



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS – EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL – PPGQA**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE
EXTRAÇÃO (QuEChERS) E DE ANÁLISE (LC-DAD E
LC-APCI-MS/MS) PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS E
HIDROXIMETILFURFURAL EM MEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Débora Tomasini

**Rio Grande - RS, Brasil
2011**

I

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO (QuEChERS) E DE ANÁLISE (LC-DAD E LC-APCI-MS/MS) PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS E HIDROXIMETILFURFURAL EM MEL

por

Débora Tomasini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
MESTRE EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

**Rio Grande, RS, Brasil
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL - PPGQA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE
EXTRAÇÃO (QuEChERS) E DE ANÁLISE (LC-DAD E
LC-APCI-MS/MS) PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS E
HIDROXIMETILFURFURAL EM MEL**

elaborada por
Débora Tomasini

como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Química**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel
(Orientador - Presidente)

Prof^a. Dr^a. Elina Bastos Caramão (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Garda Buffon (FURG)

Rio Grande, 28 de janeiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço **à Deus**, pela proteção, pelas oportunidades em meu caminho e dificuldades encontradas, que fizeram com que eu seguisse cada vez mais forte para enfrentá-las e jamais desistisse dos meus objetivos.

Aos meus pais, que apesar da distância sempre acreditaram em mim, me deram forças para lutar por meus sonhos. Agradeço pela educação que me foi dada, pelo carinho que recebo e pelo incentivo, sei que sempre estarão ao meu lado. Amor verdadeiro e exemplo de dedicação e força de vontade. **Ao meu irmão Marcelo** por continuar fazendo parte da minha vida!

Ao meu orientador Prof. Dr. Ednei Primel, por ter aceitado me orientar, pela aprendizagem que adquiri nestes anos, pela confiança, por sempre ter acreditado que eu conseguiria desenvolver este trabalho, por ter despertado meu interesse pela Química Analítica, e claro, pelos momentos de descontração e pela amizade também. Muito obrigada por tudo!

À Prof^a. Dr^a. Elina Bastos Caramão, por ter aceitado participar na defesa da dissertação, pelas suas valiosas sugestões para o final deste estudo, e pela atenção que recebi quando estive na UFRGS. Possivelmente também pela orientação no doutorado.

À Prof^a. Dr^a. Jaqueline Garda Buffon, pelas contribuições no desenvolvimento do trabalho, pelas sugestões na qualificação, pela participação na defesa e apesar da pouca convivência, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte, também pelas contribuições no desenvolvimento do trabalho e sugestões na qualificação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Montes D'Oca, pela oportunidade de ter sido iniciação científica e ter sido orientada durante três anos no laboratório KOLBE. Por ter proporcionado valiosas aprendizagens, pelo incentivo para seguir em frente na Química, mesmo que não mais na Orgânica, e pela amizade.

Aos meus amigos Diego e Táffini, pelo companheirismo, pelos conselhos, momentos de alegria e tristeza compartilhados, pelo apoio, pela amizade verdadeira e por terem sido muitas vezes minha família aqui.

Aos meus amigos e colegas Liziane e Maicon, pela amizade, pelo trabalho em equipe e pelo apoio nestes dois anos de convivência diária!

A minha amiga Sergi, pela amizade, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração... obrigada! Você também tem grande participação neste trabalho!

Aos colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do LACOM: Adri, Fabi, Maria, Brunos, Renata, Ana Laura, Liziara, Cátia, Maristela, Augusto, Ana Luiza, Natiele, Guilherme, Sherol, Vivi, Márcia e Fábio. Obrigada pelos momentos convvidos durante estes dois anos, pelo exemplo de trabalho em equipe, pelos churrascos... Obrigada também aos “associados” do LACOM.

Aos meus amigos Lara e Rodrigo, que comigo formavam o inseparável trio da graduação e do laboratório Kolbe. Obrigada por todos os momentos juntos!

Às minhas amigas Ale, Dani, Jacque e Gabi por compartilhar muitos momentos da minha vida e pelo apoio quando mais precisei.

À minha amiga, prima, Carol pelos momentos compartilhados nestes dois anos de convivência, pela amizade verdadeira.

Aos meus amigos Beto, Diane, Diego, Edu, Deby, Juli, Douglas, Paulo, Fábio, Giovani, Cleriston... crescemos juntos e hoje contamos os dias para Natal e Páscoa em que podemos nos reunir! A amizade de vocês me faz feliz e sei que é pra vida toda!

Aos colegas do PPGQTA, pelos momentos de convivência e estudo durante o mestrado.

Aos professores do PPGQTA, pelos ensinamentos e por contribuírem para minha formação como mestre.

À FURG, pela oportunidade e pelo ensino gratuito e de qualidade.

À CAPES, REUNI e ao PPGQTA pelas bolsas de estudo.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental - PPGQA

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO (QuEChERS) E DE ANÁLISE (LC-DAD E LC-APCI-MS/MS) PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS E HIDROXIMETILFURFURAL EM MEL

AUTORA: DÉBORA TOMASINI

ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL

Rio Grande, 28 de janeiro de 2011

O mel é um alimento natural rico em energia, produzido por abelhas melíferas. Segundo dados do IBGE, em 2009 a produção de mel no Brasil foi de 38.765 t, e o estado do Rio Grande do Sul foi o maior produtor. Contudo, atualmente os produtos apícolas são produzidos em ambientes poluídos por diferentes fontes de contaminação, como os agrotóxicos, que podem ser transportados pelas abelhas até a colmeia e incorporados ao mel. Além disso, o crescente consumo de mel vem exigindo um controle de qualidade mais eficiente deste produto. Neste trabalho, a otimização e validação de um método para a determinação simultânea dos agrotóxicos amitraz, carbendazim, dimetoato, fipronil, τ -fluvalinato, imidacloprido, tebuconazol e tiametoxam e de um produto indicador de qualidade do mel, o HMF, foi realizada. Para o preparo da amostra foi utilizado o método QuEChERS modificado e as determinações foram feitas por LC-DAD e por LC-APCI-MS/MS. A otimização do método QuEChERS modificado foi realizada para 4 analitos por LC-DAD e após foi empregado para a determinação simultânea dos 9 analitos por LC-APCI-MS/MS. As condições de extração utilizadas foram: 10,0 g de amostra, 150 μ L de hidróxido de amônio, 10,0 mL de acetonitrila e 4,0 g de MgSO_4 anidro. O método foi validado conforme parâmetros do INMETRO e SANCO. Os LOQs para o método, variaram entre 0,005 – 1,0 mg kg^{-1} . Todas as curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99. Foi construída a curva trabalho, para avaliar o desempenho do método e para calcular as recuperações. Os valores de recuperação estiveram na faixa de 70 a 112%, com RSD menores que 20% para todos os analitos. O efeito de matriz foi avaliado, e a maioria dos analitos apresentou enriquecimento de sinal. O efeito de matriz foi compensado com calibração por superposição na matriz. A aplicabilidade do método para méis de diferentes flores foi verificada, e o método demonstrou ser robusto e apresentou recuperações dentro da faixa estabelecida (70-120%) para todos os analitos nas diferentes amostras analisadas. O método apresentou vantagens com relação à métodos tradicionais de preparo de amostra, como não necessitar aplicação de etapa de *cleanup*, utilizar pouco volume de solvente orgânico e rapidez. Nas amostras analisadas não foram detectados resíduos de agrotóxicos. No entanto, em todas as amostras foi detectado o HMF, em concentrações de 4,6 a 51,7 mg kg^{-1} , estando abaixo da concentração máxima permitida pelas legislações vigentes.

Palavras-chave: agrotóxicos; HMF; mel; QuEChERS; LC-DAD; LC-APCI-MS/MS

ABSTRACT

Master's Thesis

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental - PPGQTA

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF EXTRACTION METHOD (QuEChERS) AND
ANALYSIS (LC-DAD AND LC-APCI-MS/MS) FOR SIMULTANEOUS
DETERMINATION OF PESTICIDES AND HYDROXYMETHYLFURFURAL IN
HONEY

AUTHOR: DÉBORA TOMASINI

ADVISOR: EDNEI GILBERTO PRIMEL, M. S., Ph. D.

January 28th, 2011, Rio Grande, RS, Brazil

Honey is a natural food produced by honeybees. According to IBGE, in 2009, honey production in Brazil was 38,765 t and the Rio Grande do Sul state was the largest producer. However, nowadays bee products are produced in an environment polluted by different sources of contamination, such as pesticides, which can be transported by honeybees to the hive and incorporated into the honey. In addition, the increasing consumption of honey has demanding an efficient quality control for this product. In this work, the determination of pesticides amitraz, carbendazim, dimethoate, fipronil, τ -fluvalinate, imidacloprid, tebuconazole and thiamethoxam, and an indicator compound of honey quality, HMF, was carried out simultaneously. For the sample preparation, the modified QuEChERS method was used and the determinations were done by LC-DAD and LC-APCI-MS/MS. The optimization of modified QuEChERS method was performed for 4 compounds by LC-DAD and after the same method was employed for the simultaneous determination of 9 compounds by LC-MS. The extraction conditions were: 10.0 g of sample, 150 μ L of ammonium hydroxide, 10.0 mL of acetonitrile and 4.0 g of anhydrous MgSO_4 . The method was validated following the parameters suggested by INMETRO and SANCO. The LOQs for the method ranged between 0.005 and 1.0 mg kg^{-1} . All the analytical curves showed r values higher than 0.99. For the recoveries calculations and method evaluation a working curve was done. The recoveries ranged between 70 and 112%, with RSD lower than 20% for all compounds. The matrix effect was evaluated, and most of the compounds showed a signal enrichment. However, the matrix effects was compensated with matrix-matched calibration. The applicability of the method for honeys from different flowers was verified, and the method showed robustness and recoveries in the range established (70-120%) for all compounds in different samples. The method showed advantages such as not require the cleanup step, low volume of organic solvents and quickness. No pesticide residues were found in the samples. However, HMF was detected in all samples, with concentrations ranged between 4.6 and 51.7 mg kg^{-1} , being below the maximum concentration allowed by the legislation.

Keywords: pesticides; HMF; honey; QuEChERS; LC-DAD; LC-APCI-MS/MS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Apicultura no município de Rio Grande/RS.....	5
Figura 2 - Produção de mel no Estado do Rio Grande do Sul	6
Figura 3 - Esquema da reação proposta para a formação do HMF	10
Figura 4 - Infestação do ácaro varroa jacobsoni nas abelhas..	13
Figura 5 – Estrutura química da PSA	19
Figura 6 - Interface do tipo APCI para LC-MS.	27
Figura 7 - Enriquecimento de sinal: comparação das curvas de calibração externa e interna (método da adição de padrão).....	28
Figura 8 - Otimização da separação cromatográfica em 220 nm.	51
Figura 9 - Cromatograma em 260 nm da separação de uma solução padrão da mistura de HMF, tiametoxam, imidacloprido e fipronil, com concentração de 10,0 mg L ⁻¹ , e os espectros de absorção de cada substância.....	52
Figura 10 - Espectros obtidos por LC-DAD, correspondentes à cada analito (a) HMF, (b) tiametoxam, (c) imidacloprido e (d) fipronil.	53
Figura 11 - Cromatogramas gerados em LC-APCI-MS para os analitos em estudo. Cromatograma no modo negativo (a) e cromatograma no modo positivo (b).	55
Figura 12 - Cromatogramas no modo MRM da fragmentação monitorada para a quantificação.	57
Figura 13 - Efeito dos diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos.....	59
Figura 14 - Recuperações para os analitos empregando QuEChERS com MgSO ₄ e com a mistura de sais MgSO ₄ e NaCl.	60
Figura 15 - Influência da etapa de <i>cleanup</i> nas recuperações dos analitos.	61
Figura 16 - Influência da etapa de <i>cleanup</i> no efeito de matriz.	62
Figura 17 - Influência do tempo de interação da solução padrão com a matriz após a etapa de fortificação nas recuperações.....	63
Figura 18 - Influência do pH nas recuperações dos analitos.	64
Figura 19 - Esquema representando o método QuEChERS otimizado.....	66

Figura 20 - Percentual de efeito de matriz para os 9 analitos empregando o método QuEChERS modificado e determinação por LC-APCI-MS/MS	72
Figura 21 - Curvas do padrão no solvente e no extrato da matriz, para os analitos carbendazim, dimetoato e τ -fluvalinato.	73
Figura 22 - Diferentes tipos de mel utilizados no desenvolvimento e aplicabilidade do método (A,B,C,D) e seus respectivos extratos obtidos (1,2,3,4).	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição do mel.....	7
Tabela 2 - Técnicas de preparo de amostra utilizadas para determinação de agrotóxicos em mel	18
Tabela 3 - Alguns trabalhos recentes utilizando o método QuEChERS para a determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes	23
Tabela 4 - Características dos agrotóxicos selecionados.....	32
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo	33
Tabela 6 - Modo gradiente otimizado para a separação por LC-DAD.....	52
Tabela 7 - Modo gradiente otimizado para a separação por LC-APCI-MS/MS	54
Tabela 8 - Otimização das condições de fragmentação para determinação dos analitos no espectrômetro de massas	56
Tabela 9 - LOQ e LOD para os analitos, LMR no Brasil e União Européia	67
Tabela 10 - Resultados obtidos para as curvas analíticas	68
Tabela 11 - Resultados obtidos para as curvas trabalho	69
Tabela 12 - Nível de fortificação, recuperação (R%) e desvio padrão relativo (RSD%) para cada analito.....	70
Tabela 13 - Nível de fortificação, recuperação (R%) e precisão intermediária (RSDpi%) para os analitos	71
Tabela 14 - Eficiência do processo (EP) para os 5 níveis de concentração de cada analito.....	74
Tabela 15 - Resultados de Recuperação (%) e RSD (%) da aplicabilidade do método para diferentes tipos de mel.	76
Tabela 16 - Efeito de matriz para os 3 méis analisados.....	77
Tabela 17 - Comparação do método proposto com alguns dos principais métodos desenvolvidos para determinação de agrotóxicos em mel.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

API - Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

APPI – Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photon Ionization*

C18 - sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

CODEX - *Codex Alimentarius*

d.i. - diâmetro interno

DLLME - Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Extraction*

DSPE – Extração por Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

ECD - Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detection*

EM – Efeito de matriz

EMATER - Associação Rio-Grandense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI - Ionização por Eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

FM – fase móvel

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HMF – 5-hidroximetilfurfural

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IHC – Comissão Internacional do Mel, do inglês *International Honey Commission*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia

K_{ow} - Coeficiente de partição octanol-água

LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-APCI-MS/MS - Cromatografia Líquida com Ionização Química a Pressão Atmosférica acoplada à Espectrometria de Massas seqüencial, do inglês *Liquid Chromatography coupled with Atmospheric Pressure Chemical Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*

LC-DAD - Cromatografia Líquida acoplada ao Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detector*.

LLE - Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LMR - Limite Máximo de Resíduos

LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

m/z - razão massa-por-carga

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRM - Monitoramento de Múltiplas Reações, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MSPD - Dispersão da Matriz em Fase sólida, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*

NPD – Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*

p.a. - grau pró-análise

pH - potencial hidrogeniônico

pK_a - potencial de dissociação ácida

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PSA - Amina Primária Secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Eficiente, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r - Coeficiente de correlação linear

R - Recuperação

RE - Resolução (legislação)

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD_{pi} - Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária

SBSE – Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*

SEBRAE: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SFE - Extração por Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

t_R - tempo de retenção

UV – ultravioleta

v/v - volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Mel	4
3.1.1	Apicultura e aspectos sócio econômicos	4
3.1.2	Composição química do mel.....	6
3.1.2.1	5-hidroxi-metilfurfural (HMF).....	9
3.1.3	Contaminação do mel.....	12
3.2	Agrotóxicos.....	14
3.2.1	Classificação.....	14
3.2.2	Toxicidade	15
3.2.3	Toxicidade de agrotóxicos para as abelhas.....	16
3.3	Técnicas de preparo de amostra.....	17
3.3.1	QuEChERS.....	19
3.4	Técnicas cromatográficas para a determinação de resíduos de agrotóxicos	24
3.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos	24
3.4.2	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	25
3.4.2.1	Efeito de matriz em LC-MS	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Seleção dos agrotóxicos para o estudo	30
4.2	Instrumentação.....	33
4.3	Reagentes, solventes e materiais	34
4.4	Preparo das soluções analíticas.....	35
4.5	Amostras de mel	36
4.6	Otimização do sistema cromatográfico LC-DAD	36
4.6.1	Preparo da fase móvel.....	37

4.6.2	Escolha da composição da fase móvel.....	37
4.6.3	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção.....	37
4.7	Otimização do sistema cromatográfico LC-APCI-MS/MS	38
4.7.1	Preparo da fase móvel.....	38
4.7.2	Escolha da composição da fase móvel.....	38
4.7.3	Otimização dos parâmetros para fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas.....	39
4.8	Preparo da amostra.....	39
4.8.1	Otimização do preparo de amostra utilizando QuEChERS modificado e quantificação por LC-DAD	40
4.8.1.1	Seleção do solvente de extração.....	40
4.8.1.2	Influência do NaCl na recuperação dos substâncias.....	41
4.8.1.3	Etapa de <i>cleanup</i>	41
4.8.2	Otimização do preparo de amostra QuEChERS modificado por LC-APCI-MS/MS	41
4.8.2.1	Etapa de <i>cleanup</i>	42
4.8.2.2	Tempo de interação após a fortificação.....	43
4.8.2.3	Otimização do pH.....	43
4.9	Validação do método.....	44
4.9.1	Limites de detecção e quantificação.....	44
4.9.2	Curva analítica, curva trabalho e linearidade.....	45
4.9.3	Exatidão (recuperação)	46
4.9.4	Precisão.....	47
4.9.5	Efeito de matriz.....	48
4.9.6	Eficiência do Processo	48
4.10	Aplicabilidade do método e robustez.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Otimização do sistema cromatográfico LC-DAD	50
5.1.1	Composição da fase móvel.....	50
5.1.2	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção.....	53

5.2	Otimização do sistema cromatográfico LC-APCI-MS/MS	54
5.2.1	Otimização das condições cromatográficas.....	54
5.2.2	Otimização dos parâmetros para fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas.....	55
5.3	Otimização do método QuEChERS modificado e determinação por LC-DAD	57
5.3.1	Seleção do solvente de extração.....	58
5.3.2	Influência do NaCl na recuperação.....	59
5.3.3	Etapa de <i>cleanup</i>	60
5.4	Otimização do preparo de amostra QuEChERS modificado por LC-APCI-MS/MS	61
5.4.1	Etapa de <i>cleanup</i>	61
5.4.2	Tempo de interação após a fortificação	62
5.4.3	Otimização do pH	64
5.5	Método QuEChERS modificado e otimizado.....	65
5.6	Validação do método.....	67
5.6.1	Limites de detecção e quantificação.....	67
5.6.2	Curva analítica, curva trabalho e linearidade.....	68
5.6.3	Exatidão (recuperação)	69
5.6.4	Precisão.....	70
5.6.5	Efeito de matriz.....	71
5.6.6	Eficiência do processo.....	73
5.7	Aplicabilidade do método e robustez.....	75
5.8	Avaliação do método proposto.....	78
6	CONCLUSÕES.....	80
7	TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS.....	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
9	PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO	93
	ANEXO 1 - Dados sobre apicultura na Região Sul do RS.....	94
	ANEXO 2 - Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel.....	95
	ANEXO 3 - Resumo do artigo submetido.....	97

1 INTRODUÇÃO

O mel é um alimento natural produzido por abelhas melíferas, a partir do néctar ou secreções de plantas, modificado e armazenado em colmeias (LEMOS *et al.*, 2010). A utilização do mel na nutrição humana não deveria limitar-se apenas a sua característica adoçante, mas principalmente por ser um alimento de alta qualidade, rico em energia e inúmeras outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos de nosso corpo (EMBRAPA, 2003).

Segundo o IBGE, em 2009 a produção total de mel no Brasil foi estimada em 38.765 toneladas. O estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor do país, com 7.155 toneladas, sendo responsável por mais de 18% da produção nacional.

Contudo, hoje os produtos apícolas são produzidos em ambientes poluídos por diferentes fontes de contaminação, o que pode levar à conseqüente alteração da qualidade do produto. Os contaminantes podem chegar às matérias-primas dos produtos apícolas por ar, água, plantas e solo, e, em seguida, serem transportados para a colmeia pelas abelhas (BOGDANOV *et al.*, 2006). Desta forma, durante a coleta de pólen e néctar, ao visitar cultivos como de pêssego, laranja, eucalipto e outros, as abelhas podem coletar também resíduos de agrotóxicos utilizados nestas culturas.

Os agrotóxicos são utilizados na agricultura com a finalidade de controlar pragas como fungos, insetos e plantas daninhas. Suas funções básicas incluem a elevação da produção com aumento da produtividade, a melhoria da qualidade dos produtos e redução do trabalho e dos gastos com energia, quando obedecidas as boas práticas agrícolas (COUTINHO *et al.*, 2005). O mercado brasileiro de agrotóxicos é o maior do mundo, e representa 16% do mercado mundial. Só em 2009, foram vendidas mais de 780 mil toneladas de produtos em nosso país (ANVISA, 2010). Porém, seu uso indiscriminado pode apresentar riscos ao meio ambiente e também à saúde, pois também pode ser introduzido na cadeia alimentar pelas abelhas através do mel, afetando a saúde humana.

A legislação brasileira possui um programa de controle de resíduos e contaminantes em mel (MAPA, 2010). No entanto, alguns agrotóxicos que são de extrema importância por apresentarem potencial toxicidade para as abelhas melíferas, e que em países europeus são proibidos, não fazem parte deste plano.

Outro ponto importante, relacionado com a qualidade do mel, é a determinação dos produtos de degradação. Um produto formado durante a decomposição de monossacarídeos (frutose, principalmente) é o 5-hidroxi metilfurfural (HMF). O HMF geralmente é ausente em mel fresco e sua concentração tende a aumentar durante o armazenamento, por aquecimento excessivo ou pode ser um indicativo de adulteração com xarope de açúcar comercial (ZAPALLÀ *et al.*, 2005; SPANO *et al.*, 2009). No Brasil, o Ministério da Agricultura (MAPA, 2000) define como máximo de concentração de HMF permitido em mel o valor de 60 mg kg⁻¹.

O crescente consumo do mel nas últimas décadas, estimulado pelas propriedades reconhecidamente benéficas à saúde humana, vem exigindo um controle de qualidade cada vez mais eficiente deste produto. Por estes e outros motivos, o desenvolvimento de novos métodos analíticos que atendam às exigências das legislações da área são requeridos.

Devido à complexidade da matriz, o preparo de amostra é uma etapa fundamental para garantir a eficiência dos métodos analíticos, principalmente na análise de contaminantes traços em alimentos. O método QuEChERS foi desenvolvido recentemente, e é amplamente utilizado na extração de agrotóxicos apolares e polares em matrizes de diversos alimentos, por ser simples, barato, passível de alto rendimento, e muito eficiente, com um número mínimo de etapas (KOESUKWIWAT *et al.*, 2008).

As técnicas de análise por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) acopladas à espectrometria de massas (MS) têm sido consideradas como sendo as mais modernas e avançadas em análises de resíduos de agrotóxicos (JARDIM *et al.*, 2009).

Por isso, métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de agrotóxicos em alimentos devem ser capazes de quantificá-los em níveis de concentrações ditos como seguro a humanos e animais e, além disso, confirmar, de forma exata, precisa, rápida, eficiente e segura, a identidade de qualquer resíduo detectado.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar um método para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e HMF em mel empregando o método QuEChERS modificado, cromatografia líquida acoplada ao detector por arranjo de diodos (LC-DAD) e cromatografia líquida com ionização química a pressão atmosférica acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-APCI-MS/MS), enfocando o preparo da amostra através da otimização do método QuEChERS modificado.

Para desenvolver e validar os métodos foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- ❖ Selecionar os principais agrotóxicos empregados nos cultivos agrícolas da região, em culturas que são fonte de pólen e néctar para as abelhas (pêssego, eucalipto, por exemplo) e também os que são diretamente aplicados nas colmeias;
- ❖ Testar diferentes composições de fase móvel e colunas cromatográficas de diferentes comprimentos, a fim de obter uma boa separação cromatográfica dos analitos por LC-DAD;
- ❖ Otimizar os parâmetros instrumentais do LC-APCI-MS/MS como fase móvel, pH, vazão, corrente da corona, voltagem do cone, vazão dos gases de nebulização e do cone; temperaturas da fonte e de dessolvatação para a determinação dos analitos;
- ❖ Otimizar o método QuEChERS para extração de agrotóxicos em mel a fim de se obter boas recuperações para os analitos em estudo;
- ❖ Validar os métodos empregando QuEChERS modificado, LC-DAD e LC-APCI-MS/MS para determinação simultânea dos agrotóxicos e HMF em mel, avaliando a influência do efeito de matriz (EM) na exatidão do método;
- ❖ Demonstrar a aplicabilidade do método para diferentes tipos de mel, empregando QuEChERS e LC-APCI-MS/MS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mel

3.1.1 Apicultura e aspectos sócio econômicos

O mel, que é usado como alimento pelo homem desde a pré-história, por vários séculos foi retirado dos enxames de forma extrativista e predatória. Entretanto, com o passar do tempo, o homem foi aprendendo a proteger seus enxames, a mantê-los em colmeias e manejá-los para obter maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas. Nascia, assim, a apicultura. Essa atividade atravessou o tempo e se tornou uma importante fonte de renda para várias famílias. Hoje, além do mel, é possível explorar produtos como: pólen apícola, cera, própolis, geléia real, apitoxina, rainhas e polinização (EMBRAPA, 2003).

O transporte de grãos de pólen de uma flor para outra ou entre suas estruturas reprodutivas é fundamental para as espécies vegetais que necessitam da polinização cruzada. A polinização das plantas é a maior contribuição ambiental das abelhas melíferas, mas para os apicultores a maior receita provém do mel colhido (CRANE, 1985; WOLFF, 2008).

A apicultura é uma atividade sustentável, que gera renda para o homem do campo sem comprometer o meio ambiente. Além disso, a cadeia apícola nacional envolve cerca de um milhão de pessoas no Brasil, sendo que em algumas localidades esta é a principal fonte de renda familiar (WOLFF, 2008). Na região sul do Rio Grande do Sul, segundo dados da EMATER (EsReg Pelotas/RS), existe cerca de 2000 apicultores, e as principais floradas para a produção de mel são de eucalipto, campo, mata nativa e pastagens (ANEXO 1). Na Figura 1, é mostrada a colheita e envase de mel, realizada por apicultores do município de Rio Grande/RS.



Figura 1 - Apicultura no município de Rio Grande/RS. Imagens cedidas pela EMATER- Rio Grande/RS.

No Brasil, em 2009, a produção total de mel foi estimada em 38.765 toneladas. O estado do Rio Grande do Sul foi o maior produtor do país, com 7.155 toneladas, sendo responsável por mais de 18% da produção nacional. A região sul do estado, que abrange 22 municípios, é responsável por aproximadamente 10% da produção do Rio Grande do Sul, e o município de Rio Grande produziu 34.706 Kg de mel (IBGE, 2010), sendo um dos maiores produtores, como pode ser observado na Figura 2.

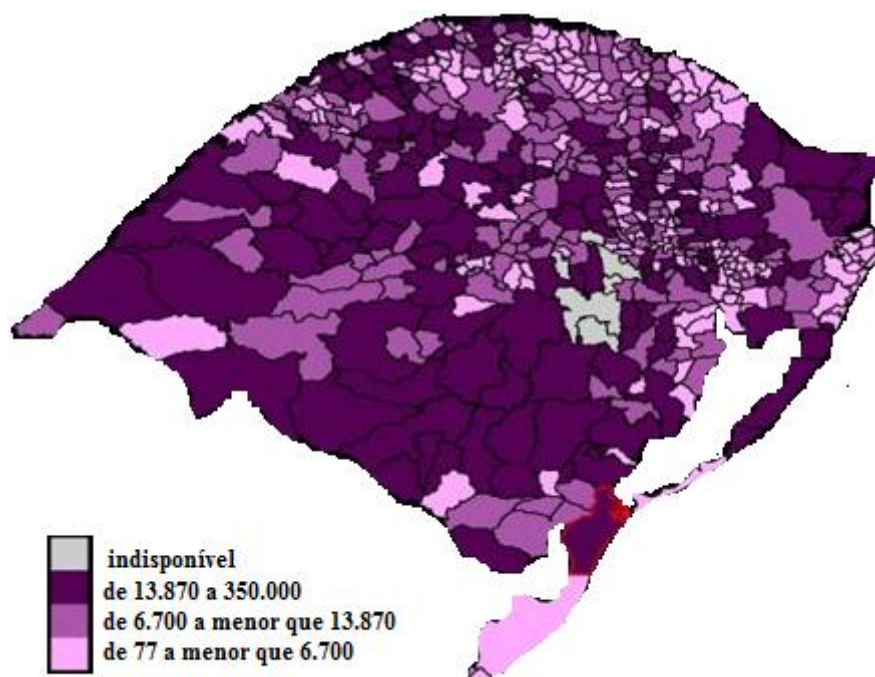


Figura 2 - Produção de mel no Estado do Rio Grande do Sul (Fonte: IBGE, pecuária municipal, 2009).

Além disso, em 2009, as exportações de mel aumentaram 52,2% em valor (US\$ 3.714.010,00) e 49,4% em peso (1.215.680 kg). O Rio Grande do Sul foi o quarto estado exportador (SEBRAE, 2010).

3.1.2 Composição química do mel

O mel é um composto natural doce produzido por abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou da secreção de partes vivas das plantas. Sua composição é altamente influenciada pelos tipos de flores usadas pelas abelhas, bem como condições regionais e climáticas (AJLOUNI *et al.*, 2010).

Os principais componentes do mel são os açúcares, dos quais os monossacarídeos frutose e glicose, juntos, perfazem cerca de 70% do total. Além disso, outras substâncias como ácidos orgânicos, enzimas, aminoácidos, vitaminas, minerais, pigmentos e ceras também são parte da composição do mel (ANKLAM,

1998; FALLICO *et al.*, 2004). Na Tabela 1 é apresentada a composição química do mel:

Tabela 1- Composição do mel

Componente	Valor médio (%)	Valores extremos (%)
Água	17,2	13,4-22,9
Frutose	38,2	27,3-44,3
Glicose	31,3	22,0-40,8
Sacarose	1,3	0,3-7,6
Maltose	7,3	2,7-16,0
Açúcares superiores	1,5	0,1-8,5
Outros	3,1	0-13,2
Nitrogênio	0,04	0-0,13
Minerais	0,17	0,02-1,03
Ácidos livres ^a	22	6,8-47,2
Lactonas ^a	7,1	0-18,8
Ácidos totais ^a	29,1	8,7-59,5
pH	3,9	3,4-6,1
Índice de diastase	20,8	2,1-61,2

FONTE: Adaptado de BELITZ, 1997.

^a meq kg⁻¹

O teor de umidade do mel deve ser abaixo de 20%, já que o mel excessivamente aquoso é muito propenso a sofrer fermentações por leveduras osmófilas (BELITZ, 1997).

Os principais carboidratos presentes no mel, frutose e glicose, também estão relacionados com a cristalização do mel. Foi verificado que a glicose se torna mais solúvel à medida que a concentração de frutose aumenta. Pode-se concluir, então,

que méis com teores de frutose elevados e baixos teores de glicose são menos suscetíveis à granulação (MOREIRA *et al.*, 2001).

Também já foram identificados mais de 20 oligossacarídeos no mel, sendo a maltose em maior proporção (29,4%). Esta composição vem determinada diferentemente pelas plantas a partir das quais o mel foi elaborado (BELITZ, 1997).

A acidez do mel está relacionada com a presença de ácidos orgânicos, particularmente o ácido glucônico (70-90%), em equilíbrio com suas lactonas ou ésteres, além de íons inorgânicos, como fosfato e cloreto (AJLOUNI *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2001). Em pequenas quantidades estão presentes outros ácidos, como por exemplo, acético, láctico, cítrico, fórmico, málico, maleico e oxálico (BELITZ, 1997).

Foi verificado que o mel de eucalipto possui uma maior concentração de ácidos livres do que outros méis, como de laranjeira por exemplo. Estes dados demonstram a influência do tipo floral na acidez total do mel (AJLOUNI *et al.*, 2010).

Além disso, a acidez total pode ser utilizada como um indicador de deterioração devido ao tempo de estocagem e condições de armazenamento da amostra. Isto porque durante a fermentação, glicose e frutose são convertidos em dióxido de carbono e álcool. O álcool então é hidrolisado na presença de oxigênio e convertido à ácido acético, que contribui para o nível de acidez livre (SUAREZ-LUQUE *et al.*, 2002).

No mel já foram identificados mais de 200 substâncias voláteis, que são ésteres de ácidos alifáticos e aromáticos, aldeídos, cetonas e alcoóis. Os mais importantes são a β -demascenona e fenilacetil, que são característicos do odor e sabor do mel (BELITZ, 1997).

Substâncias fenólicas presentes (flavonóides, flavonas, flavononas e ácidos benzóico e cinâmico) exibem uma ampla faixa de efeitos biológicos, incluindo antibactericida e anti-inflamatório, e agem como antioxidantes naturais. A capacidade antioxidante do mel é similar à de muitas frutas e vegetais frescos (PYRZYNSKA *et al.*, 2009).

As proteínas e aminoácidos presentes são provenientes do pólen ou das abelhas. A quantidade de aminoácidos é de aproximadamente 1% (em relação extrato seco) e a prolina é o maior constituinte (50-85%). Além da prolina, outros 26

aminoácidos foram identificados em proporções relativas dependendo da origem floral (HERMOSÍN *et al.*, 2003).

A tendência do mel à turbidez, caramelização e cristalização seria aumentada pela presença de colóides. Essas substâncias foram identificadas como ceras, agregados de proteínas e polissacarídeos (MOREIRA *et al.*, 2001).

A medida que aumenta o tempo de armazenamento, o mel vai escurecendo e perdendo seu aroma. Além disso, o conteúdo de HMF aumenta, de acordo com o pH e temperatura (BELITZ, 1997).

3.1.2.1 5-hidroxi-metilfurfural (HMF)

O HMF resulta da quebra de açúcares hexoses, tais como glicose e frutose, na presença de um ácido (Figura 3), e tem assumido importância no controle de qualidade do mel, porque sua quantidade em uma amostra de mel é usada como indicador direto da qualidade. Geralmente não está presente em méis frescos e seu conteúdo tende a aumentar durante o processo de aquecimento e ao longo tempo de estocagem, pela reação de Maillard em carboidratos ou desidratação catalítica ácida das hexoses (CRANE, 1985; LEMOS *et al.*, 2010; ZAPALLÀ *et al.*, 2005).

O HMF é um dos principais produtos de degradação no mel sendo o aumento de sua concentração influenciada pelo baixo pH, acidez total, minerais, origem botânica, umidade, temperatura e estresse fotoquímico. Além disso, altas concentrações de HMF também indicam adulteração, deterioração da qualidade do produto, superaquecimento e alto tempo de estocagem (FALLICO *et al.*, 2004; SPANO *et al.*, 2009).

A presença de componentes potencialmente tóxicos (tais como aldeídos reativos) em alimentos, vem aumentando a atenção de agências protetoras do consumidor e de controle de qualidade. Em particular, alguns estudos mostram que o HMF está entre as substâncias de risco de citotoxicidade, genotoxicidade e atividade mutagênica (SPANNO *et al.*, 2009), além de ocasionar irritação nos olhos, sistema respiratório e pele, quando em altas concentrações (CAPUANO *et al.*, 2010). Além do HMF, seus derivados 5-sulfoximetilfurfural (SMF) e 5-

clorometilfurfural (CMF) também são citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (TEXEIDÓ *et al.*, 2008).

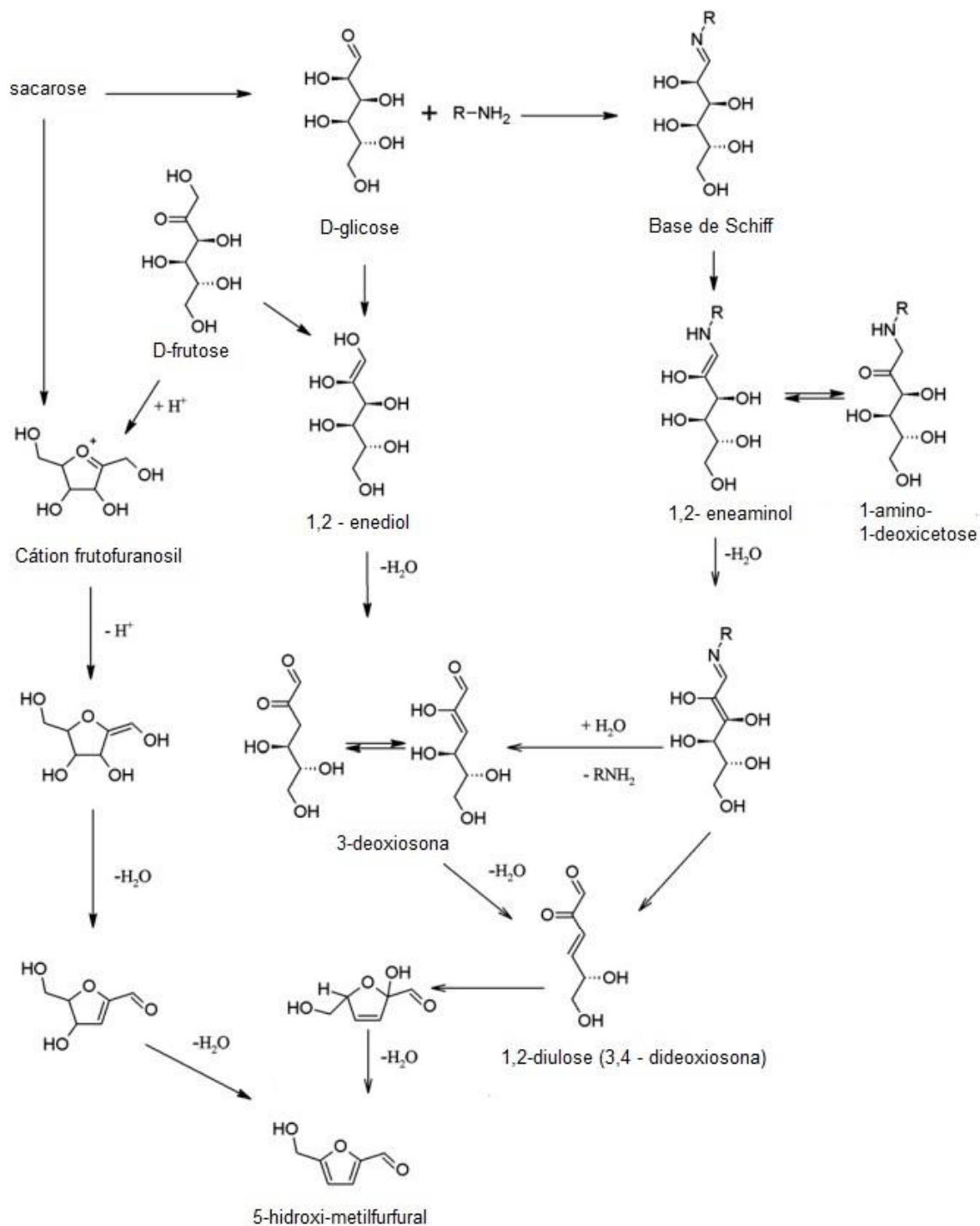


Figura 3 - Esquema da reação proposta para a formação do HMF. Adaptado de CAPUANO, 2010.

As potencialidades dos efeitos tóxicos do HMF vem despertando a atenção da comunidade científica, que atualmente busca estabelecer um método rápido e sensível para determinar o analito em matrizes reais, como no caso o mel.

A legislação brasileira estabelece uma concentração máxima residual para o HMF em mel de 60 mg kg^{-1} (MAPA, 2010), enquanto em países europeus essa concentração não deve ultrapassar 40 mg kg^{-1} , com exceção para países tropicais, em que a concentração não deve ultrapassar 80 mg kg^{-1} (CODEX, 2001).

A Comissão Internacional do Mel (IHC) estabelece três métodos de análise para determinação de HMF em mel: dois métodos espectrofotométricos (Winkler e White) e um método cromatográfico (LC-UV).

ZAPALLÀ e colaboradores (2005) desenvolveram um trabalho de comparação destes três métodos para diferentes tipos de mel. Para todos os métodos testados, o mel foi diluído em água. Para o método por LC, a amostra foi filtrada e o HMF quantificado por LC-DAD. Os outros dois métodos avaliados, utilizaram a espectrofotometria como forma de quantificação. No entanto, o método de White utilizou a adição de solução Carrez I e Carrez II para precipitação de proteínas, seguido de filtração; e o método Winkler, a adição de p-toluidina. Os autores concluíram que o método de White apresentou baixa precisão, e além disso utiliza um reagente carcinogênico (p-toluidina). A partir destas avaliações, o método utilizando LC-DAD foi considerado o mais apropriado.

Alguns trabalhos vem sendo desenvolvidos para a determinação de HMF em mel. LEMOS e colaboradores (2010) desenvolveram um método para análise de 15 amostras de mel, por LC-UV, no qual uma amostra de 5 g de mel foi diluída em água ultrapura, em um balão volumétrico de 50 mL. A seguir, filtrada em membrana de borossilicato de $0,45 \mu\text{m}$ e injetada no sistema LC-UV. Foi utilizada uma coluna de C18 ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) e o modo de eluição isocrático com água/acetonitrila (80:20) e vazão de 1 mL min^{-1} , e a detecção do analito em 285 nm. Em determinadas amostras de diferentes origens botânica e épocas (de 1999 a 2009), foram encontradas concentrações de HMF que variaram de 26,7 à $400,8 \text{ mg kg}^{-1}$. Os autores concluíram que a concentração de HMF aumenta com o envelhecimento do mel.

SPANO e colaboradores (2009) determinaram aldeídos furânicos e ácidos em 18 amostras de mel, de diferentes épocas, e origem botânica. Também foi realizada uma diluição direta do mel em água, seguida por filtração. Para as análises por LC-DAD foi utilizada uma coluna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) e modo de eluição gradiente com água acidificada e metanol. As concentrações de HMF encontradas variaram de 0,97 a 155,8 mg kg⁻¹, também dependendo do tempo de estocagem do mel.

Além do mel, a determinação de HMF em outros alimentos vem sendo estudada, como por exemplo em alimentos para crianças (GOKMEN *et al.*, 2006), açúcares, vinagre balsâmico, caramelo e suco de maçã (GASPAR *et al.*, 2009) e suco de laranja, cereais, mel, biscoitos e laranjas (TEXEIDÓ *et al.*, 2008). Este último, foi o único trabalho encontrado na revisão bibliográfica que desenvolve um método utilizando LC-APCI-MS/MS para a determinação de HMF. Para isto, o autor realiza SPE na etapa do preparo de amostra, e para as análises por LC-MS utiliza uma coluna fenil-fluorinada e modo de eluição isocrático, com água:metanol (90:10). A quantificação foi realizada de duas maneiras: através da adição de padrão e pela curva no extrato da matriz. Como os resultados não foram significativamente diferentes, a calibração na matriz foi proposta como método mais rápido e aceitável para a quantificação. Foram encontradas concentrações na faixa de 3,4 a 44,5 mg kg⁻¹ para o HMF nas amostras de mel.

3.1.3 Contaminação do mel

Atualmente, produtos apícolas são produzidos em ambientes poluídos por diversas fontes de contaminação. Em geral, a contaminação dos produtos apícolas pode ser ocasionada através de uma forma indireta, pelo ambiente através da utilização de agrotóxicos e outros contaminantes, ou diretamente pelas práticas apícolas, na utilização de antibióticos e acaricidas para o tratamento de doenças da colmeia.

Agrotóxicos aplicados imprópriamente, especialmente os sistêmicos que entram no sistema fluido de uma planta, podem contaminar o pólen e o néctar das flores. Para a produção de mel, a cada dia de 10.000 a 25.000 abelhas operárias

fazem uma média de 10 viagens para explorar aproximadamente 7 km² nas áreas que cercam seu “habitat”, recolhendo o néctar, a água e o pólen das flores. Durante este processo, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados por elas e ficam retidos nos pelos superficiais de seu corpo ou são inalados e unidos em seu aparelho respiratório (CRANE 1985; RISSATO *et al.*, 2006). Desta forma, as abelhas podem coletar os resíduos de agrotóxicos utilizados nas regiões próximas às colmeias e contaminar indiretamente o mel e outros produtos apícolas.

Outra fonte de contaminação do mel é através da utilização de produtos químicos, como acaricidas e antibióticos, diretamente na colmeia para tratar de doenças das abelhas. Frequentemente são utilizados acaricidas como amitraz, cimazol, bromopropilato, coumafós, flumetrina, e τ -fluvalinato para o combate ao *Varroa jacobsoni* (Figura 4), um ácaro que suga o sangue (hemolinfa) das abelhas adultas e larvas (BOGDANOV, 2006; KORTA *et al.*, 2001; RIAL-OTERO *et al.*, 2007).



Figura 4 - Infestação do ácaro varroa jacobsoni nas abelhas. Figuras apresentadas no rótulo do produto Bayvarol®.

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos, bem como de outros contaminantes no mel, auxilia na avaliação do potencial de risco destes produtos à saúde do consumidor e fornece informações sobre o uso de agrotóxicos nos campos de colheita e arredores. O Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Mel (PNCRC/2010), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, encontra-se no Anexo 2.

3.2 Agrotóxicos

A qualidade da produção agrícola sempre foi intensamente afetada pelo aparecimento de formas de vida indesejáveis, tais como insetos e ervas daninhas. Desta forma, tornou-se necessária a utilização de agrotóxicos, também denominados pesticidas, de diversas classes químicas (COUTINHO *et al.*, 2005).

De acordo com a legislação brasileira, através do decreto nº 4.074, que regulamenta a lei 7802/1989, os agrotóxicos são definidos como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, 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).

O mercado brasileiro de agrotóxicos é o maior do mundo, e representa 16% do mercado mundial. Só em 2009, foram vendidas mais de 780 mil toneladas de produtos em nosso país (ANVISA, 2010). Porém, seu uso indiscriminado pode apresentar riscos ao meio ambiente e também à saúde, pois também pode ser introduzido na cadeia alimentar através dos alimentos contaminados, afetando a saúde humana.

3.2.1 Classificação

Existem cerca de 300 princípios ativos em duas mil formulações comerciais diferentes no Brasil, classificados quanto à sua ação e grupo químico a que pertencem (STOPPELLI, 2005). De acordo com o organismo alvo, os agrotóxicos são classificados em acaricidas, bactericidas, inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, raticidas, vermífugos, entre outros, de acordo com as pragas que controlam (RIBEIRO *et al.*, 2008; JARDIM *et al.*, 2009).

Em relação à estrutura química, eles podem pertencer à classe dos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, organonitrogenados, triazinas, benziamidazóis, etc (RIBEIRO *et al.*, 2008). Devido à variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais os agrotóxicos apresentam diferentes modos de ação, biotransformação e eliminação, sendo que alguns deles podem causar riscos à saúde e ao meio ambiente (GALLI *et al.*, 2006).

Também podem ser classificados em orgânicos: carbamatos, clorados, fosforados e cloro fosforados; inorgânicos: segundo a composição química, apresentando arsênio, tálio, bário, nitrogênio, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco; e botânicos: compostos de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona (JARDIM *et al.*, 2009).

Além disso, podem ser divididos em dois grupos principais, agrotóxicos de contato ou não sistêmicos e agrotóxicos sistêmicos. Os agrotóxicos de contato ou não sistêmicos não penetram no tecido vegetal e, conseqüentemente, não são transportados dentro do sistema vascular das plantas. O caráter sistêmico foi introduzido nos agrotóxicos que vieram após 1940; estes penetram na cutícula da planta sendo transportados pelo seu sistema vascular. São pouco afetados pelo clima e conferem imunidade em todo o crescimento da nova planta (RODRIGUES, 2010).

3.2.2 Toxicidade

A toxicologia é o estudo dos efeitos nocivos de substâncias sobre os seres vivos. Com relação ao estudo toxicológico dos agrotóxicos, devem ser analisadas as conseqüências ambientais associadas ao uso desses produtos químicos, com ênfase nas substâncias cuja toxicidade chega a afetar a saúde humana (JARDIM *et al.*, 2009). As classes toxicológicas dos agrotóxicos são indicadas por meio das cores dos rótulos , sendo:

- classe I – faixa vermelha (extremamente tóxico);
- classe II – faixa amarela (altamente tóxico);
- classe III – faixa azul (medianamente tóxico);
- classe IV – faixa verde (pouco ou muito pouco tóxico).

Atualmente, muitos agrotóxicos, principalmente da classe dos organoclorados e organofosforados que são as mais tóxicas existentes, tiveram seu uso proibido devido à possibilidade de suas fórmulas favorecerem a formação de tumores cancerígenos, assim como vários outros problemas à saúde humana. Com isto, o desenvolvimento de técnicas precisas de quantificação de resíduos de diferentes agrotóxicos em águas e alimentos tornou-se de fundamental importância (GALLI *et al.*, 2006).

A ANVISA e o MAPA dispõem sobre o uso de agrotóxicos em diversas culturas, estabelecendo limites máximos de resíduos (LMR) dessas substâncias em diversos alimentos.

3.2.3 Toxicidade de agrotóxicos para as abelhas

Fatos relacionados a mortalidade de abelhas por agrotóxicos tornam-se importantes justificativas para o trabalho. Em julho de 2007, o sumiço de abelhas no estado do Rio Grande do Sul, provavelmente devido à contaminação por dessecantes e formicidas utilizados em lavouras, foi destacado no jornal Zero Hora (ZERO HORA, 2007). Em 2008 foi relatado que o agrotóxico tiametoxam, utilizado no cultivo da laranja, estaria dizimando abelhas no estado de São Paulo, e teria sido detectado nos insetos mortos (PORTAL ECODEBATE, 2008).

Os inseticidas fipronil, imidacloprido e tiametoxam agem fortemente no sistema nervoso dos insetos-alvo, e também são altamente tóxicos para as abelhas pois podem entrar em contato com elas durante a coleta de pólen e néctar. Estes inseticidas são suspeitos de causar uma perda significativa de colônias de abelhas, observada em diversos países desde a década passada (GARCÍA-CHAO *et al.*, 2010). Desde 1998, apicultores europeus e canadenses reportam sérias perdas de abelhas melíferas atribuídas ao uso dos inseticidas imidacloprido e fipronil nas práticas agrícolas (FIDENTE *et al.*, 2005; RIAL-OTERO *et al.*, 2007). Na França e Itália, apicultores suspeitam que o imidacloprido seja responsável pela morte de inúmeras abelhas e pelo drástico declínio na produção de mel (TOTTI *et al.*, 2006) e em 2005 foi relatado na França a morte de abelhas após estas forragearem culturas de girassol tratadas com fipronil (EL HASSANI *et al.*, 2005).

A aplicação destes agrotóxicos para o controle de pragas pode não somente causar a mortalidade imediata das abelhas, assim como afetá-las gradualmente. Os sintomas mais evidentes dos efeitos de doses sub-letais dos agrotóxicos são dificuldades de mobilidade, diminuição da capacidade de comunicação, interferindo em suas atividades sociais e dificuldade de retorno a colônia logo após as coletas (MALASPINA, 2006). Um estudo foi realizado com a aplicação de doses sub letais de fipronil em abelhas melíferas. Uma baixa dose de fipronil (0,5 ng/abelha) aplicada topicamente foi suficiente para reduzir a aprendizagem olfativa das abelhas, resultado que já havia sido observado com o imidacloprido (EL HASSANI *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar, que em alguns países como Alemanha, França, Inglaterra e Itália, os agrotóxicos neonicotinóides (imidacloprido e tiametoxam) já tiveram sua venda proibida por estarem relacionados à morte de abelhas (PORTAL ECODEBATE, 2008). Ainda assim, o Brasil permite o uso de tais agrotóxicos, que são recomendados pela ANVISA para diversas culturas (incluindo pêssego, citros, eucalipto, pastagens e arroz) podendo ocasionar a possível contaminação de produtos apícolas e até a morte de abelhas, causando grandes prejuízos aos apicultores.

3.3 Técnicas de preparo de amostra

A preparação da amostra é a série de etapas necessárias para transformar uma amostra, de tal forma que ela se torne apropriada para análise. A preparação de uma amostra pode incluir a sua dissolução, a extração do analito de uma matriz complexa, a concentração de um analito diluído a um nível dentro dos limites de determinação, a conversão química do analito a uma forma que seja detectável e, finalmente, a remoção ou mascaramento de espécies interferentes (HARRIS, 2008).

Devido à complexidade da matriz, um preparo de amostra eficiente aliado à detecção de níveis traços dos analitos é importante para obter resultados confiáveis. O preparo de amostra é a etapa fundamental para assegurar a eficiência dos métodos analíticos, especialmente nas análises de substâncias traços em alimentos.

Um preparo de amostra eficiente depende da matriz, bem como das propriedades e da concentração dos analitos (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Nas análises de resíduos de agrotóxicos, as concentrações do analito geralmente são muito baixas e as amostras são muito complexas para serem analisadas sem uma etapa prévia de preparo da amostra. As interferências são problemas freqüentes que devem ser considerados. Os principais objetivos do preparo da amostra são, portanto, promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse, e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes (PRESTES *et al.*, 2009).

Na determinação de agrotóxicos em mel são empregadas diversas técnicas de preparo de amostra, e alguns exemplos são apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 - Técnicas de preparo de amostra utilizadas para determinação de agrotóxicos em mel

Preparo de amostra	Analitos	LOQ	Recuperação RSD	Análises	Autor, ano
SPE	acaricidas	0,003 – 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$	63 – 100 % < 7,9%	LC-DAD	Korta, 2001
	51 agrotóxicos	0,1 – 6,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LOD)	> 86% < 10%	GC-MS	Albero, 2004
	4 inseticidas	0,01 – 0,1 mg kg^{-1} (LOD)	76 – 99% < 10%	LC-MS	Fidente, 2005
MSPD	4 agrotóxicos	0,07 – 0,25 mg kg^{-1}	54 – 84 % < 8,5 %	GC-MS	Bezerra, 2010
LLE	multirresíduo	< 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LOD)	76 – 91% < 0,23% (sd)	GC-NPD	Choudhary, 2008
SFE	32 agrotóxicos	< 0,01 mg kg^{-1} (LOD)	88 – 98% < 6%	GC-ECD	Rissato, 2004
SBSE	6 inseticidas	0,04 - 0,4 mg kg^{-1}	52 - 75% < 9%	LC-MS	Blasco, 2004
DLLME	5 triazinas	< 8,55 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LOD)	60-133% < 16,5%	LC-DAD	Wang, 2010
QuEChERS	36 agrotóxicos	0,02 – 0,05 mg kg^{-1}	72-120% < 22%	GC-ECD	Barakat, 2007

Um artigo de revisão sobre métodos cromatográficos para a determinação de agrotóxicos em mel, incluindo algumas das principais técnicas de preparo de amostra empregadas para tal, foi publicado em 2007 na revista *Talanta*, por RIAL-OTERO e colaboradores (RIAL-OETRO *et al.*, 2007).

3.3.1 QuEChERS

O método QuEChERS (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro; do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) foi desenvolvido em 2003 para extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, por ANASTASSIADES e colaboradores (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). O método é amplamente utilizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos polares, mediantemente polares e apolares, em diversas matrizes de alimentos, pois é simples, barato, passível de alto rendimento e bastante eficiente, com um número mínimo de etapas (KOESUKWIWAT *et al.*, 2008).

O método original envolve uma extração inicial de 10 g de amostra com acetonitrila, seguido por um particionamento de fases formado com a adição de sulfato de magnésio e uma etapa de *cleanup* (limpeza) do extrato, por extração em fase sólida dispersiva (DSPE) com amina primária-secundária (PSA), cuja estrutura química é apresentada na Figura 5:

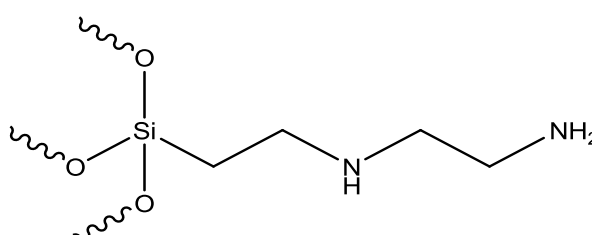


Figura 5 – Estrutura química da PSA

Desde seu desenvolvimento, o método QuEChERS tem passado por diferentes modificações para ser empregado na determinação de diferentes analitos em diversas matrizes.

Os solventes mais utilizados para extração no método QuEChERS são: acetato de etila, acetona e acetonitrila, sendo que cada um destes apresenta vantagens e desvantagens. A seleção do solvente extrator é um dos pontos fundamentais para a extração quantitativa dos analitos e para isso, muitos aspectos devem ser considerados como: habilidade de extração dos analitos, seletividade durante a extração, partição e *cleanup*, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, custo, segurança, e aspectos ambientais (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; PRESTES *et al.*, 2009). No entanto, a acetonitrila minimiza a extração de lipídios, proteínas e carboidratos, demonstrando ser um solvente mais efetivo e mais utilizado em métodos multirresíduo (LEHOTAY *et al.*, 2001; CUNHA *et al.*, 2007).

Para promover o efeito “*salting out*” são utilizados sais, geralmente NaCl adicionado juntamente com o MgSO_4 , o qual é o mais utilizado devido à maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração especialmente das substâncias apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003; REYNOLDS, 2005; PRESTES *et al.*, 2009). O NaCl é utilizado em alguns casos pois geralmente aumenta as recuperações para analitos polares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Porém em métodos que utilizam acetona, a partição é controlada através de uma combinação de NaCl e solventes apolares, mas apresenta desvantagens como a diluição do extrato e o consumo maior de solventes (PRESTES *et al.*, 2009).

A etapa de *cleanup* é realizada para remover co-extrativos que possam interferir posteriormente nas análises. O *cleanup* geralmente é realizado por DSPE, assim como no método original, onde uma alíquota do extrato é colocada em contato com um sorvente que retém os interferentes da matriz, e após a agitação e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico. Os sorventes mais utilizados são a PSA, o C18 e o carbono grafite (GCB). PSA retém ácidos orgânicos polares, açúcares e ácidos graxos; C18 é mais utilizado para matrizes cujo teor de gordura é $\geq 2\%$ pois retém substâncias graxas e lipídios; e o GCB é utilizado para reter interferentes com estruturas planares, como esteróis e clorofila (PRESTES *et al.*, 2009; KOESUKWIWAT *et al.*, 2008; LEHOTAY, 2007).

Na literatura atual, foram encontrados 3 trabalhos que empregam o método QuEChERS para extração de agrotóxicos em mel:

PAN *et al.*, 2006: utilizaram este método para a determinação de cloranfenicol (antibiótico). Os autores empregaram acetonitrila como solvente de extração e banho de ultrassom para agitação. Para a etapa de *cleanup* foram utilizadas 25 g de PSA para 1,0 mL de extrato, que posteriormente foi evaporado e redissolvido para a pré-concentração. A determinação foi realizada por LC-ESI-MS, em que foi utilizada uma coluna de C18 e fase móvel composta por metanol e solução aquosa de acetato de amônio 0,2%. As recuperações foram de 78-93%, com RSD menores que 3,9% e o LOQ foi de 0,006 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

BARAKAT *et al.*, 2007: utilizaram o método para a determinação de 36 pesticidas. Os autores empregaram acetonitrila como solvente de extração e tampão acetato. Na etapa de *cleanup*, utilizaram 0,4 g de PSA juntamente com 0,6 g de MgSO_4 para 6,0 mL de extrato. A determinação foi realizada por GC-ECD, e as recuperações foram de 72-120%, com RSD menores que 22% e LOQ com valores entre 0,02 e 0,05 mg kg^{-1} .

KAMEL, 2010: utilizou o método QuEChERS para a determinação de pesticidas neonicotinóides e metabólitos em mel, pólen e abelhas. O autor empregou acetonitrila como solvente de extração e na etapa de *cleanup* foi realizada SPE com cartuchos de C18. O extrato foi evaporado e redissolvido para pré-concentração. A determinação foi realizada por LC-ESI-MS, em que foi utilizada uma coluna de C18 e fase móvel composta por metanol e solução aquosa de ácido fórmico 0,1%. As recuperações foram de 70-120%, com RSD menores que 20% para a maioria dos analitos, e os valores dos LOD foram de 0,2 a 15 ng g^{-1} .

No entanto, o método QuEChERS é amplamente empregado para diversas matrizes, principalmente de alimentos. Dependendo da matriz e dos analitos, o método apresenta diversas modificações. Na Tabela 3, são apresentados alguns dos trabalhos mais recentes envolvendo o método, com diferentes modificações, como por exemplo no solvente extrator e na etapa de *cleanup*.

Ensaio de proficiência empregando o método QuEChERS mostram que este método é robusto, sendo o método transferido com sucesso entre os laboratórios participantes. Nos Estados Unidos, este método foi adotado em 2007 como método

oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos. O método QuEChERS também é considerado método oficial pelo *European Committee for Standardization* (PRESTES *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Alguns trabalhos recentes utilizando o método QuEChERS para a determinação de agrotóxicos em diferentes matrizes

Matriz	Analitos	Preparo da amostra	LOQ	Recuperação-RSD	Análises	Autor, Ano
Solo	4 herbicidas	10 g de amostra + 20 mL acetona (30 min agitação) <i>Cleanup</i> : 10 mL extrato + 0,15 g C18	0,5-1,2 ng g ⁻¹ (LOD)	76,3-92,5% - < 7,2%	LC-DAD	Wu, 2009
Chás (folhas, de infusão e pronto)	42 agrotóxicos	1 g de amostra + 10 mL de água + 10 mL de acetato de etila e ciclohexano (9:1) + 1 g NaCl <i>Cleanup</i> : 2 mL de extrato + PSA, GCB e Florisil (25 mg cada + 300 mg de Na ₂ SO ₄)	< 47 ng g ⁻¹	70-120% - <15%	LC-MS/MS	Kanrar, 2010
Azeitonas	Multirresíduo	10 g de amostra + 10 mL de acetonitrila + 4 g MgSO ₄ + 1 g de NaCl <i>Cleanup</i> : 5 mL de extrato+ PSA, C18 e GCB (250 mg cada + 750 mg MgSO ₄)	< 165 µg kg ⁻¹	70-120% (70% dos analitos) - <10% (85% dos analitos)	LC-MS/MS	Gibert-Lopez, 2010
Grãos de cereais (arroz, milho)	Multirresíduo	2-5 g de amostra + 20 mL acetonitrila + água (1:1) + 4 g MgSO ₄ + 1 g de NaCl <i>Cleanup</i> : 1 mL de extrato + 150 mg PSA + 50 mg C18 + 150 mg MgSO ₄	10 ng g ⁻¹ (a maioria dos analitos)	70-120% - < 20% (~180 analitos)	GC-TOF-MS e UPLC-MS/MS	Mastovská, 2010
Abelhas	Multirresíduo	2 g de amostra + 15 mL de acetonitrila e água (2:1) + tampão citrato + 4 g MgSO ₄ + 1 g de NaCl <i>Cleanup</i> : 5 mL do extrato + 500 mg MgSO ₄ + 450 mg C18 + 200 mg PSA + 50 mg GCB	10-500 ng g ⁻¹	70-120% - < 20% (para a maioria dos analitos)	GC-MS/MS	Walorczyk, 2009
Vinho	72 agrotóxicos	20 mL amostra + 20 mL de acetonitrila + 8 g de MgSO ₄ + 3,5 g de NaCl <i>Cleanup</i> : 9 mL de extrato + 300 mg PSA + 150 mg GCB + 900 mg MgSO ₄	0,3–3,3 µg L ⁻¹ (p/maioria)	<80% - >10% (p/maioria)	ULPC-MS/MS	Zhang, 2009
Cebola	5 agrotóxicos	10 g de amostra + 10 mL de acetonitrila + 4 g de MgSO ₄ Sem etapa de <i>cleanup</i>	0,0005 – 0,05 mg kg ⁻¹	61,8 – 120 % - <20%	LC-MS	Rodrigues, 2011

3.4 Técnicas cromatográficas para a determinação de resíduos de agrotóxicos

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos

A cromatografia é uma técnica empregada de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Nenhuma outra técnica de separação é tão poderosa e de aplicação tão generalizada como a cromatografia (SKOOG, 2009). A cromatografia líquida é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia, pois independentemente da limitação da volatilidade ou estabilidade térmica, requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel (COLLINS *et al.*, 2006).

O detector é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico. Ele mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra, ou da solução que a contém, e envia um sinal para registro, geralmente, diretamente proporcional à concentração do componente da amostra (COLLINS *et al.*, 2006).

O detector por arranjo de diodos (DAD) utiliza uma lâmpada de deutério ou xenônio que emite luz, e a luz emitida por esta lâmpada é colimada através de um sistema de lentes sobre a amostra. A luz total que passa através da célula contendo a amostra incide sobre uma grade holográfica. Esta grade irá difratar a radiação, separando os seus diferentes comprimentos de onda, sendo que cada um deles irá incidir sobre um diodo do arranjo. Este diodo, ao ser irradiado, produz uma corrente elétrica cuja magnitude depende da intensidade da emissão. Através de um circuito de calibração adequado, esta corrente será transformada em absorbância nos diferentes comprimentos de onda, resultando no espectro de absorção da substância (SCOTT, 2003; CALDAS, 2009).

Os detectores DAD permitem a coleta de dados de um espectro inteiro, na região do ultravioleta e do visível (190 a 800 nm), em aproximadamente 1 segundo (CALDAS, 2009). Uma grande maioria de substâncias absorvem radiação UV incluindo as que têm elétrons π e elétrons desemparelhados, uma dupla ligação

adjacente a um átomo contendo elétrons não ligantes ($>C=C-X$), substâncias contendo bromo, iodo ou enxofre, aromáticos, grupo carbonila ($>C=O$), grupo nitro ($-NO_2$), íons inorgânicos (Br^- , I^- , NO_3^- , NO_2^-) e duas duplas conjugadas ($>C=C-C=C<$) (COLLINS *et al.*, 2006).

Algumas vantagens do DAD: o fato de ser não-destrutivo e poder ser acoplado com outros detectores; permite selecionar o comprimento de onda de máxima absorbância de cada substância presente na amostra; permite determinar a pureza do pico cromatográfico (CALDAS, 2009; COLLINS *et al.*, 2006).

LC-DAD tem sido empregada para a determinação não somente de agrotóxicos, mas também diversos analitos, em diferentes matrizes, como água, solo e alimentos. Alguns exemplos são citados abaixo:

- OBANA *et al.*, 2002: determinação de 3 inseticidas em frutas e vegetais; preparo da amostra por LLE e SPE (*cleanup*);
- SECCIA *et al.*, 2008: determinação de 4 inseticidas em leite bovino; preparo da amostra por SPE;
- CALDAS *et al.*, 2009: determinação de 4 agrotóxicos em águas subterrâneas; preparo da amostra por SPE;
- SPANO *et al.*, 2009: determinação de 5 ácidos e aldeídos furânicos em mel; preparo da amostra: diluição do mel em água e filtração;
- WU *et al.*, 2009: determinação de 4 herbicidas em solo; preparo da amostra: DSPE seguida por DLLME;
- TSAI *et al.*, 2009: determinação de 7 antibióticos em músculo suíno; preparo da amostra: DLLME e DSPE;
- WANG *et al.*, 2010: determinação de 5 triazinas em mel; preparo da amostra: DLLME.

3.4.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é uma das técnicas mais poderosas para a análise de resíduos de agrotóxicos, pois a cromatografia líquida é muito efetiva na separação dos analitos, enquanto a

espectrometria de massas permite a sua identificação e/ou confirmação em níveis traços (JARDIM *et al.*, 2009).

Na detecção por espectrometria de massas é possível obter uma grande quantidade de informação estrutural acerca do analito, o que assegura sua identificação com maior seletividade do que quando ela é feita apenas com base nas características de retenção das substâncias analisadas, como ocorre nas outras técnicas de detecção cromatográficas (VÉKEY, 2001). Além disso, quando existem substâncias que não podem ser totalmente separadas pela técnica cromatográfica empregada, usando MS/MS é possível detectá-las individualmente se possuírem diferentes massas moleculares ou gerarem diferentes espectros de massas (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O espectrômetro de massas é um instrumento sofisticado constituído basicamente de três partes: fonte de ionização, muitas vezes denominada interface, analisador de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados. Após a injeção da amostra no MS, ocorre a produção de íons pela fonte de ionização (COLLINS *et al.*, 2006). As fontes de ionização mais empregadas, que produzem ionização em pressão atmosférica, são: Ionização por Eletronebulização (ESI); Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) e Fotoionização à Pressão Atmosférica (APPI) (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009).

A ESI é de longe a mais empregada no acoplamento LC-MS, seguida pela APCI. A ESI gera, em solução, íons dos analitos antes que eles cheguem ao espectrômetro de massas. O eluato é nebulizado dentro de uma câmara que está sob pressão atmosférica, na presença de um forte campo eletrostático e de um gás aquecido. O aquecimento causa a evaporação do solvente das moléculas do analito. O gás aquecido promove aglomeração do solvente dentro da gota para evaporação. Com a diminuição da gota, ocorre a concentração da carga dentro da gota, e o processo acima descrito se repete. Os íons são transportados ao analisador de massas através de uma série de estágios de vácuo e elementos iônicos que focam o caminho (CALDAS 2009; FERNANDEZ-ALBA, 2005).

A APCI tem sido mais utilizada na análise de moléculas não polares e de maior volatilidade, uma vez que a ionização ocorre na fase gasosa (CHIARADIA *et al.*, 2008; LANÇAS, 2009). O eluente da coluna cromatográfica passa através de um

nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O *spray* formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Na corona é aplicado um campo suficiente para gerar ionização. Como o solvente (proveniente da FM) encontra-se em maior concentração no *spray* que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (CHIARADIA *et al.*, 2008). Na Figura 6 pode ser observada a representação da APCI:

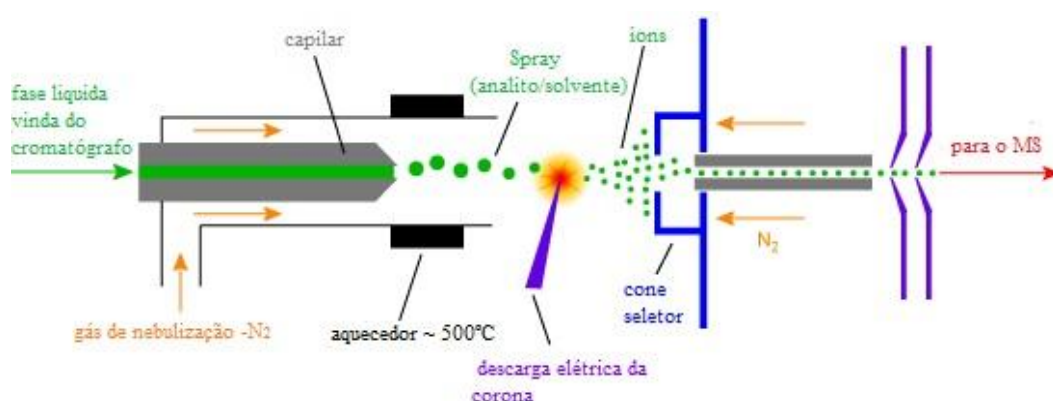


Figura 6 - Interface do tipo APCI para LC-MS. Adaptado de: University of Bristol, www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html.

A APPI baseia-se na absorção de fótons de luz pelo analito, ocasionando sua ionização com perda de um elétron e formando um cátion radicalar ($M^{\bullet+}$). Esta interface é a mais recente, sendo ainda pouco empregada (LANÇAS, 2009).

Após a ionização, os íons são analisados pelo analisador de massas de acordo com sua razão massa/carga. Para algumas misturas complexas é necessário o acoplamento de dois ou mais analisadores de massas em conjunto, em uma técnica conhecida como espectrometria de massas *tandem*. Os espectrômetros de massas *tandem* são do tipo de triplo quadrupolo. No sistema de triplo quadrupolo, o primeiro quadrupolo age como um filtro de massas selecionando o íon de interesse. Esse íon é então fragmentado por colisão com um gás inerte em uma célula de colisão (segundo quadrupolo). O terceiro quadrupolo analisa os fragmentos produzidos (VÉKEY, 2001; SKOOG, 2009).

3.4.2.1 Efeito de matriz em LC-MS

O efeito de matriz em LC-MS ocorre quando substâncias da matriz co-eluem com as substâncias de interesse, alterando a eficiência da ionização dos analitos, suprimindo ou enriquecendo o sinal dos mesmos (TAYLOR, 2005; ISMAIEL *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2010). O exato mecanismo pelo qual ocorre o efeito matriz é desconhecido, mas, provavelmente, é originado da competição entre um analito e a co-eluição de um componente da matriz não monitorado (RODRIGUES, 2010).

Este efeito pode ser diferente nas fontes ESI e APCI, já que estas são diferentes formas de ionização dos analitos. Muitos autores observam que a supressão de sinal ocorre mais freqüentemente na ESI, sendo este efeito pouco pronunciado na APCI. No entanto em APCI, mais comumente ocorre o enriquecimento de sinal (GOSETTI *et al.*, 2010). Um exemplo de efeito de matriz é apresentado na Figura 7, que mostra o enriquecimento de sinal provocado na determinação de tiramina em queijo:

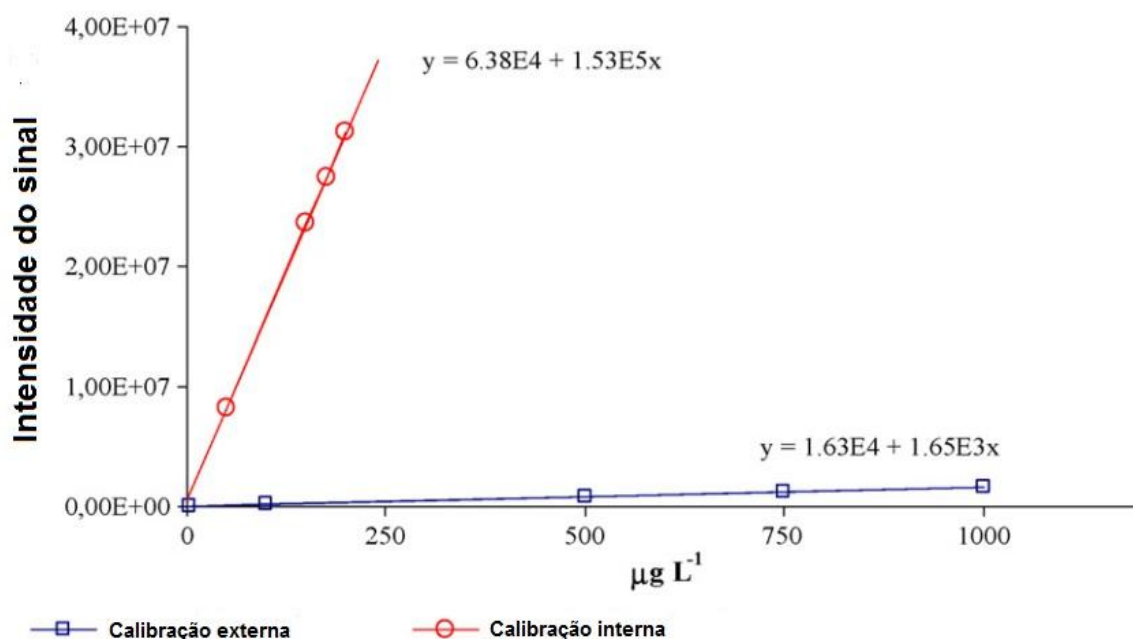


Figura 7 - Enriquecimento de sinal: comparação das curvas de calibração externa e interna (método da adição de padrão). Fonte de ionização APCI. MS no modo MRM. Adaptado de GOSETTI e colaboradores (2010).

Para minimizar a influência dos componentes da matriz na quantificação de agrotóxicos são utilizadas estratégias como limpeza dos extratos, injeção no topo da coluna, e injeção com temperatura programada de vaporização. Também existem os procedimentos que promovem a compensação da ocorrência do efeito de matriz como a utilização de analitos protetores, função de correção, adição de padrão e curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos da matriz (PINHO *et al.*, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na otimização e validação de um método para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e um produto indicador de qualidade em amostras de mel.

Para o preparo de amostra foi utilizado o método QuEChERS modificado, o qual foi otimizado para alcançar maior eficiência no processo de extração. Também, foram otimizados os parâmetros de fragmentação dos analitos para determinação por LC-APCI-MS/MS. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Substâncias Orgânicas e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 Seleção dos agrotóxicos para o estudo

Para a seleção dos agrotóxicos estudados, inicialmente foi contatada a empresa Votorantim Celulose, que possui extensa área de cultivo de eucaliptos na região, para coleta de dados sobre utilização de agrotóxicos em seus cultivos. No entanto, somente dois herbicidas foram mencionados (Scout e Fordor, cujos princípios ativos são glifosato e isoxaflutole, respectivamente).

Não havendo padrões de glifosato e isoxaflutole disponíveis no momento, foi realizada uma pesquisa em sites da ANVISA e MAPA, a fim de verificar quais agrotóxicos são recomendados para cultivos de eucalipto, principal fonte floral para a produção de mel de eucalipto. Foram então selecionados três agrotóxicos: fipronil, imidacloprido e tiametoxam. Além disso, imidacloprido e tiametoxam tem uso indicado para diversas culturas, como pêssago, citros, arroz entre outros (ANVISA, 2010; MAPA, 2010), que tem grande produtividade agrícola na região e também podem ser fontes de pólen e néctar para a produção de mel.

Estes três agrotóxicos então selecionados (fipronil, imidacloprido e tiametoxam) são altamente tóxicos para as abelhas e já foram relacionados ao envenenamento destas em diversas colmeias por todo o mundo, como já discutido na revisão bibliográfica.

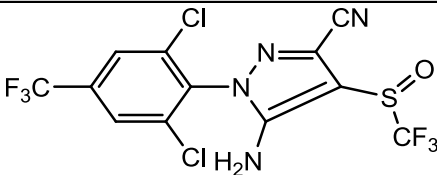
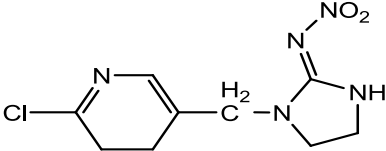
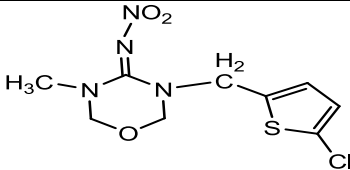
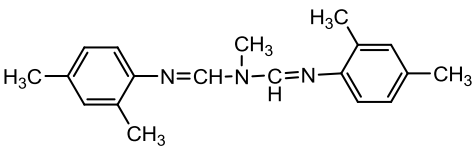
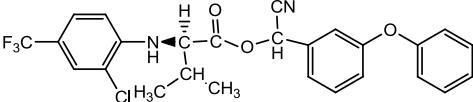
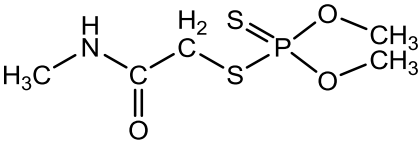
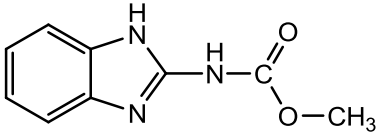
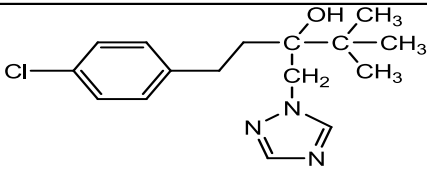
Para o início do trabalho, a determinação destes três agrotóxicos foi realizada por LC-DAD. Conforme o andamento das atividades experimentais, e para a determinação por LC-APCI-MS, foram incluídos mais cinco analitos, também de grande importância, além do HMF.

Dois deles, os acaricidas amitraz e τ -fluvalinato, são utilizados diretamente nas colmeias, para o tratamento do *Varroa jacobsoni*, um parasita que ataca as abelhas melíferas. O amitraz também tem uso indicado para culturas de citros e maçã. O τ -fluvalinato é estável em mel por no mínimo 9 meses (KORTA *et al.*, 2001), e também tem uso indicado em culturas de algodão e café.

O dimetoato também é um inseticida e acaricida, e tem uso indicado para culturas de citros, tomate e maçã, por exemplo. Pertence à classe dos organofosforados, e por isso apresenta um efeito tóxico mais agudo para os seres humanos e outros mamíferos do que os agrotóxicos organoclorados (COUTINHO *et al.*, 2005). Além disso, de todos os agrotóxicos selecionados, somente o dimetoato possui um limite máximo residual em mel na legislação brasileira (MAPA, 2010).

Os fungicidas carbendazim e tebuconazol são amplamente utilizados em diversos cultivos da região, como citros, cebola, arroz e pêssego. Os oito agrotóxicos selecionados encontram-se na Tabela 4, que apresenta a fórmula estrutural, classe, grupo químico, classe toxicológica e ingestão diária aceitável (IDA), e na Tabela 5 que apresenta as principais propriedades físico-químicas de cada um, como pK_a e K_{ow} .

Tabela 4 - Características dos agrotóxicos selecionados

FIPRONIL	
	Grupo químico: Pirazol Classe: Inseticida, formicida e cupinicida Classificação toxicológica: Classe II Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,0002 mg kg⁻¹
IMIDACLOPRIDO	
	Grupo químico: Neonicotinóide Classe: Inseticida Classificação toxicológica: Classe III Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,05 mg kg⁻¹
TIAMETOXAM	
	Grupo químico: Neonicotinóide Classe: Inseticida Classificação toxicológica: Classe III Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,02 mg kg⁻¹
AMITRAZ	
	Grupo químico: Bis (arilformamidina) Classe: Acaricida, inseticida Classificação toxicológica: Classe III Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,01 mg kg⁻¹
T- FLUVALINATO	
	Grupo químico: Piretróide Classe: Acaricida, inseticida Classificação toxicológica: Classe II Ingestão Diária Aceitável (IDA) = -
DIMETOATO	
	Grupo químico: Organofosforado Classe: Acaricida, inseticida Classificação toxicológica: Classe II Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,002 mg kg⁻¹
CARBENDAZIM	
	Grupo químico: Benzimidazol Classe: Fungicida Classificação toxicológica: Classe III Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,02 mg kg⁻¹
TEBUCONAZOL	
	Grupo químico: Triazol Classe: Fungicida Classificação toxicológica: Classe IV Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,03 mg kg⁻¹

Fonte: ANVISA, 2010.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos selecionados para estudo

Agrotóxico	MM (g mol ⁻¹)	pK _a	K _{ow}	Solubilidade em água (g L ⁻¹)	Pressão de vapor (mPa)
			(log P)	pH 7	25 °C
Amitraz	293,4	4,2	5,5	<0,0001	0,34
Carbendazim	191,2	4,2	1,51	0,008	0,15
Dimetoato	229,3	2,0	0,704	23,3	0,25
Fipronil	437,2	n.d*	4,0	1,9 (pH 5); 2,4 (pH 9)	3,7.10 ⁻⁴
T-Fluvalinato	502,9	n.d*	4,26	1,03.10 ⁻⁶	9.10 ⁻⁸ (20°C)
Imidacloprido	255,7	n.d*	0,57	0,61	4.10 ⁻⁷ (20 °C)
Tebuconazol	307,8	b.f*	3,7	0,036	1,7.10 ⁻³ (20°C)
Tiametoxam	291,7	n.d*	-0,13	4,1	6,6.10 ⁻⁶

Fonte: TOMLIN, 2003; n.d = não dissocia / b.f= base muito fraca; (*) Pesticide Properties Database PPDB, 2010

4.2 Instrumentação

- ❖ Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa;
- ❖ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- ❖ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 µL) (Labmate, Polônia; Digipet);
- ❖ pHmetro Hanna pH20 pH21 – eletrodo de vidro combinado (São Paulo, Brasil);
- ❖ Sistema de filtração em membrana Phenomenex;
- ❖ Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- ❖ Ultrassom Quimis modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- ❖ Vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun. (Bioteck Internacional, Alemmar - Comercial e Industrial S.A.);

- ❖ Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- ❖ Cromatógrafo a Líquido Waters (Milford, MA, USA) equipado com bomba quaternária modelo 600, com sistema de eluição por gradiente, detector por Arranjo de Diodos 2996 PDA, sistema de aquisição de dados “software Empower PDA” e alça de injeção de 20 µL;
- ❖ Coluna analítica Waters ODS2 C18 5 µm (150 × 4,6 mm d.i.), (Waters, Milford, MA, USA);
- ❖ Coluna analítica Phenomenex Hyperclone BDS C18 5 µm (250 × 4,6 mm d.i.), (Phenomenex, Torrance, CA, USA);
- ❖ Coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.) (Waters, Milford, MA, USA);
- ❖ Cromatógrafo a Líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização química à pressão atmosférica (APCI), sistema de aquisição de dados através do “software Masslynx 4.0 Waters” e volume de injeção de 10 µL;
- ❖ Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia).

4.3 Reagentes, solventes e materiais

- ❖ Acetato de sódio 99,5% (JT Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- ❖ Ácido acético glacial (Merck, RJ, Brasil);
- ❖ Ácido fórmico p.a. 98% (Merck, RJ, Brasil);
- ❖ Água destilada;
- ❖ Água Ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm);
- ❖ Cloreto de sódio p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- ❖ Hidróxido de amônio p.a. (Isofar, RJ, Brasil);

- ❖ Metanol, acetona, acetato de etila e acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- ❖ PSA-Bondesil (amina primária secundária) (Varian, USA);
- ❖ Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker);
- ❖ Padrões analíticos: 5-hidroxi metilfurfural (HMF) 99,0%, amitraz 98,9%, carbendazim 99,0%, dimetoato 99,4%, fipronil 97,6%, τ -fluvalinato 93,8%, imidacloprido 99,9%, tebuconazol 99,6%, tiametoxam 99,7%, (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil);
- ❖ Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-APCI-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ❖ Gás Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- ❖ Detergente Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ❖ Membrana filtrante de nylon 0,45 μ m de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil);
- ❖ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- ❖ Tubos de polipropileno (50 e 15 mL de capacidade) – Sarstedt (Alemanha);
- ❖ Dispenser Boeco 10 - 50 mL;
- ❖ Vidraria comum de rotina (balões volumétricos, pipetas volumétricas, béquer, etc).

4.4 Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque, contendo 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico (amitraz, carbendazim, dimetoato, fipronil, τ -fluvalinato, imidacloprido, tebuconazol, tiametoxam) e de HMF foram preparadas pela dissolução dos padrões sólidos em acetonitrila, considerando o grau de pureza. As soluções foram armazenadas em frasco âmbar e estocadas a -18 °C.

A partir das soluções estoques de 1000 mg L⁻¹ foram preparadas soluções trabalho de concentrações de 100 e 10 mg L⁻¹ de cada substância em acetonitrila.

Foi preparada uma solução trabalho na concentração de 10 mg L⁻¹, contendo a mistura das seguintes substâncias: HMF, fipronil, imidacloprido e tiametoxam. Esta

solução trabalho e respectivas diluições preparadas diariamente, foram utilizadas para a otimização do método por LC-DAD.

Uma solução trabalho contendo a mistura das 9 substâncias foi preparada em diferentes concentrações para cada substância: 100 mg L⁻¹ para o HMF; 50 mg L⁻¹ para o tiametoxam; 10 mg L⁻¹ para o imidacloprido; 5 mg L⁻¹ para carbendazim, dimetoato e τ -fluvalinato; 1 mg L⁻¹ para fipronil e tebuconazol e 0,5 mg L⁻¹ para o amitraz. Diluições desta solução trabalho, preparadas diariamente, foram utilizadas para a otimização e validação do método por LC-APCI-MS/MS.

4.5 Amostras de mel

As amostras de mel de flor de eucalipto, provenientes do município de Rio Grande/RS, foram adquiridas em um supermercado local e foram utilizadas na otimização e validação do método. A representatividade da amostragem foi de 20% do total disponível na prateleira do supermercado. Estas amostras foram analisadas preliminarmente (sem a adição dos agrotóxicos) para verificação da possível presença de alguns dos compostos em estudo.

As amostras de mel utilizadas para a aplicabilidade do método, provenientes de diferentes flores (eucalipto, trevo e mata nativa) e de diferentes municípios (Bagé, Alegrete e Rio Grande/RS) foram adquiridas em supermercados locais, com representatividade de 10% do total disponível em cada ponto de venda. Cada amostra apresentava diferentes características, principalmente na coloração (de amarelo claro a escuro) e aspecto (líquido e cristalizado). As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e em local escuro antes das análises.

4.6 Otimização do sistema cromatográfico LC-DAD

Para a otimização das condições cromatográficas primeiro foram injetadas, individualmente, as soluções analíticas dos agrotóxicos selecionados para este estudo, observando o tempo de retenção e o espectro de absorção molecular de

cada substância, obtido pelo DAD. Durante as outras etapas do estudo, a ordem de eluição dos analitos foi feita comparando-se os tempos de retenção (t_R) e o espectro dos picos na mistura com o t_R e o espectro dos picos dos padrões, injetados individualmente

4.6.1 Preparo da fase móvel

Os solventes utilizados, metanol e acetonitrila, foram preparados individualmente, filtrados à vácuo através de membranas de nylon 0,45 μm . A água ultrapura e os solventes foram degaseificados em ultrassom durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A fase móvel foi armazenada em frascos próprios para solventes e rotulada.

4.6.2 Escolha da composição da fase móvel

Devido às diferenças de polaridade das substâncias analisadas, a composição da fase móvel teve que ser variada durante a separação cromatográfica, de modo a que a força cromatográfica aumentasse gradativamente. Desta forma, o modo utilizado foi eluição por gradiente, o que permite se obter maior simetria dos picos cromatográficos, melhor resolução e detectabilidade em menor tempo de análise (COLLINS *et al.*, 2006).

Para a definição da composição da fase móvel para a separação cromatográfica foram testadas misturas contendo diferentes proporções dos solventes metanol, acetonitrila e água ultrapura.

4.6.3 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada substância analisada, foi injetada no LC-DAD a solução padrão individual de cada uma, contendo 10,0 mg L^{-1} , e monitorado o espectro de absorção molecular entre

190 e 400 nm. Os espectros dos padrões foram utilizados para confirmar a identidade dos picos nas amostras.

Com o DAD e o *software* utilizado, foi possível obter-se a pureza dos picos cromatográficos através da análise de três diferentes pontos do pico. A similaridade dos três espectros obtidos corresponde a pureza do pico (CALDAS, 2009). A pureza dos picos foi realizada durante todas as etapas do desenvolvimento do método.

4.7 Otimização do sistema cromatográfico LC-APCI-MS/MS

4.7.1 Preparo da fase móvel

O procedimento de preparo da fase móvel foi o mesmo realizado para o LC-DAD, como descrito no item 4.5.1, porém os solventes e a água ultrapura foram acidificados com 0,1% de ácido fórmico.

A acidificação é realizada para tornar os solventes mais ionizáveis como, por exemplo, a acetonitrila que é pouco ionizável, favorecendo a fragmentação dos analitos. Além disso, no sistema de LC-MS/MS é indicado o uso de aditivos orgânicos voláteis, como o ácido fórmico, a fim de evitar que estes cristalizem na interface (DEMOLINER, 2008).

4.7.2 Escolha da composição da fase móvel

Da mesma forma que para o LC-DAD, foram testadas diferentes proporções dos solventes acidificados (acetonitrila, metanol e água ultrapura). Também foi utilizado o modo de eluição por gradiente, a fim de se obter uma melhor separação cromatográfica, e visto que em LC-MS a co-eluição de compostos da matriz conduz erros de quantificação causados por supressão ou efeitos de enriquecimento dos íons (ISMAIEL *et al.*, 2008).

4.7.3 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas

A fonte de ionização à pressão atmosférica (API) foi empregada com interface por ionização química à pressão atmosférica (APCI). Para a otimização dos parâmetros de fragmentação dos analitos, foram realizadas infusões diretas das soluções padrões individuais, com concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, no espectrômetro de massas.

Foram variados os seguintes parâmetros: corrente da corona, voltagem do cone, vazão dos gases de nebulização e do cone; temperaturas da fonte e de dessolvatação. A etapa de otimização das condições de fragmentação foi determinante para selecionar os íons a serem monitorados para qualificação e quantificação dos analitos.

4.8 Preparo da amostra

Primeiramente no desenvolvimento do trabalho, foi proposta como técnica de preparo de amostra a microextração líquido-líquido dispersiva - DLLME. O princípio básico da técnica é a dispersão de um solvente extrator (imiscível em água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa contendo a amostra, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator (REZAEE *et al.*, 2006). Apesar de apresentar um baixo volume de solventes utilizados, a técnica apresentou-se pouco robusta, e foi possível somente a extração de um analito, o inseticida fipronil.

Uma discussão mais ampla sobre a técnica, bem como uma comparação com o método QuEChERS (que foi empregado posteriormente), foi realizada no artigo *“Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey samples by high performance liquid chromatography with diode-array detection”*, cujo resumo encontra-se no ANEXO 3. O artigo foi submetido à revista *“Journal of Chromatography A”* e encontra-se em revisão na mesma.

O desenvolvimento do método QuEChERS para a determinação de 8 agrotóxicos e HMF em mel foi então realizado neste trabalho. Ao final, foi realizada uma comparação com algumas das principais técnicas utilizadas para extração de agrotóxicos em mel e o método proposto.

4.8.1 Otimização do preparo de amostra utilizando QuEChERS modificado e quantificação por LC-DAD

A otimização do método QuEChERS modificado foi realizada variando-se os seguintes parâmetros: solvente de extração, adição de cloreto de sódio, etapa de *cleanup* e influência do pH, para assim obter-se recuperações percentuais (R%) entre 70 e 120%, com desvios padrão relativos percentuais (RSD%) menores que 20% para os analitos. Para isto, foram utilizadas as amostras de mel de eucalipto, sem a presença dos agrotóxicos em estudo, denominadas branco da matriz.

Inicialmente, a otimização foi realizada para 4 analitos (HMF, imidacloprido, fipronil e tiametoxam) por LC-DAD. As amostras foram fortificadas com 500 μL de solução padrão contendo a mistura dos analitos, ao nível de $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$.

4.8.1.1 Seleção do solvente de extração

Na otimização do método para a aplicação em mel, foram testados quatro solventes de extração: acetato de etila, acetona, acetonitrila e metanol. O procedimento foi realizado da seguinte maneira: foram pesados 5,0 g de mel para um tubo de polipropileno (capacidade de 50 mL); as amostras foram fortificadas ao nível de $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$ com solução padrão da mistura dos quatro analitos (o tempo de interação da solução padrão com a matriz foi de 30 minutos); foram adicionados 10 mL de água ultrapura e os tubos foram agitados em vórtex por 1 min; em seguida 10 mL de solvente extrator foram adicionados em cada tubo e agitados manualmente por 10 s e por mais 1 min em vórtex; foram adicionadas 4,0 g de MgSO_4 e novamente agitado por 10 s manualmente e por mais 1 min em vórtex; os

tubos foram centrifugados por 5 min a uma velocidade de 5000 rpm. Para cada tipo de solvente extrator, o procedimento foi realizado em triplicata. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante obtido (extrato) foi diretamente injetada no sistema LC-DAD.

4.8.1.2 Influência do NaCl na recuperação dos substâncias

Para avaliar a influência da adição de NaCl na recuperação dos analitos, o procedimento foi realizado como descrito no item 4.8.1.1, primeiramente sem a adição de NaCl e em seguida adicionando-se 1,0 g de NaCl juntamente com 4,0 g de MgSO₄. Os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando-se acetonitrila como solvente de extração.

4.8.1.3 Etapa de *cleanup*

Neste trabalho foram realizados experimentos para estimar o efeito da etapa de *cleanup* nas recuperações dos analitos. Para isto, foi realizada a extração como descrito no item 4.8.1.1 utilizando como solvente a acetonitrila. Após a separação de fases, uma alíquota de 1,0 mL do extrato foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 25,0 mg de PSA ou 25,0 mg de C18 e agitado por 1 min em vórtex e centrifugado por 2 min a 5000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi retirada e injetada no sistema LC-DAD. Os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.8.2 Otimização do preparo de amostra QuEChERS modificado por LC-APCI-MS/MS

Para a aplicação do método QuEChERS modificado para os 9 analitos por LC-APCI-MS/MS, foi necessário realizar novamente a otimização de alguns parâmetros do método desenvolvido por LC-DAD, visto que dentre estas substâncias

algumas apresentam diferentes propriedades em relação aos 4 analitos anteriormente estudados.

No método QuEChERS desenvolvido para os 9 analitos por LC-APCI-MS/MS, a massa de amostra utilizada foi alterada para 10,0 g, para assim atingir menores limites de detecção do método. A velocidade e o tempo de centrifugação também foram maiores, para se obter uma melhor separação de fases. As amostras foram fortificadas com 500 µL de uma solução padrão contendo a mistura dos analitos, em um nível intermediário, nas seguintes concentrações: 5 mg kg⁻¹ para o HMF; 2,5 mg kg⁻¹ para o tiametoxam; 0,5 mg kg⁻¹ para o imidacloprido; 0,25 mg kg⁻¹ para carbendazim, dimetoato e fluvalinato; 0,05 mg kg⁻¹ para fipronil e tebuconazol e 0,025 mg kg⁻¹ para o amitraz. As diferentes concentrações utilizadas na mistura dos padrões são decorrentes da diferença na sensibilidade por LC-APCI-MS/MS.

4.8.2.1 Etapa de *cleanup*

Da mesma forma que para a otimização do método por LC-DAD, o procedimento experimental para avaliar o efeito da etapa de *cleanup* foi realizado novamente. O objetivo foi verificar se a etapa de *cleanup* poderia influenciar no efeito matriz.

O procedimento experimental foi realizado da seguinte maneira: foram pesadas 10,0 g de mel para um tubo de polipropileno; as amostras foram fortificadas com solução padrão da mistura contendo os 9 analitos (o tempo de interação da solução padrão com a matriz foi de 30 min); foram adicionados 10 mL de água ultrapura e os tubos foram agitados em vórtex por 1 min; em seguida, 10 mL de acetonitrila foram adicionados em cada tubo e agitados manualmente por 10 s e por mais 1 min em vórtex; foram adicionadas 4,0 g de MgSO₄ e novamente agitado por 10 s manualmente e por mais 1 min em vórtex; os tubos foram centrifugados por 10 min a uma velocidade de 8000 rpm. Este procedimento foi realizado em triplicata e o extrato analisado por LC-APCI-MS/MS.

A etapa de *cleanup* foi realizada da seguinte maneira: após a extração e a separação de fases, uma alíquota de 1,0 mL do extrato foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 25,0 mg de PSA, e agitado por 1 min em vórtex. Após, foi

realizada a centrifugação por 2 min a 5000 rpm, e uma alíquota do sobrenadante foi analisada por LC-APCI-MS/MS.

4.8.2.2 Tempo de interação após a fortificação

O tempo de interação após a fortificação é o tempo em que a amostra fica em contato com a solução padrão dos analitos, e varia de acordo com a matriz que se está trabalhando. No caso de amostras líquidas, esta interação entre amostra e analito acontece praticamente instantaneamente, e em amostras sólidas é necessário um tempo para que ocorra evaporação do solvente da solução padrão, e uma maior interação da matriz com os analitos (RODRIGUES, 2010).

Avaliou-se o tempo de interação após a fortificação da matriz com a solução padrão dos analitos. A avaliação ocorreu sem e com tempo de interação, 30 min. Três amostras foram fortificadas com solução padrão e deixadas em repouso durante 30 min. Transcorrido esse tempo, foi realizado o procedimento de extração conforme o item 4.8.2.1. Outras três amostras foram fortificadas e imediatamente realizada a extração. Todos os experimentos foram realizados sem a etapa de *cleanup* e as alíquotas de cada extrato foram analisadas por LC-APCI-MS/MS.

4.8.2.3 Otimização do pH

A avaliação da influência do pH foi verificada mantendo-se o pH da amostra (pH 4,6), adicionando-se tampão acetato, em meio fortemente ácido (pH 2,9) e em meio alcalino (pH 9,7).

Primeiramente, foi realizado o procedimento experimental utilizando-se tampão acetato (BARAKAT *et al.*, 2007). O procedimento foi realizado como descrito no item 4.8.2.1, sem a etapa de *cleanup*, porém a acetonitrila foi acidificada com 100 µL de ácido acético glacial e juntamente com 4,0 g de sulfato de magnésio foi adicionado 1,0 g de acetato de sódio.

Para o meio fortemente ácido, foram realizados experimentos em que a solução aquosa da amostra foi acidificada com 300 µL de ácido acético glacial,

prossequindo-se as etapas do procedimento de extração após a acidificação do meio. Para os experimentos em meio alcalino, foram adicionadas 3 gotas de hidróxido de amônio à solução aquosa contendo a amostra.

Em todos os experimentos, após a etapa de centrifugação, uma alíquota de cada extrato foi retirada e analisada por LC-APCI-MS/MS. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9 Validação do método

O método desenvolvido por LC-APCI-MS/MS foi validado empregando figuras analíticas de mérito como: limite de detecção, limite de quantificação, curva analítica, curva trabalho, linearidade, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Parâmetros sugeridos para validação de métodos analíticos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO (INMETRO, 2010). Também foi avaliado o efeito de matriz, como sugerido pelo guia de validação para análise de resíduos de pesticidas em alimentos da Comissão Europeia (SANCO, 2009).

4.9.1 Limites de detecção e quantificação

LOD e LOQ foram estimados a partir da relação sinal/ruído calculada pelo “software” do equipamento, considerando no mínimo 3 e 10 vezes a razão do sinal pela linha de base (ruído), respectivamente.

Os limites instrumentais foram obtidos através de padronização externa no solvente, pelo preparo de soluções analíticas de diferentes concentrações em acetonitrila, e os limites do método foram obtidos pela injeção de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas através de diluições da solução padrão trabalho com o extrato branco da matriz extraído pelo método QuEChERS modificado.

Os limites do método QuEChERS não apresentam fator de pré-concentração, pois a proporção utilizada no preparo de amostra é de 1,0 g de amostra para 1,0 mL de extrato.

4.9.2 Curva analítica, curva trabalho e linearidade

A linearidade do instrumento e do método foi avaliada pela construção de curvas analíticas através de padronização externa no solvente e por padronização externa no extrato branco da matriz. Também foi construída a curva trabalho, em que as amostras de mel foram fortificadas em cada nível com a solução padrão dos analitos, passando então pela etapa de preparo de amostra otimizada e em seguida analisada por LC-APCI-MS/MS. Esta curva é aplicada para avaliar a performance do método proposto e na validação do método, nos cálculos de recuperação (TSAI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010).

Para a construção das curvas analíticas e trabalho, foram preparados três conjuntos de soluções:

1. Soluções preparadas através de diluições da solução padrão de trabalho no solvente (acetonitrila);
2. Soluções preparadas a partir de diluições da solução padrão de trabalho no extrato branco da matriz, extraído pelo método QuEChERS modificado (pós fortificação);
3. Soluções obtidas a partir da extração das amostras de mel fortificadas com a solução padrão de trabalho (pré fortificação).

Comparações das áreas dos picos obtidos pelos conjuntos das soluções 1 e 2 são indicativos de efeito de matriz. Comparações das áreas obtidas pelos conjuntos das soluções 1 e 3 são indicativos de um efeito de matriz combinado com a potencial recuperação dos analitos (eficiência do processo).

De acordo com as características de cada analito, as curvas analíticas responderam em diferentes faixas de concentração. Por isso, foi preparada uma solução trabalho contendo a mistura dos 9 analitos com diferentes concentrações para cada um (descritas no item 4.4), e através de diluições sucessivas desta solução trabalho, foram construídas as curvas analíticas (no solvente, no extrato da

matriz e curva trabalho). Tais curvas foram preparadas a partir do LOQ de cada analito, conforme descrito a seguir:

- 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg L⁻¹ para HMF;
- 0,50; 1,25; 2,50; 3,75 e 5,00 mg L⁻¹ para tiametoxam;
- 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg L⁻¹ para imidacloprido;
- 0,050; 0,125; 0,250; 0,375 e 0,500 mg L⁻¹ para carbendazim, dimetoato e τ -fluvalinato;
- 0,01; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 mg L⁻¹ para fipronil e tebuconazol;
- 0,005; 0,0125; 0,0250; 0,0375 e 0,0500 mg L⁻¹ para amitraz.

Cada solução foi injetada três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software* (Masslynx 4.0 Waters) do equipamento. A partir destes dados foi avaliado o coeficiente de correlação linear (r), obtendo assim a linearidade do instrumento e do método.

4.9.3 Exatidão (recuperação)

A exatidão é calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, e pode ser avaliada através de ensaios de recuperação. A recuperação pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito, em pelo menos três níveis: baixo, médio e alto (INMETRO, 2010).

Avaliou-se a exatidão do método QuEChERS modificado conforme o procedimento descrito a seguir: foram pesados 10,0 g de mel isento de agrotóxicos para tubos de polipropileno. As amostras foram fortificadas nos mesmos níveis em que foram construídas as curvas analíticas. Em seguida, foram adicionados 10,0 mL de água ultrapura e 150 μ L de hidróxido de amônio, e os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto; 10,0 mL de acetonitrila foram adicionados e agitou-se novamente; foram adicionados 4,0 g de MgSO₄ e após a agitação, os tubos foram centrifugados. Os extratos foram analisados por LC-APCI-MS/MS. Os testes foram realizados em triplicata.

Para determinar as concentrações, substituiu-se os valores de área encontrados em cada nível na equação da curva trabalho. Para calcular as recuperações, substituiu-se os valores na equação 1:

$$Recuperação(\%) = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad (1)$$

sendo:

C1= concentração do analito na amostra fortificada;

C2= concentração do analito na amostra não fortificada;

C3= concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

4.9.4 Precisão

A precisão instrumental foi avaliada a partir de injeções sucessivas de solução analítica padrão com a mistura dos agrotóxicos (n=3) para todas as concentrações da faixa linear e estimada através do desvio padrão relativo percentual (RSD%).

A precisão do método foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária. Para a repetibilidade, as amostras foram fortificadas em diferentes níveis em triplicata, seguindo todo o procedimento de extração por QuEChERS modificado, e injetadas em triplicata no mesmo dia, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. A partir das nove determinações foi calculado o RSD%. A precisão intermediária RSD_{pi}% foi realizada da mesma forma que a repetibilidade, porém em diferentes dias. Para os cálculos dos RSD% utilizou-se a equação 2, apresentada a seguir:

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

4.9.5 Efeito de matriz

A ocorrência do efeito de matriz deve ser avaliada e compensada na validação do método. Para isto, são construídas curvas analíticas no solvente e no extrato branco da matriz para avaliar o efeito de matriz, e a calibração deve ser realizada através de curvas no extrato da matriz para a compensação do efeito de matriz, rotineiramente (SANCO, 2009).

Para a avaliação do efeito de matriz, realizou-se a comparação entre as áreas obtidas das soluções analíticas em acetonitrila e daquelas obtidas com soluções analíticas preparadas no extrato da matriz (PRESTES, 2007). O cálculo foi efetuado através da equação 3:

$$EfeitoMatriz\% = \frac{inclinação(X1) - inclinação(X2)}{inclinação(X2)} \times 100 \quad (3)$$

onde:

X1= inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no extrato da matriz (mel);

X2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparada no solvente (acetonitrila);

Quando os valores encontrados para o efeito matriz estiverem entre -20 e +20%, considera-se que o efeito matriz é baixo; se estiverem entre -50 e -20% ou entre +20 e +50% é considerado médio; e se os valores encontrados forem abaixo de -50% ou acima de +50%, o efeito matriz é considerado alto (ECONOMOU, 2009).

4.9.6 Eficiência do Processo

A eficiência do processo, EP, (VARGA *et al.*, 2010), inclui tanto os efeitos de matriz como também a recuperação. Pode ser útil para monitorar estes dois parâmetros e também torna mais fácil escolher entre os procedimentos de extração. A eficiência do processo é calculada conforme a equação 4:

$$EP(\%) = \frac{C}{A} \times 100 \quad (4)$$

onde:

C = área absoluta dos picos cromatográficos dos analitos extraídos da matriz pré-fortificada;

A = área absoluta dos picos cromatográficos dos analitos no solvente (solução padrão);

Valores de EP próximos a 100%, geralmente indicam que as recuperações do método estão próximas a 100% e o efeito matriz é baixo. Diferenças significativas entre EP% e recuperação indicam que deve ser utilizada a curva construída no extrato da matriz para a determinação das recuperações, pois o efeito de matriz é alto (KRUIVE *et al.*, 2008).

4.10 Aplicabilidade do método e robustez

Após a validação, o método foi aplicado para 3 diferentes tipos de mel, provenientes de diferentes localidades e floradas. Primeiramente, foram realizados experimentos com o branco das amostras a fim de verificar a existência de resíduos de agrotóxicos ou HMF.

Para avaliar exatidão, aplicabilidade do método e robustez, as amostras de mel foram fortificadas em 2 níveis (na concentração correspondente ao LOQ e 5 vezes maior a esta concentração). Além disso, foi avaliado o efeito de matriz para as diferentes amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do sistema cromatográfico LC-DAD

5.1.1 Composição da fase móvel

Para a separação cromatográfica dos analitos por LC-DAD foram testadas diferentes colunas cromatográficas e composições de fase móvel. Inicialmente, o trabalho foi realizado apenas com a separação cromatográfica de três agrotóxicos, fipronil, imidacloprido e tiametoxam. O HMF foi acrescentado ao trabalho posteriormente. Foi utilizada uma solução padrão em metanol da mistura dos agrotóxicos na concentração de 10 mg L^{-1} .

Iniciou-se a otimização da separação com uma coluna Waters Spherisorb ODS-2 C18 $5 \mu\text{m}$ ($150 \times 4,6 \text{ mm d.i.}$) e modo de eluição isocrático, utilizando a fase móvel composta por metanol e água ultrapura, numa proporção de 40:60 v/v. A ordem de eluição dos analitos foi: tiametoxam, imidacloprido e fipronil, com tempos de retenção de 5,2; 8,0 e 35,8 min, respectivamente (cromatograma 1, Figura 8). Para diminuir o tempo de retenção do fipronil, aumentou-se a força de eluição, aumentando a proporção de metanol na fase móvel, numa proporção de 50:50 v/v. O resultado foi a co-eluição de tiametoxam e imidacloprido, e para o fipronil, o tempo de retenção foi 18,2 min (cromatograma 2, Figura 8). Um aumento da força de eluição ainda maior, 70:30 v/v, confirmou a co-eluição de tiametoxam e imidacloprido, 2,5 e 2,6 min, e o fipronil eluiu num tempo de retenção de 5,6 min (cromatograma 3, Figura 8).

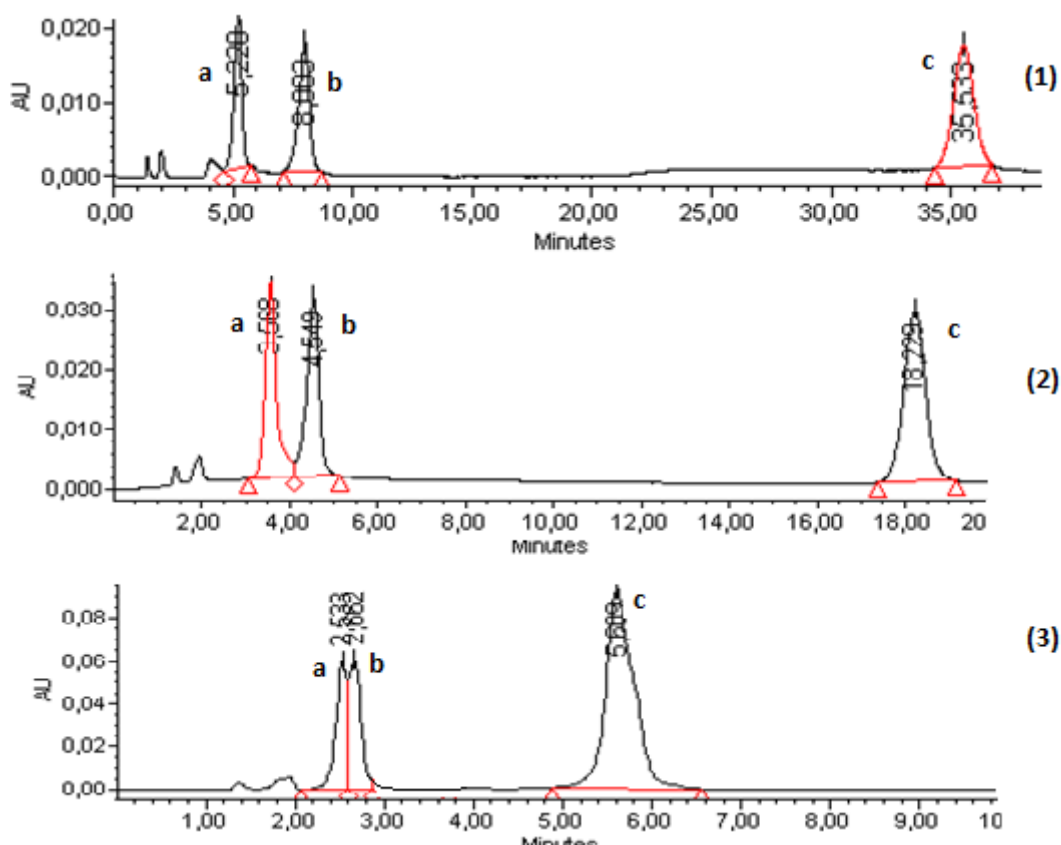


Figura 8 - Otimização da separação cromatográfica em 220 nm. Os números 1, 2 e 3 correspondem à força de eluição. Os analitos estão representados pelas letras a (tiametoxam), b (imidacloprido) e c (fipronil).

Como os resultados anteriores foram insatisfatórios, testou-se uma coluna analítica maior, Phenomenex Hyperclone BDS C18 5 μ m (250 x 4,6 mm d.i.). Porém, não foi possível obter boa separação no modo isocrático, pois o intervalo de tempo entre o fipronil e os outros 2 agrotóxicos foi mais longo.

Então, foi realizado o modo de eluição gradiente, com diferentes solventes e proporções de fase móvel. A coluna utilizada foi a Waters Spherisorb ODS-2 C18, e utilizou-se acetonitrila na composição da fase móvel. Desta forma, os picos apresentaram-se mais simétricos, com boa resolução e seletividade. Uma separação efetiva dos picos cromatográficos foi adquirida com o gradiente descrito na Tabela 6:

Tabela 6 - Modo gradiente otimizado para a separação por LC-DAD

tempo (min)	vazão (mL min ⁻¹)	% ACN	% H ₂ O
	0,8	25	75
4	0,8	25	75
8	1,2	70	30
13	1,2	70	30
14	0,8	25	75
18	0,8	25	75

Com a inclusão do HMF após a otimização da separação cromatográfica dos 3 agrotóxicos, este apresentou um tempo de retenção de 2,7 minutos, não co-eluindo com nenhum dos agrotóxicos analisados. A separação cromatográfica é apresentada na Figura 9, juntamente com os espectros de absorção de cada substância:

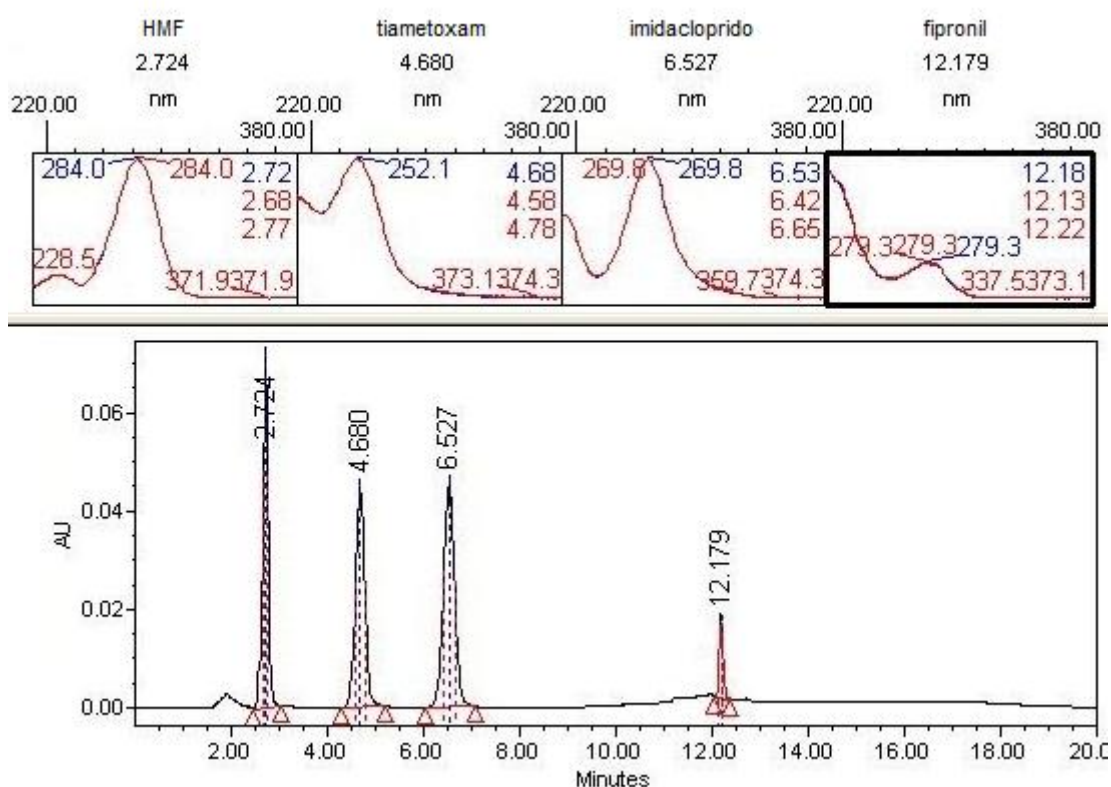


Figura 9 - Cromatograma em 260 nm da separação de uma solução padrão da mistura de HMF, tiametoxam, imidacloprido e fipronil, com concentração de 10,0 mg L⁻¹, e os espectros de absorção de cada substância.

5.1.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção

Além do tempo de retenção, os espectros de absorção obtidos no LC-DAD para soluções individuais dos agrotóxicos foram utilizados para confirmar as identidade dos analitos e foram comparados aos espectros obtidos para os padrões e aos espectros obtidos para as amostras, na faixa de 190 a 400 nm. Como pode ser observado na Figura 10, os analitos possuem máxima absorção em diferentes comprimentos de onda. Dessa forma, para a quantificação, para cada analito foi escolhido o comprimento de onda correspondente à maior absorção: 284 nm para o HMF; 252 nm para tiametoxam; 269 nm para imidacloprido e 280 nm para fipronil.

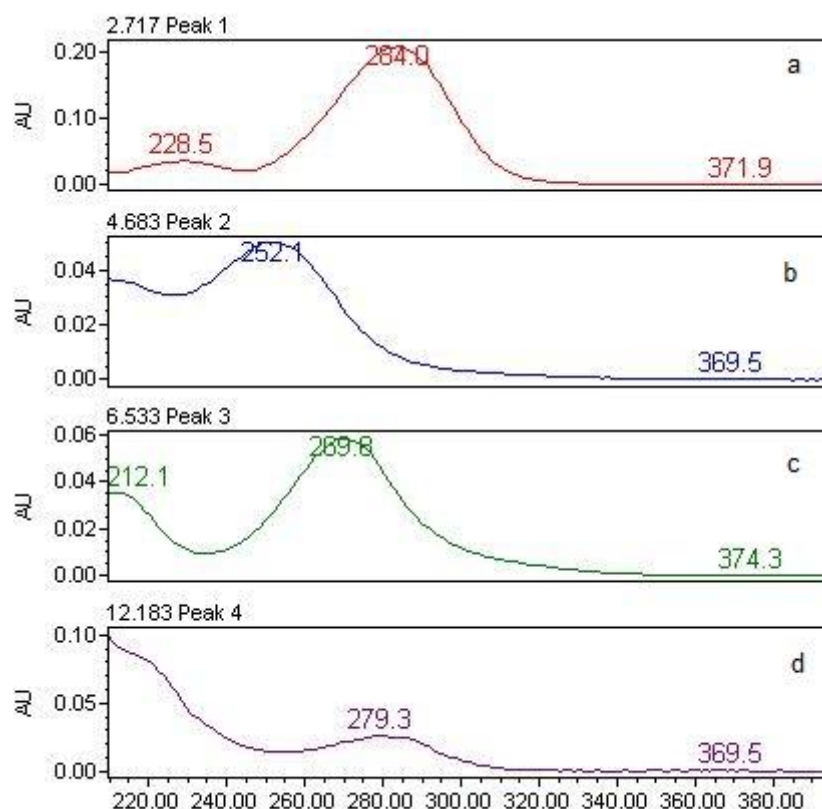


Figura 10 - Espectros obtidos por LC-DAD, correspondentes à cada analito (a) HMF, (b) tiametoxam, (c) imidacloprido e (d) fipronil.

5.2 Otimização do sistema cromatográfico LC-APCI-MS/MS

5.2.1 Otimização das condições cromatográficas

Para a separação cromatográfica dos 9 analitos (HMF, amitraz, carbendazim, dimetoato, fipronil, τ -fluvalinato, imidacloprido, tebuconazol e tiametoxam) por LC-APCI-MS/MS, foi utilizada uma coluna XTerra® MS C18 (50 x 3 mm, 3,5 μ m) e modo de eluição por gradiente. A Tabela 7 apresenta as condições do modo gradiente utilizado.

Tabela 7 - Modo gradiente otimizado para a separação por LC-APCI-MS/MS

tempo (min)	vazão (mL min ⁻¹)	% MeOH	% H ₂ O acidif.
	0,2	30	70
5	0,4	100	0
9	0,4	100	0
10	0,2	70	30
15	0,2	70	30

A separação completa não se faz necessária para a detecção por MS/MS, mas geralmente melhora a detectabilidade e reduz o efeito de supressão iônica (PETROVIC *et al.*, 2005). Foi então selecionado o modo de eluição por gradiente para as análises. A acidificação da fase móvel é necessária pois influencia na eficiência da ionização dos analitos, favorecendo a fragmentação das substâncias a serem determinadas.

Na Figura 11 são apresentados os cromatogramas obtidos. O cromatograma no modo negativo para o fipronil, foi monitorado a partir de 5 min e o cromatograma no modo positivo para o restante dos analitos.

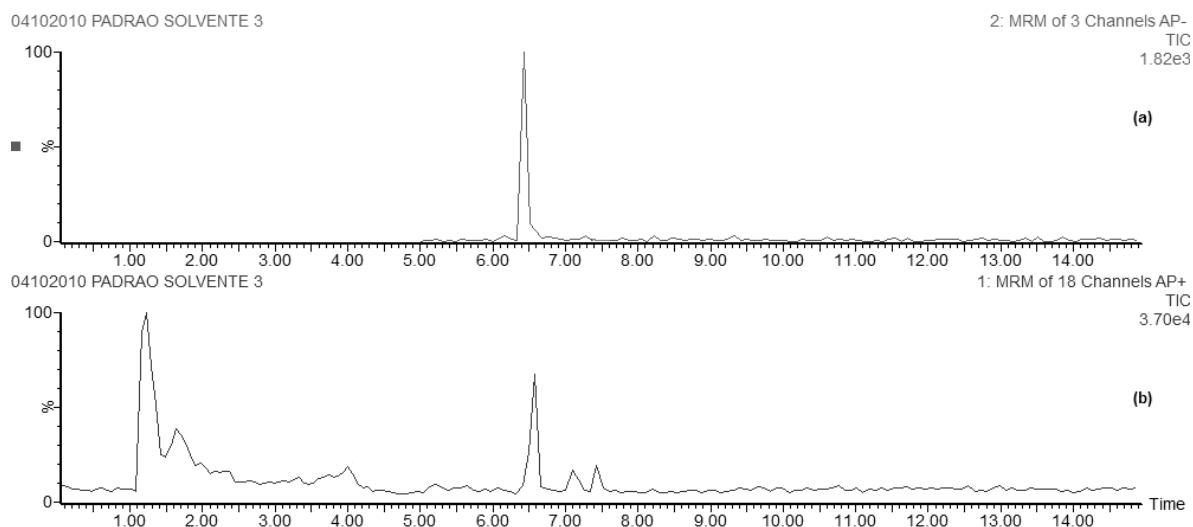


Figura 11 - Cromatogramas gerados em LC-APCI-MS para os analitos em estudo. Cromatograma no modo negativo (a) e cromatograma no modo positivo (b).

5.2.2 Otimização dos parâmetros para fragmentação dos analitos no espectrômetro de massas

As melhores condições para a fragmentação dos íons monitorados foram: corrente da corona: 0,5 μA ; voltagem do cone: 30 V; vazão do gás de nebulização: 350 L h^{-1} ; vazão do gás do cone: 50 L h^{-1} ; temperatura da fonte: 100 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura de dessolvatação: 500 $^{\circ}\text{C}$.

Na Tabela 8 são apresentadas as transições monitoradas no modo APCI (+) e no modo APCI (-), modo de aquisição MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), energia de colisão, voltagem do cone e tempo de retenção dos analitos estudados.

Para analitos monitorados no modo positivo, a molécula do analito é ionizada através da adição de um próton de hidrogênio, dando origem ao íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ e em alguns casos, pela adição de sódio $[\text{M}+23]^{+}$ ou de um íon amônio $[\text{M}+18]^{+}$. A adição de um próton ou de um íon amônio é resultado da fase móvel, e a adição de sódio é resultado de sódio na fase móvel, no padrão ou na amostra que está sendo analisada. Íons monitorados no modo negativo, como o fipronil, são

formados pela remoção de um próton da molécula ou mais raramente, pela adição de um elétron (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; DEMOLINER, 2008).

Tabela 8 - Otimização das condições de fragmentação para determinação dos analitos no espectrômetro de massas

Analitos	MRM transição (<i>m/z</i>)	Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)	<i>t_R</i> (min)	Razão do íon (%)
Carbendazim	APCI +	192>160*	28	1,29	46,95
		192>132	29		
Hidroximetilfurfural	APCI +	127>109*	5	1,63	9,67
		127>81	5		
Tiametoxam	APCI +	292>211*	30	2,10	56,18
		292>122	31		
Imidacloprido	APCI +	256>209*	14	3,19	26,52
		256>175	27		
Dimetoato	APCI +	230>125*	20	4,07	98,04
		230>199	10		
Fipronil	APCI -	435>330*	15	6,42	5,40
		435>250	26		
Tebuconazol	APCI +	308>70*	20	6,58	9,77
		308>125	22		
Amitraz	APCI +	294>163*	20	7,18	9,02
		294>122	20		
T-Fluvalinato	APCI +	406>251	11	7,43	14,00
		406>337	11		

Tempo de permanência para cada transição monitorada: 0,2 s modo positivo; 0,3 s modo negativo. (*)Transições utilizadas para a quantificação.

Para cada analito foram selecionados dois fragmentos característicos, como apresentado na Tabela 8. O fragmento mais intenso (mais estável) foi escolhido para quantificação e o segundo fragmento mais intenso para a confirmação. A Figura 12 ilustra os cromatogramas no modo MRM para a transição escolhida para a quantificação de cada analito no sistema LC-APCI-MS/MS.

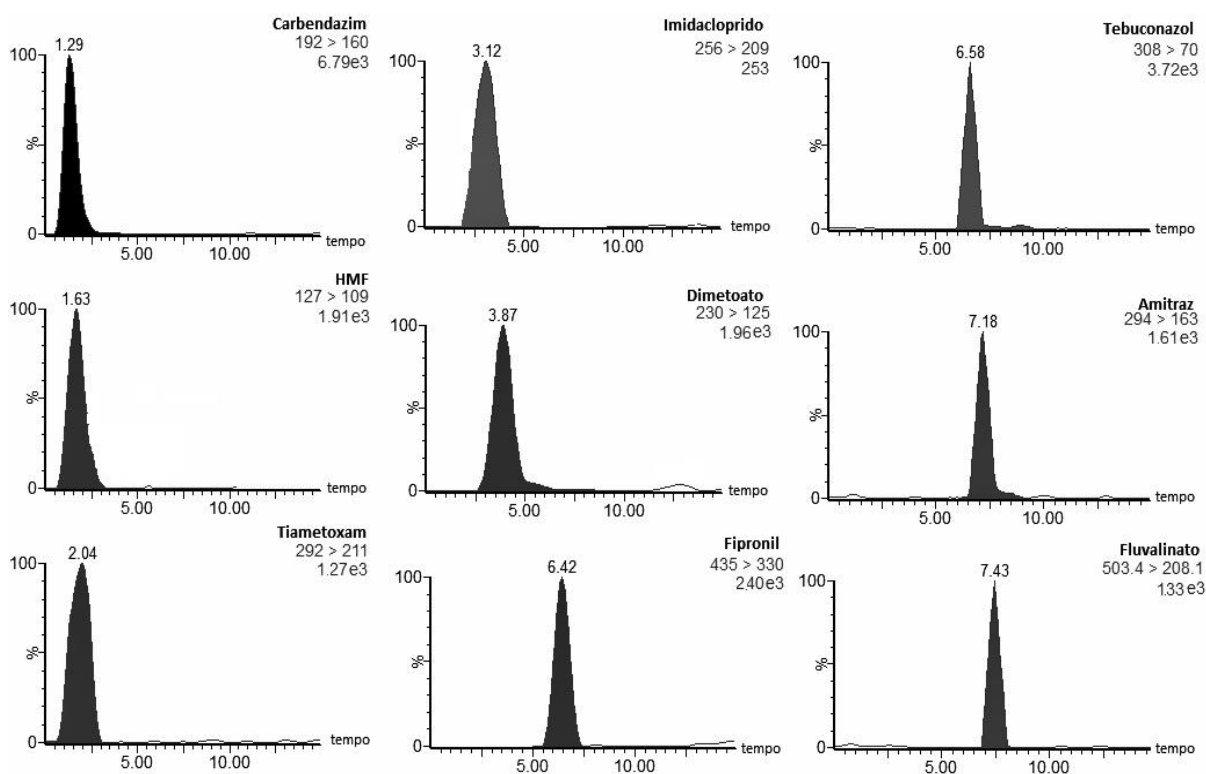


Figura 12 - Cromatogramas no modo MRM da fragmentação monitorada para a quantificação.

5.3 Otimização do método QuEChERS modificado e determinação por LC-DAD

Os primeiros parâmetros avaliados para a otimização do método QuEChERS foram realizados para 4 analitos (HMF, fipronil, imidacloprido e tiametoxam), para determinação por LC-DAD. As amostras de mel (branco da matriz) foram fortificadas ao nível de 5 mg kg⁻¹.

5.3.1 Seleção do solvente de extração

Inicialmente, foram testados quatro solventes para a extração: acetona, acetonitrila, acetato de etila e metanol. Quando o metanol foi utilizado para a extração, não houve separação da água nem mesmo com o uso de sulfato de magnésio para o particionamento das fases.

O acetato de etila é empregado em alguns métodos de extração, como por exemplo na extração de substâncias cloradas de amostras de solo por QuEChERS modificado (PINTO *et al.*, 2010) e na extração de agrotóxicos de amostras de diferentes chás, também por QuEChERS modificado (KANRAR *et al.*, 2010). Para a otimização do método utilizando acetato de etila como solvente de extração, foram obtidas baixas recuperações, principalmente para os analitos mais polares (imidacloprido e tiametoxam). As baixas recuperações podem ser justificadas por este ser um solvente praticamente imiscível em água (MASTOVSKÀ *et al.*, 2004), consequentemente mais apolar que outros solventes utilizados, como a acetonitrila.

A acetona foi o solvente extrator utilizado no método de Luke (1975), que com o passar dos anos foi miniaturizado e passou por diversas modificações (PRESTES *et al.*, 2009). Atualmente ainda é utilizada como solvente de extração e tem demonstrado bom desempenho, como no trabalho desenvolvido por PIZZUTTI *et al.*, 2009, na extração de 169 pesticidas em grãos de soja.

A acetonitrila é o solvente utilizado no método QuEChERS original e atualmente é o mais empregado nas modificações do método, principalmente, porque além de apresentar uma extração mais seletiva, extrai uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades (PRESTES *et al.*, 2009).

A Figura 13 mostra que a acetona e acetonitrila apresentaram melhores recuperações, provavelmente devido às características dos analitos, como a alta solubilidade nestes solventes. Porém, para a acetona, não foi possível quantificar o composto HMF, já que este eluiu juntamente com o pico do solvente. No entanto, uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos da amostra foi observada quando a acetonitrila foi usada, diminuindo a extração de lipídios, proteínas e carboidratos devido à sua melhor separação da água do que a acetona (LEHOTAY *et al.*, 2001).

Portanto, acetonitrila foi escolhido como solvente de extração, por apresentar também valores de R% e RSD% dentro do estabelecido.

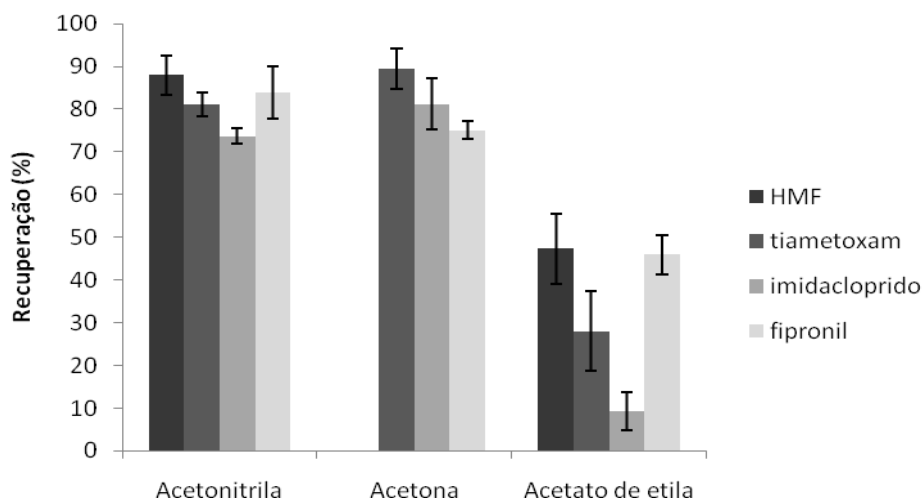


Figura 13 - Efeito dos diferentes solventes extratores na recuperação dos analitos. Barras de erros representam valores de RSD(%).

5.3.2 Influência do NaCl na recuperação

A utilização de MgSO_4 na etapa de partição das fases, deve-se à sua elevada capacidade de remoção de água quando comparado aos demais sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, resultando no aquecimento da amostra durante as fases de extração/separação, favorecendo a extração, principalmente de substâncias apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Foram utilizadas 4,0 g de MgSO_4 , conforme descrito no método original e também utilizado por BARAKAT *et al.*, (2007), o que foi suficiente para causar uma boa separação de fases.

O uso de NaCl com MgSO_4 é utilizado principalmente para favorecer a transferência de substâncias polares para a fase orgânica (PRESTES *et al.*, 2009). A adição de NaCl não alterou significativamente as recuperações, como pode ser observado na Figura 14. Assim, apenas o uso de MgSO_4 foi suficiente para promover recuperações entre 75 e 93%.

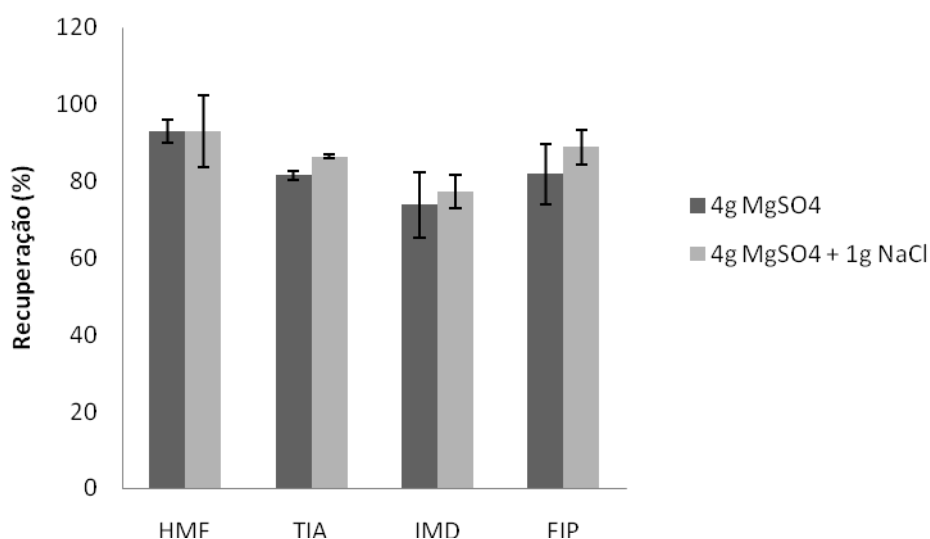


Figura 14 - Recuperações para os analitos empregando QuEChERS com MgSO₄ e com a mistura de sais MgSO₄ e NaCl. Barras de erros representam valores de RSD (%).

5.3.3 Etapa de *cleanup*

Na etapa de *cleanup* por DSPE, são utilizados sorventes para reter interferentes da matriz e permitir que os analitos permaneçam na fase orgânica (extrato).

Como pode ser observado na Figura 15, a etapa de *cleanup* utilizando PSA reduziu significativamente as recuperações do HMF. Isso porque estrutura do PSA retém fortemente os ácidos orgânicos polares, açúcares e ácidos graxos co-extraídos (KOESUKWIWAT *et al.*, 2008). Desta maneira, o HMF por ser uma substância polar, e assim como os açúcares possuir um grupo aldeído e uma hidroxila, fica retido no PSA. Já com o emprego de C18 não houve remoção das interferências do extrato da matriz, pois o C18 é usado principalmente para amostras com teores de gordura $\geq 2\%$, por exemplo, arroz, cevada, trigo, óleos vegetais entre outros (PRESTES *et al.*, 2009).

Considerando que as possíveis interferências da matriz são compensadas pelo emprego de calibração externa por superposição da matriz, e que as recuperações para os analitos foram entre 74 e 88% sem utilizar *cleanup*, esta etapa

se torna desnecessária, tornando o procedimento de preparo da amostra ainda mais rápido e diminuindo o consumo de reagentes.

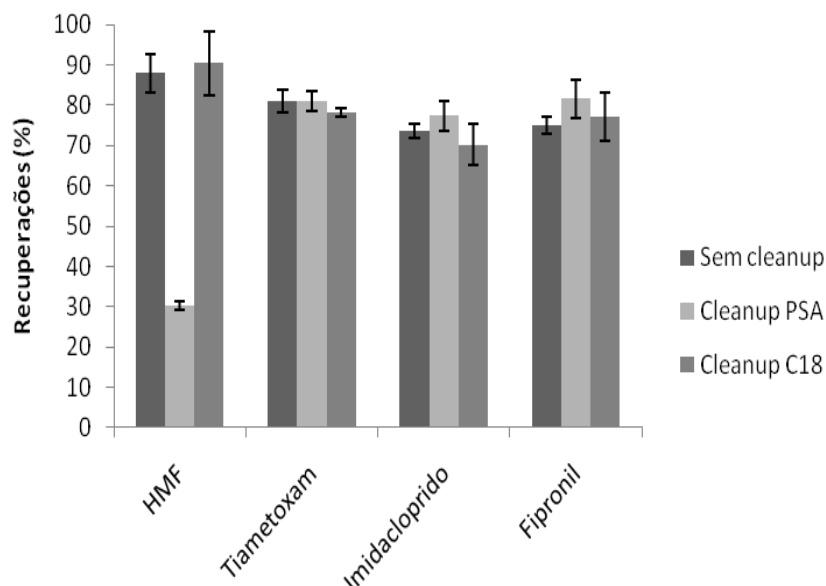


Figura 15 - Influência da etapa de *cleanup* nas recuperações dos analitos. Barras de erros representam valores de RSD(%).

5.4 Otimização do preparo de amostra QuEChERS modificado por LC-APCI-MS/MS

Para a aplicação do método QuEChERS modificado para a extração dos 9 analitos e determinação por LC-APCI-MS/MS foi necessário o ajuste de alguns parâmetros. Para isto, as amostras de mel (branco da matriz) foram fortificadas em um nível intermediário conforme descrito no item 4.8.2.

5.4.1 Etapa de *cleanup*

A etapa de *cleanup* foi novamente avaliada a fim de verificar sua influência no efeito de matriz por LC-APCI-MS/MS.

O efeito de matriz foi avaliado através da comparação das inclinações das curvas de calibração preparadas no extrato branco da matriz e no solvente, como descrito no item 4.9.5. Como pode ser observado na Figura 16, dentre os substâncias que possuem um alto efeito de matriz, somente para HMF, amitraz e imidacloprido houve diminuição deste efeito. Tiametoxam, dimetoato e tebuconazol que também possuem alto efeito de matriz não obtiveram redução de efeito de matriz. O restante dos analitos que apresentam médio e baixo efeito matriz, não sofreram alterações significativas. Desta forma, para compensar a ocorrência do efeito de matriz foi utilizada a curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos do branco da matriz, não utilizando etapa de *cleanup* no método.

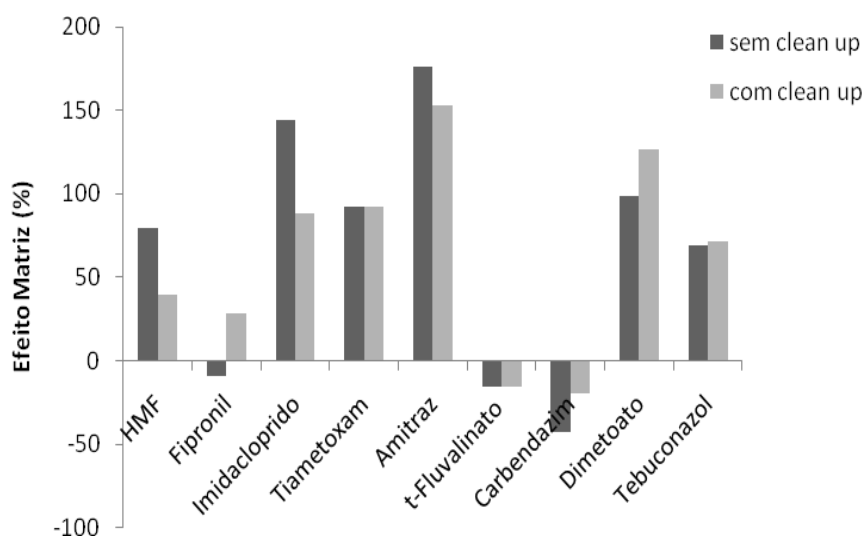


Figura 16 - Influência da etapa de *cleanup* no efeito de matriz. Valores negativos indicam supressão de sinal e valores positivos, enriquecimento.

5.4.2 Tempo de interação após a fortificação

O tempo de interação após a fortificação é pouco mencionado nos trabalhos que empregam o método QuEChERS como preparo de amostra. Os três trabalhos desenvolvidos para mel, não mencionam se há um tempo em que os analitos

interagem com a matriz ou se a extração ocorre instantaneamente após a fortificação. No método original, desenvolvido por ANASTASSIADES *et al.*, em 2003 para frutas e vegetais, 100 μ L da solução padrão dos agrotóxicos foram adicionados em 10,0 g de amostra, que foi homogeneizada em vórtex por 30 s e deixada em repouso por aproximadamente 1 min, para que ocorresse a interação com a matriz. No entanto, maiores tempos de interação também são utilizados, como por exemplo no método desenvolvido por NGUYEN *et al.*, 2008, para a determinação de pesticidas em repolho e rabanete, em que 10,0 g das amostras foram fortificadas e deixadas em repouso por 3 h antes das extrações.

Foi testado, para os ensaios de fortificação, um tempo de interação de 30 min da matriz com a solução padrão e a fortificação seguida pela extração, sem intervalo de tempo. O tempo de interação da matriz com a solução padrão após a etapa de fortificação não influenciou de maneira significativa nas recuperações obtidas. Alguns analitos no entanto, apresentaram uma melhor recuperação quando não houve intervalo de tempo entre a fortificação das amostras e o procedimento de extração, como pode ser observado na Figura 17. O amitraz apresentou recuperações menores que 32,1% devido à sua instabilidade em meio ácido, já que o mel apresenta um pH em torno de 4.

Assim, para a validação do método, não foi utilizado tempo de interação entre a matriz e a solução padrão após a fortificação das amostras.

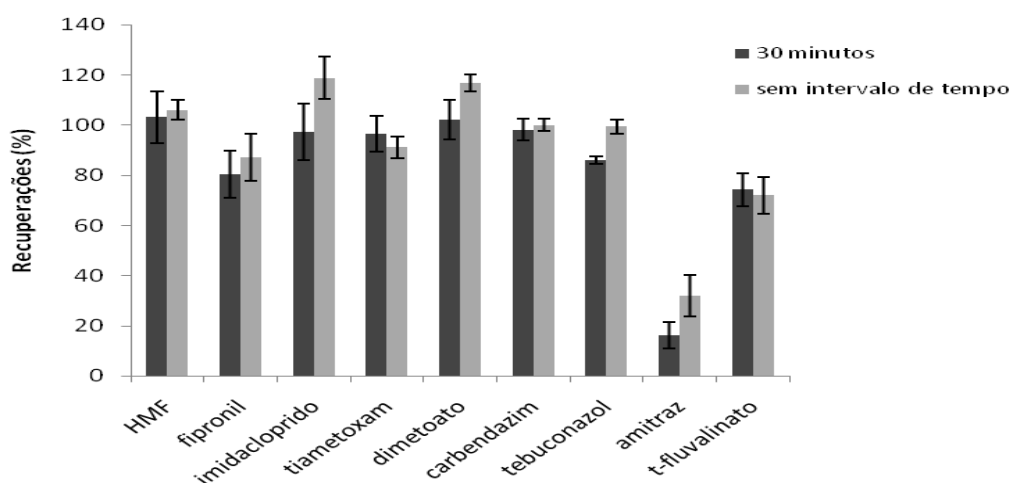


Figura 17 - Influência do tempo de interação da solução padrão com a matriz após a etapa de fortificação nas recuperações. Barras de erros indicam valores de RSD%.

5.4.3 Otimização do pH

Como pode ser observado na Figura 18, para todos os analitos e em todas as faixas de pH, as recuperações foram acima de 70%, com exceção do amitraz.

O amitraz é um agrotóxico que sofre rápida hidrólise em meio ácido. Um estudo realizado por KORTA *et al.*, (2001) mostrou através de análises de amostras de mel por LC, que o amitraz sofre degradação completa no mel em 10 dias, e os principais produtos formados nesta degradação são o 2,4-dimetil-anilina (DMA) e 2,4-dimetilfenilformamida (DMF). Em outro estudo, realizado por CORTA *et al.*, (1999), diferentes constantes de velocidade e tempos de meia-vida para o amitraz foram apresentados, numa faixa de pH 1,3-10,7. Com o aumento de pH, a constante de velocidade de degradação do amitraz diminui, e consequentemente seu tempo de meia-vida aumenta.

Como só foi possível obter recuperações acima de 70% para o amitraz em meio alcalino, o método foi otimizado utilizando-se hidróxido de amônio para o ajuste de pH.

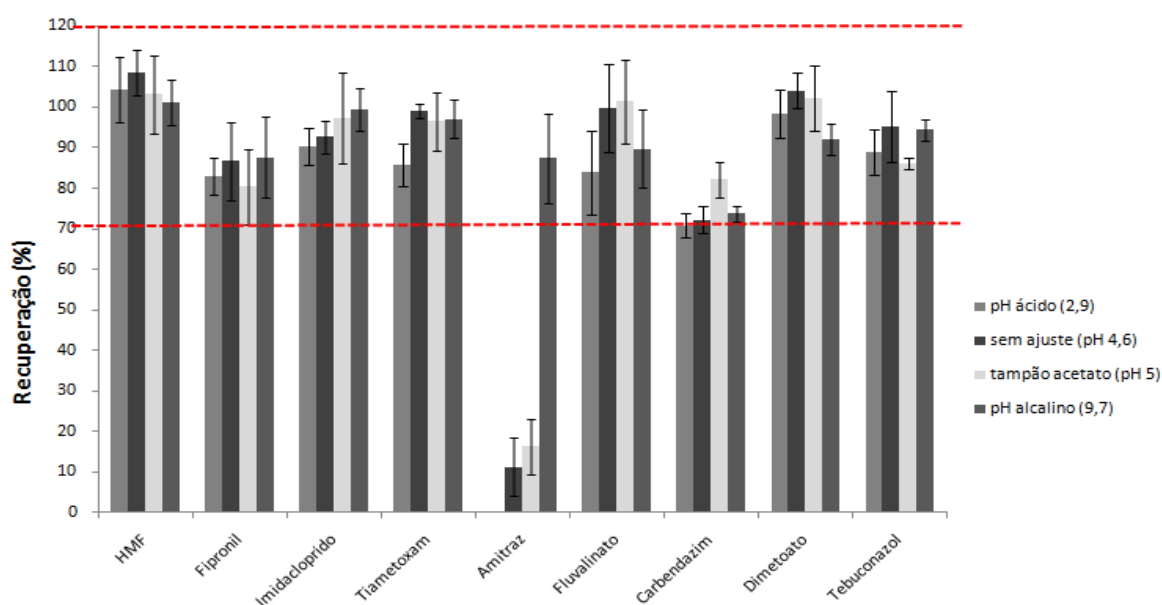


Figura 18 - Influência do pH nas recuperações dos analitos. Barras de erros indicam valores de RSD%.

5.5 Método QuEChERS modificado e otimizado

O método QuEChERS modificado que foi desenvolvido neste trabalho, proporcionou a extração simultânea de oito agrotóxicos de diferentes classes e de um substância indicadora da qualidade do mel, com recuperações entre 70 e 120% e RSDs menores que 20% para todos os analitos. Além disso, não necessitou da etapa de *cleanup*, reduzindo o tempo de preparo e gastos com reagentes. A robustez do método permitiu que fosse empregado em diferentes amostras de mel (de diferentes flores), resultando em boas recuperações e sem que o efeito de matriz pudesse alterar a eficiência apresentada pelo método.

O preparo da amostra aliado as determinações por LC-APCI-MS/MS proporcionou LOQs menores que os LMR em mel estabelecidos pela União Européia para quatro analitos. O desenvolvimento deste método pode auxiliar para estabelecer LMRs na legislação brasileira para os agrotóxicos estudados, com exceção do dimetoato, que apresenta LMR.

A Figura 19 apresenta as etapas envolvidas após a otimização do método QuEChERS modificado para os 9 analitos:



Figura 19 - Esquema representando o método QuEChERS otimizado.

5.6 Validação do método

5.6.1 Limites de detecção e quantificação

Na Tabela 9 são apresentados os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos pelo método desenvolvido por LC-APCI-MS/MS, bem como os LMR estabelecidos pelo MAPA, no Brasil, e pela Comissão da União Européia (EU PESTICIDES DATABASE, 2010). Os limites instrumentais e do método foram iguais, pois não houve pré-concentração ou diluição na etapa de preparo de amostra, a razão amostra:volume de acetonitrila foi 1:1 (m/v).

Tabela 9 - LOQ e LOD para os analitos, LMR no Brasil e União Européia

Analitos	LMR (mg kg ⁻¹) MAPA	LMR (mg kg ⁻¹) UE	LOQ (mg kg ⁻¹) método proposto	LOD (mg kg ⁻¹) método proposto
Amitraz	n.p	0,2	0,005	0,0016
Carbendazim	n.p	1,0	0,05	0,016
Dimetoato	0,02	n.p	0,05	0,016
Fipronil	n.p	0,01*	0,01	0,0033
τ -Fluvalinato	n.p	0,01	0,05	0,016
Imidacloprido	n.p	0,05	0,1	0,033
Tebuconazol	n.p	0,05	0,01	0,0033
Tiametoxam	n.p	0,01*	0,5	0,16
HMF [#]	60,0	80,0	1,0	0,33

n.p: não possui; (*)limite do analito somado aos metabólitos; (#) produto de degradação

Como pode ser observado, o método atingiu limites de quantificação menores que os LMR para 4 analitos. Na legislação brasileira só há LMR para o dimetoato e HMF em mel dentre os analitos selecionados.

Para o método desenvolvido por LC-DAD, os limites de quantificação atingidos foram maiores. Isso porque além de utilizar uma massa de amostra menor,

muitos interferentes da matriz eluíram próximo aos analitos nos cromatogramas, aumentando assim a razão sinal/ruído. Os limites de quantificação do método para os 4 analitos determinados por LC-DAD foram: 2,5 mg kg⁻¹ para HMF; 1,25 mg kg⁻¹ para tiametoxam e 0,4 mg kg⁻¹ para imidacloprido e fipronil. Estes valores de LOQ são relativamente altos se comparados com os LMR e com os LOQs atingidos pelo método por LC-APCI-MS, o que justifica a não realização da validação completa do método desenvolvido por LC-DAD.

5.6.2 Curva analítica, curva trabalho e linearidade

Os parâmetros de linearidade obtidos através de calibração externa, superposição da matriz e curva de trabalho para o método empregado, estão apresentados nas Tabelas abaixo. Na Tabela 10 são apresentadas as equações e os coeficientes de correlação para as curvas no solvente e no extrato, utilizadas para cálculos de efeito matriz. A Tabela 11 apresenta os mesmos parâmetros das curvas trabalho, que foram utilizadas para cálculos de recuperação relativa e avaliação do desempenho do método.

Tabela 10 - Resultados obtidos para as curvas analíticas

Analitos	Curva analítica no solvente	r	Curva analítica no extrato	r
Amitraz	$y = 1,123.10^7x + 1,390.10^5$	0,996	$y = 3,297.10^7x - 1,139.10^5$	0,996
Carbendazim	$y = 3,474.10^7x + 4,827.10^5$	0,998	$y = 1,335.10^7x - 2,189.10^5$	0,998
Dimetoato	$y = 4,105.10^6x - 5,264.10^4$	0,999	$y = 8,391.10^6x - 6,525.10^4$	0,999
Fipronil	$y = 2,320.10^6x + 1,191.10^3$	0,997	$y = 2,969.10^6x + 1,010.10^4$	0,999
T-Fluvalinato	$y = 682134x - 7685,5$	0,999	$y = 677710x - 7314,1$	0,999
Imidacloprido	$y = 878121x - 37495$	0,999	$y = 2,140.10^6x + 383,13$	0,999
Tebuconazol	$y = 72665397,37x - 218795,46$	0,999	$y = 1,121.10^8x - 1,592.10^5$	0,999
Tiametoxam	$y = 312313x - 71635$	0,999	$y = 574042x + 92581$	0,996
HMF	$y = 5,642.10^5x - 1,046.10^6$	0,998	$y = 9,284.10^5x + 2,101.10^6$	0,994

Tabela 11 - Resultados obtidos para as curvas trabalho

Analitos	Curva trabalho	r
Amitraz	$y = 2,702.10^7x + 4,427.10^4$	0,997
Carbendazim	$y = 1,092.10^7x + 9,960.10^4$	0,999
Dimetoato	$y = 8,678.10^6x - 4,281.10^4$	0,999
Fipronil	$y = 2,193.10^6x + 1,655.10^4$	0,996
T-Fluvalinato	$y = 554449x + 10375$	0,999
Imidacloprido	$y = 2,066.10^6x - 2,113.10^4$	0,999
Tebuconazol	$y = 1,087.10^8x + 1,576.10^5$	0,999
Tiametoxam	$y = 541039x - 90314$	0,998
HMF	$y = 6,976.10^5x + 3,997.10^6$	0,992

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, e análise das equações das retas para ambos os métodos, é possível concluir que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,99, estando de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO que recomendam r igual a 0,99 e acima de 0,90, respectivamente. Os coeficientes de correlação (r) para as curvas trabalho demonstram uma boa linearidade de todo o método analítico, abrangendo desde a etapa de preparo de amostra até as análises no LC-APCI-MS/MS.

5.6.3 Exatidão (recuperação)

A exatidão do método foi avaliada em termos de recuperação. Para isto, foram realizados ensaios de recuperação em 5 níveis de concentração dos analitos. O processo de extração foi realizado empregando o método QuEChERS modificado. As recuperações foram calculadas a partir das concentrações adicionadas antes da extração e obtidas utilizando a curva trabalho.

A literatura para a validação de métodos cromatográficos, indica que os intervalos de recuperação aceitáveis para determinação de resíduos devem estar entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009). Os valores de recuperação e RSD encontram-se na Tabela 12:

Tabela 12 - Nível de fortificação, recuperação (R%) e desvio padrão relativo (RSD%) para cada analito

Analitos	Nível de fortificação mg kg ⁻¹	R%	RSD%	Analitos	Nível de fortificação mg kg ⁻¹	R%	RSD%
Amitraz	0,005	86,7	19,8	Imidacloprido	0,1	111,5	16,6
	0,0125	92,1	12,4		0,25	97,1	7,3
	0,025	107,4	8,9		0,5	97,4	8,9
	0,0375	102,6	8,9		0,75	100,7	6,6
	0,05	97,2	6,2		1	100,3	8,3
Carbendazim	0,05	87,8	10,1	Tebuconazol	0,01	90,5	9,9
	0,125	98,2	6,1		0,025	100,1	6,1
	0,25	104,4	4,3		0,05	101,1	7,8
	0,375	98,1	5,3		0,075	103,1	12,5
	0,5	100,1	3,2		0,1	98,1	6,2
Dimetoato	0,05	103,7	12,5	Tiametoxam	0,5	111,9	19,8
	0,125	99,2	7,2		1,25	99,4	13,8
	0,25	100,6	6,1		2,5	93,8	12,4
	0,375	98,2	5,2		3,75	103	8,9
	0,5	100,8	4,6		5	99,7	10,5
Fipronil	0,01	87,6	12,4	HMF	1	70	11,1
	0,025	95,7	7		2,5	75	10,7
	0,05	110,7	8,3		5	109,3	12,7
	0,075	95,8	7,2		7,5	97,1	16,6
	0,1	100,1	7,2		10	99,8	6,3
τ-Fluvalinato	0,05	77,5	18,4				
	0,125	104	17,1				
	0,25	100,1	13,1				
	0,375	100,3	15,7				
	0,5	99,5	16,7				

Resultados obtidos para n=9

Os valores de recuperação obtidos entre 70 e 112% com RSD% menores que 20% estão de acordo faixa estabelecida (de 70 à 120% com precisão de até ± 20%).

5.6.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade, expressa como precisão intradia (RSD%), e também precisão intermediária, expressa como

precisão interdias (RSD_{pi}). A avaliação da precisão intermediária foi realizada em dois níveis de fortificação para cada analito, ao nível do LOQ e 5 vezes maior que o LOQ.

Os valores da precisão intradia, expressados como $RSD\%$, encontram-se na Tabela 12, no item 5.6.3, e estão de acordo com a faixa estabelecida, de até 20% (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009).

Na Tabela 13, encontram-se os valores de recuperação ($R\%$) e precisão interdias ($RSD_{pi}\%$) para cada analito e seus respectivos níveis de fortificação. Para a precisão interdias os valores de $RSD\%$ também estiveram dentro da faixa estabelecida, pois foram menores que 17%.

Tabela 13 - Nível de fortificação, recuperação ($R\%$) e precisão intermediária ($RSD_{pi}\%$) para os analitos

Analitos	Nível de fortificação $mg\ kg^{-1}$	$R\%$	$RSD_{pi}\%$	Analitos	Nível de fortificação $mg\ kg^{-1}$	$R\%$	$RSD_{pi}\%$
Amitraz	0,005	97,7	11,7	Imidacloprido	0,1	97,1	7,4
	0,025	96,4	5,1		0,5	112,6	6,0
Carbendazim	0,05	76,3	5	Tebuconazol	0,01	98,7	9,9
	0,25	70,4	2,9		0,05	105,4	4,4
Dimetoato	0,05	98,3	4,9	Tiametoxam	0,5	99,1	6,4
	0,25	98,2	2,2		2,5	99,2	3,5
Fipronil	0,01	104,2	5,7	HMF	1	76,6	9,2
	0,05	86,9	9,8		5	119,8	12,9
τ -Fluvalinato	0,05	120	16,7				
	0,25	104,7	8,8				

Resultados obtidos para $n=9$

5.6.5 Efeito de matriz

O efeito de matriz do método desenvolvido por LC-APCI-MS/MS foi avaliado através da comparação das inclinações das curvas dos padrões no solvente e dos padrões no extrato da matriz.

Como pode ser observado na Figura 20, praticamente todos os analitos apresentaram efeito matriz positivo, ou seja, enriquecimento de sinal. Apenas o

carbendazim apresentou supressão de sinal, e o τ -fluvalinato apresentou efeito matriz insignificante.

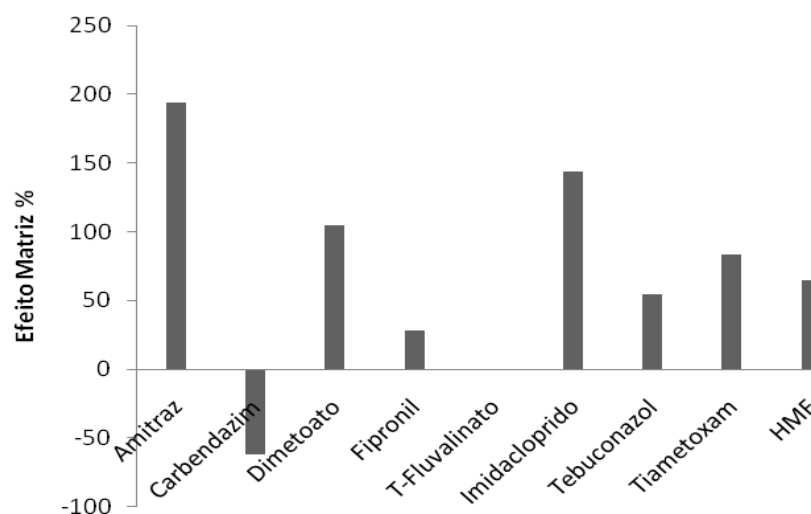


Figura 20 - Percentual de efeito de matriz para os 9 analitos empregando o método QuEChERS modificado e determinação por LC-APCI-MS/MS

De acordo com GOSETTI *et al.*, (2010), estudos da literatura consideraram que o efeito de matriz que ocorre na fonte de ionização ESI geralmente é supressão de sinal, sendo este efeito bem menor na APCI. O efeito de matriz que ocorre na APCI em sua maioria, é o enriquecimento de sinal, como foi observado neste estudo. Com exceção para o fipronil e τ -fluvalinato, todos os analitos apresentaram um alto efeito de matriz (> 50%) (ECONOMOU *et al.*, 2009).

O efeito de matriz também pode ser observado através da inclinação das curvas preparadas no solvente e no extrato da matriz. Quando há sobreposição das curvas, não é observado efeito de matriz; se a inclinação da curva no extrato for menor, indica supressão de sinal; e se a inclinação da curva no extrato for maior, indica enriquecimento de sinal (GOSETTI *et al.*, 2010). Como exemplo, na Figura 21 são apresentadas as curvas para 3 analitos: carbendazim, dimetoato e τ -fluvalinato:

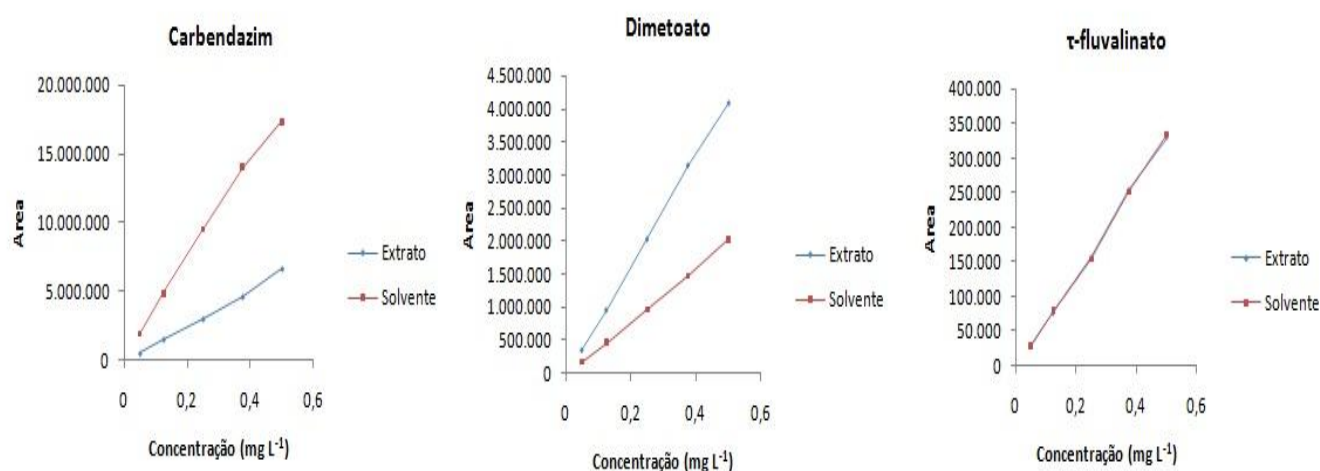


Figura 21 - Curvas do padrão no solvente e no extrato da matriz, para os analitos carbendazim, dimetoato e τ -fluvalinato.

Cada analito apresentou diferente efeito de matriz. O carbendazim apresentou supressão de sinal, como pode ser observado, já que a curva no extrato possuiu uma menor inclinação comparada com a curva no solvente. No caso do dimetoato, houve enriquecimento de sinal, já que a curva no extrato apresentou maior inclinação. O τ -fluvalinato foi o único que não apresentou efeito de matriz, que pode ser confirmado pela sobreposição das curvas.

Para compensar o efeito de matriz, foi realizada a calibração com o extrato branco da matriz correspondente (SANCO,2009).

5.6.6 Eficiência do processo

Geralmente, enriquecimento de sinal provocado pelo efeito matriz ocasiona um aumento da eficiência do processo e a supressão de sinal pode causar baixa eficiência de processo, mesmo com elevadas recuperações (VARGA *et al.*, 2010). Por isso, a eficiência do processo resume a eficiência de preparação da amostra (de recuperação) e ionização do analito (efeito de matriz) e é adequada para avaliar o desempenho global de um método de análise (KRUIVE *et al.*, 2008).

Como pode ser observado na Tabela 14, a eficiência do processo foi alta para a maioria dos analitos, isto porque além das altas recuperações obtidas pelo

método, o efeito de matriz pronunciado é o enriquecimento de sinal, elevando assim os valores da eficiência do processo. Isto demonstra que os valores de recuperação e efeito de matriz apresentam diferenças significativas, e para calcular as recuperações da extração, deve-se comparar os resultados da adição de padrão antes da extração com a adição de padrão no extrato branco da matriz (KRUVE *et al.*, 2008), como foi realizado. No caso de analitos em que o efeito matriz foi menor ou praticamente nulo, como o fipronil e o τ -fluvalinato, a eficiência do processo apresentou valores próximos a 100%, indicando que para estes analitos, o processo é eficiente resultando em boas recuperações e um baixo efeito de matriz.

Tabela 14 - Eficiência do processo (EP) para os 5 níveis de concentração de cada analito.

Nível de Concentração	amitraz			carbendazim			dimetoato		
	A	C	EP %	A	C	EP %	A	C	EP %
1	163.952	176.915	107,9	1.889.347	600.411	31,8	169.072	407.202	240,8
2	281.038	357.366	127,2	4.829.642	1.456.553	30,2	459.924	1.032.700	224,5
3	450.081	770.942	171,3	9.492.983	2.958.036	31,2	956.448	2.141.002	223,8
4	560.495	1.084.676	193,5	14.031.000	4.120.036	29,4	1.464.325	3.151.970	215,3
5	686.499	1.357.052	197,7	17.328.290	5.554.861	32,1	2.024.299	4.333.961	214,1
	fipronil			τ -fluvalinato			imidacloprido		
	A	C	EP %	A	C	EP %	A	C	EP %
1	18.794	35.778	190,4	28.980	33.801	116,6	63.679	209.405	328,8
2	59.386	69.042	116,3	79.402	83.918	105,7	163.297	480.510	294,3
3	123.721	138.003	111,5	154.033	149.924	97,3	402.009	985.514	245,1
4	181.681	174.263	95,9	251.070	219.175	87,3	628.320	1.539.159	245,0
5	225.560	235.934	104,6	334.861	285.840	85,4	838.334	2.051.073	244,7
	tebuconazol			tiametoxam			HMF		
	A	C	EP %	A	C	EP %	A	C	EP %
1	590.912	1.140.833	193,1	116.578	212.552	182,3	465.388	1.034.064	222,2
2	1.566.707	2.875.828	183,6	296.572	582.522	196,4	1.631.453	3.338.685	204,6
3	3.291.830	5.649.234	171,6	673.221	1.178.616	175,1	3.166.993	5.734.987	181,1
4	5.270.803	8.564.450	162,5	1.122.549	1.999.860	178,2	4.655.240	6.947.690	149,2
5	7.078.774	10.816.228	152,8	1.492.980	2.608.390	174,7	6.304.337	8.747.669	138,8

As letras A e C correspondem às áreas dos picos cromatográficos dos analitos no solvente e após a extração, respectivamente.

5.7 Aplicabilidade do método e robustez

Após a validação, o método foi aplicado para 4 diferentes tipos de mel, provenientes de diferentes localidades e flores, identificados pelas letras A, B, C e D na Figura 22. Os números 1, 2, 3 e 4 representam os extratos de cada amostra obtidos após a extração pelo método QuEChERS:

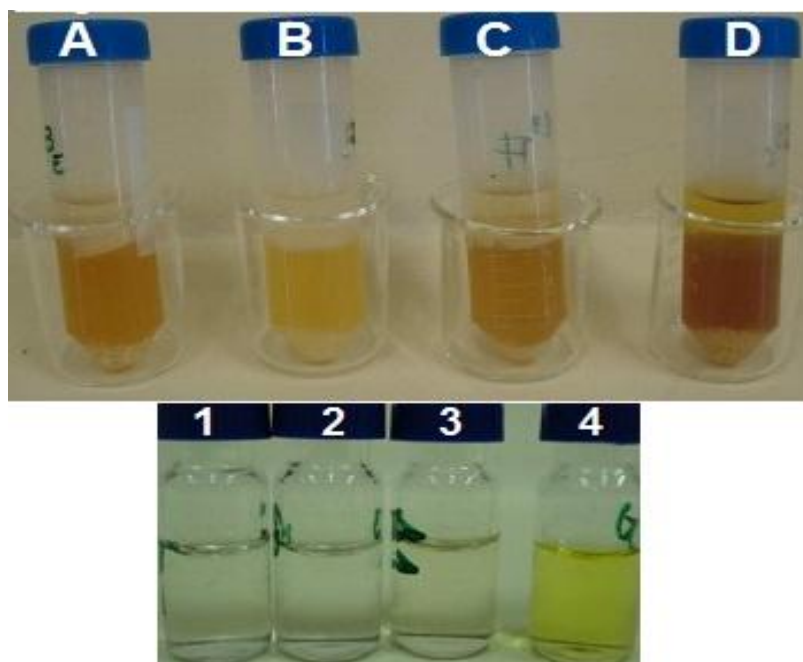


Figura 22 - Diferentes tipos de mel utilizados no desenvolvimento e aplicabilidade do método (A,B,C,D) e seus respectivos extratos obtidos (1,2,3,4).

Em nenhuma das amostras analisadas foi encontrado resíduo de agrotóxicos, no entanto nenhuma amostra estava isenta de HMF. Para calcular as concentrações de HMF para cada mel, utilizou-se a equação da curva no extrato da matriz (TEXEIDÓ *et al.*, 2008). Os valores encontrados nas análises do branco de cada matriz foram substituídos na equação das respectivas curvas. Nenhuma amostra apresentou teor de HMF acima do permitido pela legislação brasileira (60 mg kg^{-1}). As concentrações encontradas para cada amostra foram: $4,6 \text{ mg kg}^{-1}$ para o mel A; $12,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para o mel B; $11,8 \text{ mg kg}^{-1}$ para o mel C e $51,7 \text{ mg kg}^{-1}$ para o mel D.

Para avaliar a robustez do método proposto, 3 amostras (B,C e D) de méis de diferentes flores e composição, foram fortificadas aos níveis do LOQ e 5 vezes o LOQ de cada composto, e submetidos ao método desenvolvido para avaliar R%, RSD% e EM. Dessa forma, através dos resultados apresentados na Tabela 15, em que os valores de R% estão entre 70 e 120%, com RSD% menores que 20%, o método demonstrou ser robusto quando aplicado à análise de amostras de mel de diferentes flores (os resultados de R% e RSD% para o mel A, encontram-se na Tabela 12, apresentada anteriormente, pois o mel A foi utilizado na otimização e validação do método).

Tabela 15 - Resultados de Recuperação (%) e RSD (%) da aplicabilidade do método para diferentes tipos de mel.

Analitos	Nível de fortificação mg kg ⁻¹	Mel B		Mel C		Mel D	
		R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%
Amitraz	0,005	79,2	11,4	110,2	11,7	78,1	8,8
	0,025	74,8	10,0	74,4	13,1	97,7	7,4
Carbendazim	0,05	77,5	7,2	100,3	15,0	87,2	7,2
	0,25	74,4	2,9	82,9	6,4	86,2	14,3
Dimetoato	0,05	95,1	7,8	113,4	9,0	70,8	4,4
	0,25	96,6	4,7	95,4	6,9	115,7	8,5
Fipronil	0,01	91,6	10,5	72,2	15,5	104,9	5,1
	0,05	93,5	9,6	77,9	13,6	110,0	8,2
τ-Fluvalinato	0,05	110,9	11,3	113,6	13,7	113,5	15,0
	0,25	90,8	10,6	93,1	15,6	78,2	13,8
Imidacloprido	0,1	98,5	8,8	117,5	12,9	114,8	10,6
	0,5	94,5	8,1	101,1	4,9	109,4	8,4
Tebuconazol	0,01	74,1	5,5	104,0	14,9	87,7	8,3
	0,05	80,9	8,0	92,1	9,4	103,5	8,7
Tiametoxam	0,5	85,0	8,8	103,3	10,5	118,3	3,8
	2,5	111,1	4,5	95,6	4,5	113,3	3,2
HMF	1	119,3	7,0	94,7	13,9	107,6	5,6
	5	95,0	6,3	76,7	10,9	112,8	7,5

Cada tipo de mel apresentou diferente efeito de matriz, como demonstrado por DEBAYLE e colaboradores (2008) no estudo de um método multirresíduo para a determinação de agrotóxicos e antibióticos em diferentes tipos de mel por LC-MS. Na Tabela 16 são apresentados os valores do efeito de matriz, calculados também a

partir das inclinações das curvas do padrão no solvente e nos respectivos extratos. Os resultados demonstram que o efeito de matriz para o mel é dependente da origem floral da matriz.

Tabela 16 - Efeito de matriz para os 3 méis analisados.

Substâncias	Mel B	Mel C	Mel D
Amitraz	63,7%	32,1%	33,2%
Carbendazim	-63,0%	-71,6%	-65,5%
Dimetoato	23,7%	63,4%	6,5%
Fipronil	21,4%	88,5%	35,8%
τ -fluvalinato	6,1%	11,2%	19,6%
Imidacloprido	39,7%	130,7%	102,4%
Tebuconazol	53,0%	64,5%	21,1%
Tiametoxam	52,7%	96,9%	118,3%
HMF	-5,4%	72,1%	112,5%

5.8 Avaliação do método proposto

A Tabela 17 mostra a comparação entre o método QuEChERS proposto e os diferentes métodos empregados para determinação de agrotóxicos em mel.

Como pode ser observado, além de apresentar um menor tempo de extração se comparado com técnicas amplamente utilizadas, como a SPE, o volume de solvente utilizado é baixo. Outra técnica que apresenta um baixo consumo de solventes é a LLE-LTP, no entanto, existem várias etapas neste procedimento, como o congelamento da solução e etapa de *cleanup* com florisil, o que torna a técnica relativamente demorada.

No caso de técnicas como a IL-DLLME em que o volume de solvente é ainda menor, a técnica não apresenta robustez e sua aplicação para matrizes complexas ainda vem sendo estudada.

O método QuEChERS apresentado é simples e apresenta um baixo consumo de solventes. Além de ser robusto e amplamente empregado para diferentes amostras, sem ser necessária uma etapa de filtração ou *cleanup*. Se comparado com o método QuEChERS desenvolvido por BARAKAT (2007), o método proposto apresenta um menor consumo de reagentes (sais) e não apresenta etapa de *cleanup*, diminuindo o tempo e os custos do método. Além disso, apresenta boas recuperações e inclui para determinação no mesmo método um substância indicador de qualidade e contaminantes do produto.

Tabela 17 - Comparação do método proposto com alguns dos principais métodos desenvolvidos para determinação de agrotóxicos em mel.

Método	Analitos	Massa de amostra	Volume de solvente	Adição de sal	Tempo de extração	Recuperações	Referência
LLE GC-ECD	organofosforados	10 g	200 mL	15 g Na ₂ SO ₄	~1 hora	76-83%	Choudhary <i>et al.</i> , 2008
SPE GC-MS e LC-APCI-MS	multiresíduo	5 g	25 mL	-	~50 minutos	40-98%	Blasco <i>et al.</i> , 2003
IL-DLLME HPLC-DAD	triazinas	2 g	225 µL	0,6 g NaCl	~ 15minutos	60-133%	Wang <i>et al.</i> , 2010
SPE HPLC-DAD	acaricidas	0,5 g	5 mL	-	~30 minutos	63-100%	Korta <i>et al.</i> , 2001
LLE-LTP GC-MS	4 pesticidas	3 g	8 mL	0,1 g NaCl	~1 hora	84-100%	Pinho <i>et al.</i> , 2010
QuEChERS GC-ECD	multiresíduo	5 g	10 mL	1g NaAc + 4 g MgSO ₄ <i>cleanup</i> : 0,4 g PSA	~15 minutos	72-120%	Barakat <i>et al.</i> , 2007
QuEChERS LC-APCI-MS	Multiresíduo + HMF	10 g	10 mL	4 g MgSO ₄	~15 minutos	70-111%	Método proposto

6 CONCLUSÕES

O método QuEChERS modificado demonstrou rapidez, simplicidade, baixo custo e robustez para o preparo das amostras de mel, além de apresentar boa exatidão e precisão para os 9 analitos determinados neste estudo. Além disso, o método desenvolvido não necessitou da etapa de *cleanup* para a purificação dos extratos, uma vez que o extrato obtido era límpido e não houve diferenças significativas no efeito de matriz e recuperações.

Através da otimização do preparo de amostra com determinação dos analitos por LC-DAD foi possível obter cromatogramas com picos simétricos, com boa resolução e seletividade. O detector por arranjo de diodos permitiu confirmar a identidade dos analitos através dos testes de pureza dos picos, além de ser possível selecionar o comprimento de onda de máxima absorção para a quantificação de cada substância.

A determinação dos analitos por LC-APCI-MS/MS permitiu a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM. As condições cromatográficas otimizadas para determinação por LC-APCI-MS/MS permitiram a identificação e quantificação das substâncias em estudo, em um tempo de análise de 15 minutos.

Na validação do método foram obtidos resultados de acordo com o INMETRO e o SANCO. As curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. A partir da construção da curva trabalho foi possível calcular os valores de recuperação corrigindo possíveis erros sistemáticos da etapa do preparo de amostra, além de avaliar a linearidade do método.

Os limites de quantificação variaram de 0,005 a 1,0 mg kg⁻¹. Como na legislação brasileira apenas dimetoato e HMF possuem LMR para mel, se compararmos os valores obtidos com os da legislação européia, 4 analitos atingiram menores limites: amitraz, carbendazim, tebuconazol e HMF. O desenvolvimento deste método pode auxiliar para estabelecer LMRs na legislação brasileira para todos os agrotóxicos estudados, pois não há limites no PNCRC em mel (MAPA) para

estes analitos (com exceção do dimetoato), apesar da importância, devido às formas de utilização e toxicidade.

O método empregando QuEChERS modificado e determinação por LC-APCI-MS/MS apresentou recuperações entre 70 e 112% com RSD menor que 19,8%. No entanto, os componentes da matriz afetaram a eficiência da ionização para a maioria dos analitos, sendo necessária a correção do efeito de matriz através da construção da curva no extrato.

Através da aplicabilidade foi possível verificar a robustez do método para diferentes tipos de mel. Em nenhuma das amostras analisadas foram encontrados resíduos de agrotóxicos. No entanto, em todas as amostras foi detectado HMF, em concentrações que variaram de 4,6 a 51,7 mg kg⁻¹, estando abaixo do limite máximo permitido pelas legislações vigentes.

7 TRATAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos do método QuEChERS modificado e os solventes utilizados durante o estudo foram coletados, separados em frascos, rotulados e armazenados adequadamente aguardando procedimento a ser adotado pela instituição. Além disso, estão sendo desenvolvidos e otimizados processos oxidativos para a degradação dos resíduos de agrotóxicos gerados no laboratório.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJLOUNI, S.; SUJIRAPINYOKUL, P. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1000–1005, 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003 - ANVISA. Brasília, 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). "Estudo traça perfil do mercado de agrotóxicos no Brasil." – 25/03/2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br> Acesso em julho, 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Monografias de Produtos Agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em agosto, 2010.

ALBERO, B.; SANCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J.L. Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 5828–5835, 2004.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

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

BARAKAT, A. A.; BADAWY, H.M.A.; SALAMA, E.; ATTALLAH, E.; MAATOOK, G. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey. **Journal of Food, Agriculture & Environment** . v. 5, p. 97-100, 2007.

BELITZ, H.D.; GROSH, W. **Química de los alimentos**. 2ª ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A., 1997.

BEZERRA, D.S.S.; SILVA, M.M..S.; CARVALHO, P.H.V.; AQUINO, A.; NAVICKIENE, S. MSPD procedure combined with GC-MS for the determination of procymidone, bifenthrin, malathion and pirimicarb in honey. **Química Nova**, v. 33, p. 1348-1351, 2010.

BLASCO, C.; FERNANDEZ, M.; PENA, A.; LINO, C.; SILVEIRA, M.I.; FONT, G.; PICÓ, Y. Assessment of Pesticide Residues in Honey Samples from Portugal and Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 8132–8138, 2003.

BLASCO, C.; FERNANDEZ, M.; PICÓ, Y.; FONT, G. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1030, p. 77–85, 2004.

BOGDANOV, S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, v. 37, p. 1-18, 2006.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, Lei nº 7802/1989. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, janeiro de 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br> Acesso em agosto de 2010.

CALDAS, S.S, **Otimização e Validação de Métodos Empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em Água subterrânea**. 2009. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

CALDAS, S.S.; DEMOLINER, A.; PRIMEL, E.G. Validation of a Method using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Residues in Groundwaters. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 20, p. 125-132, 2009.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **LWT - Food Science and Technology**, *no prelo*, 2010.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de substâncias tóxicas em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CHOUDHARY, A.; SHARMA, D.C. Pesticide Residues in Honey Samples from Himachal Pradesh (India). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 417–422, 2008.

CODEX STANDARD FOR HONEY. **CODEX STAN 12-1981**. Rev. 2001. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net> Acesso em: março, 2010.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

CORTA, E.; BAKKALI, A.; BERRUETA, L.A.; GALLO, B.; VICENTE F. Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS. **Talanta**, v. 48, p. 189–199, 1999.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: Mecanismos de degradação e toxidez. Pesticidas: **Revista de eco toxicologia e meio ambiente**, v. 15, p. 65-72, jan./dez. 2005.

CUNHA, S.C.; LEHOTAY, S.J.; MASTOVSKA, K.; FERNANDES, J.O.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 620 – 632, 2007.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2ed. São Paulo: Nobel, 1985. 226p.

DEBAYLE, D.; DESSALCES, G.; GRENIER-LOUSTALOT, M.F. Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 39, p. 1011–1020, 2008.

DEMOLINER, A., **Otimização e Validação de Metodologia Analítica Empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Multiclasses de Agrotóxicos e Metabólitos em Água de Superfície e Abastecimento**. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009

EL HASSANI, A.K. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 82, p. 30 – 39, 2005.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção de mel**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> Acesso em março de 2009.

EU Pesticides Database – Regulation EC N°396/2005. Disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm. Acesso em: dezembro, 2010.

FALLICO, B.; ZAPPALÀ, M.; ARENA, E.; VERZERA, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 305–313, 2004.

FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

FIDENTE, P.; SECCIA, S.; VANNI, F.; MORRICA, P. Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 175–178, 2005.

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G.S.; COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, p. 105-112, 2006

GARCÍA-CHAO, M.; AGRUÑA, M.J.; CALVETE, G.F.; SAKKAS, V.; LLOMPART, M.; DAGNAC, T. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, p. 107–113, 2010.

GASPAR, E.M.S.M.; LUCENA, A.F.F. Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1576–1582, 2009.

GILBERT-LOPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J.F.; LOZANO, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.; MOLINA-DÍAZ, A. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6022–6035, 2010.

GOKMEN, V.; SENYUVA, H.Z. Improved Method for the Determination of Hydroxymethylfurfural in Baby Foods Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 54, p. 2845–2849, 2006.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M.C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929–3937, 2010.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2008.

HERMOSÍN, I.; CHICON, R.M.; CABEZUDO, M.D. Free amino acid composition and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 83, p. 263–268, 2003.

IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2009**. IBGE, 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 03 - Brasília, 2010. 20p.

ISMAIEL, O.A.; HALQUIST, M.S.; ELMAMLY, M.Y.; SHALABY, A.; KARNES, H.T. Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations. **Journal of Chromatography B**, v. 875, p. 333–343, 2008.

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A.; QUEIROZ, S.C.N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, No.4, p. 996-1012, 2009

KAMEL, A. Refined Methodology for the Determination of Neonicotinoid Pesticides and Their Metabolites in Honey Bees and Bee Products by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5926–5931, 2010.

KANRAR, B.; MANDAL, S.; BHATTACHARYYA, A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 42 pesticides in made tea, tea infusion and

spent leaves using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.1926–1933, 2010.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 10-20, 2008.

KORTA, E.; BAKKALI, A.; BERRUETA, A.; GALLO, B.; VICENTE, F.; KILCHENMANN, V.; BOGDANOV, S. Study of Acaricide Stability in Honey. Characterization of Amitraz Degradation Products in Honey and Beeswax. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5835–5842, 2001.

KORTA, E.; BAKKALI, A.; BERRUETA, A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Study of semi-automated solid-phase extraction for the determination of acaricide residues in honey by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 930, p. 21–29, 2001.

KRUBE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.01, n. 02, p. 35-61, 2009.

LEHOTAY, S.J.; LIGHTFIELD, A.R.; HARMAN-FETCHO, J.A.; DONOGHUE, D.J. Analysis of Pesticide Residues in Eggs by Direct Sample Introduction/Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4589–4596, 2001.

LEMOES, G.S.; SANTOS, J.S.; SANTOS, M.L.P. Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. **Química Nova**, v. 33, p. 1682-1685, 2010.

MALASPINA, O. ; SOUZA, T. F. Pólen Tóxico e Defensivo Agrícola: Riscos e Consequências. **XVI Congresso Brasileiro de Apicultura e II Congresso Brasileiro de Meliponicultura**. Sergipe, maio de 2006. Disponível em: <<http://www.apis.sebrae.com.br/arquivos>> Acesso em: junho de 2009.

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

MAŠTOVSKÁ, K.; DORWEILER, K.J.; LEHOTAY, S.J.; WEGSCHEID, J.S.; SZPYLKA, K.A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.5959–5972, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. Instrução normativa nº 8, de 29 de abril de 2010. **Programa de controle de resíduos e contaminantes em mel – PNCRC/2010**. Brasil, 2010. Disponível em: www.extranet.agricultura.gov.br Acesso em: setembro de 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Disponível em: www.extranet.agricultura.gov.br Acesso em: julho de 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. **AGROFIT- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: www.extranet.agricultura.gov.br Acesso em: novembro de 2010.

MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C.A.B. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, p. 516-525, 2001.

NGUYEN, T.D.; YU, J.E.; LEE, D.A.; LEE, G. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 207–213, 2008.

OBANA, H.; OKIHASHI, M.; AKUTSU, K.; KITAGAWA, Y.; HORI, S. Determination of Acetamiprid, Imidacloprid, and Nitenpyram Residues in Vegetables and Fruits by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4464–4467, 2002.

PAN, C.; ZHANG, H.; CHEN, S.; XU, Y.; JIANG, S. Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic column liquid chromatography-mass spectrometry after use of QuEChERS clean-up. **Acta Chromatographica**, v. 17, p. 320-327 , 2006.

PESTICIDE PROPERTIES DATABASE – PPDB. University of Hertfordshire, 2010. Disponível em: www.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/ Acesso em: agosto de 2010.

PETROVIC, M.; HERNANDO, M.D.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 1–14, 2005.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, p. 1307-1311, 2010.

PINTO, C.G.; LAESPADA, M.E.F.; MARTÍN, S.H.; FERREIRA, A.M.C.; PAVÓN, J.L.P.; CORDERO, P.M. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. **Talanta**, v.81, p. 385–39, 2010.

PIZZUTTI, I.; DE KOK, A.; HIEMSTRA, M.; WICKERT, C.; PRESTES, O.D. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 4539-4552, 2009.

PORTAL ECODEBATE. Agrotóxico que combate praga da laranja está dizimando abelhas no interior de São Paulo. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2008/08/20/agrotoxico-que-combate-praga-da-laranja-esta-dizimando-abelhas-no-interior-de-sao-paulo/>>. Acesso em: junho de 2009.

PORTAL ECODEBATE. Itália proíbe agrotóxicos neonicotinóides associados à morte de abelhas. Disponível em: <http://www.ecodebate.com.br/2008/09/22/italia-proibe-agrotoxicos-neonicotinoides-associados-a-morte-de-abelhas/>>. Acesso em: junho de 2009.

PRESTES, O.D. **Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduo para Determinação de Pesticidas em Arroz Polido utilizando Método Quechers Modificado, Clean-Up Dispersivo e GC-MS (NCI-SIM)**. 2007. 108 p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

PRESTES, O.D.; FRIGGI, C.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um Método Moderno de Preparo de Amostra para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Alimentos por Métodos Cromatográficos Acoplados à Espectrometria de Massas. **Química Nova**, v.32, p.1620-1634, 2009.

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 893-902, 2009

REYNOLDS, S.L. Sample handing and clean-up procedures I. in: FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M-R.M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1–9, 2006.

RIAL-OTERO, R.; GASPAR, E.M.; MOURA, I.; CAPELO, J.L. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Talanta**, v. 71, p. 503–514, 2007.

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

RIBEIRO, M.L.; LOURENCETTI, C.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S.; OLIVEIRA, L.C. Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente. **HOLOS environment**, v.8, p. 53-71, 2008.

RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S.; KNOLL, F.R.N.; APON, B.M. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 153–159, 2004.

RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S.; KNOLL, F.R.N.; ANDRADE, R.M.B.; ALMEIDA, M.V. Método Multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. **Química Nova**, v.29, nº5, p. 950-955, 2006.

RODRIGUES, S.A. **Otimização e Validação de Métodos Empregando MSPD, QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para Determinação de Agrotóxicos em cebola**. 2010. 119 p. Dissertação (Mestrado em Química) - FURG, Rio Grande, RS.

RODRIGUES, S.A.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, p. 82–89, 2010.

RODRIGUES, S.A.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, *no prelo*.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Document nº SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Uppsala, Suécia. 01/01/2010.

SCOTT, R. P. W. **Liquid Chromatography Detectors**. Chrom-Ed Book Series - library4science, LLC, 2003. Disponível em: <<http://www.library4science.com/>>

SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio à Micro e Pequenas Empresas. **Setor de Apicultura**. Disponível em: www.sebrae.com.br. Acesso em: dezembro de 2010.

SECCIA, S.; FIDENTE, P.; MONTESANO, D.; MORRICA, P. Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1214, p. 115–120, 2008.

SKOOG, A. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre:Bookman, 2009. 1023 p.

SPANIO, N.; CIULU, M.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M.I.; PIU, P.C.; SALIS, S.; SANNA, G. A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. **Talanta**, v. 78, p. 310–314, 2009.

STOPPELLI, I.M.B.S.; MAGALHÃES, C.P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência e saúde coletiva**, v. 10, p. 91-100, 2005.

SUAREZ-LUQUE, S.; MATO, I.; HUIDOBRO, J.F.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M.T. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 955, p. 207–214, 2002.

TAYLOR, P.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 328– 334, 2005.

TEXEIDÓ, E.; MOYANO, E.; SANTOS, F.J.; GALCERAN, M.T. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 102–108, 2008.

TOMLIN, C. D. S. **The e-Pesticide Manual, Thirteenth Edition, Version 3.0**. Londres, 2003. CD-ROM.

TOTTI, S.; FERNÁNDEZ, M.; GHINI, S.; PICÓ, Y.; FINI, F.; MAÑES, J.; GIROTTI, S. Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography–mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 69, p. 724–729, 2006.

TSAI, W-H.; CHUANG, H-Y.; CHEN, H-H.; HUANG, J-J.; CHEN, H-C.; CHENG, S-H.; HUANG, T-C. Application of dispersive liquid–liquid microextraction and dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of quinolones in swine muscle by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, p. 56–62, 2009.

UNIVERSITY OF BRISTOL. **A schematic of the components of an APCI source**. Disponível em: www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms/html. Acesso em: dezembro de 2010.

WALORCZYK, S.; GNUSOWSKI, B. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6522–6531, 2009.

WANG, Y.; YOU, J.; REN, R.; XIAO, Y.; GAO, S.; ZHANG, H.; YU, A. Determination of triazines in honey by dispersive liquid–liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4241-4246, 2010.

WOLFF, L.F.; REIS, V.D.A.; SANTOS, R.S.S. Abelhas melíferas: bioindicadores e qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 38 p.

WU, Q.; WANG, C.; LIU, Z.; WU, C.; ZENG, X.; WEN, J.; WANG, Z. Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 5504–5510, 2009.

VARGA, R.; SOMOGYVÁRI, I.; EKE, Z.; TORKOS, K. Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction – liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, *no prelo*, 2010.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 921, p.227, 2001

ZAPPALÀ, M.; FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. **Food Control**, v. 16, p. 273–277, 2005.

ZHANG, K.; WONG, J.W.; HAYWARD, D.G.; SHELADIA, P.; KRYNITSKY, A.J.; SCHENCK, F.J.; WEBSTER, M.G.; AMMANN, J.A.; EBELER, S.E. Multiresidue Pesticide Analysis of Wines by Dispersive Solid-Phase Extraction and Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4019-4029, 2009.

ZERO HORA. Mistério nas colméias. Porto Alegre, 29 de julho de 2007.

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; CARDOSO, L.V. ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G. **Otimização da DSPE para extração simultânea de HMF e inseticidas em mel.** In: XVIII SBQSul, 2010, Curitiba PR.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; CARDOSO, L.V. ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G. **Determinação simultânea de hidroximetilfurfural e inseticidas em mel empregando DSPE e HPLC-DAD.** In: XII Encontro de pós graduação - IX MPU- Mostra da produção universitária, 2010, Rio Grande RS.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; CARDOSO, L.V. ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G. **Validação de método para a determinação de fipronil em mel empregando DLLME e HPLC-DAD.** XII Encontro de pós graduação - IX MPU- Mostra da produção universitária, 2010, Rio Grande RS.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; CARDOSO, L.V. ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G. **Validação de método para a determinação de fipronil em mel empregando DLLME e HPLC-DAD.** In: SIMCRO- Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas afins, 2010, Campos do Jordão SP.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; CARDOSO, L.V. ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G. **Determinação simultânea de hidroximetilfurfural e inseticidas em mel empregando DSPE e HPLC-DAD.** In: SIMCRO- Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas afins, 2010, Campos do Jordão SP

TOMASINI, D. ; SAMPAIO, M.R.F. ; CARDOSO, L.V. ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G. **Otimização de método para a determinação de agrotóxicos em mel por HPLC-DAD** In: XVII SBQSul, 2009, Rio Grande RS.

TOMASINI, D.; SAMPAIO, M.R.F. ; CARDOSO, L.V. ; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E. G. **Estudo de métodos empregando DLLME, HPLC-DAD e LC-MS para a determinação de agrotóxicos em mel.** In: XI Encontro de pós graduação - VIII Mostra da Produção Universitária, 2009, Rio Grande RS.

ANEXO 1: Dados sobre apicultura na Região Sul do RS – Escritório Regional EMATER Pelotas/RS.
Apis mellifera

Nº	Municípios	Nº Apicultores no município	Nº Apicultores Assistidos	Nº Colméias no município	Nº Colméias de produtores assistidos	Nº Associação/Cooperativa no município	Nº Associação/Cooperativa assistida	kg mel/colméia no município	kg mel/colméia assistida	Apicultura Migratória Produtores / nºcolméias	Casas/entre postos de Mel atendidos	Preço médio do Kg mel na última safra	Floradas principais no município	Serviço de Inspeção SIM SIPOA SIF	Observações
1	Amaral Ferrador	15	0									6	angico, eucalipto,acácia.		Campos em branco: sem Informação
2	Arroio do Padre														
3	Arroio Grande	25	0	20	0	1	0	10	0						
4	Canguçu	917	30	10	748	1	1	15	15	918	1	3	Nativas e Exóticas		COOMELCA
5	Capão do Leão	37	15	10	13	0	0	15	15		0	6	EUCALIPTO, ACÁCIA		
6	Cerrito	50	15	20	20	0	0	10	10	0	0	2	eucalipto, carqueja, amaricá, nativa.		Preço desestimula produtores
7	Cristal	115	0	5	0	1	0	6,5	0						
8	Herval	50	15	10	25	1	1	12	20						
9	Jaguarão	26	15	15	25	1	1	20	30	300		5	eucaliptus e mata nativa		
10	Morro Redondo	52	28	15	18	1	1	12	16			5	Mat nat, eucalip e pastagens		
11	Pedras Altas														
12	Pedro Osório	45	14	10	14	1	1	12	18	0	0	6	Carqueja, Coronilha		5.400kg (produção) 450 caixas
13	Pelotas	60	5	83	30	0	0	22	25	0	0	4			
14	Pinheiro Machado	65	30	14	25	1	1	15	22	0	0	2	eucalipto, carqueja, coronilha, molho, erva-de-passarinho...	Existe o SIM, somente para o frigorífico municipal	
15	Piratini	200	15	20	20	1	0	15	15			2,5			Pouco comércio
16	Rio Grande	104	30	3900	1700	2	1	18	30	400	1	8,00	Eucalipto, Campo Nativo, Mata Nativa e pastagens (trevos)	Tem o SIM Encaminhado solicitação SIF	1 Associação em dissolução e 1 cooperativa (COOAPIS) c/25 sócios 2 produtores de rainhas
17	Santa Vitória Palmar														
18	Santana Boa Vista	65	40	15	19	0	0	12	20	0	0	5	Eucalipto e nativas		Implantação 1 Assoc. ligada a Coop. de prod. Cofrusa
19	São José do Norte	10	0	8	0	0	0	8	0	0	0				
20	São Lourenço Sul	150	0	10	0	1	0	12	0	150	0	5	eucalipto e nativas		Dados aproximados
21	Turuçu	8	0	25	0	0	1	0	0						
22	Chuí														
TOTAL		1994	252			10	7			1768	2				

ANEXO 2:

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 8, DE 29 DE ABRIL DE 2010

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe conferem os arts. 10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, tendo em vista o disposto na Portaria MA nº 51, de 6 de fevereiro de 1986, na Portaria MAARA nº 527, de 15 de agosto de 1995, na Portaria MAPA nº 45, de 22 de março de 2007, e o que consta do Processo nº 21000.001330/2010-72, resolve:

Art. 1º Aprovar os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2010, na forma dos Anexos à presente Instrução Normativa.

Art. 2º As análises relativas aos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2010 serão realizadas nos laboratórios oficiais e credenciados pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Parágrafo único. A Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes - CCRC/SDA determinará, para plena execução do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes - PNCRC no exercício de 2010 (PNCRC/2010), e ouvida a Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/SDA, o remanejamento da remessa de amostras para outro laboratório habilitado a realizar as análises requeridas pelo PNCRC sempre que tomar conhecimento que o laboratório anteriormente escolhido apresentou qualquer não conformidade que impossibilite a realização da programação para o exercício de 2010.

Art. 3º As alterações técnicas complementares ao PNCRC de que trata esta Instrução Normativa serão publicadas no Diário Oficial da União.

Art. 4º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

INÁCIO AFONSO KROETZ

ANEXO VII

PROGRAMA DE CONTROLE DE RESÍDUOS E CONTAMINANTES EM MEL - PNCRC/2010

Plano de Controle de Resíduos e Contaminantes - Mel

Grupo	Analito	Matriz	LIMITE DE REFERÊNCIA*	Nº de Itens de ensaio
Antimicrobianos	Clortetraciclina (a)	MEL	(µg/kg)	15
	Oxitetraciclina (a)		10	
	Tetraciclina (a)		10 *(II)	
	Doxiciclina (a)		10	
	Sulfatiazol (b)	MEL	10	15
	Sulfametazina (b)			
	Sulfadimetoxina (b)			
	Nitrofurazona - SEM	MEL	1 *(III)	30
	Furazolidona - AOZ			
	Furaltadona - AMOZ			
	Nitrofurantoina - AHD			
	Cloranfenicol	MEL	0,30*(III)	30
	Tilosina	MEL	10	10
	Eritromicina	MEL	10	10
	Estreptomicina	MEL	10	10
Compostos Halogenados e Organoclorados	Aldrin	MEL	10	15
	Alfa-endosulfan		10	
	4,4-DDE		10	
	4,4-DDD		10	
	4,4 DDT		10	
	Dodecacloro		10	
	Endrin		10	
	Tetradifona		20	
	Lindane		10	
	Vinclozolina		20	
	Heptacloro		10	
	Alfa-HCH		10	
	Beta-HCH		10	
Carbamatos	Carbofuran	MEL	50	15
	Carbaril		20	
Piretróides	Permetrinas	MEL	20	
	Ciflutrinás		20	
	Fenpropatrina		10	
	Deltametrina		20	
Organofosforados	Clorpirifós	MEL	20	30
	Dimetato		20	
	Dissulfoton		10	
	Parationa		20	
	Fenamifós		10	
	Terbufós		10	
	Profenofós		20	
Contaminantes Inorgânicos	Arsênio (As)	MEL	500	30
	Cádmio (Cd)		500	
	Chumbo (Pb)		500	
	Mercurio (Hg)		500	

ANEXO 3

Comparison of dispersive liquid–liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey samples by high performance liquid chromatography with diode-array detection

(Submetido à Journal of Chromatography A)

Débora Tomasini^a, Maicon R. F. Sampaio^a, Liziane V. Cardoso^a, Sergiane S. Caldas^a, Ednei G. Primel^{a*}

ABSTRACT

Two methods, based on dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) and Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS), have been developed, validated and critically compared for the analysis of the insecticide fipronil in honey by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection. Parameters that affect the extraction have been investigated for both methods. Under optimal conditions, the limits of quantification were 0.03 and 0.6 mg kg⁻¹ for DLLME and modified QuEChERS, respectively. The recoveries were between 70.7-101.1% and 76.3-87.7% for DLLME and QuEChERS, with relative standard deviations in the range of 7.1-11.2% and 5.9-10.8%, respectively. Both methods were found to be simple, fast and inexpensive. Compared with modified QuEChERS, the advantages of the DLLME technique were the preconcentration factor and fewer amounts of solvent. However, the modified QuEChERS method demonstrated to be more robust and more suitable for the determination of pesticides in complex samples. The methods under study were applied to the determination of fipronil in different kinds of honey.

Keywords: Dispersive liquid-liquid microextraction; Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe; High performance liquid chromatography-diode array detection; Honey; Fipronil;