. *Anal Bioanal Chem.* v. 389:1697–1714, 2007.

PEREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; et al. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.360-365, 2007.

PICO', Y, BLASCO, C. E FONT, G. Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spec. Rev.*, v. 23, p, 45–85, 2004.

PIRARD, C.; WIDART J.; NGUYENB, B.K.; et al. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v.1152, p.116-123, 2007.

PIRINI, A.; CONTE, L. S.; FRANCIOSO, O. et al. Capillary Gas-Chromatographic Determination of Free Amino-Acids in Honey As A Means of Discrimination Between Different Botanical Sources. *Hrc-J. High Res. Chrom.*, v.15, p.165-170, 1992.

POOLE, C. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1158, p. 241–250, 2007.

RELATÓRIO ADECA. Estudo da viabilidade sócio-econômica de determinadas culturas no município de Amparo. Disponível em: http://www.amparo.sp.gov.br/prefeitura/des_economico/relatorio_adeca.pdf. Acessado em 05/10/2005

RIAL-OTERO, R.; et al. Chromatographic-based methods for pesticide determination

in honey: An overview. *Talanta*, v.71, p.503-514, 2007.

RISSATO, S, GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N. et al. Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de agrotóxicos na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. *Quim. Nova*, v. 29, No. 5, p.950-955, 2006.

RISSATO, S. LIBÂNIO, M., GIAFFERIS, G. P.; et al. Determinação de agrotóxicos organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP) *Quim. Nova*, v. 27, No. 5, 739-743, 2004b.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N.; et al. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A*, v.1048, p.153-159, 2004a.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO B.; MARTÍN G.; et al. Determination of Pesticide Residues by GC-MS Using Analyte Protectants to Counteract the Matrix Effect *Anal.Sci.*, v. 21, p. 1291-1296, 2005.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; ALBERO, B. et al. Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography. *Spa. J. Agr. Res.*, v. 6 (Special issue), p. 7-14, 2008.

SHEN, H. Y. e JIANG, H. L. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. *Anal. Chim. Acta*, v.535, p.33-41, 2005.

SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias. Normas de uso de praguicidas da Sucen. Sorocaba, SUCEN, Serviço Regional, 1990.

US-FDA Confirmation Of Multiple Phenicol Residues In Honey By Electrospray LC/MS. Laboratory Information Bulletin, v.18, n. 5.,2002.

US-FDA Preparation and LC/MS/MS Analysis of Honey for Fluoroquinolone Residues. CFSAN/Office of Plant and Dairy Foods. 2006. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/fluoroqu.html>. Acessado em 02/05/2009.

US-FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods. 1994. Disponível em <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/cm3.pdf>. Acessado em 02/05/2009.

VARGAS, T. *Avaliação da qualidade de mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná*. 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

VAZ, C. M, R, et al Análise de agrotóxicos por técnicas eletroanalíticas. Comunicado técnico. Embrapa Nº 7, p.1-12, 1996.

VOLANTE, M.; GALARINI, R.; MIANO, V.; et al. A SPME-GC-MS Approach for Antivarroa and Pesticide Residues Analysis in Honey. *Chromatographia*, v. 54, p. 241-246, 2001.

ANEXO A. Formulário de instruções para coleta de amostras

Formulário para coleta de mel
Instruções

Este formulário se destina à obtenção de informações sobre a coleta de amostras de mel para análise de resíduos de pesticidas.

As informações contidas são confidenciais e somente serão utilizadas como dados para trabalho científico da Escola de Veterinária/UFG.

As informações deverão ser precisas para que expressem a realidade de cada apiário e, assim, a veracidade da pesquisa. Os frascos para a coleta devem ser de vidro e serão enviados para o endereço solicitado previamente.

A identificação dos frascos deverá ser a mesma constante no formulário. Cada amostra deverá ser acompanhada de um formulário. Deverão ser coletadas 200 g de cada amostra.

Definição de pesticida: Para os fins desta pesquisa, pesticida será definido como qualquer substância utilizada para o controle de pragas de colméias ou culturas que, normalmente, são acaricidas, herbicidas, inseticidas. Sinônimos: defensivos agrícolas, praguicidas, agrotóxicos. As amostras deverão ser enviadas ao endereço abaixo:

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais/CETEC
Setor de Biotecnologia e Tecnologia Química
Av. José Cândido da Silveira, 2000 – Horto
Cep: 31170-000 Belo Horizonte/MG
At. Carla Pittella/ SDB
E-mail: carla.pittella@cetec.br
31 3489 2331

| | | | | | | | |
|--|----------|--------------|------------|--------------|--------|-------------------|--|
| Nome/Amostra nº | | | | | | Data de produção: | |
| | | | | | | Data de envase: | |
| Produtor | | | | | | | |
| Registro | | | | | | | |
| Endereço do apiário | | | | | | | |
| Estado/Cidade | | | | | | | |
| Localização (GPS) | | | | | | | |
| (Marcar X) Classificação | | | | | | | |
| Origem | | Floral | | Meliponídeo | Melato | | |
| | | Silvestre | Monofloral | | | | |
| Indicar o pólen predominante | | | | | | | |
| Obtenção do mel do favo | | | | Apresentação | | | |
| escorrido | prensado | centrifugado | líquido | cristalizado | favos | filtrado | |
| Cor | | | | | | | |
| Informações sobre pesticidas | | | | | | | |
| Tipos de pesticidas (acaricidas ou outros) usados nas colméias | | | | | | | |
| Tipos de culturas do entorno | | | | | | | |
| Proximidade de culturas da região com o apiário (km ou metros) | | | | | | | |
| Tipos de pesticidas usados nas culturas | | | | | | | |
| Época de aplicação dos pesticidas | | | | | | | |

ANEXO B. Caracterização da amostras reais segundo informação dos colaboradores

ANEXO B. Caracterização da amostras reais segundo informação dos colaboradores

| Nº | Id amostra | Cidade | Estado | Tipo | Pólen predominante | Cor | Pesticidas colméias | Culturas próximas | Proximidade de culturas | Pesticidas usados em culturas próximas |
|----|------------|----------------|--------|------------|--------------------|-------------|---------------------|--|-------------------------|---|
| 1 | A002 | Lagoa | RS | silvestre | | âmbar | ni | mata nativa | 800 m | ni |
| 2 | A004 | Lagoa Vermelha | RS | silvestre | ni | âmbar | fumigação enxofre | soja e milho | 100 m | imidacloprid, semevin, fipronil, triazol, estrobilurina, mancozeb |
| 3 | A005 | Brotas | SP | monofloral | laranjeira | clara | ni | cana de açúcar e laranja | 500 m | ni |
| 4 | A006 | Brotas | SP | monofloral | laranjeira | clara | ni | cana de açúcar e laranja | 500 m | ni |
| 5 | A007 | Brotas | SP | monofloral | laranjeira | clara | ni | cana de açúcar e laranja | 500 m | ni |
| 6 | A008 | Campo Grande | RS | silvestre | cipó-uva | âmbar | ni | milho | 3 km | ni |
| 7 | A009 | Jardim | RS | silvestre | ni | ni | ni | matas e cerrado | ni | ni |
| 8 | A010 | Catas Altas | MG | silvestre | eucalipto | Âmbar | ni | eucalipto, milho, cana de açúcar e capineira | 1 km | Ivomec |
| 9 | A011 | Belo Horizonte | MG | silvestre | eucalipto | âmbar | nenhum | Eucalipto, capineira | 1 km | malation |
| 10 | A012 | Catas Altas | MG | silvestre | eucalipto | Âmbar claro | ni | eucalipto, milho, Cana de açúcar e capineira | 1 km | Ivomec |
| 11 | A013 | Cruz Alta | RS | monofloral | ni | clara | nenhum | soja | 20 m | inseticida e herbicida |
| 12 | A014 | Cruz Alta | RS | monofloral | ni | amarelo | nenhum | girassol | junto | inseticida |
| 13 | A015 | Bauru | SP | silvestre | cipó uva | clara | nenhum | laranja sorgo pastagens | 2 km | ni |
| 14 | A016 | Bauru | SP | silvestre | faveiro | marrom | nenhum | laranja sorgo pastagens | 1.5 km | ni |

| Nº | Id amostra | Cidade | Estado | Tipo | Pólen predominante | Cor | Pesticidas colméias | Culturas próximas | Proximidade de culturas | Pesticidas usados em culturas próximas |
|----|------------|-------------------|--------|------------|----------------------|---------------|---------------------|---|-------------------------|--|
| 15 | A018 | Redenção da Serra | SP | silvestre | ni | âmbar | ni | eucalipto e flor nativa | ni | ni |
| 16 | A019 | Taubaté | SP | silvestre | ni | âmbar | nenhum | milho, arroz, hortaliças | 500 m | malation, folecour, supabor |
| 17 | A022 | Paraibuna | SP | silvestre | ni | amarelo âmbar | nenhum | mata atlântica, eucalipto | 2 km | herbicidas, formicidas |
| 18 | A023 | Marechal Deodoro | AL | silvestre | ni | caramelo | nenhum | cana de açúcar, fruteiras, mata atlântica | 100 m a 300 m | herbicidas, outros |
| 19 | A024 | Rio largo | AL | silvestre | ni | caramelo | nenhum | cana de açúcar, sabiá, mata, mamona, feijão e capim | 100 m a 500 m | ni |
| 20 | A025 | Conchal | SP | monofloral | laranjeira | amarelo | ni | laranja | 40 m | inseticidas, acaricidas, abamectina |
| 21 | A026 | Aguai | SP | monofloral | laranjeira | amarelo | ni | laranja | 40 m | inseticidas, acaricidas, abamectina |
| 22 | A027 | Limeira | SP | monofloral | laranjeira | amarelo | ni | laranja | 40 m | inseticidas, acaricidas, abamectina |
| 23 | A030 | Palmeiras | BA | silvestre | Silvestre | âmbar 50 mm | nenhum | mata nativa, tomate e pimentão | 10 km | ni |
| 24 | A031 | Palmeiras | BA | silvestre | Silvestre | âmbar escuro | nenhum | mata nativa | 10 km | ni |
| 25 | A032 | Palmeiras | BA | silvestre | candeia e assa-peixe | âmbar | nenhum | mata nativa, hortaliças, tomate e pimentão | 5 Km | ni |
| 26 | A033 | Palmeiras | BA | silvestre | candeia e assa-peixe | claro | nenhum | mata nativa, pasto, tomate e pimentão | 15 Km | ni |
| 27 | A034 | Palmeiras | BA | silvestre | ni | âmbar | nenhum | mata tomate e pimentão | 10 Km | ni |

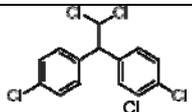
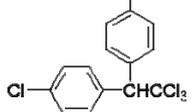
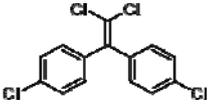
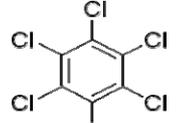
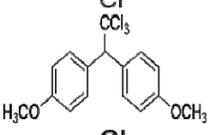
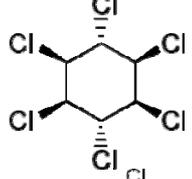
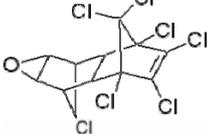
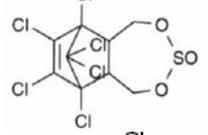
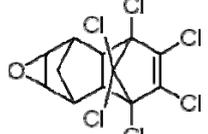
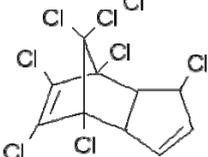
| Nº | Id amostra | Cidade | Estado | Tipo | Pólen predominante | Cor | Pesticidas colméias | Culturas próximas | Proximidade de culturas | Pesticidas usados em culturas próximas |
|----|------------|------------------|--------|------------|---------------------|---------------|---------------------|--|-------------------------|--|
| 28 | A035 | Palmeiras | BA | silvestre | ni | claro | nenhum | mata nativa, pasto, tomate e pimentão | 10 Km | ni |
| 29 | A036 | Palmeiras | BA | silvestre | Silvestre | âmbar 80 mm | nenhum | mata nativa | 5 Km | ni |
| 30 | A037 | Palmeiras | BA | silvestre | Silvestre | claro | nenhum | mata nativa, tomate e pimentão | 5 Km | ni |
| 31 | A040 | Palmeiras | BA | silvestre | Silvestre | claro 46 mm | nenhum | mata nativa | 5 Km | ni |
| 32 | A046 | Palmeiras | BA | silvestre | Silvestre | âmbar | nenhum | mata nativa | 8 Km | ni |
| 33 | A050 | Palmeiras | BA | silvestre | silvestre | claro-âmbar | nenhum | mata nativa, tomate e pimentão | 6 Km | ni |
| 34 | A052 | Palmeiras | BA | silvestre | silvestre | âmbar | nenhum | mata nativa, tomate e pimentão | 5 Km | ni |
| 35 | A054 | Cajuru | SP | silvestre | ni | âmbar claro | nenhum | cana de açúcar, café, matas ciliares de cerrado, pasto | 200m a 300 m | ni |
| 36 | A055 | Nova Europa | SP | silvestre | laranja, eucalipto | âmbar escuro | nenhum | laranja, restos de mata ciliar, eucalipto | 50 m | inseticidas |
| 37 | A056 | Ribeirão Preto | SP | silvestre | aroeira, assa-peixe | marrom escuro | nenhum | cana de açúcar, pasto, hortaliças | 600 m | ni |
| 38 | A057 | São Simão | SP | monofloral | eucalipto e cerrado | âmbar | nenhum | eucalipto e cerrado | 50 m | ni |
| 39 | A057a | Cacheira do Sul | RS | monofloral | eucalipto | âmbar | nenhum | nenhum | ni | ni |
| 40 | A058 | Cachoeira do Sul | RS | monofloral | soja | claro | nenhum | feijão e soja | junto | Glifosato metalaxil-M endossulfan |
| 41 | A059 | Cachoeira do Sul | RS | silvestre | ni | âmbar | nenhum | soja e arroz | 3 km | ni |
| 42 | A060 | Santa Bárbara | MG | silvestre | ni | âmbar claro | nenhum | mata nativa, pastagem e eucalipto | junto | ni |

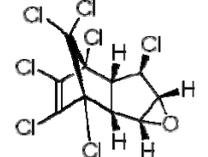
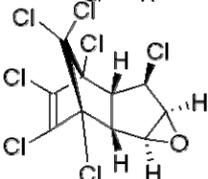
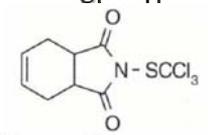
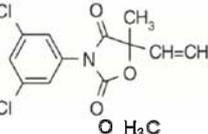
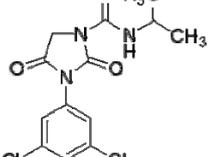
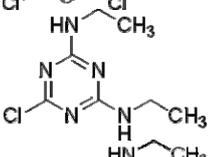
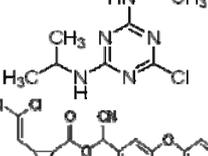
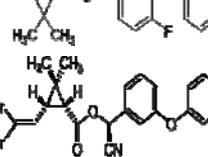
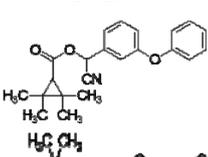
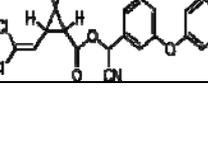
| Nº | Id amostra | Cidade | Estado | Tipo | Pólen predominante | Cor | Pesticidas colméias | Culturas próximas | Proximidade de culturas | Pesticidas usados em culturas próximas |
|----|------------|---------------------------|--------|-----------|--|-------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------|--|
| 43 | A062 | São Gonçalo do Rio Abaixo | MG | silvestre | ni | âmbar claro | nenhum | mata nativa, café e eucalipto | junto | ni |
| 44 | A069 | Petim | RS | silvestre | Eucalipto, <i>Senecio ssp.</i> , astrapéia | âmbar claro | nenhum | eucalipto, laranjeira, arroz | ni | ni |
| 45 | A073 | Rolante | RS | silvestre | ni | âmbar | nenhum | milho, mandioca, frutíferas | junto | ni |
| 46 | A074 | Santa Bárbara | MG | silvestre | ni | âmbar | nenhum | eucalipto | 100 m | ni |

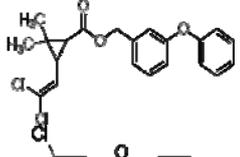
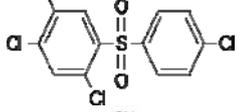
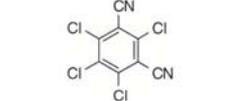
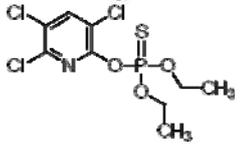
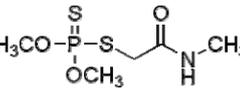
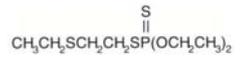
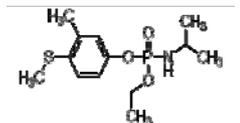
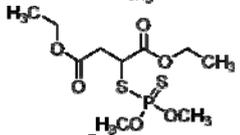
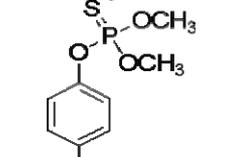
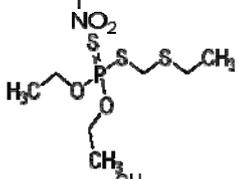
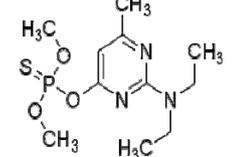
ni: não informado

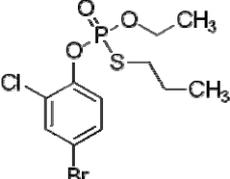
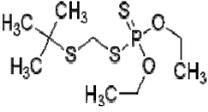
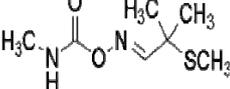
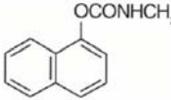
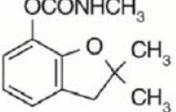
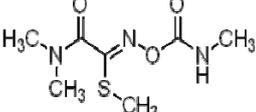
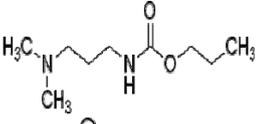
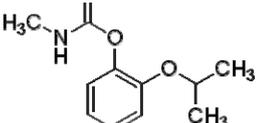
ANEXO C. Pesticidas seleccionados

ANEXO C Pesticidas seleccionados

| Pesticida | Grupo quimico | Fórmula química | Fórmula estructural | Massa |
|------------------|------------------|-----------------------|--|--|
| 4.4 DDD(TDE) | | $C_{14}H_{10}Cl_4$ |  | 319.9514 320.9587(+) 318.9441(-) |
| 4.4 DDT | | $C_{14}H_9Cl_5$ |  | 353.9124 354.9196(+) 352.9051(-) |
| 4.4-DDE | | $C_{14}H_8Cl_4$ |  | 317.9358 318.9430(+) 316.9285(-) |
| Hexaclorobenzeno | Organoclorados | C_6Cl_6 |  | 283.8104 284.8177(+) 282.8031(-) |
| Metoxicloro | | $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$ |  | 344.0140 345.0213(+) 343.0067(-) |
| Lindane | | $C_6H_6Cl_6$ |  | 290.830 |
| Dieldrin | Clorociclodienos | $C_{12}H_8Cl_6O$ |  | 379.8682 380.8755(+) 378.8609(-) |
| Alfa-Endossulfan | | $C_9H_6Cl_6O_3S$ |  | 405.8143 406.8216(+) 404.8070(-) |
| Endrin | | $C_{12}H_8Cl_6O$ |  | 379.8682 380.8755(+) 378.8609(-) |
| Heptachlor | | $C_{10}H_5Cl_7$ |  | 371.8185 372.8258(+) 370.8112(-) |

| Pesticida | Grupo químico | Fórmula química | Fórmula estrutural | Massa |
|----------------------|---------------|--------------------------|--|--|
| Heptacloro epoxide A | | $C_{10}H_5Cl_7O$ |  | 387.8134 388.8207(+) 386.8062(-) |
| Heptacloro epoxide B | | $C_{10}H_5Cl_7O$ |  | 387.8134 388.8207(+) 386.8062(-) |
| Captana | | $C_9H_8Cl_3NO_2S$ |  | 300.9317 301.9390(+) 299.9244(-) |
| Vinclozalina | Dicarboximida | $C_{12}H_9Cl_2NO_3$ |  | 284.9961 286.0034(+) 283.9889(-) |
| Iprodiona | | $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$ |  | 330.170 |
| Simazina | Clorotriazina | $C_7H_{12}ClN_5$ |  | 201.0782 202.0855(+) 200.0710(-) |
| Atrazina | | $C_8H_{14}ClN_5$ |  | 215.0939 216.1012 214.0866(-) |
| Ciflutrina | Piretróide | $C_{22}H_{18}Cl_2FNO_3$ |  | 433.0651 434.0724(+) 432.0578(-) |
| Deltametrina | | $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ |  | 504.9721 505.9724(+) 503.9648(-) |
| Fenpropatrina | | $C_{22}H_{23}NO_3$ |  | 349.1678 350.1751(+) 348.1605(-) |
| Cipermetrina | | $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ |  | 416.303 |

| Pesticida | Grupo químico | Fórmula química | Fórmula estrutural | Massa |
|--------------------|---------------------|------------------------|--|--|
| Permetrina | | $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ |  | 390.0793 391.0865(+) 389.0720(-) |
| Tetradifona | Clorodifenilsulfona | $C_{12}H_6Cl_4O_2S$ |  | 355.8819 356.8892(+) 354.8746(-) |
| Clorotalonil | Isoftalonitrila | $C_8Cl_4N_2$ |  | 265.912 |
| Clorpirifós | Organofosforados | $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ |  | 350.9239 351.9311(+) 349.9166(-) |
| Dimetoato | | $C_5H_{12}NO_3PS_2$ |  | 228.9997 230.0070(+) 227.9925(-) |
| Dissulfotom | | $C_8H_{19}O_2PS_3$ |  | 274.0287 275.0360(+) 273.0214(-) |
| Fenamifós | | $C_{13}H_{22}NO_3PS$ |  | 303.1060 304.1133(+) 302.0987(-) |
| Malationa | | $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ |  | 330.0363 331.0435(+) 329.0290(-) |
| Paration metílico | | $C_8H_{10}NO_5PS$ |  | 263.0019 264.0091(+) 261.9946(-) |
| Phorate | | $C_7H_{17}O_2PS_3$ |  | 260.0130 261.0203(+) 259.0057(-) |
| Pirimifós metílico | | $C_{11}H_{20}N_3O_3PS$ |  | 305.0965 306.1037(+) 304.0892(-) |

| Pesticida | Grupo químico | Fórmula química | Fórmula estructural | Massa |
|-------------|---------------------------------|-------------------------|--|--|
| Profenofós | | $C_{11}H_{15}BrClO_3PS$ |  | 373.9334 374.9406(+) 372.9261(-) |
| Terbufós | | $C_9H_{21}O_2PS_3$ |  | 288.0443 289.0516(+) 287.0371(-) |
| Aldicarb | Metilcarbamato de oxima | $C_7H_{14}N_2O_2S$ |  | 190.0777 191.0850(+) 189.0704(-) |
| Carbaril | Metilcarbamato de naftila | $C_{12}H_{11}NO_2$ |  | 201.0790 202.0863(+) 200.0717(-) |
| Carbofurano | Metilcarbamato de benzofuranila | $C_{12}H_{15}NO_3$ |  | 221.1052 222.1125(+) 220.0979(-) |
| Oxamyl | Carbamato | $C_7H_{13}N_3O_3S$ |  | 219.0679 220.0752(+) 218.0606(-) |
| Propamocarb | | $C_9H_{20}N_2O_2$ |  | 188.1525 189.1598(+) 187.1452(-) |
| Propoxur | Metilcarbamato de fenila | $C_{11}H_{15}NO_3$ |  | 209.1052 210.1125(+) 208.0979(-) |

ANEXO D. . Curvas analíticas em acetato de etila

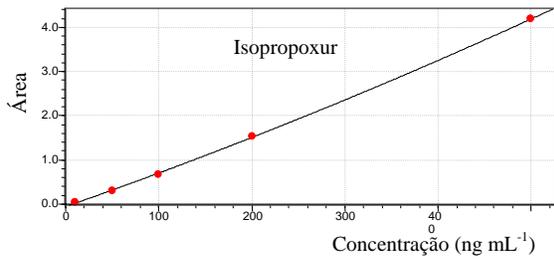


Figura 1. Curva analítica para isopropoxur (m/z 110)

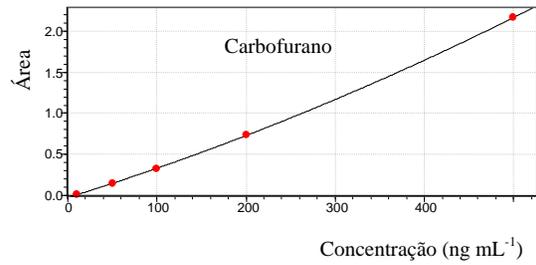


Figura 5. Curva analítica para carbofurano (m/z 131)

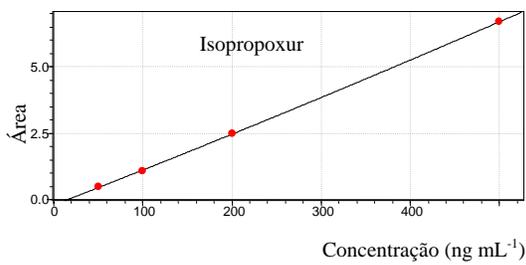


Figura 2. Curva analítica para isopropoxur (m/z 152)

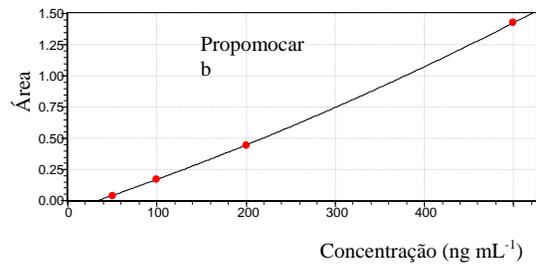


Figura 6. Curva analítica para propomocar b (m/z 58)

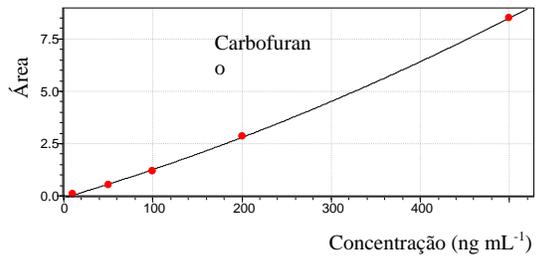


Figura 3. Curva analítica para carbofurano (m/z 164)

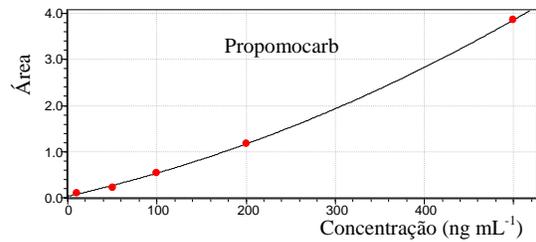


Figura 7. Curva analítica para propomocar b (m/z 129)

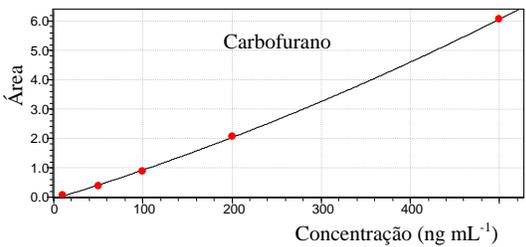


Figura 4. Curva analítica para carbofurano (m/z 149)

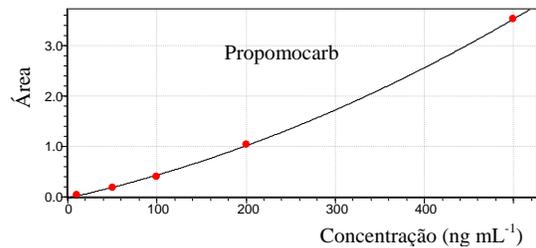


Figura 8. Curva analítica para propomocar b (m/z 188)

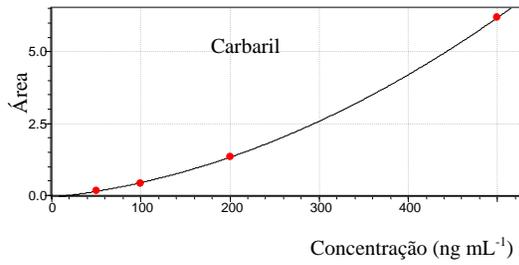


Figura 9. Curva analítica para carbaril (m/z 115)

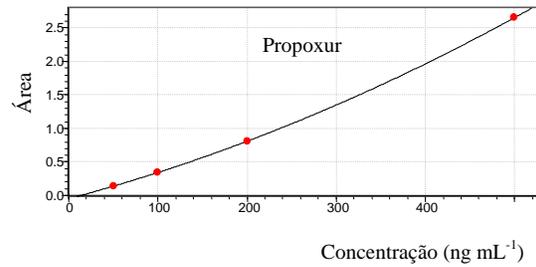


Figura 13. Curva analítica para propoxur (m/z 152)

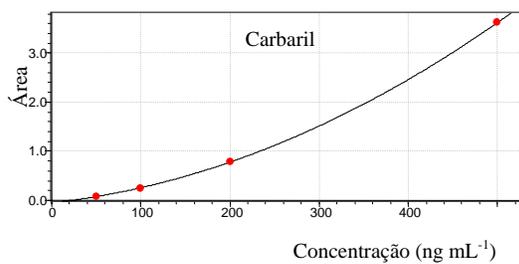


Figura 10. Curva analítica para carbaril (m/z 116)

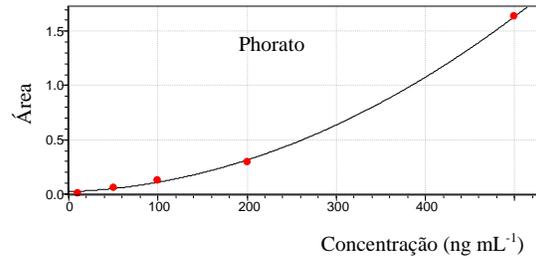


Figura 14. Curva analítica para phorato (m/z 260)

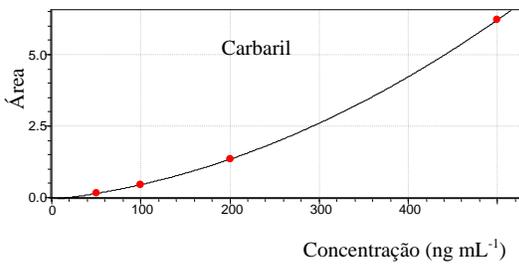


Figura 11. Curva analítica para carbaril (m/z 144)

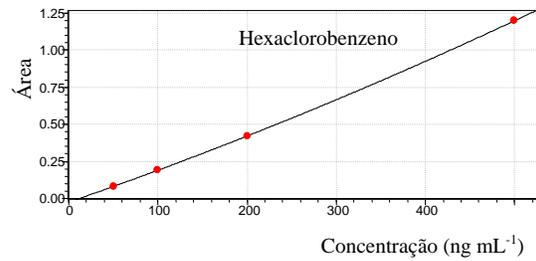


Figura 15. Curva analítica para hexaclorobenzeno (m/z 284)

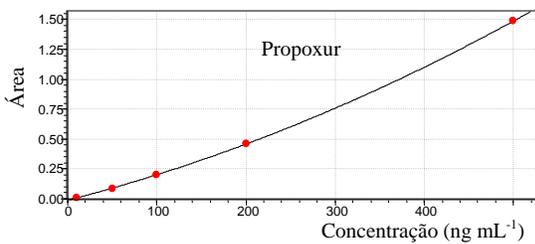


Figura 12. Curva analítica para propoxur (m/z 110)

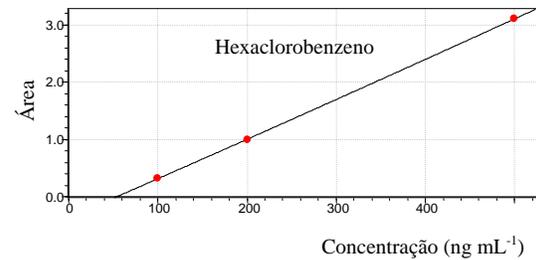


Figura 16. Curva analítica para hexaclorobenzeno (m/z 249)

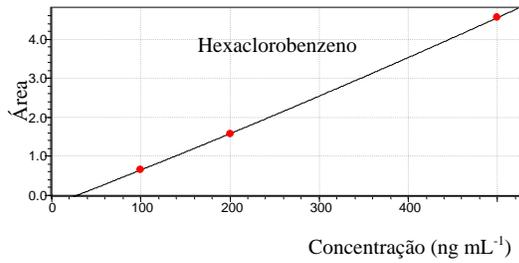


Figura 17. Curva analítica para hexaclorobenzeno (m/z 142)

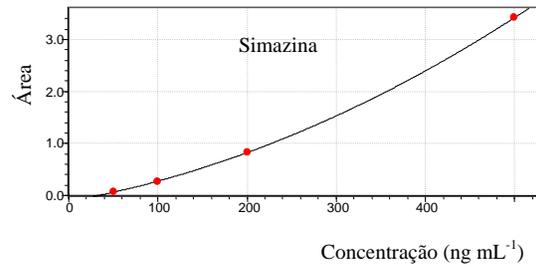


Figura 21. Curva analítica para simazina (m/z 186)

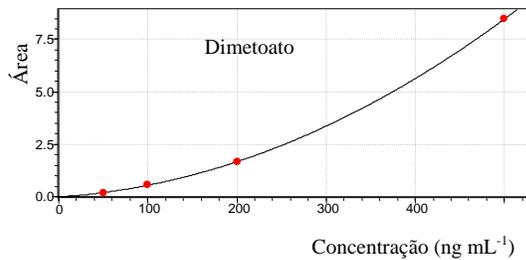


Figura 18. Curva analítica para dimetoato (m/z 87)

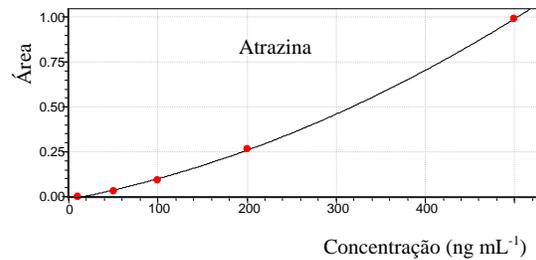


Figura 22. Curva analítica para atrazina (m/z 200)

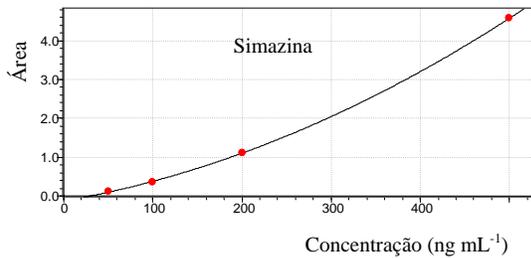


Figura 19. Curva analítica para simazina (m/z 201)

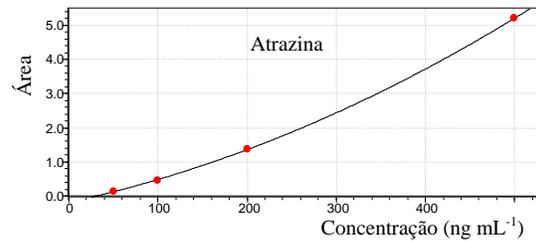


Figura 23. Curva analítica para atrazina (m/z 215)

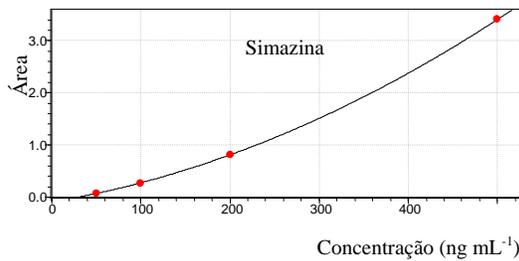


Figura 20. Curva analítica para simazina (m/z 173)

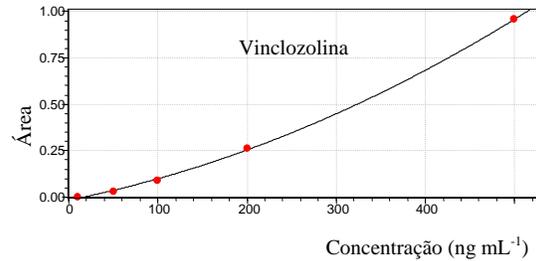


Figura 24. Curva analítica para vinclozolina (m/z 178)

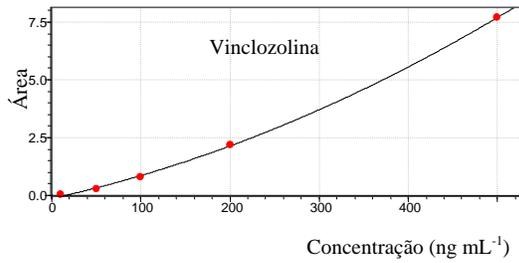


Figura 25. Curva analítica para vinclozolina (m/z 124)

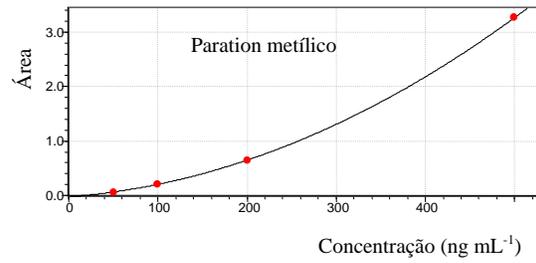


Figura 29. Curva analítica para paration metílico (m/z 263)

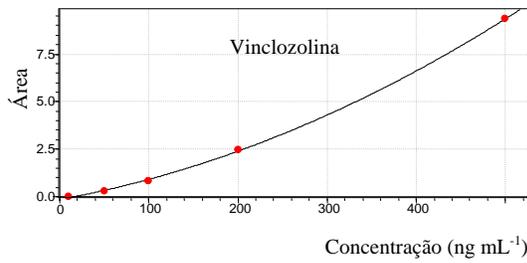


Figura 26. Curva analítica para vinclozolina (m/z 285)

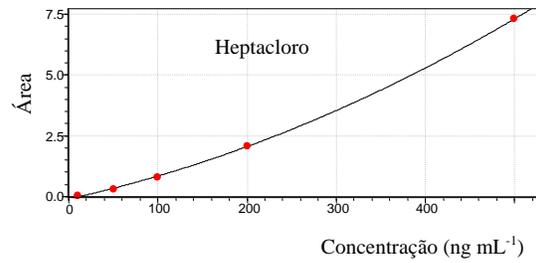


Figura.30. Curva analítica para heptacloro (m/z 100)

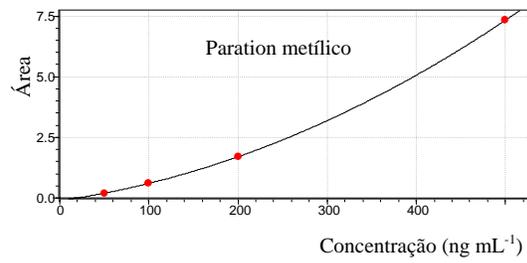


Figura 27. Curva analítica para paration metílico (m/z 285)

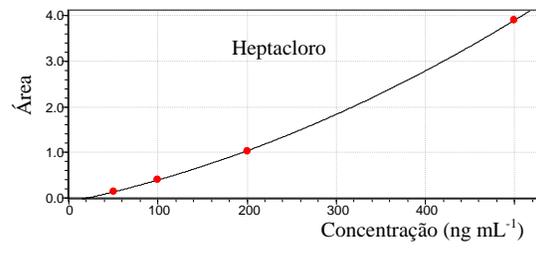


Figura 31. Curva analítica para heptacloro (m/z 272)

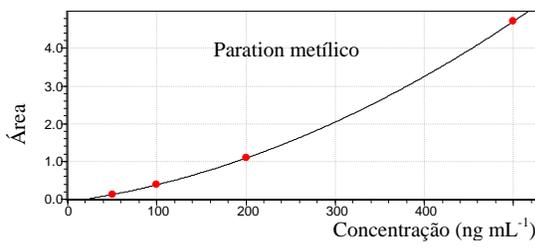


Figura 28. Curva analítica para paration metílico (m/z 125)

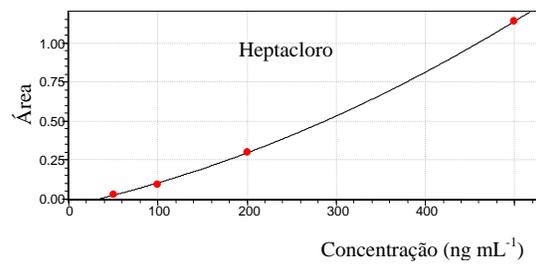


Figura 32. Curva analítica para heptacloro (m/z 337)

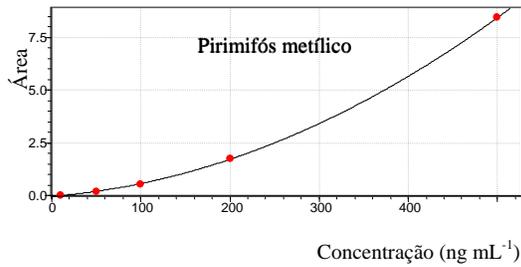


Figura 33. Curva analítica para pirimifós metílico (m/z 290)

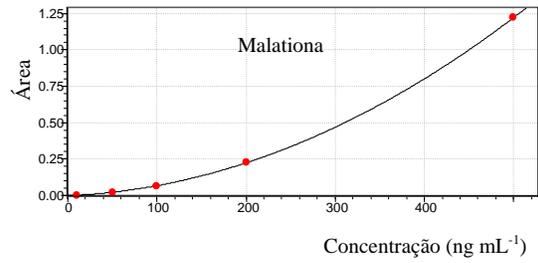


Figura 37. Curva analítica para malationa (m/z 173)

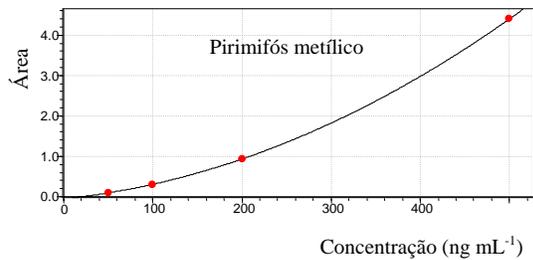


Figura 34. Curva analítica para pirimifós metílico (m/z 125)

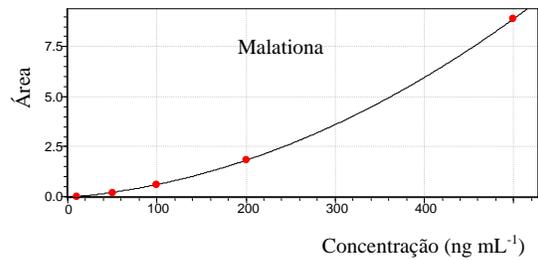


Figura 38. Curva analítica para malationa (m/z 193)

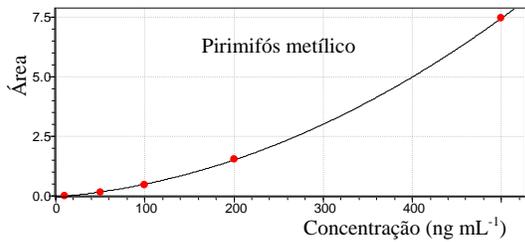


Figura 35. Curva analítica para pirimifós metílico (m/z 276)

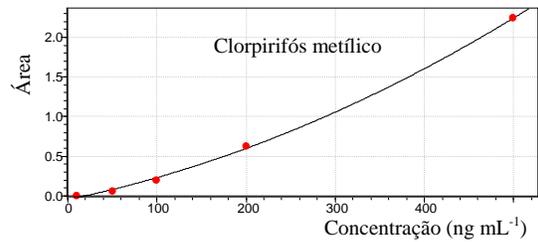


Figura 39. Curva analítica para clorpirifós metílico (m/z 97)

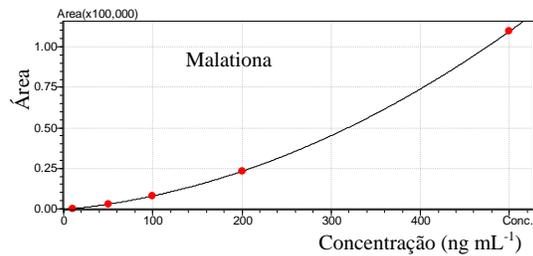


Figura 36. Curva analítica para malationa (m/z 127)

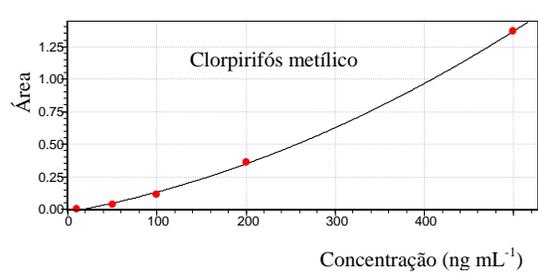


Figura 40. Curva analítica para clorpirifós metílico (m/z 197)

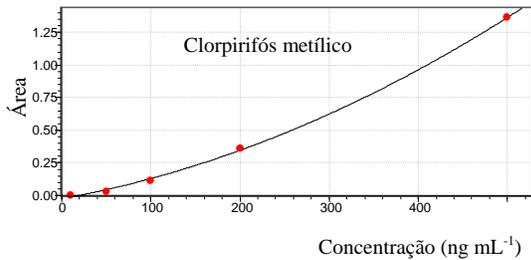


Figura 41. Curva analítica para clorpirifós metílico (m/z 314)

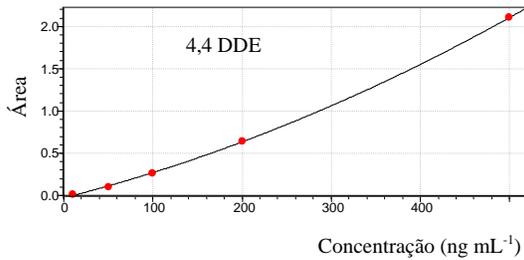


Figura 45. Curva analítica para 4,4 DDE (m/z 246)

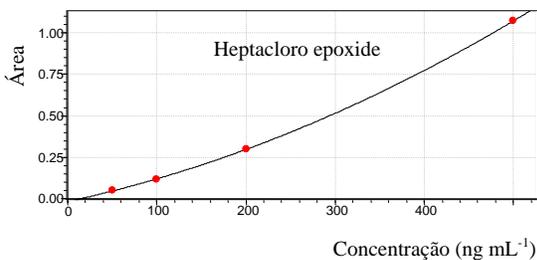


Figura 42. Curva analítica para heptacloro epoxide (m/z 237)

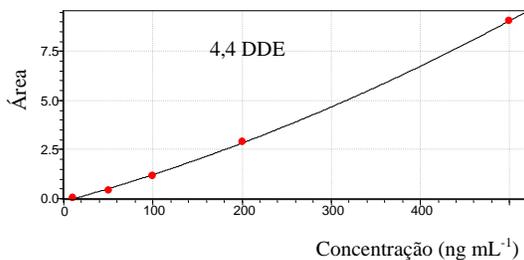


Figura 46. Curva analítica para 4,4 DDE (m/z 176)

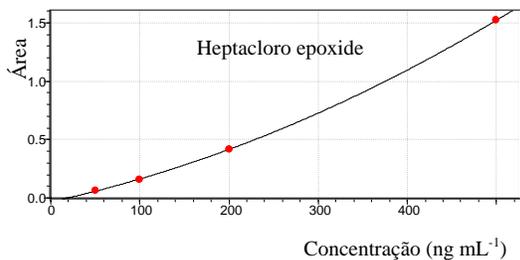


Figura 43. Curva analítica para heptacloro epoxide (m/z 263)

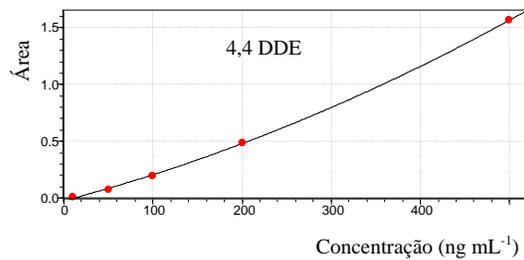


Figura 47. Curva analítica para 4,4 DDE (m/z 318)

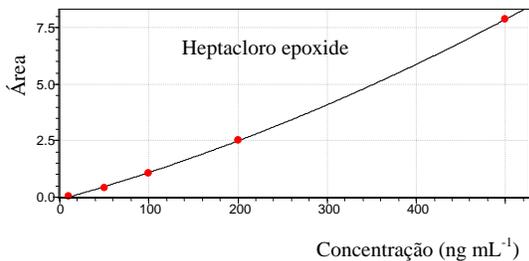


Figura 44. Curva analítica para heptacloro epoxide (m/z 81)

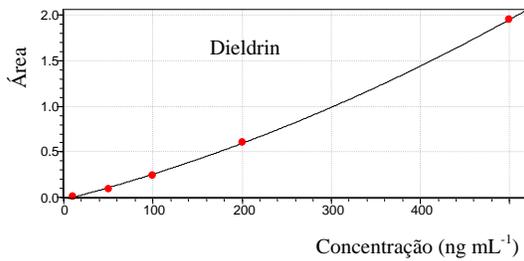


Figura 48. Curva analítica para dieldrin (m/z 79)

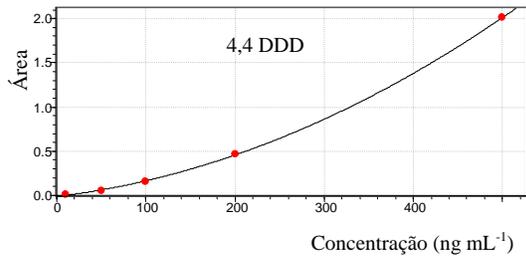


Figura 49. Curva analítica para 4,4 DDD (m/z 235)

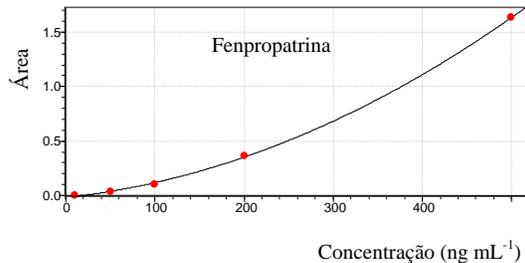


Figura 53. Curva analítica para fenpropatrina (m/z 181)

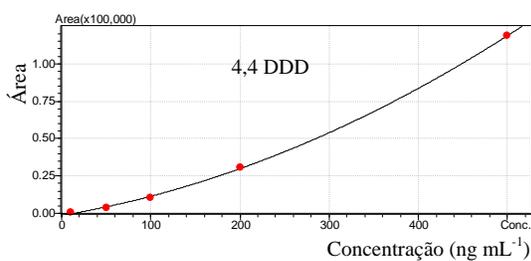


Figura 50. Curva analítica para 4,4 DDD (m/z 237)

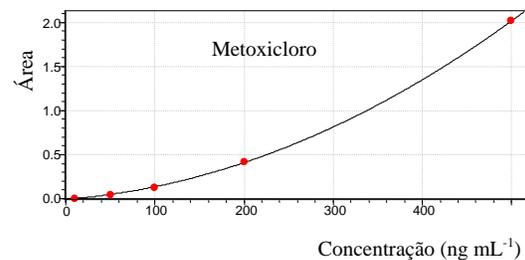


Figura 54. Curva analítica para metoxicloro (m/z 227)

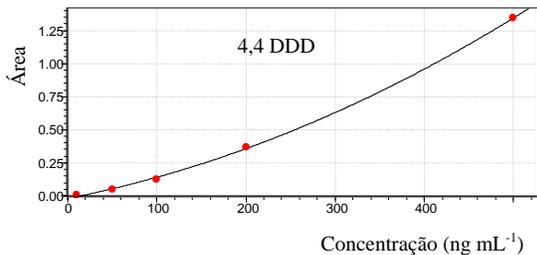


Figura 51. Curva analítica para 4,4 DDD (m/z 165)

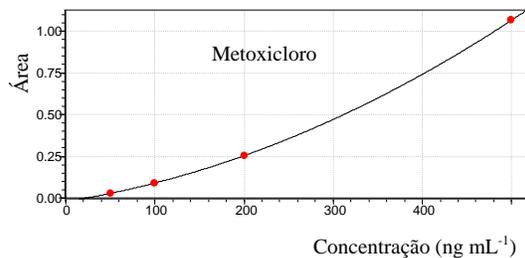


Figura 55. Curva analítica para metoxicloro (m/z 274)

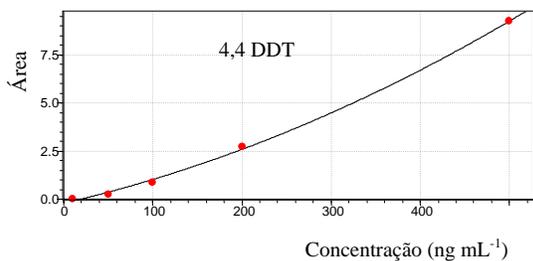


Figura 52. Curva analítica para 4,4 DDT (m/z 165)

ANEXO E. Curvas analíticas na matriz

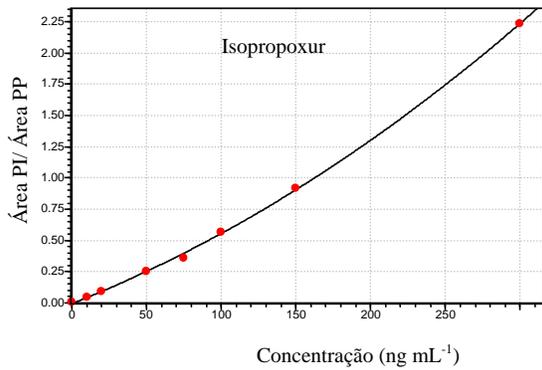


Figura 1. Curva analítica para isopropoxifenol (m/z 110)

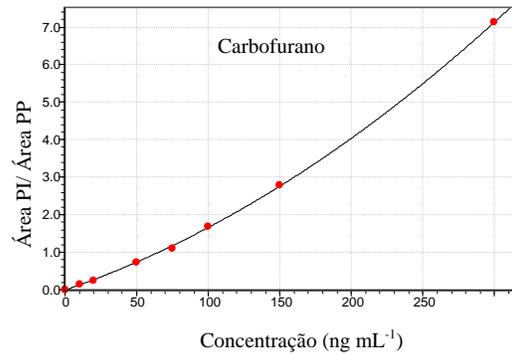


Figura 4. Curva analítica para carbofurano (m/z 149).

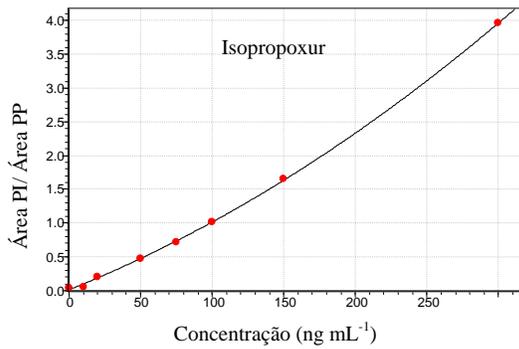


Figura 2. Curva analítica para isopropifenol (m/z 152).

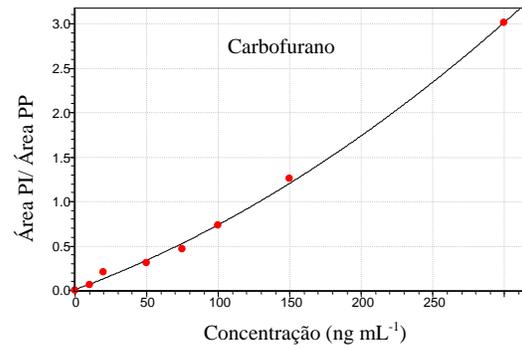


Figura 5. Curva analítica para carbofurano (m/z 131).

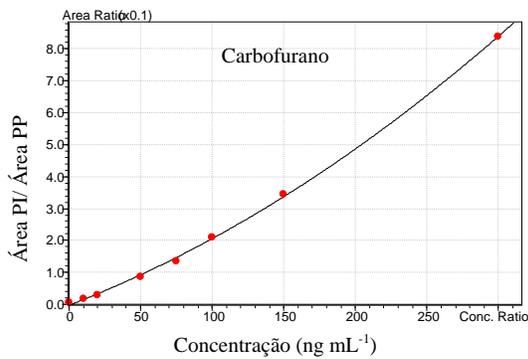


Figura 3. Curva analítica para carbofurano (m/z 164).

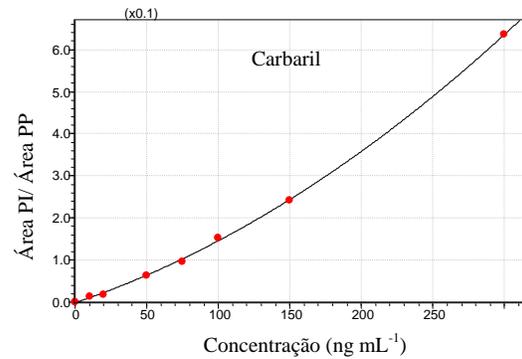


Figura 6. Curva analítica para carbaril (m/z 116).

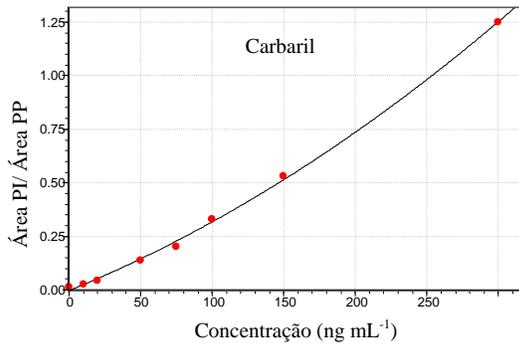


Figura 7. Curva analítica para carbaril (m/z 144).

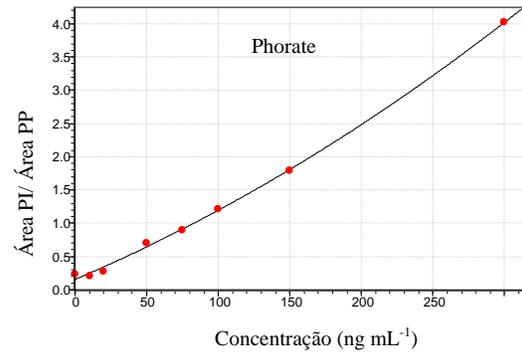


Figura 10 Curva analítica para phorate (m/z 75).

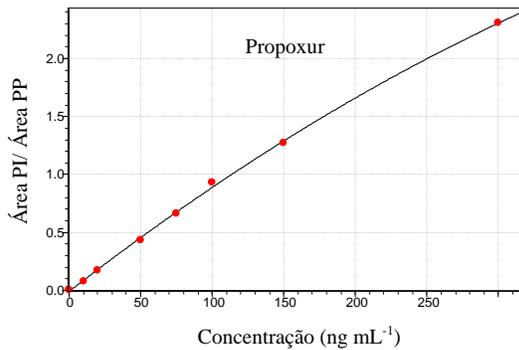


Figura 8. Curva analítica para propoxur (m/z 110).

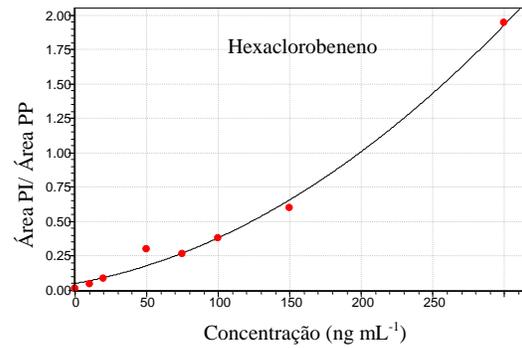


Figura 11. Curva analítica para hexaclorobeneno (m/z 284).

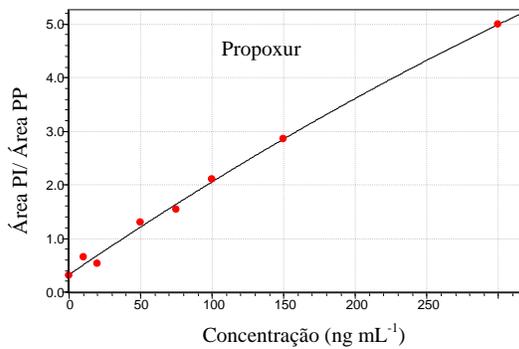


Figura 9. Curva analítica para propoxur (m/z 152).

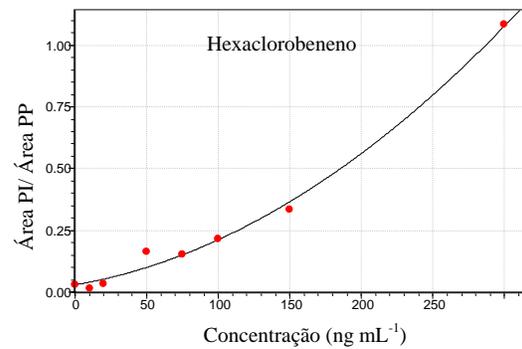


Figura 12. Curva analítica para hexaclorobeneno (m/z 282).

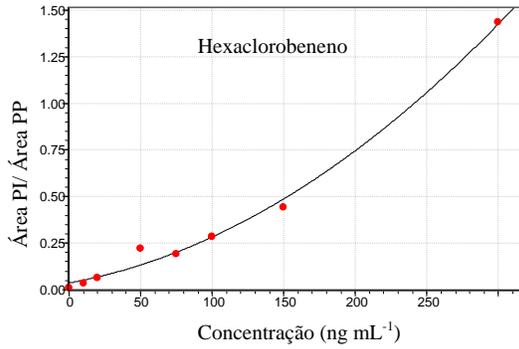


Figura 13. Curva analítica para hexaclorobeneno (m/z 286).

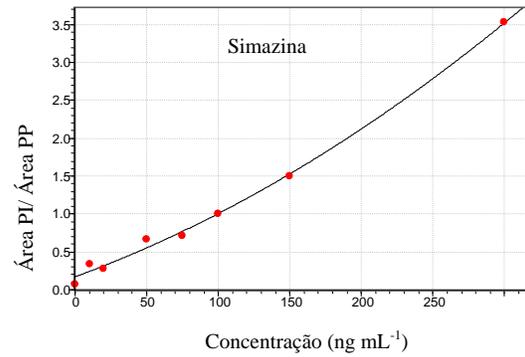


Figura 16. Curva analítica para simazina (m/z 201)

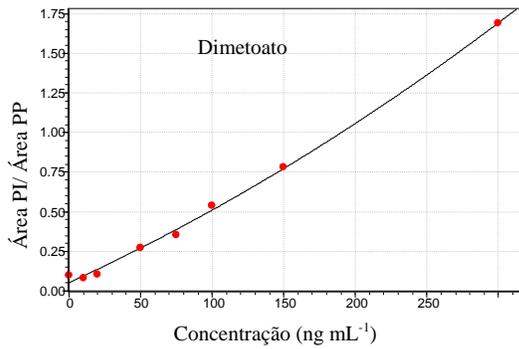


Figura 14. Curva analítica para dimetoato (m/z 87)

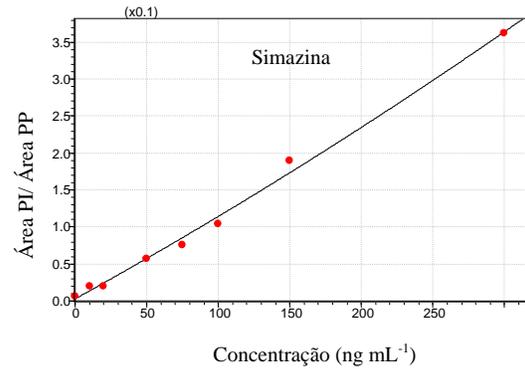


Figura 17. Curva analítica para simazina (m/z 186)

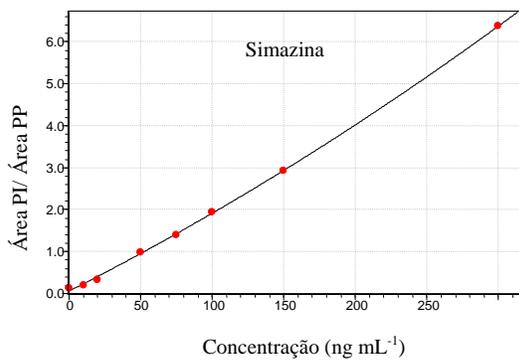


Figura 15. Curva analítica para simazina (m/z 201)

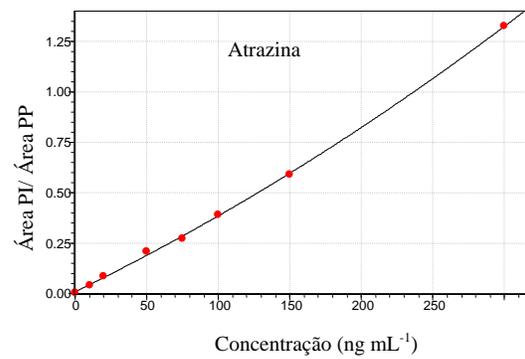


Figura 18. Curva analítica para atrazina (m/z 200)

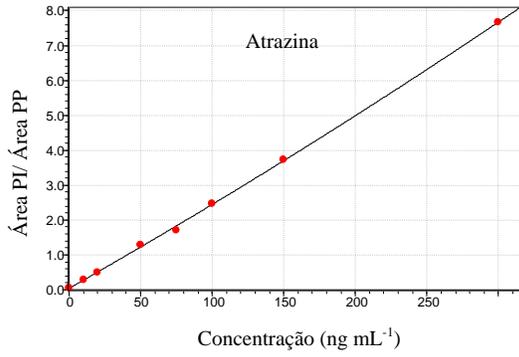


Figura 19. Curva analítica para atrazina (m/z 200)

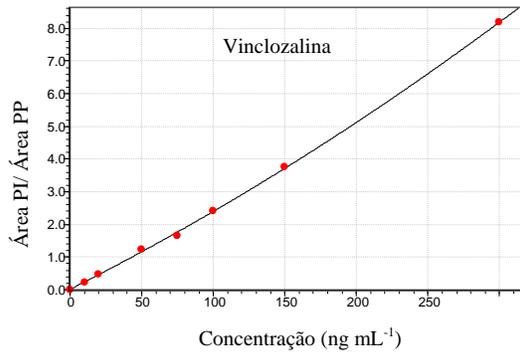


Figura 22. Curva analítica para vinclozolina (m/z 285)

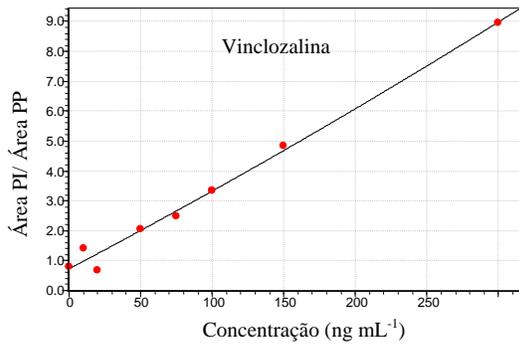


Figura 20. Curva analítica para vinclozolina (m/z 212)

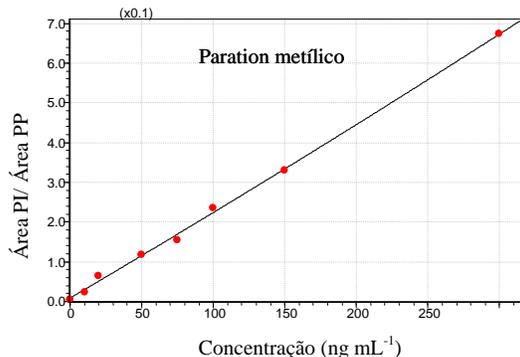


Figura 23. Curva analítica para paration metílico (m/z 263)

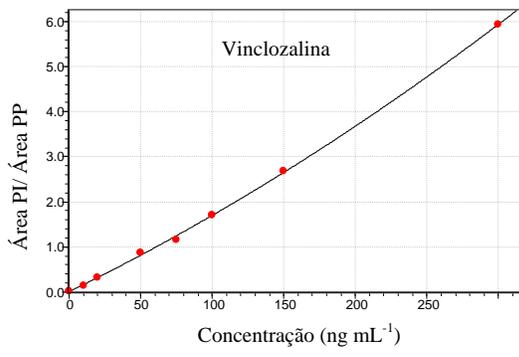


Figura 21. Curva analítica para vinclozolina (m/z 214)

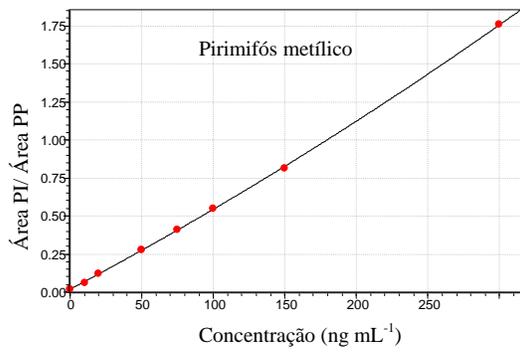


Figura 24. Curva analítica para pirimifós metílico (m/z 290)

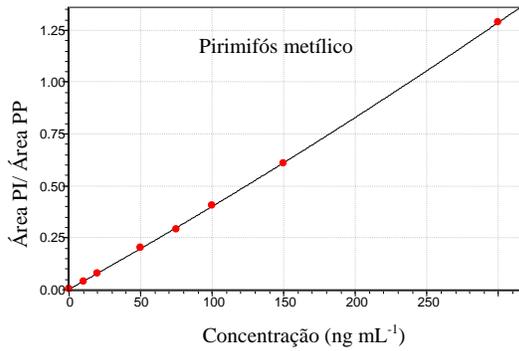


Figura 25. Curva analítica para pirimifós metílico (m/z 305)

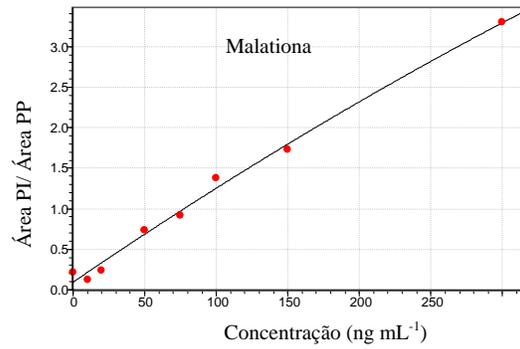


Figura 28. Curva analítica para malationa (m/z 125)

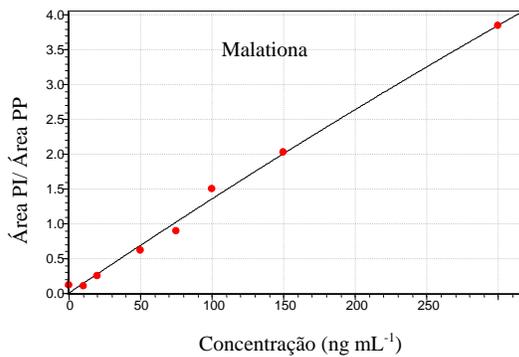


Figura 26. Curva analítica para malationa (m/z 227)

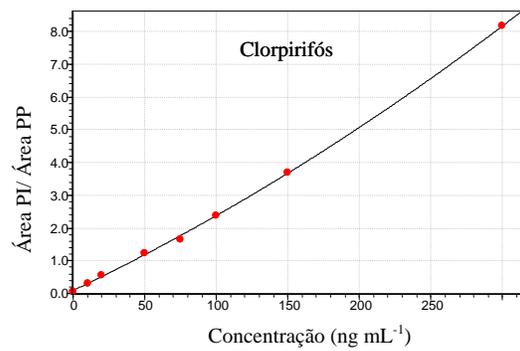


Figura 29. Curva analítica para clorpirifós (m/z 314)

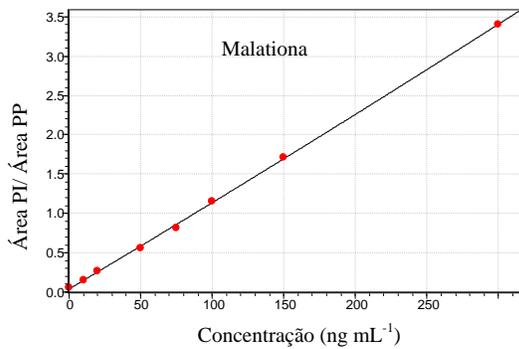


Figura 27. Curva analítica para malationa (m/z 173)

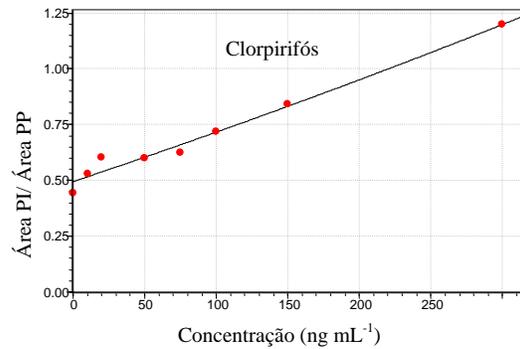


Figura 30. Curva analítica para clorpirifós (m/z 199)

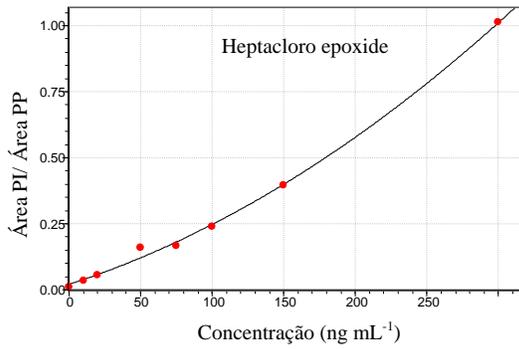


Figura 31. Curva analítica para heptacloro epoxide (m/z 353)

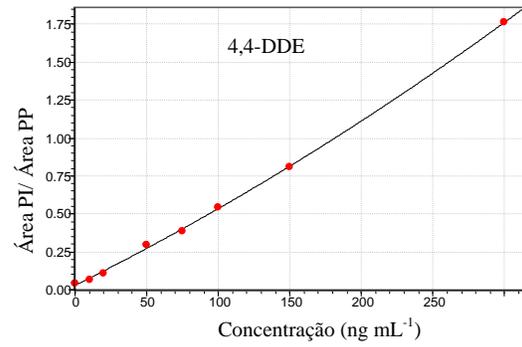


Figura 34. Curva analítica para 4,4-DDE (m/z 248)

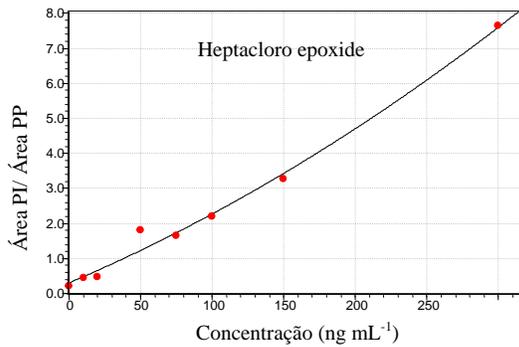


Figura 32. Curva analítica para heptacloro epoxide (m/z 355)

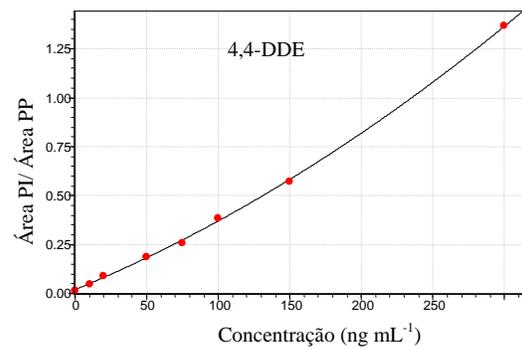


Figura 35. Curva analítica para 4,4-DDE (m/z 318)

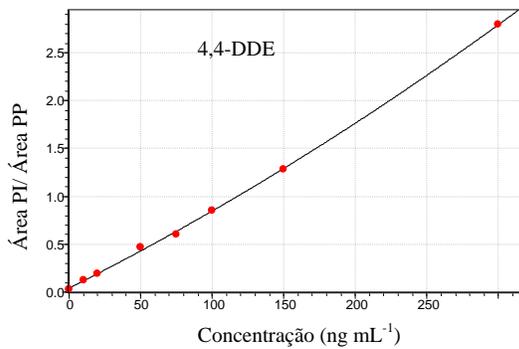


Figura 33. Curva analítica para 4,4-DDE (m/z 246)

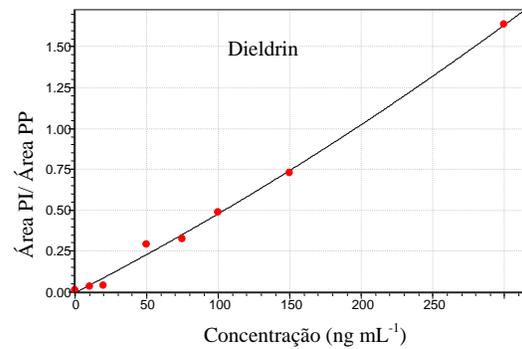


Figura 36. Curva analítica para dieldrin (m/z 79)

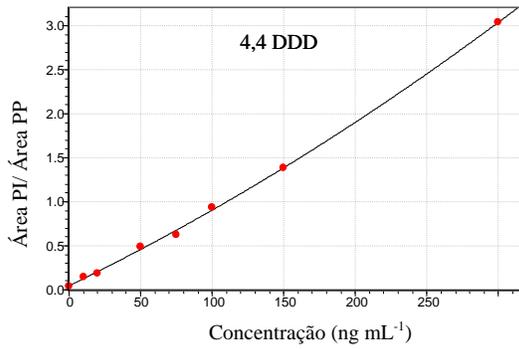


Figura 37. Curva analítica para 4,4-DDD (m/z 235)

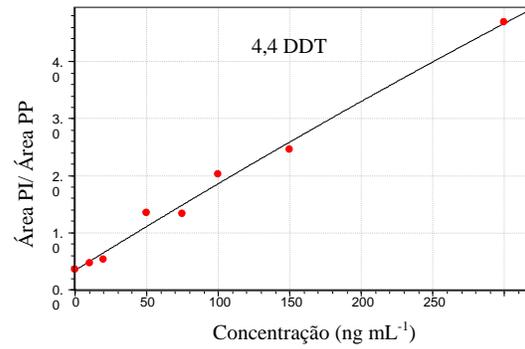


Figura 40. Curva analítica para 4,4-DDT (m/z 165)

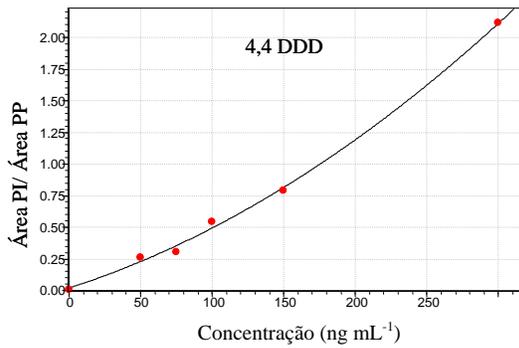


Figura 38. Curva analítica para 4,4-DDD (m/z 237)

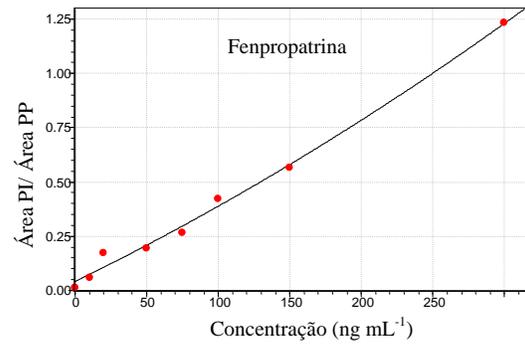


Figura 41. Curva analítica para fenpropatrina (m/z 181)

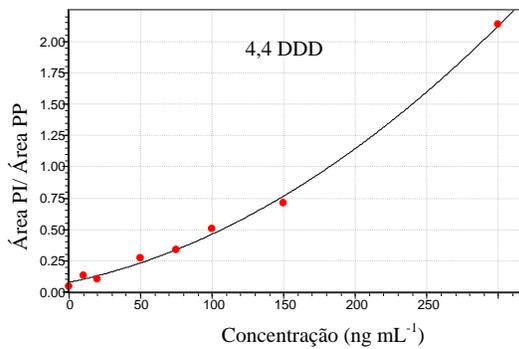


Figura 39. Curva analítica para 4,4-DDD (m/z 165)

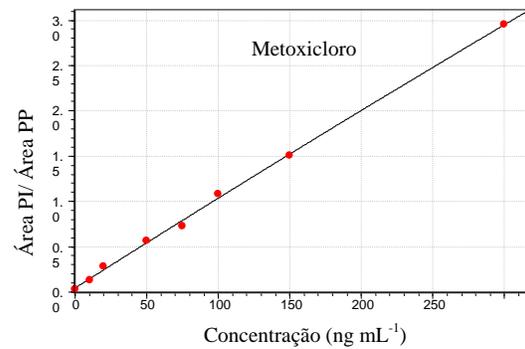


Figura 42. Curva analítica para metoxicloro (m/z 227)

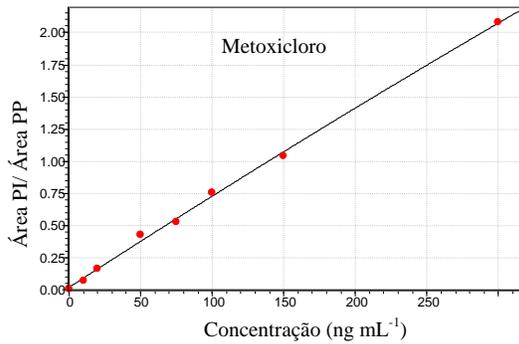


Figura 43. Curva analítica para metoxicloro (m/z 212)

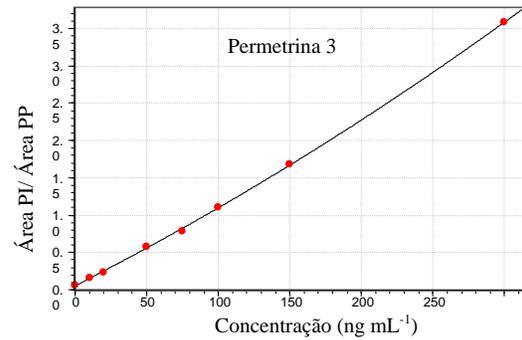


Figura 46. Curva analítica para permetrina (m/z 183)

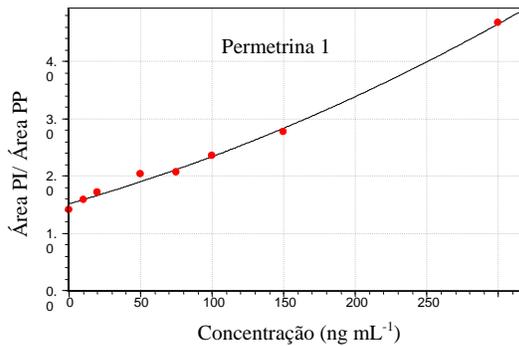


Figura 44. Curva analítica para permetrina (m/z 183)

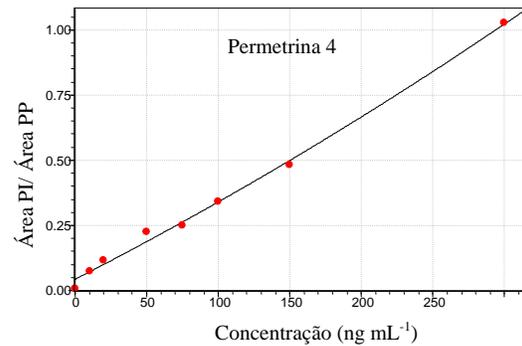


Figura 47. Curva analítica para permetrina (m/z 163)

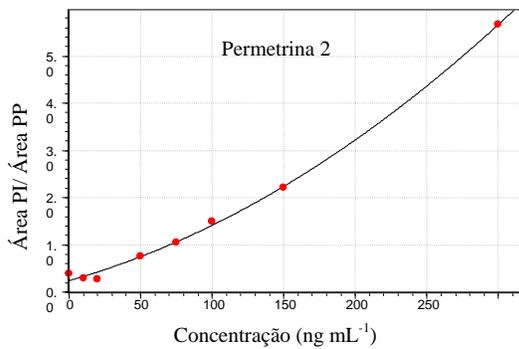


Figura 45. Curva analítica para permetrina (m/z 163)

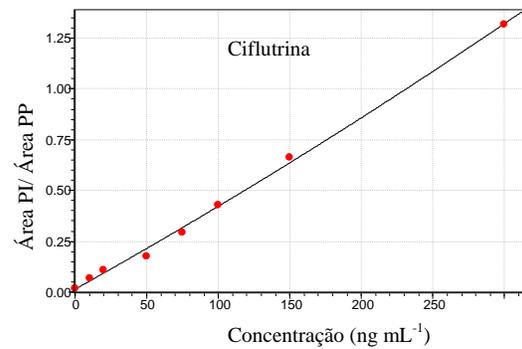


Figura 48. Curva analítica para permetrina (m/z 20)

