



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE
AGROTÓXICOS EM MEL EMPREGANDO
MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E GC-ECD**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Débora Orso

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MEL
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E GC-ECD**

por

Débora Orso

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MEL
EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E GC-ECD**

elaborado por
Débora Orso

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Zanella - Orientador
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Marcio A. Mazutti
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Osmar D. Prestes
Universidade Federal do Pampa

Santa Maria, 03 de agosto de 2011

Dedico este trabalho a todas as pessoas que acompanharam e que torceram pela realização do mesmo, em especial aos meus Pais, João e Neide, pois sem o incentivo de vocês eu não estaria concluindo mais esta etapa em minha vida. Obrigada por tudo!
AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella agradeço pela orientação profissional durante este estudo, mas principalmente ao incentivo, à oportunidade, à compreensão e aos ensinamentos transmitidos durante todo este tempo de trabalho realizado. Agradeço também pela amizade conquistada e pela oportunidade de fazer parte do grupo LARP.

À Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime, meus sinceros agradecimentos por todo apoio, incentivo, pelos ensinamentos, pela participação e sugestões no exame de qualificação. Obrigada pela oportunidade de fazer parte deste grupo, por toda a dedicação durante este período e por acreditar na realização deste trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Marcio A. Mazutti e Prof. Dr. Osmar D. Prestes, pela disposição em participar da defesa da dissertação, pelas valiosas contribuições e sugestões, bem como, pelos questionamentos, visando a melhoria deste trabalho.

Aos colegas e amigos do LARP, que participaram ativamente durante a realização deste trabalho, a vocês meu muito obrigada por tudo. Agradeço por fazerem da minha vida mais feliz, a amizade conquistada com cada um de vocês já foi uma vitória.

Às minhas amigas Juliana, Danieli, Magali e Tiele, obrigada pela amizade, pelo companheirismo e pela disposição em ajudar sempre, aos amigos Filipe, Manoel, Carol, Osmar, Giovana, Mateus, Guilherme, Janice e Lucila, muito obrigada por todo apoio, pelas ajudas, pelo incentivo e por todos os momentos maravilhosos convividos com vocês durante a realização deste trabalho.

À Márcia e a todos os membros do LARP, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Hermano, muito obrigada por ter fornecido, durante a etapa de realização deste trabalho, as amostras de méis para esta conclusão.

Aos meus pais, João e Neide, e aos meus irmãos, Felipe e Josiane, que tanto torceram, sofreram e vibraram comigo, vocês são as pessoas mais importantes da minha vida! Obrigada pelo incentivo, sem ele seria praticamente impossível esta realização.

A todos os demais familiares e amigos, que de alguma forma torceram e vibraram durante este momento da minha vida.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, os quais contribuíram para minha formação.

Aos secretários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela gentileza e atenção dispensadas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro fornecido e pela bolsa.

Agradeço muito a Deus, pela força recebida e pela proteção, guiando-me sempre para o melhor dos caminhos, ao conceder-me mais esta etapa de vitória, caracterizada por muito aprendizado e realizações.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MEL EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E GC-ECD

Autora: Débora Orso

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 03 de agosto de 2011

A produção mundial de mel vem crescendo continuamente em função do maior consumo de produtos naturais, estando relacionado diretamente com a saúde dos consumidores e estimulado pelas suas qualidades terapêuticas e nutricionais. Torna-se necessário, portanto, a verificação da adequação das características relacionadas à qualidade do mel, tais como, as suas características físico-químicas e a identificação da origem floral e geográfica deste produto. Para tal finalidade, surge a importância da análise de resíduos e o necessário monitoramento destes, para que o seu suprimento seja garantido.

Neste estudo, foi desenvolvido e validado um método para a determinação de resíduos de 23 agrotóxicos em mel, analisados pela utilização do método de extração QuEChERS modificado e Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétrons (GC-ECD). Dessa forma, efetuou-se a fortificação da amostra de mel, com soluções contendo os 23 agrotóxicos, em 3 níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 6 réplicas para cada nível, e aplicou-se o método QuEChERS modificado. Este método de extração consistiu em pesar 2,5 g da matriz, adição de 5 mL da solução Na_2EDTA 0,1 mol L^{-1} e 5 mL de acetonitrila, após efetuou-se a agitação em vortex, por 3 min. Acrescentou-se 6,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,5 g de cloreto de sódio, agitando-se novamente por 1 min. Posteriormente, ocorreu a centrifugação por 8 min. A purificação dos extratos foi realizada através da etapa de *clean-up* dispersivo, em que 2 mL do extrato foram transferidos para outro tubo contendo 120 mg de sulfato de magnésio anidro e 100 mg de amina primária secundária (PSA), repetindo-se a agitação e centrifugação e, em seguida, os extratos foram analisados por GC-ECD.

Avaliou-se a linearidade das curvas analíticas (6 níveis de concentração e seis injeções de cada nível), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), efeito matriz, exatidão e precisão do método analítico. Em geral, a faixa linear de concentração das curvas analíticas, preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz, situou-se entre 5,0 ou 10,0 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ com valores de $r^2 > 0,99$. A técnica GC-ECD promoveu a quantificação de 95,6% dos compostos que apresentaram LOQ do método de 3,0 ou 6,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Portanto, conclui-se que o método mostrou-se adequado à determinação multirresíduo dos agrotóxicos em mel, bem como, a técnica de purificação dos extratos de mel foi eficiente, conciliando sensibilidade e seletividade adequadas, e todos os parâmetros de validação encontram-se dentro dos limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos.

Palavras Chave: mel, agrotóxicos, método QuEChERS, GC-ECD.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Chemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN HONEY BY MODIFIED QuEChERS METHOD AND GC-ECD

Author: Débora Orso
Advisor: Prof. Dr. Renato Zanella
Santa Maria, 3rd August, 2011

The production of honey has been increasing continuously in the world in function of the greatest consume of natural products. It is related directly to human health, and stimulated by its therapeutics and nutritious qualities. Due to this, it is necessary the verification of the features related to honey quality as: physical-chemical characteristics and identification of the floral and geographic origin of this product. For such intention emerges the importance of the residues analysis and monitoring to ensure its supply.

In this study was developed and validated a method for the determination of 23 pesticide residues in honey using modified QuEChERS method and Gas Chromatography with Electron Capture Detection (GC-ECD). The fortification of honey samples was preformed, with a solution containing the 23 pesticides, in 3 levels of concentration (10.0; 20.0 and 50.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 6 extractions of each level was realized, and the modified QuEChERS method was applied. This extraction method consisted to weight 2.5 g of honey and the addition of 5 mL of a Na_2EDTA solution 0.1 mol L^{-1} and 5 mL of acetonitrile followed by vortex shaking, for 3 min. Partition consisted of the addition of 6.0 g of anhydrous magnesium sulfate and 1.5 g of sodium chloride shaken for 1 min, followed by centrifugation for 8 min. The purification of the extract was realized through a dispersive clean up step in which 2 mL of the extract was transferred to another tube, previously added 120 mg anhydrous magnesium sulfate and 100 mg of primary secondary amine (PSA) followed by vortex shaking and centrifugation. Finally the extracts were analyzed by GC-ECD.

The linearity of the analytical curves (6 levels of concentration and 6 injections of each level), detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), matrix effects, accuracy and precision of the analytical method were evaluated. In general the linear range of the analytical curves prepared in acetonitrile and matrix matched were between 5.0 or 10.0 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ with values of $r^2 > 0.99$. The GC-ECD technique enables the quantification of 95.6% of the compounds and method LOQ of 3.0 or 6.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Therefore, the method proved appropriated for pesticide multiresidue determination in honey, as well, effective purification technique for honey extracts combining good sensitivity and selectivity. All the parameters evaluated are in agreement to limits suggested for chromatographic methods validation.

Keywords: honey, pesticides, QuEChERS method, GC-ECD

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das abelhas rainha e operária e zangão.....	4
Figura 2 - Diferentes modos de contaminação de abelhas pela aplicação direta de agrotóxicos em colméias para o tratamento de doenças de abelhas e conseqüente contaminação do mel e pela contaminação indireta, através da aplicação em lavouras, contaminando o ambiente e posteriormente as abelhas.....	31
Figura 3 - Sistema GC-ECD utilizado para análises.	48
Figura 4 - Representação esquemática do método de determinação de resíduos de agrotóxicos em mel.	56
Figura 5 - Algumas etapas e materiais utilizados durante o procedimento de extração e <i>clean-up</i> do método QuEChERS modificado: a) tubo para extração com amostra de mel; b) tubo contendo a amostra e a solução de Na ₂ EDTA 0,1 mol L ⁻¹ em banho maria para aquecimento a 45 °C; c) extrato após adição de Na ₂ EDTA 0,1 mol L ⁻¹ e MeCN; d) agitação de frasco após adição das soluções; e) adição dos sais MgSO ₄ e NaCl para a etapa de partição; f) extrato após etapa de centrifugação; g) extrato centrifugado para posterior etapa de <i>clean-up</i> ; h) extrato de <i>clean-up</i> após centrifugação.	57
Figura 6 - Representação esquemática do método otimizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em mel, utilizando o método QuEChERS modificado.....	62
Figura 7 - Cromatograma obtido para uma solução analítica na matriz (mel) contendo 50 µg L ⁻¹ dos agrotóxicos em estudo.....	68
Figura 8 - Cromatograma obtido para amostra “branco” de mel.	69
Figura 9 - Cromatograma obtido para solventes e reagentes utilizados durante procedimento de extração de mel.	70
Figura 10 - Percentuais de recuperação para a repetitividade dos agrotóxicos analisados, nos três níveis de fortificação (10,0; 20 e 50 µg kg ⁻¹).....	76
Figura 11 - Percentuais de RSD para a repetitividade dos agrotóxicos analisados, nos três níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 50,0 µg kg ⁻¹)..	76
Figura 12 - Percentuais de recuperação para a precisão intermediária dos agrotóxicos analisados, nos três níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 50,0 µg kg ⁻¹).....	78

Figura 13 - Percentuais de RSD para a precisão intermediária dos agrotóxicos analisados, nos três níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).....	78
Figura 14 - Cromatograma total dos agrotóxicos obtidos por GC-ECD para a solução analítica 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.....	79
Figura 15 - Cromatograma total dos agrotóxicos obtidos por GC-ECD para a solução analítica fortificada a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.....	80
Figura 16 - Percentual de efeito matriz para os agrotóxicos avaliados neste estudo.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos componentes presentes na composição básica do mel, de acordo a faixa da composição média, da variação e do desvio padrão que estes podem apresentar. Fonte: CRANE, 1975; VILHENA & ALMEIDA-MURADIAN, 1999. 10

Tabela 2 - Níveis máximos permitidos para componentes presentes no mel, de acordo com a legislação brasileira. Fonte: BRASIL, 2000.....12

Tabela 3 - Quantidade estabelecida (em $\mu\text{g g}^{-1}$) para cada um dos minerais presentes em amostras de méis. Fonte: KUJAWSKI & NAMIESNIK, 2008.....12

Tabela 4 - Relação das exportações de mel brasileiro entre os anos de 2009, 2010 e primeiro trimestre de 2011. 17

Tabela 5 - Relação da exportação de mel por país, entre os anos de 2009, 2010 e primeiro trimestre de 2011. Fonte: SEBRAE/UAGRO, 2011. 18

Tabela 6 - Relação das exportações de mel por estado brasileiro, entre os meses de 2010 e primeiro trimestre de 2011. Fonte: SEBRAE/UAGRO, 2011..... 19

Tabela 7 - Relação entre o número de intoxicações por manipulações indevidas de agrotóxicos em diferentes regiões brasileiras. Fonte: MS/SINITOX, 2010.....23

Tabela 8 - Classificação quanto à classe toxicológica dos agrotóxicos. Fonte: ANVISA, 2005. 26

Tabela 9 - Relação dos agentes causadores de intoxicações, seus respectivos casos de curas, cura não confirmadas, seqüelas e óbitos. Fonte: MS / FIOCRUZ / SINITOX, 2010. 27

Tabela 10 - Relação dos LMR's para mel, de acordo com a União Européia (EU), legislação brasileira e *Codex Alimentarius*, na ordem de mg kg^{-1} para cada composto estudado. Fonte: PNCRC, 2010; *CODEX ALIMENTARIUS*, 2007; UE, 2007.29

Tabela 11 - Relação de todos os agrotóxicos analisados por GC-ECD, com informações de pureza, classe, grupo químico e fórmula molecular. 49

Tabela 12 - Relação dos diferentes ensaios realizados para os agrotóxicos analisados neste trabalho para escolha do melhor método de análise. 51

Tabela 13 - Agrotóxicos analisados com seus respectivos t_R 61

Tabela 14 - Recuperações médias (%) obtidas nos ensaios de extração.....63

Tabela 15 - Constantes de formação de alguns complexos metal – EDTA	65
Tabela 16 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos em acetonitrila, empregando QuEChERS modificado e GC-ECD	71
Tabela 17 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos no extrato da matriz, empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS	72
Tabela 18 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método.....	74
Tabela 19 - Valores de recuperação e RSD (%) para avaliar a repetitividade do método utilizado, aos três níveis de fortificação estudados (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).	75
Tabela 20 - Percentuais de recuperação e RSD% obtidos para a precisão intermediária do método, a partir da extração com acetonitrila, do mel fortificado aos níveis de 10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com os agrotóxicos analisados por GC-ECD.....	77
Tabela 21 - Efeito matriz (%) dos agrotóxicos analisados por GC-ECD, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APACAME – Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíficas Europeias
- BA – Bahia
- CBA – Confederação Brasileira de Apicultores
- cc β – capacidade de detecção
- CE – Ceará
- d.i. – diâmetro interno
- DLLME – Microextração Dispersiva Líquido-Líquido, do inglês *Dispersive Liquid – Liquid Microextraction*
- d-SPE/DSPE – Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPI – Equipamento de Proteção Individual
- EU – União Europeia, do inglês *European Union*
- EUA – Estados Unidos
- FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- GAP – Boas Práticas Agrícolas, do inglês *Good Agricultural Practice*
- GARP – Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
- GC-ECD – Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography with Electron Capture Detector*
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*
- GC-NPD – Cromatografia Gasosa com Detecção Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection*
- HCB – hexaclorobenzeno
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICH – Conferência Internacional sobre Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*
- IDA – Ingestão Diária Aceitável
- IICA – Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura
- INMETRO – Instituto Nacional Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- ISO – Organização Internacional para Padronização ou Organização Internacional de Normalização, do inglês, *International Organization for Standardization*
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- k_f – constante de formação
- LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*
- LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- LMR – Limite Máximo de Resíduo
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LODi – Limite de Detecção do instrumento, do inglês *Limit of Detection instrument*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- LOQm – Limite de Quantificação do método, do inglês *Limit of Quantification method*
- MAE – Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
- MDS – Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome
- MeCN – acetonitrila
- MERCOSUL – Mercado Comum do Sul
- MG – Minas Gerais
- MMA – Ministério do Meio Ambiente
- MS – Ministério da Saúde
- MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*
- MT – Mato Grosso
- Na₂EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético Dissódico
- OCPs – agrotóxicos organoclorados
- OPPs – agrotóxicos organofosforados
- P.A. – Grau Pró-Análise, do inglês *Pro Analyse*

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

P.I. – Padrão Interno

PBDEs – Difenil Éteres Polibromados

PCBs – Bifenilas Policloradas

PDMS – polidimetilsiloxano, do inglês *polydimethylsiloxane*

PI – Piauí

PLE – Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*

PNCRC – Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes

PSA – Amina primária secundária, do inglês *Primary Secondary Amine*

PTV – Vaporização com temperatura programada, do inglês *Programmed Temperature Vaporisation*

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

r – coeficiente de correlação

r^2 – coeficiente de determinação

RJ – Rio de Janeiro

RN – Rio Grande do Norte

rpm – rotações por minuto

RSD – Desvio Padrão Relativo do inglês *Relative Standard Deviation*

RSD% - Desvio Padrão percentual, do inglês *percentage Standard Deviation*

RSDpi – Desvio Padrão Relativo para precisão intermediária, do inglês *Relative Standard Deviation for Intermediate Precision*

RSDr – Desvio Padrão Relativo para repetitividade, do inglês *Relative Standard Deviation for repeatability*

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

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SPA – Secretaria de Política Agrícola

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

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

t_R – tempo de retenção

UAGRO – Unidade de Atendimento Coletivo Agronegócio

UF – Unidade de Federação

VIM – Vocabulário Internacional de Medidas

LISTA DE ANEXO

Anexo 1 – Fórmulas estruturais dos agrotóxicos presentes neste trabalho.....	97
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Abelhas	3
2.1.1 Origem.....	3
2.1.2 Histórico	4
2.1.3 Importância Econômica.....	5
2.2 Mel	6
2.2.1 Origem e importância	6
2.2.2 Histórico	7
2.2.3 Importância Econômica.....	8
2.2.4 Importância nutricional e composição.....	9
2.2.5 Produção de mel no Brasil e no mundo.....	13
2.2.6 Produção de mel no Rio Grande do Sul	15
2.2.7 Oferta e demanda nacional e mundial	16
2.2.8 Produtos derivados do mel	20
2.3 Agrotóxicos.....	21
2.3.1 Definição	21
2.3.2 Histórico no Brasil e no mundo.....	22
2.3.3 Classificação.....	24
2.3.4 Toxicidade	25
2.3.5 Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para agrotóxicos.....	28
2.3.6 Ocorrência de agrotóxicos no mel.....	30
2.4 Análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos	32
2.4.1 Métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos.....	33
2.4.2 Métodos multirresíduos para determinação de agrotóxicos em alimentos.....	36
2.4.2.1 Análise de resíduos de agrotóxicos em mel por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD)	39
2.4.3 Efeito Matriz em GC	40
2.5 Validação de métodos analíticos.....	41
2.5.1 Linearidade e curva analítica.....	42
2.5.2 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	44

2.5.3 Detectabilidade	44
2.5.4 Precisão.....	44
2.5.5 Exatidão	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Instrumentação	47
3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados	48
3.3 Padrões analíticos dos agrotóxicos analisados	49
3.4 Otimização do sistema cromatográfico GC-ECD para determinação dos agrotóxicos	50
3.5 Otimização do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em mel	50
3.5.1 Otimização da etapa de <i>clean-up</i> dispersivo.....	52
3.5.2 Escolha da amostra para etapa de validação.....	52
3.6 Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em mel empregando GC-ECD	53
3.6.1 Curva analítica e linearidade	53
3.6.2 Limite de Detecção (LOD) e limite de Quantificação (LOQ).....	53
3.6.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método	54
3.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária).....	58
3.7 Avaliação do efeito matriz na resposta cromatográfica.....	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
4.1 Otimização do sistema cromatográfico GC-ECD para determinação dos compostos	60
4.2 Otimização do método de extração QuEChERS modificado	63
4.2.1 Avaliação dos ensaios de extração	63
4.2.2 Otimização da etapa de <i>clean-up</i> dispersivo	66
4.2.3 Validação do método QuEChERS modificado	69
4.2.4 Seleção do padrão interno.....	70
4.2.5 Análise dos solventes e reagentes pelo método QuEChERS modificado	70
4.2.6 Curva analítica e linearidade	71
4.2.7 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método.....	73
4.2.8 Ensaio de fortificação para avaliação da recuperação do método QuEChERS	74
4.2.9 Efeito matriz do extrato de mel nas análises por GC-ECD	81

5 CONCLUSÕES	84
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXO.....	97

1 INTRODUÇÃO

Dentre os produtos naturais, o mel é um alimento apreciado por seu sabor característico e considerável valor nutritivo, sendo por isso cada vez mais consumido. O mel está se consolidando como um dos produtos nacionais recordistas na pauta de exportações, sendo um dos produtos mais valorizados no mercado externo. Com base em dados divulgados pelo Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior (MDIC), as vendas de mel para o exterior totalizaram US\$ 3,5 milhões no primeiro trimestre de 2011, outro recorde foi referente ao volume exportado, que registrou aumento de 29%, comparado com o mesmo período do ano anterior.

O agronegócio é responsável por um terço de todas as riquezas geradas no país atualmente, representando US\$180,2 bilhões de dólares. No aspecto social, o agronegócio é responsável por 37% dos empregos e 42% das exportações, conquistou 215 mercados internacionais e é o terceiro exportador mundial. Todos esses atributos colocam o agronegócio brasileiro no epicentro das soluções viáveis para o equacionamento do maior desafio contemporâneo, que é conciliar crescimento econômico, segurança alimentar, oferta de energia e reversão das mudanças climáticas.

Para ser utilizado na agricultura, todo agrotóxico deve ser registrado para a cultura e para a praga alvo. A eficácia do agrotóxico no controle de pragas, doenças e/ou plantas daninhas, depende muito de sua aplicação. É, portanto, de fundamental importância, a utilização devidamente correta destes produtos, para assim, não causar malefícios ao homem, aos animais e até mesmo às abelhas que podem se contaminar, direta ou indiretamente, pois os resíduos de agrotóxicos estão presentes em todo o meio ambiente, incluindo a água, o solo e os alimentos, resultados de sua aplicação na agricultura moderna.

Algumas espécies de plantas podem causar o envenenamento de abelhas por meio do pólen ou néctar tóxicos, secreção dos nectários extraflorais ou seiva. Felizmente, as plantas que envenenam abelhas são aquelas que geralmente produzem pouco néctar ou pólen. Além das plantas tóxicas, o envenenamento de abelhas por agrotóxicos é outro problema mundial, devido ao fato de que as abelhas possuem grande valor como polinizadores de muitas culturas.

As abelhas, de maneira geral, são consideradas insetos de interesse econômico, principalmente por dois motivos: pela atividade apícola e pela polinização. Contudo, a

produção de mel oriunda de floradas silvestres está se tornando cada vez mais escassa no Brasil e no mundo e, conseqüentemente, mais dependente das culturas agrícolas.

O uso de agrotóxicos na agricultura, ainda quando aplicados de acordo com as Boas Práticas Agrícolas (GAP) e em concentrações que respeitem os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos, podem deixar resíduos de agrotóxicos, identificáveis e quantificáveis, comprometendo a segurança alimentar.

Desta forma, este trabalho objetivou a otimização e a validação de um método multirresíduo de extração, utilizando o método QuEChERS modificado e análise por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD), de 23 agrotóxicos em mel, de diferentes grupos químicos, tais como, organofosforados, organoclorados e piretróides. Devido a complexidade da matriz, caracterizada pela presença de elevado teor de açúcar, otimizou-se também um método de *clean-up* da amostra.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Abelhas

2.1.1 Origem

São duas as classes de abelhas existentes: as que possuem vida solitária, isto é, os indivíduos não se diferenciam em castas e não há formação de colônias, enquanto as demais apresentam algum grau de sociabilidade, chamadas de abelhas sociais. No Brasil, as abelhas de espécies sociais, constituem famílias numerosíssimas, as chamadas abelhas de mel, “*Apis melliferas*” ou “*mellificas*” (WIESE, 2005).

As *Apis melliferas* representam a espécie mais apreciada pela alta produção de mel e cera por serem bastante doces e de fácil manejo, além disso, exercem papel fundamental na polinização de culturas agrícolas e espécies nativas. Oriundas da Europa, Ásia e África, foram trazidas para a América por seus colonizadores. No Brasil, foram introduzidas pelos Padres da Companhia de Jesus, por ocasião da fundação dos Sete Povos das Missões (OSOWSKI, 2003).

As abelhas são insetos que pertencem à ordem himenóptera, tendo surgido na face da Terra há mais de 50 milhões de anos, e sempre estiveram presentes em civilizações antigas como a de gregos e egípcios (SEELEY, 2006). Estima-se que existem mais de 4 mil gêneros e cerca de 25 a 30 mil espécies de abelhas distribuídas nas diferentes regiões do mundo.

As abelhas *melliferas* são criadas em áreas em que há abundância de plantas produtoras de néctar, como a laranjeira, eucalipto, etc. Como norma, os maiores produtores de mel estabelecem suas colméias em zonas de agricultura intensiva, já que não é prático cultivar plantas para a produção de mel (MARCHINI *et al.*, 2007).

A abelha brasileira apresenta características próprias, desenvolvidas através de cruzamentos sob influência das condições físicas que o Brasil oferece dentro de suas dimensões continentais (MAETERLINCK, 2001). Várias espécies de *Apis melliferas* foram introduzidas no Brasil, dentre elas, citam-se: *Apis mellifera mellifera*, originárias do Norte da Europa e Centro-Oeste da Rússia, *Apis mellifera ligustica*, originárias da Itália, *Apis mellifera caucásica*, originárias do Cáucaso, na Rússia, *Apis mellifera carnica*, originárias dos Alpes da Áustria, nordeste da Iugoslávia e Vale Danúbio, *Apis mellifera scutellata*, originárias do nordeste da África (EMBRAPA, 2003). Juntamente, surgiram as abelhas africanizadas.



Fonte: EMBRAPA, 2003.

Figura 1 - Representação das abelhas rainha e operária e zangão.

A metamorfose das abelhas passa pelas seguintes fases: ovo, estado larval, pré-pupa, pupa, ninfa ou crisálida. Ao nascer, o inseto já é adulto, a abelha não tem infância (OSOWSKI, 2003). Os ovos que dão origem aos insetos femininos – rainha e operária – são os mesmos (Figura 1), diferem somente quanto ao tamanho, formato das células e pela alimentação.

2.1.2 Histórico

A apicultura brasileira teve início oficialmente no século XIX, quando o Imperador Pedro II autorizou pelo Decreto nº 72 de 12 de julho de 1839, o Padre Antonio José Pinto Carneiro a trazer abelhas da Europa e da costa da África (CBA, 2007).

Após o descobrimento do Brasil, jesuítas e holandeses se instalaram no interior do Rio Grande do Sul, nas terras das missões, em que teve início a primeira apicultura no Brasil, proveniente da Europa (SCHIRMER, 1986).

Frederico Augusto Hanemann, Emílio Schenk, Dom Amaro van Emelen, Pedro Van Toll Filho e Bruno Schirmer, foram um dos primeiros apicultores que chegaram ao Brasil na década de 1800 (OSOWSKI, 2003). Várias obras, tais como, “A cartilha do Apicultor”, “A cera e o mel” e a “Criação racional de abelhas” foram escritas por eles, além de contribuírem na invenção de implementos para a apicultura.

A partir de 1957, ano em que começaram os primeiros experimentos com abelhas africanas no país, a atividade apícola experimentou um importante salto de desenvolvimento e começou a se tornar a atividade principal para muitos. Inicialmente rejeitadas em função de sua agressividade, as abelhas africanizadas foram cruzadas com a espécie *mellifera*, transmitindo a estas uma série de qualidades desejáveis como a resistência às doenças e a alta capacidade de produção de mel (CBA, 2007).

2.1.3 Importância Econômica

O estudo mais aprofundado das abelhas considera o enxame como um todo e nele se estabelecem relações intrínsecas entre os indivíduos, com implicações diretas na produção de mel. As abelhas são os principais agentes polinizadores dos vegetais, conseqüentemente, os vegetais produzem substâncias adocicadas que atraem as abelhas, as quais levam em seus pêlos o pólen dessa planta florífera. O pólen, por sua vez, é importante para o desenvolvimento da colméia, pois é a fonte principal de proteína das abelhas, e garante o desenvolvimento da família (VIEIRA *et al.*, 2002).

Há dois benefícios que a apicultura trás para o homem em simbiose com o meio ambiente: primeiramente a polinização, um dos processos mais interativos existentes entre plantas e animais, sendo que a grande maioria das espécies de plantas com flores, várias compondo a dieta humana e de muitos animais domesticados, depende de polinizadores animais para se reproduzir, especialmente os insetos. O outro benefício, oriundo do incremento da apicultura é o aumento da sua importância para as espécies vegetais, contribuindo para a preservação de muitas plantas que poderiam entrar em processo de extinção (LEHMBERG *et al.*, 2008). Do mesmo modo, as abelhas podem ser utilizadas para monitoramento ambiental, pois são consideradas boas indicadoras biológicas, pois a mortalidade e a presença de resíduos ou produtos da colméia em seus corpos podem ser detectados por análises laboratoriais (BARGANSKA, SLEBIODA & NAMIESNIK, 2011).

A polinização é responsável por 35% da cultura brasileira, dentre elas, destacam-se: melão, café, maracujá, citrus, soja, algodão, caju, maçã, canola, abóbora, pimentão, morango, tomate e cebola. O único agente polinizador em larga escala atualmente é a espécie da *Apis mellifera*. Todas as colméias destinadas à polinização devem ser muito populosas, acima de 60.000 abelhas cada uma, para assim garantir uma boa frutificação nos cultivos. As abelhas são excelentes insetos polinizadores e, portanto, contribuem para a manutenção da

biodiversidade das espécies vegetais no meio ecológico onde vivem (MALASPINA & SILVA-ZACARIN, 2006).

As abelhas são responsáveis por mais de 90% da polinização das flores. Isto afeta a produção de alimentos para uma população que não para de crescer. Os cientistas acreditam que, por volta de 2035, as abelhas estarão extintas no planeta Terra caso os homens continuem com o mesmo ritmo de destruição. Os maiores polinizadores são as abelhas sendo responsáveis por aproximadamente 70% deste processo, as moscas por 15%, morcegos 7,0%, vespas 5% e borboletas, mariposas e pássaros por 3% (FAO, 2010).

2.2 Mel

2.2.1 Origem e importância

Através dos tempos, o mel sempre foi considerado um produto especial, utilizado pelo homem desde os tempos mais remotos. Evidências de seu uso pelo ser humano aparecem desde a Pré-história, com inúmeras referências em pinturas rupestres e em manuscritos e pinturas do antigo Egito, Grécia e Roma (EMBRAPA, 2003).

O néctar é a principal fonte em que se origina o mel. É secretado por um órgão específico das plantas chamado nectário, situado geralmente na base interna das flores, os nectários florais. Há casos em que estes órgãos estão situados em diversas outras partes, os nectários extras florais (APACAME, 2007).

O néctar consiste em uma solução de água e açúcares, com pequenas quantidades de outras substâncias: aminoácidos, minerais, vitaminas, ácidos orgânicos, enzimas, óleos aromáticos, etc. Esse conteúdo pode variar de 4 a 20% em função da espécie botânica e de condições climáticas. O recolhimento do néctar pela abelha pode resultar em uma carga de até 40 mg, que representa aproximadamente uma gota de líquido (CBA, 2007).

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. Uma abelha voa aproximadamente 24 km/h em uma altura que varia de 1 a 8 metros. Ao voltar da coleta, a abelha estará levando com ela néctar suficiente para alcançar a colméia. Geralmente a abelha visita entre 50 e 1000 flores em uma viagem, permanecendo fiel à espécie botânica que escolheu para trabalhar (DÖTTERL & VEREECKEN, 2010). As visitas podem demorar algum tempo e as abelhas fazem cerca de 13

a 17 viagens por dia. As abelhas recolhem o néctar e o transformam, por combinação específica das substâncias que amadurecem, em favos, para posterior desenvolvimento (SILVA *et al.*, 2009).

De acordo com a Diretiva do Conselho europeu 2001/110/EC, *European Commission, Council Directive 2001/110/EC*, o mel é considerado um fluido viscoso, aromático, natural e doce produzido pelas abelhas *Apis mellifera*, (KUJAWSKI & NAMIESNIK, 2008) a partir do néctar das flores ou das secreções de partes vivas de determinadas plantas ou excreções de insetos sugadores de plantas.

E ainda, considerando a Instrução Normativa nº 11, BRASIL (2000), o mel pode ser classificado quanto à origem botânica em mel de flores, aquele obtido principalmente dos néctares das flores; distinguindo-se em mel unifloral ou monofloral quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma família, gênero ou espécie. O mel de melato é obtido primordialmente a partir de secreções das partes vivas das plantas e das excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (CAMPOS, 2003).

2.2.2 Histórico

Pesquisas arqueológicas mostram que as abelhas sociais já produziam e estocavam mel há 20 milhões de anos, antes mesmo do surgimento do homem na Terra. Apesar de os egípcios serem considerados os pioneiros na criação de abelhas, a palavra colméia vem do grego, pois os gregos colocavam seus enxames em recipientes com forma de sino, chamados *colmo* (EMBRAPA, 2003).

Na Idade Média, em algumas regiões da Europa, as árvores eram propriedades do governo, sendo proibido derrubá-las, pois elas poderiam servir de abrigo a um enxame no futuro. Os enxames eram registrados em cartório e deixados de herança por escrito, o roubo de abelhas era considerado um crime imperdoável, podendo ocorrer punição com morte (EMBRAPA, 2003).

Nesta época, o alimento ingerido era uma mistura de mel, pólen e cera, pois o homem ainda não sabia como separar os produtos do favo. A partir deste período, inicia-se o uso de recipientes horizontais e com comprimento maior para colheita do mel. Em 1851, o Reverendo Lorenzo Lorraine Langstroth construiu a colméia de quadros móveis, permitindo o desenvolvimento da apicultura racional e o avanço tecnológico da atividade praticado até os dias de hoje (SEELEY, 2006).

O consumo do mel cresceu de forma sustentável nas últimas décadas, estimulado principalmente pelas conhecidas qualidades terapêuticas, nutricionais e funcionais e ao uso como insumo pela indústria de alimentos.

2.2.3 Importância Econômica

O mel é considerado o produto apícola mais fácil de ser explorado, sendo também o mais conhecido e aquele com maiores possibilidades de comercialização. Além de ser um alimento, é também utilizado em indústrias farmacêuticas e cosméticas pelas suas ações terapêuticas (FREITAS, KHAN & SILVA, 2005).

Em 1980, a média dos apiários brasileiros era de 20.000 kg de mel por ano. A adoção de novas tecnologias, incorporadas a partir de experimentações, colocou o Brasil em uma posição de vanguarda na apicultura brasileira, com a obtenção de médias anuais superiores a 200.000 toneladas de mel (APACAME, 2007).

As exportações de mel no período inicial do ano de 2010 obtiveram um aumento significativo de 87% em relação ao mesmo período do ano de 2009. O preço médio do mel exportado foi de US\$ 2,39/kg (CBA, 2010).

Em 2009, São Paulo manteve a liderança nas exportações de mel por estado, com US\$ 1.152.848,00, respondendo por mais de 30% do valor total das exportações. O segundo maior exportador foi o Ceará, com US\$ 832.130,00 e o terceiro foi Santa Catarina, com uma receita de exportação de mel de US\$ 606.312,00. O Rio Grande do Norte foi o quarto exportador com US\$ 367.044,00, seguido, em quinto lugar pelo Rio Grande do Sul com US\$ 350.579,00. O sexto exportador de mel foi o Paraná (US\$ 336.919,00), e o sétimo foi Piauí (US\$ 165.719,00). Minas Gerais foi responsável pelo menor valor exportado (US\$ 12.000,00), entretanto obteve o melhor preço (US\$ 3,00/kg de mel). Os Estados que obtiveram preços abaixo da média nacional de US\$ 2,39/kg foram: Rio Grande do Norte (US\$ 2,14/kg), Piauí (US\$ 2,17/kg) e Santa Catarina (US\$ 2,35/kg) (CBA, 2010).

No mesmo período do ano, Estados Unidos absorveram 46,7% do mel brasileiro exportado (US\$ 1,79 milhão) a um preço de US\$ 2,20/kg. Para o Canadá foram destinados 11,02% do nosso mel, pagando US\$ 2,22/kg. Para o mercado Europeu foram destinadas 40,3% das exportações (US\$ 1,54 milhão) a um preço acima da média. A Alemanha foi o destino de 19,64% do mel brasileiro exportado em janeiro/2009, com um total de US\$ 751.934,00, a um preço de US\$ 2,65/kg. O Reino Unido absorveu 12,6% (US\$ 482.076,00)

das exportações de mel, pagando US\$ 2,85/kg. Os outros países europeus importadores de mel do Brasil foram Dinamarca (US\$ 134.265,00 a um preço de US\$ 2,22/kg), França (US\$ 118.944,00 a US\$ 2,20/kg) e Holanda (US\$ 54.100,00 a US\$ 2,87/kg).

Com relação às exportações de cera, um dos produtos derivados do mel, conforme citados no item 2.8.8, o valor foi de US\$ 541.789,00, representou uma redução de 7,7%, em relação ao mesmo mês do ano anterior. Deste total comercializado, 93,3% foi somente com o Japão (US\$ 505.398,00). Os dois maiores exportadores foram os Estados de Minas Gerais (US\$ 309.836,00/3.522,00 kg) e São Paulo (US\$ 228.904,00/2.096, 00 kg). Em relação a janeiro de 2008, Minas Gerais ampliou o valor das exportações em 95,4% e São Paulo obteve uma redução de 46,6% em valor (SEBRAE, 2009).

Da mesma forma, as exportações de própolis no ano de 2009 alcançaram US\$ 8.946.000,00, no valor de US\$ 85,20/kg. Apenas dois estados realizaram exportações, sendo Minas Gerais e São Paulo os principais exportadores (SEBRAE, 2009).

2.2.4 Importância nutricional e composição

Quimicamente classificado, o mel pode ser considerado uma solução aquosa de açúcar altamente concentrada e higroscópica (KUJAWSKI & NAMIESNIK, 2008). É considerado um dos alimentos mais puros da natureza, basicamente uma mistura de açúcares, proteínas, compostos fenólicos, aminoácidos livres, ácidos orgânicos, vitaminas e minerais, os quais são encontrados em menores quantidades (SILVA *et al.*, 2009).

Possui aproximadamente 200 substâncias, tendo por isso, ocupado importante papel na alimentação, visto que possui alto poder nutritivo e terapêutico (ORHAN *et al.*, 2003). É mais facilmente digerido que a própria sacarose, contudo, ele não pode ser considerado um alimento completo pelos padrões nutricionais para seres humanos. Da mesma forma, podem ser utilizados no tratamento de queimaduras, distúrbios gastrointestinais, asma, tratamento de pele e feridas (AL-MAMARY; AL-MEERI & AL-HABORI, 2002).

Sua composição química, de acordo com a Tabela 1, foi objeto de revisões bibliográficas, citadas por VILHENA & ALMEIDA-MURADIAN (1999), que sugeriram ser a composição do mel dependente de muitos fatores, tais como: espécies de plantas visitadas, espécies das abelhas, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel, condições meteorológicas e ambientais etc.

Tabela 1 - Relação dos componentes presentes na composição básica do mel, de acordo a faixa da composição média, da variação e do desvio padrão que estes podem apresentar.

Composição básica do mel			
Componentes	Média	Variação	Desvio padrão
Água (%)	17,20	13,40 – 22,90	1,46
Frutose (%)	38,19	27,25 – 44,26	2,07
Glicose (%)	31,28	22,03 – 40,75	3,03
Sacarose (%)	1,31	0,25 – 7,57	0,95
Maltose (%)	7,31	2,74 – 15,98	2,09
Açúcares totais (%)	1,50	0,13 – 8,49	1,03
Outros	3,10	0,00 – 13,20	1,97
pH	3,91	3,42 – 6,10	-
Acidez livre (mEq/kg)	22,30	6,75 – 47,19	8,22
Lactose (mEq/kg)	7,11	0,00 – 18,76	3,52
Acidez total (mEq/kg)	29,12	8,68 – 59,49	10,33
Lactose/Acidez livre	0,33	0,00 – 0,95	0,13
Cinzas	0,16	0,02 – 1,02	0,15
Nitrogênio	0,04	0,00 – 0,13	0,02
Diastase	20,80	2,10 – 61,20	9,76

Fonte: CRANE, 1975; VILHENA & ALMEIDA-MURADIAN, 1999.

De acordo com a Tabela 1, o mel contém açúcares simples ou monossacarídeos, dos quais a glicose e a frutose representam em torno de 65 a 70% da sua composição, e o conteúdo de água (umidade) pode variar de 15 a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% (CRANE, 1975).

O principal grupo químico de açúcares presentes compreende os monossacarídeos e oligossacarídeos, totalizando em torno de 78% da composição de méis. A frutose e a glicose representam em média, respectivamente, 38 e 30% desta composição.

O pH do mel é ácido (na faixa de 3,42 – 6,10) e esta acidez é baixa o suficiente para inibir o crescimento da maioria dos microorganismos, e nestas condições poucos agrotóxicos são naturalmente degradados (RIAL-OTERO *et al.*, 2007).

De acordo com o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel, ele é caracterizado quanto à cor, que varia desde incolor a pardo-escuro, quanto ao sabor e ao

aroma, os quais são definidos de acordo com a sua origem, em floral, multifloral ou melato e quanto à consistência, variável de acordo com o estado físico que se encontra em que o mel se apresenta (MAPA, 2010b).

Um composto característico formado durante a decomposição de monossacarídeos (principalmente a frutose) é o 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF), aldeído cíclico e, por isso sua medida é utilizada para avaliar a qualidade do mel. O alto teor de HMF (> 60 mg/kg) é indicador de condições de armazenamento inapropriadas (KUJAWSKI & NAMIESNIK, 2008).

Os métodos físico-químicos, citados na legislação brasileira, Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, apresentam alguns níveis máximos permitidos para amostras de mel, como citados na Tabela 2 (MURADIAN *et al.*, 2005).

A acidez do mel tem sua origem na variação dos ácidos orgânicos, devido às diferentes fontes de néctares (origem floral), pela ação da enzima glicose-oxidase, que origina o ácido glucônico, pela ação das bactérias durante a maturação do mel e pelas quantidades de minerais presentes no mel (VIDAL, 1984).

O teor de umidade é de suma importância, pois pode acondicionar o seu tempo de vida a esse fator. O mel que possuir alto teor de umidade ($> 20\%$) passará pelo processo de fermentação (BRASIL, 2000). A determinação é feita pelo método refratométrico de Chataway, que é um método indireto, recomendado pela *Association of Official Analytical Chemistry* (VILHENA & ALMEIDA–MURADIAN, 1999).

Tabela 2 - Níveis máximos permitidos para componentes presentes no mel, de acordo com a legislação brasileira.

Parâmetros	Legislação brasileira
Acidez livre (mEq kg ⁻¹)	Máximo 50
Hidroximetilfurfural (HMF) (mg kg ⁻¹)	Máximo 60
Umidade (%)	Máximo 20
Açúcares redutores (g/100 g)	Máximo 65
Sólidos insolúveis (g/100 g)	Máximo 0,1
Sacarose aparente (g/100 g)	Máximo 6,0
Cinzas (g/100 g)	Máximo 0,6

Fonte: BRASIL, 2000.

O conteúdo de sais minerais, demonstrados na Tabela 3, é de 0,3% em média, podendo ocorrer variações dependendo do tipo de mel. Estão presentes: o alumínio (Al), fósforo (P), magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), lítio (Li), sódio (Na), dentre outros (OZCAN; ARSLAN & CEYLAN, 2006).

Tabela 3 – Quantidade estabelecida (em µg g⁻¹) para cada um dos minerais presentes em amostras de méis.

Minerais	Mel natural (µg g⁻¹)
Alumínio (Al)	13,70 ± 5,47
Boro (B)	30,50 ± 12,20
Cálcio (Ca)	532,0 ± 228,0
Cromo (Cr)	3,12 ± 1,56
Ferro (Fe)	80,30 ± 34,70
Lítio (Li)	3,70 ± 1,42
Magnésio (Mg)	212,0 ± 80,60
Manganês (Mn)	0,848 ± 0,227
Sódio (Na)	354,0 ± 97,4
Níquel (Ni)	1,93 ± 0,529
Fósforo (P)	436,0 ± 53,20
Chumbo (Pb)	0,451 ± 0,110
Selênio (Se)	0,957 ± 0,320
Estrôncio (Sr)	1,68 ± 0,734
Zinco (Zn)	2,94 ± 0,918

Fonte: KUJAWSKI & NAMIESNIK, 2008

O mel contém ainda cerca de 1% de misturas, como grãos de pólen, podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração e substâncias naturais, como as cinzas; ácidos orgânicos, responsáveis pelo gosto do mel, presentes na faixa de 0,05 a 1,2%; proteínas, principalmente albumina e globulina e uma faixa entre 0,03 e 0,5% de aminoácidos (KUJAWSKI & NAMIESNIK, 2008).

O mel de melato se refere às excreções, em forma de líquidos açucarados, de um grande número de espécies de homópteros que vivem como parasitas sugadores da seiva elaborada do floema das plantas. Este tipo de mel difere do mel floral em vários aspectos: por exemplo, o mel de melato possui menor teor de glicose, razão pela qual usualmente não cristaliza, este tipo de mel apresenta também menor teor de frutose, maior teor de oligossacarídeos e de cinzas, maior pH e maior teor de nitrogênio. Estabeleceu-se, após verificação de alguns parâmetros, uma equação matemática, chamada de equação de Kirkwood, a qual utiliza os resultados de pH, cinzas na matéria seca, e açúcares redutores, obtendo uma função, baseada em parâmetros dos dois tipos de mel, e foi adotado o valor limite de 73,1 como sendo o valor limite para o mel ser classificado como mel floral, abaixo deste valor, o mel é classificado como mel de melato (CAMPOS *et al.*, 2003).

Os méis devem ser embalados adequadamente, conforme as condições previstas de armazenamento e devem conferir uma proteção adequada contra contaminação. O mel em favos e o mel com pedaços de favos só devem ser acondicionados em embalagens destinadas para sua venda direta ao público (MAPA, 2010b).

O mel é uma matriz muito complexa, havendo, durante a sua elaboração, interferência de variáveis não controladas pelo homem, como clima, floração, presença de insetos sugadores e outros fatores. As abelhas, por sua vez, irão utilizar os recursos disponíveis como fonte de açúcar para elaborá-lo. Portanto, o mais comum é a ocorrência de mel floral misturado com mel de melato (MAPA, 2010a; CAMPOS *et al.*, 2003).

2.2.5 Produção de mel no Brasil e no mundo

A produção mundial de mel teve uma tendência crescente nos últimos 20 anos, em regiões e países industrializados e não-industrializados, atribuídas a um aumento no número de colméias e da produção por colônia. O consumo também aumentou durante os últimos anos, sendo atribuído ao aumento geral nos padrões de vida, e também a um interesse maior em produtos naturais e saudáveis (MDS, 2011).

A atividade apícola se adapta relativamente bem aos diversos ambientes do País, até mesmo o semi-árido, no qual as restrições para a agricultura são mais fortes. A apicultura sobrevive bem nesse meio, e consegue obter excelente produtividade em razão do clima, visto que as abelhas buscam o aquecimento e, dessa forma saem mais cedo das colméias, produzindo por um período maior de tempo (STEFANELLO *et al.*, 2006).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção brasileira de mel natural, presente em todo o território nacional, cresceu 70% entre 1999 e 2005, estimuladas, principalmente pela atratividade do mercado externo. Entre 2005 e 2007, a produção nacional de mel cresceu 7,2% e dados mais recentes mostram que a produção de mel brasileiro, no ano de 2010, foi superior a produção do ano de 2009, com alta de aproximadamente 30% na produção (IBGE, 2010).

No Brasil, há aproximadamente 1.600.000 colméias habitadas pelas abelhas africanizadas, 300.000 apicultores, os quais geram 1.000.000 de empregos diretos e indiretos no setor industrial em aproximadamente 350 mil propriedades que produzem mel no Brasil (STEFANELLO *et al.*, 2006), dados atuais revelam que 50 mil toneladas de mel/ano são produzidas no Brasil e metade desta produção é comercializada ao mercado internacional (AGROFT, 2011). Na década de 1950, o Brasil era o 28º maior produtor mundial, com produção estimada em 5 mil toneladas de mel/ano, e em 1996, já ocupava a posição de 5º maior produtor, com produção estimada em 40 mil toneladas mel/ano, se mantendo até o ano atual, como 5º líder em produção e exportação de mel (EMBRAPA, 2008 & AGROFT, 2011). As exportações brasileiras de mel triplicaram, e o mercado atual dos produtos apícolas no país é de US\$ 360 milhões (RISSATO, 2006).

O consumo interno anual de mel é de 120 g por habitante (CBA, 2010). Há uma projeção de que este consumo interno aumente, para que em 2015, a produção anual alcance patamares de 100.000 toneladas de mel produzidos e 50.000 toneladas exportados.

Desde o início de 2002, decisões dos Estados Unidos (EUA) e da Comunidade Européia suspenderam a importação de mel da China, devido aos altos índices de resíduos de medicamentos veterinários encontrados no mel, oriundos daquele país. Concomitantemente, os EUA suspenderam também a importação de mel da Argentina, alegando distorções no preço do produto, o qual estava promovendo uma concorrência desleal com os próprios produtores americanos. Esses dois fatos contribuíram para colocar o Brasil, pela primeira vez, na rota do mercado mundial.

O mundo produz 1.200.000 toneladas de mel por ano. A Argentina produz cerca de 60.000 toneladas/ano, consome 10.000 toneladas/ano e possui uma área de apenas 2.776.700

km². A Alemanha importa 50% do mel exportado no mundo e produz somente 33.000 toneladas/ano. No Japão, 60% do mel consumido se destinam às indústrias e 40% constitui mel de mesa, por isso, tem se transformado em um dos maiores importadores de mel, principalmente devido à redução do número de apicultores, em decorrência da competição dos preços de importação e da diminuição de áreas de espécies de *Apis melliferas*. No total, cerca de 300.000 toneladas de mel são comercializadas internacionalmente em cada ano. A União Européia, os Estados Unidos e o Japão dependem muito do mel importado para atender à demanda dos seus consumidores, e juntos respondem por 70% do total das importações (FAO, 2010).

Devido a esses padrões existentes relacionando as importações e exportações de mel entre países produtores e consumidores, há uma grande necessidade de análises internacionais para evitar que o produto tenha sido contaminado por agrotóxicos ou inseticidas ou até chegar ao mercado.

2.2.6 Produção de mel no Rio Grande do Sul

Atualmente, estima-se que exista no mundo mais de 20 mil espécies de abelhas. A maioria destas é solitária, os indivíduos não se diferenciam em castas e não há formação de colônias, enquanto as demais apresentam algum grau de sociabilidade. No Brasil, as espécies sociais com colônias perenes, restringem-se às abelhas (*Apis mellifera*), introduzidas pelos colonizadores e pelas abelhas sem ferrão, as quais pertencem ao grupo *meliponini*. Até o momento, são conhecidas aproximadamente 400 espécies de *meliponíneos* no mundo, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo 22 destas registradas no Rio Grande do Sul (WITTMANN & HOFFMANN, 1990; SANTOS, 1999), dentre as quais se destacam pela sua produção de mel, pólen e enxames. O estado do RS possui 20 espécies nativas de abelhas sem ferrão (15º SEMINÁRIO ESTADUAL DE APICULTURA, 2010).

Os estados da região Sul são os maiores produtores de mel, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina são respectivamente, os 1º, 3º e 4º maiores produtores brasileiros, em termos de volume produzido (MAPA, 2010a; SPA & IICA, 2009).

A produção no RS, que registrou uma taxa de crescimento média anual de 5,02% ao longo do período de 2000 a 2005, está espalhada em todo o estado, com destaque para as regiões Noroeste e Sudoeste Rio-grandense. Os principais municípios produtores são: Santana do Livramento (362 mil kg); Cambará do Sul (251,3 mil kg) e Santiago (237,5 mil kg) (MAPA, 2010a; SPA & IICA, 2009).

2.2.7 Oferta e demanda nacional e mundial

No primeiro trimestre de 2011, as exportações do mel nacional atingiram aproximadamente US\$ 13 milhões com quantidade de mel produzida maior que 5.000, 000 kg, um aumento de 30,8% em valor e de 13,7% em volume produzido na comparação com o mesmo período de 2010 (SEBRAE, 2011). A Tabela 4 apresenta a relação entre o montante exportado de mel (em US\$), nos períodos de 2009 a 2011

A liderança das exportações pertence ao estado de São Paulo, responsável pela receita de US\$ 1,29 milhão. O segundo estado é o Rio Grande do Sul, com receita de US\$ 984 mil, seguido pelo Paraná (US\$ 865 mil), Ceará (US\$ 620 mil), Piauí (US\$ 418 mil), Santa Catarina (US\$ 329 mil), Rio Grande do Norte (US\$ 108 mil) e Minas Gerais (US\$ 68 mil) (UAGRO & MDIC, 2011).

EUA é o principal destino do mel brasileiro, respondendo por 43,1% da receita das exportações e pagando o preço de US\$ 2,20/kg. A Alemanha - segundo mercado - foi o destino de 27,1% do mel brasileiro, com o melhor preço (US\$ 2,65/kg), juntamente com o Reino Unido, os quais absorveram 49,0% das exportações de mel. Outros países importadores de mel do Brasil foram Espanha, Canadá, França, Bolívia e Japão (CBA, 2007).

A Tabela 5 ilustra as exportações de mel brasileiro em 2009, 2010 e no primeiro trimestre de 2011 comercializado ao exterior. Da mesma forma, estão demonstradas informações sobre a receita obtida pela exportação e a quantidade exportada a cada país.

Tabela 4 – Relação das exportações de mel brasileiro entre os anos de 2009, 2010 e primeiro trimestre de 2011.

EXPORTAÇÃO BRASILEIRA DE MEL 2009 A 2011									
Ano	2009			2010			2011		
Meses	US\$	Produção (kg)	Preço (US\$/kg)	US\$	Produção (kg)	Preço (US\$/kg)	US\$	Produção (kg)	Preço (US\$/kg)
Janeiro	3.829.156	1.602.698	2,39	2.943.680	1.029.710	2,86	3.849,18	1.171.189	3,29
Fevereiro	6.446.772	2.796.509	2,31	3.532.933	1.256.137	2,81	5.327.084	1.624.435	3,28
Março	7.216.601	3.003.481	2,4	6.923.622	2.415.650	2,87	8.634.671	2.614.158	3,30
Abril	8.235.733	3.183.750	2,59	6.063.074	2.109.136	2,87	-	-	-
Mai	7.973.821	3.076.027	2,59	4.124.983	1.432.599	2,88	-	-	-
Junho	5.136.618	2.069.460	2,48	5.543.022	1.902.067	2,91	-	-	-
Julho	5.061.583	1.992.339	2,54	5.773.387	2.004.252	2,88	-	-	-
Agosto	3.747.484	1.476.495	2,54	4.884.589	1.689.093	2,89	-	-	-
Setembro	5.030.419	1.955.148	2,57	2.439.715	813.909	3,00	-	-	-
Outubro	4.482.025	1.714.374	2,63	3.714.010	1.215.680	3,06	-	-	-
Novembro	3.715.036	1.350.294	2,75	3.584.891	1.113.179	3,22	-	-	-
Dezembro	4.916.168	1.776.618	2,77	5.527.771	1.650.737	3,35	-	-	-
Total	65.791.416	25.987.193	2,53	55.055.677	18.632.149	2,95	13.965.604,18	5.409.782	9,87

Fonte: SEBRAE/UAGRO, 2011.

Tabela 5 – Relação da exportação de mel por país, entre os anos de 2009, 2010 e primeiro trimestre de 2011.

EXPORTAÇÃO BRASILEIRA DE MEL POR PAÍS - JANEIRO A DEZEMBRO DE 2009 A 2011								
Países	2009		2010		2011 (até março)		2011/2010 (%)	
	US\$	Produção (kg)	US\$	Produção (kg)	US\$	Produção (kg)	US\$	kg
Alemanha	13.605.249	4.843.097	12.664.090	4.239.832	3.664.631	1.084.621	-71,06	-74,42
Angola	11.998	1.647	12.561	1.029	37.689	2.560	200,05	148,79
Antilhas Hol	2.350	270	-	-	-	-	-	-
Argentina	-	-	1.740	200	-	-	-	-
Aústria	217.728	80.640	1.437.431	504.000	136.685	40.320	-90,49	-92
Bélgica	452.951	172.625	245.040	81.360	343.492	104.480	40,18	28,42
Bolívia	905	71	-	-	741	96	-	-
Cabo Verde	325	355	101	79	-	-	-	-
Canadá	2.814.714	1.090.689	2.003.759	611.372	498.271	139.060	-75,13	-77,25
Chile	95	10	-	-	-	-	-	-
China	11.686	1.740	80.132	12.417	25.460	3.249	-68,23	-73,83
Coréia do Sul	35.226	13.530	6.000	3.000	-	-	-	-
Dinamarca	180.633	80.640	-	-	-	-	-	-
Em. Árabes Unidos	14.646	2.536	3.546	567	-	-	-	-
Espanha	-	-	644.569	207.220	271.806	82.590	-57,83	-60,14
EUA	41.134.716	16.975.618	30.121.720	10.336.823	10.553.586	3.236.038	-64,96	-68,69
França	360.864	141.120	843.891	283.680	397.547	124.065	-52,89	-56,27
Israel	-	-	247.968	60.480	-	-	-	-96,88
Japão	125.257	30.101	57.774	7.138	5.250	37	-90,91	-99,48
Luxemburgo	-	-	108.864	40.320	-	-	-	-
México	5.074	505	2.500	500	-	-	-	-
Países Baixos	467.424	186.760	127.832	41.236	-	-	-	-
Panamá	59.508	22.040	-	-	68.243	21.460	-	-
Paraguai	-	-	350	167	-	-	-	-
Peru	180	20	789	75	-	-	-	-
Reino Unido	6.049.106	2.259.813	6.299.756	2.157.269	1.806.592	571.143	-71,32	-73,52
Suíça	223.841	80.430	132.348	41.167	-	-	-	-
Uruguai	922	198	-	-	-	-	-	-
TOTAL	65.791.416	25.987.193	55.055.677	18.632.149	17.810.933	5.409.719	402,59	595,27

Fonte: SEBRAE/UAGRO, 2011.

A Tabela 6 é uma representação das exportações de mel nos anos de 2010 e 2011, a qual inclui os maiores estados exportadores de mel entre estes anos. São Paulo (SP) manteve a liderança, seguido pelo estado do Rio Grande do Sul (RS) (UAGRO & SEBRAE, 2011). Oito empresas exportaram mel para a União Européia, sendo duas de Santa Catarina, duas de São Paulo, duas do Ceará, uma do Paraná e uma do Rio Grande do Sul. Entretanto, apenas cinco empresas, uma do Estado de Santa Catarina, duas de São Paulo, uma do Ceará e uma do Paraná, responderam por 88% do valor total exportado (CBA, 2010).

Tabela 6 – Relação das exportações de mel por estado brasileiro, entre os meses de 2010 e primeiro trimestre de 2011.

EXPORTAÇÃO DE MEL POR MÊS DE JANEIRO A MARÇO 2010 E 2011								
UF	2010			2011			2011/2010	
	US\$	Produção (kg)	US\$/kg	US\$	Produção (kg)	US\$/kg	US\$ (%)	kg (%)
BA	-	-	-	237.153	71.535	3,32	-	-
CE	2.277.854	761.520	2,99	1.805.441	521.481	3,46	- 20,74	- 31,52
MA	106.255	36.830	2,89	-	-	-	-	-
MG	102.657	37.625	2,73	177.185	57.011	3,11	72,6	51,52
MS	-	-	-	741	96	7,72	-	-
MT	-	-	-	29.640	10.545	2,81	-	-
PI	1.615.469	587.115	2,75	2.214.801	681.754	3,25	37,1	16,12
PR	820.273	273.630	3,00	1.919.853	558.760	3,44	134,05	104,2
RJ	-	-	-	10.897	110	99,06	-	-
RN	507.412	207.941	2,44	327.488	114.240	2,87	- 35,46	- 45,06
RS	3.619.763	1.268.164	2,85	4.152.373	1.326.009	3,13	14,71	4,56
SC	1.678.506	569.593	2,95	707.291	215.237	3,29	- 57,86	- 62,21
SP	2.672.046	959.079	2,79	5.054.348	1.518.684	3,33	89,16	58,35
Consumo	-	-	-	1.173.722	334.320	3,51	-	-
TOTAL	13.400.235	4.701.497	2,85	17.810.933	5.409.782	3,29	32,92	15,07

Fonte: SEBRAE/UAGRO, 2011.

2.2.8 Produtos derivados do mel

A geléia real é uma substância cremosa, segregada pelas glândulas cerebrais das abelhas. Uma colméia produz, normalmente, o necessário para os seus gastos, por isso é uma substância rara e de difícil obtenção (WIESE, 2005). É rica em vitaminas B₁, B₂, B₆, B₇ e B₈, ácido fólico e com alto teor de ácido pantotênico, proteínas (PAMPLONA *et al.*, 2004) e açúcares invertidos. Os sais minerais presentes são: cálcio (em CaO), fósforo (em P₂O₅), sódio (em Na₂O), sais de magnésio, enxofre, partículas radioativas, etc.

A *Apis mellifica* é o único inseto que produz e trabalha na cera, substância secretada como produto da digestão da abelha, sendo que, para cada quilo de cera, é necessário que elas ingiram seis quilos de mel. De um modo geral, a composição da cera é formada por ácido cerótico, solúvel ao álcool fervente, mericina – éter palmítico do ácido mirícico e ceroleina (CBA, 2010).

As ceras encontradas no comércio classificam-se em cera normal, a das abelhas; cera mineral, representada pelos produtos do petróleo; a parafina e a cera vegetal, entre as quais se destaca a carnaúba. No entanto, todas elas são inferiores à cera de abelha. São utilizadas em produtos para cosméticos, cremes, próteses dentárias para modelagem, produtos farmacêuticos, móveis, pisos, calçados e, dentre todas as suas aplicações, destaca-se a produção de velas (APACAME, 2007).

A cera pertence ao grupo das substâncias complexas, cuja composição não foi ainda esclarecida. Segundo informa IOIRISH (1985), em sua composição fazem parte 15 produtos químicos: 74,4 a 74,7% de éteres complexos (mirícico, cerílico e melílico) e ácidos graxos; 13,5 a 15% de ácidos livres (cerótico, melílico, ácidos da série oleínica e outros) e de 12,5 a 15,5% de hidratos de carbono saturados (pentosa, heptosa, monosa e outros).

A própolis é uma pasta, preparada pelas abelhas, de cor escura e de consistência mais ou menos dura. Provém de resina, extraída de certas árvores, as abelhas misturam com cera e a secreção de suas glândulas salivares. Sua composição química é de aproximadamente 55% de resinas e bálsamos; 10% de essências etéreas; 30% de cera e 5% de pólen (CBA, 2010).

2.3 Agrotóxicos

2.3.1 Definição

Segundo o decreto nº 4.074, o qual regulamenta a Lei nº 7802/1989 do Ministério da Agricultura e Pecuária, estabelece que agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Sendo considerados produtos afins os hormônios, reguladores de crescimento e produtos químicos e bioquímicos de uso veterinário.

O *Codex Alimentarius* conceitua agrotóxico como qualquer substância utilizada para prevenir, destruir, atacar, repelir ou controlar pragas, incluindo espécies de plantas ou animais que devam estar presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos e rações animais para o controle de ectoparasitas. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladores de crescimento para plantas, desfolhantes, desseccantes, agentes promotores de amadurecimento de frutos, inibidores de germinação e substâncias que são aplicadas aos grãos antes e depois da colheita para evitar a deterioração do alimento durante a estocagem e transporte. São excluídos desse conceito os fertilizantes, nutrientes animais e/ou vegetais, aditivos alimentares e medicamentos de uso veterinário (FAO, 2005).

O resíduo de agrotóxico é definido como sendo qualquer substância específica presente no alimento, “in natura” ou não, ou ainda em ração animal, proveniente do uso de agrotóxicos, como os produtos de conversão, metabólitos, produtos de reações e impurezas consideradas com alguma significância toxicológica. Este termo inclui resíduos de substâncias desconhecidas ou de fontes inevitáveis (como o meio ambiente), bem como o uso de produtos químicos conhecidos (FAO, 2005).

Até a promulgação da Lei n.º 7.802 de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda, utilização, importação, exportação, destino final de resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e controle de agrotóxicos, esses produtos eram comumente denominados “defensivos agrícolas”. A partir daí, devido à pressão

de diversos setores da sociedade, foi adotada a denominação “agrotóxico”, que evidencia os efeitos nocivos e perigos inerentes ao uso desses produtos. O termo “defensivo agrícola”, ao contrário, esconde os efeitos negativos ao ambiente e à saúde humana.

A designação “pesticida” também é muito utilizada, principalmente pela indústria de agrotóxicos, pois reforça o caráter positivo do produto, qualificando-o como substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira (BAIRD, 2002).

2.3.2 Histórico no Brasil e no mundo

A utilização de agrotóxicos teve início na década de 20 e, durante a Segunda Guerra Mundial, eles foram utilizados até como arma química. Quando bem utilizados, os agrotóxicos impedem a ação de seres nocivos, sem estragar os alimentos. Porém, se não houver cuidados durante o uso, ou tempo de ação dos agrotóxicos, estes podem representar além de riscos à saúde humana, sérios impactos ao meio ambiente. O uso mais antigo dos agrotóxicos de que se tem registro é a queima de enxofre para fumigar os lares gregos cerca do ano 1000 a. C. (BAIRD, 2002).

A partir da década de 50, quando se iniciou a chamada “Revolução Verde”, foi possível observar profundas mudanças no processo tradicional da produção agrícola, bem como nos impactos dessa atividade sobre o ambiente e a saúde humana. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas aos agricultores aumentando a produtividade através do controle de doenças e proteção contra insetos e outras pragas (RIBAS & MATSUMURA, 2009).

No início dos anos 50, ocorreu a introdução de inseticidas organofosforados, tais como: parationa metílica, metamidofós, entre outros (FENIK; MACIEJ & BIZIUK, 2011). Os agrotóxicos chegaram ao sul do país junto com a monocultura da soja, trigo e arroz. Nos dias atuais, os agrotóxicos encontram-se disseminados na agricultura convencional, como uma solução de curto prazo para a infestação de pragas e doenças.

Após 1975, efetivou-se a instalação da indústria de agrotóxicos no país, confirmada pelas principais empresas fabricantes destes produtos em nível mundial. Construiu-se no Brasil uma estrutura de mercado dos agrotóxicos caracterizada pelo elevado grau de concentração. O mercado brasileiro de agrotóxicos apresentou crescimento significativo: entre 1977 e 2006, período em que o consumo de agrotóxicos expandiu-se, em média, 10% ao ano,

de forma que o Brasil esteve entre os seis maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (PORRINI *et al.*, 2003).

Tabela 7 – Relação entre o número de intoxicações por manipulações indevidas de agrotóxicos em diferentes regiões brasileiras.

Regiões	Zona rural	Zona urbana	Total
NORTE	13	43	57
Amazonas	-	-	-
Pará	13	43	57
NORDESTE	85	564	649
Ceará	-	7	7
Rio Grande do Norte	3	1	4
Paraíba	39	86	125
Piauí	2	12	14
Pernambuco	20	342	362
Bahia	-	-	-
Sergipe	21	116	137
SUDESTE	712	978	1690
Minas Gerais	428	408	836
Espírito Santo	-	-	-
Rio de Janeiro	66	14	80
São Paulo	218	556	774
SUL	504	556	1060
Paraná	113	143	256
Santa Catarina	-	-	-
Rio Grande do Sul	391	356	747
CENTRO - OESTE	123	183	306
Mato Grosso do Sul	39	45	84
Mato Grosso	-	-	-
Goiás	-	-	0
Distrito Federal	84	138	222

Fonte: MS/SINITOX, 2010.

Em termos estatísticos, em 2003, o Brasil foi classificado como o oitavo país entre os maiores consumidores de agrotóxicos e o quarto maior mercado do mundo. Segundo a ANVISA (2006), o Brasil ocupava o posto de segundo maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Hoje, o Brasil é um dos maiores compradores de agrotóxicos do mundo, e as intoxicações por estas substâncias estão aumentando tanto entre os trabalhadores rurais que

ficam expostos, quanto entre pessoas que se contaminam através dos alimentos de forma indireta.

A maior utilização dessas substâncias é na agricultura, especialmente nos sistemas de monocultura em grandes extensões. O consumo anual de agrotóxicos no Brasil é superior a 300 mil toneladas de produtos formulados. Expresso em ingredientes ativos, isto representa mais de 130 mil toneladas de consumo anual destes componentes químicos (MALASPINA *et al.*, 2010).

2.3.3 Classificação

Há muitas formas de classificar os agrotóxicos, entre elas: finalidade, modo de ação, persistência, deslocamento, duração do efeito do tratamento, toxicidade e grupo químico (SANCHES, 2003 & ANVISA, 2005).

O Decreto Federal nº 98.816 de 11/01/90 (que regulamentou a Lei 7.802) no artigo 2º estabelece a classificação dos agrotóxicos por finalidade de uso, como: inseticidas (combatem os insetos), fungicidas (combatem os fungos), herbicidas (combatem as plantas daninhas), acaricidas (combatem os ácaros), reguladores e inibidores de crescimento, etc. (SANCHES, 2003 & ANVISA, 2005). Dentre essas classes, as três principais, que representaram cerca de 100% do consumo mundial de agrotóxicos, em 2007, foram os herbicidas (48%) inseticidas (25%) e fungicidas (22%) (TOMITA, 2005).

Quanto à persistência, os agrotóxicos são classificados segundo o tempo de meia vida, que é o tempo necessário, após aplicação, para que tenha sua eficácia reduzida à metade. Considera-se persistência curta (até 90 dias); média (de 91 a 180 dias) e longa (maior que 180 dias). O deslocamento dos agrotóxicos no ambiente durante sua meia vida pode ser pequeno (até 20 cm); médio (de 21 a 60 cm) ou grande (maior que 60 cm) (SANCHES, 2003 & ANVISA, 2005).

Os agrotóxicos são classificados quimicamente em compostos orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos (denominados assim devido à presença do átomo de carbono na estrutura) constituem o grupo de maior importância. São divididos em sintéticos e naturais. O desenvolvimento dos compostos orgânicos sintéticos possibilitou a geração de imensa gama de produtos orgânicos, tais como: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (PRESTES, 2007).

Os compostos organoclorados são derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano e/ou do ciclodieno. Foram muito utilizados na agricultura como inseticidas, porém seu emprego tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido. Possuem solubilidade muito baixa em água, a não ser que oxigênio ou nitrogênio encontrem-se também nas moléculas. (BAIRD, 2002). Os compostos: endrin, hexaclorobenzeno (HCB), heptacloro e lindano são alguns exemplos desta classe de agrotóxicos.

Os compostos organofosforados são ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo (ácido fosfórico, ácido tiosfosfórico, ácido ditiosfosfórico e outros), contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio (JOKANOVIC, 2001). Os compostos: malationa, diazinona e parationa metílica, fazem parte desta classe.

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico e podem ser inseticidas, herbicidas e fungicidas (BARBOSA, 2004). Carbaril, carbofuran e pirimicarbe são exemplos de carbamatos.

Os piretróides são compostos sintéticos, análogos aos componentes obtidos a partir dos piretros, extraídos do crisântemo (ANVISA, 2005). Alguns desses compostos são: aletrina, permetrina, deltametrina e cipermetrina.

O Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamentou a Lei de Agrotóxicos e Afins nº 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece as competências para os três órgãos envolvidos no registro de agrotóxicos: Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente (MMA), através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). O MS por meio da ANVISA é o responsável, dentre outras competências, pela avaliação e classificação toxicológica de agrotóxicos, e junto com o MAPA, no âmbito de suas respectivas áreas de competência, pelo monitoramento dos resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal e animal. A ANVISA estabelece o Limite Máximo de Resíduo (LMR) e o intervalo de segurança de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura agrícola (ANVISA, 2010).

2.3.4 Toxicidade

Segundo GARCIA-RODRIGUEZ *et al.* (1996), alguns agrotóxicos permanecem no solo por até décadas e são transferidos para as culturas seguintes e para futuras pastagens, contaminando assim, a carne bovina e o leite através da alimentação desses animais. Os

autores afirmam ainda que o uso de agrotóxicos tem aumentado o número de pragas existentes ao eliminar inimigos naturais das mesmas, além de envenenarem insetos úteis como abelhas e polinizadores.

A avaliação e a classificação do potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico são baseadas em estudos físico-químicos, toxicológicos e eco toxicológico. Dessa forma um agrotóxico pode ser classificado quanto à periculosidade ambiental conforme demonstrado na Tabela 8 (ANVISA, 2005), em classes que variam de I a IV, bem como: produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I, rótulo vermelho), produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II, rótulo amarelo), produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III, rótulo azul) e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV, rótulo verde).

Tabela 8 – Classificação quanto à classe toxicológica dos agrotóxicos.

Classificação	Cor da faixa	Dosagem letal 50	Dosagem capaz de matar um adulto
Classe I: extremamente tóxico	Vermelha	5 mg kg ⁻¹ de peso corpóreo	Algumas gotas
Classe II: altamente tóxico	Amarela	5 – 50 mg kg ⁻¹ de peso corpóreo	Algumas gotas/ 1 colher de chá
Classe III: mediamente tóxico	Azul	50 - 500 mg kg ⁻¹ de peso corpóreo	1 colher de chá/ 2 colheres de sopa
Classe IV: pouco tóxico	Verde	500 - 5000 mg kg ⁻¹ de peso corpóreo	2 colheres de sopa/ 1 copo

Fonte: ANVISA, 2005.

Segundo a lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, para serem vendidos ou expostos à venda em todo o território nacional, os agrotóxicos e afins ficam obrigados a exibir rótulos próprios, redigidos em português, que contenham, entre outros, os seguintes dados: o nome do produto, o nome e a porcentagem de cada princípio ativo e o total dos ingredientes inertes que contenham a quantidade de agrotóxicos, componentes ou afins. A embalagem deve expressar em unidades de peso ou volume, conforme o caso, o nome e o endereço do fabricante e do importador, os números de registro do produto e do estabelecimento do fabricante ou importador, o número do lote ou da partida, um resumo dos principais usos do produto e a classificação toxicológica do produto (ANVISA, 2010).

Considerando os resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), é possível verificar que agrotóxicos autorizados para determinada cultura,

mas com restrições quanto ao modo de aplicação devido a sua elevada toxicidade aos trabalhadores rurais, ainda estão sendo utilizados no campo de forma indevida.

Desta forma, é de extrema importância que trabalhadores rurais, como os agricultores, utilizem equipamentos de aplicação manual, os Equipamentos de Proteção Individuais (EPI's), ficando menos expostos aos agrotóxicos e conseqüentemente às intoxicações agudas e crônicas por eles causados, demonstrados pela Tabela 9.

Tabela 9 – Relação dos agentes causadores de intoxicações, seus respectivos casos de curas, curas não confirmadas, seqüelas e óbitos.

Agentes	Cura	Cura não Confirmada	Seqüela	Óbito	Total
Medicamentos	9510	4266	21	51	13848
Agrotóxico - uso agrícola	1951	644	11	115	2721
Agrotóxico – uso doméstico	1029	482	14	1	1526
Produtos veterinários	254	220	3	3	480
Raticidas	1126	382	-	-	1508
Domissanitários	2494	1217	18	-	3729
Cosméticos	327	201	-	-	528
Produtos químicos industriais	1642	854	11	-	2507
Metais	124	11		-	135
Drogas de abuso	3551	83	1	-	3635
Plantas	534	303	2	-	839
Alimentos	564	21	-	--	585
Animais					
peçonhentos/serpentes	1954	648	32	-	2634
Animais peçonhentos/aranhas	1041	1606	19	-	2666
Animais					
peçonhentos/escorpiões	7780	375	1	-	8156
Outros animais peçonhento-venenosos	1962	2049	14	-	4337
Animais não peçonhentos	2678	297	-	-	3147
Total	40793	14414	168	279	77458

Fonte: SINITOX, 2010.

2.3.5 Limites Máximos de Resíduos (LMRs) para agrotóxicos

O LMR é a quantidade legalmente permitida, ou reconhecida, como aceitável e é estabelecido para cada composto aprovado para uso em um determinado alimento. O LMR sempre está correlacionado à Ingestão Diária Aceitável (IDA). Esta é obtida a partir de ensaios de experimentação, avaliando-se a toxicidade, a teratogenicidade e carcinogenicidade destes compostos não intencionais (DENOBILE, 2004). No Brasil, a competência para estabelecer Limites Máximos de Resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários ou de agrotóxicos, é do Ministério da Saúde através da ANVISA. No caso de não estarem estabelecidos pelo Ministério, utilizam-se os adotados no MERCOSUL, os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas Diretivas da União Européia e os utilizados pelo FDA/USA, segundo Instrução Normativa Nº 42, de 20/12/1999 (MAPA, 2010b).

A concentração máxima de resíduos de agrotóxicos legalmente permitidos em mel tem sido estabelecido por diferentes órgãos nacionais, porém a maioria dos compostos estudados não está incluída no *Codex Alimentarius* (*Codex Alimentarius*, 2007). Enquanto outros países não toleram nenhum nível de resíduo. A determinação de LMRs tornou-se necessária devido aos riscos oferecidos desses resíduos para a saúde humana, a fim de garantir a segurança alimentar. É expresso em miligramas de resíduos por quilograma de alimento.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR) foi instituído pela Portaria Ministerial nº. 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº. 527, de 15 de agosto de 1995. Este plano visa garantir a saúde do consumidor por meio de um monitoramento da presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais, entre outros, em produtos de origem animal, tais como, PNCR em carnes (bovina, aves, suína e equina), mel, leite, ovos e pescado (MAPA, 2010a).

As ações deste plano estão direcionadas para se conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos LMR de substâncias com uso autorizado, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país (MAPA, 2010a).

É de fundamental importância o PNCR para o país, visto que o não cumprimento das metas anuais previstas para o controle de resíduos em carne, por exemplo, acarretaria sérios problemas às exportações dos produtos cárneos brasileiros para os principais mercados (EUA/UE), e o que é mais significativo, é que deixaria o consumidor a mercê da nocividade de resíduos contaminantes, tais como os medicamentos antimicrobianos, antiparasitários, metais pesados, promotores de crescimento e poluentes ambientais, entre outros, em face da

ausência do monitoramento possibilitado pelos programas setoriais do plano, como a Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999.

De acordo com a Tabela 10, para os agrotóxicos estudados, os LMRs em mel, no Brasil, segundo PNCRC, são de 0,01 mg kg⁻¹, com exceção de: tetradifona, clorpirifós metílico, clorpirifós etílico, lindano e tretadifona, os quais possuem LMR de 0,02 mg kg⁻¹, para trifloxistrobina e clorotalonil, o LMR é de 0,5 mg kg⁻¹ e para o composto bifentrina o LMR é de 0,05 mg kg⁻¹. LMRs da União Européia (EU) e *Codex Alimentarius* também são estabelecidos para mel.

Tabela 10 - Relação dos LMRs para mel, de acordo com a União Européia (EU), legislação brasileira e *Codex Alimentarius*, na ordem de mg kg⁻¹ para cada composto estudado.

Agrotóxicos	LMRs (mg kg ⁻¹)		
	UNIÃO EUROPÉIA (EU)	Brasil	<i>Codex Alimentarius</i>
Triclorfom			
Trifluralina	0,5		
Hexaclorobenzeno		0,01	
Quintozeno		0,01	
Lindano	0,01	0,02	
Clorpirifos metílico		0,02	
Clorotalonil	1,0	0,5	2,0
Cresoxim metílico			
Heptacloro	0,1	0,01	
Malationa	0,02	0,01	
Clorpirifós etílico		0,02	
Bromofós metílico		0,01	
Fipronil	0,1		
Heptacloro epóxido		0,01	
Endossulfam alfa	0,05	0,01	2,0
4,4-DDE		0,01	
Dieldrin		0,01	
Endrim I	0,01	0,01	
Endossulfam beta	0,05	0,01	0,2
Endrim II	0,01	0,01	
Trifloxistrobina	0,3	0,5	0,3
Endossulfam sulfato	0,05	0,01	0,2
Bifentrina	0,05	0,05	
Tetradifona		0,02	
Cialotrina-lambda	0,05		0,05

Fonte: PNCRC, 2010; *Codex Alimentarius*, 2007; UE, 2007.

2.3.6 Ocorrência de agrotóxicos no mel

Em longo prazo, o uso de compostos químicos na agricultura, tais como, inseticidas, fungicidas e herbicidas, podem causar a contaminação do meio ambiente. Em alguns casos, os compostos utilizados para o controle de pragas permanecem nas plantas em que foram distribuídas, afetando insetos diferentes daqueles os quais os compostos foram desenvolvidos (EVANS & SPIVAK, 2010).

Por outro lado, a ocorrência de doenças nas colméias pode acarretar prejuízos diretos pela diminuição da produtividade, uma vez que o aumento da mortalidade, tanto de crias como de abelhas adultas, leva a uma redução da população da colméia com conseqüente redução da produção (BENETTI, *et al.*, 2004). Ganhos com grandes produtividades podem ser alcançados na agricultura pelo uso adequado de agrotóxicos. Eles são necessários para atender a demanda mundial dos gêneros alimentícios e não há alternativas que possam competir de tal forma em grande escala.

A Figura 2 representa algumas das formas de contaminações com resíduos de agrotóxicos em mel, os quais podem originar-se de contaminações de plantas durante a coleta do pólen e do néctar das abelhas, ou do tratamento de colméias para controlar algumas pestes e doenças que podem afetá-las (RISSATO *et al.*, 2006).

As espécies de abelhas *Apis mellifera* executam a tarefa vital de polinização das colheitas agrícolas e das espécies nativas, e são importantes para a produção comercial do mel e de produtos apícolas (MALASPINA & SILVA-ZACARIN, 2006).

Durante este processo, representado acima, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados por estas trabalhadoras e ficam retidos nos pelos superficiais de seu corpo ou são inalados e unidos em seu aparelho respiratório. Devido a estes fatores, as abelhas podem ser usadas como bioindicadores para monitoramento de impacto ambiental causado por fatores biológicos, químicos e físicos, tais como, parasitas, contaminações industriais e agrotóxicos (RISSATO *et al.*, 2006).

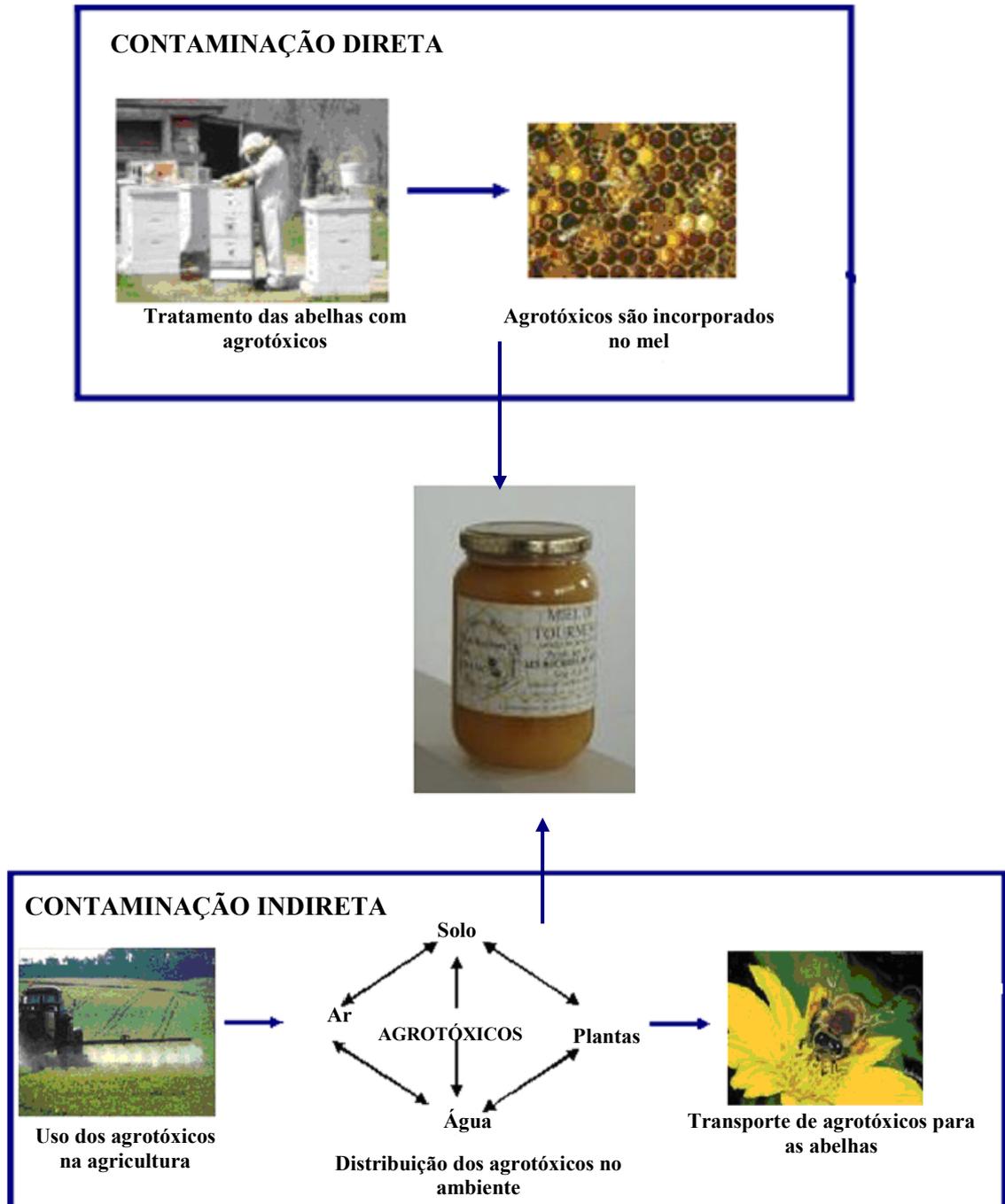


Figura 2 - Diferentes modos de contaminação de abelhas pela aplicação direta de agrotóxicos em colméias para o tratamento de doenças de abelhas e conseqüente contaminação do mel e pela contaminação indireta, através da aplicação em lavouras, contaminando o ambiente e posteriormente as abelhas (Adaptado de RISSATO *et al.*, 2006).

A determinação de contaminantes e resíduos em mel e em outros produtos das abelhas tem se tornado crescente, especialmente porque estes compostos podem diminuir as propriedades benéficas do mel e, em quantidades significantes, podem representar uma séria ameaça à saúde humana (KUJAWSKI & NAMIEŚNIK, 2011). Por isso, o monitoramento de

resíduos de agrotóxicos 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 em suas vizinhanças.

2.4 Análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Historicamente, as análises químicas em alimentos de origem animal, começaram a ser relatados em meados de 1960 (BRABANDER *et al.*, 2009). Quando o homem começou a plantar, há mais de doze mil anos, fixando-se em um determinado território, iniciou-se a produção de alimentos para suprir suas necessidades básicas. Para atender à enorme demanda por alimentos, surgem então, agroecossistemas e monoculturas. Essas novas modalidades de produção agrícola favoreceram o aparecimento de pragas, doenças, ervas daninhas e microorganismos, decorrentes do desequilíbrio que atingiu essas populações. Esse desequilíbrio traz sérios problemas para a produção agrícola de alimentos, obrigando ao uso de métodos artificiais como agrotóxicos, fertilizantes, entre outros (GALLI *et al.*, 2006).

O mel é um produto natural que deve ser livre de resíduos de contaminantes, tais como, os agrotóxicos. Desta forma, vários métodos utilizados para determinação de resíduos de agrotóxicos em mel tem sido relatados na literatura, dentre estes, citam-se alguns métodos no item 2.4.1.

Tipicamente, as etapas de preparo de amostra, incluem primeiramente a homogeneização ou amostragem; extração; pré-concentração (se necessário); *clean-up* e análise final. Para a análise de matrizes complexas, como o mel, uma combinação de diferentes técnicas na etapa de preparo da amostra são frequentemente utilizadas, levando em consideração a necessidade de alcançar o desempenho exigido com menos etapas possíveis (KUJAWSKI & NAMIESNIK, 2008). Da mesma forma, torna-se necessário aplicar uma etapa de *clean-up* da amostra, a fim de eliminar os compostos interferentes para posterior análise, esta é geralmente, a etapa que consome mais tempo durante o preparo da amostra e é também a mais trabalhosa e que está sujeita a erros. É necessário, por isso, validar o método para assegurar níveis adequados de recuperações e repetibilidade.

Portanto, a análise de resíduos de agrotóxicos representa um instrumento de proteção à saúde humana, devido ao risco que estes compostos oferecem, além de sua persistência no meio ambiente, tendência a bioacumulação e à alta toxicidade causada (WANG *et al.*, 2006).

2.4.1 Métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos

A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos tem se tornado de suma importância e necessidade, principalmente em relação à classe toxicológica e à estabilidade destes produtos (ANASTASSIADES, *et al.*, 2003).

Durante os últimos anos, diferentes metodologias têm sido propostas com o objetivo de diminuir os passos da operação de amostragem, determinar níveis cada vez menores de concentração e reduzir os resíduos tóxicos. Porém, algumas etapas clássicas fazem parte da sequência das análises, entre elas, a Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) seguida por outras etapas de *clean-up*, por exemplo, a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*) ou Cromatografia de Permeação em Gel (GPC, do inglês *Gel Permeation Chromatography*) (KENDE, 2006) com as etapas posteriores, que são caracterizadas pela pré-concentração da amostra, separação e análise cromatográfica seguida pela determinação dos analitos (PICÓ, BLASCO & FONT, 2004).

A determinação de contaminantes em nível de traços em matrizes complexas requer extensivo preparo e extração da amostra para posterior análise instrumental. Diversas técnicas são necessárias para obtenção do analito de interesse em solução aquosa ou orgânica, geralmente a complexidade da matriz de produtos agrícolas exige etapas de amostragem, homogeneização da amostra, extração e *clean-up* tornam-se muito importantes para obtenção da análise quantitativa (RIDGWAY, LALLJIE & SMITH, 2007).

As metodologias para a determinação de resíduos devem garantir bons resultados de exatidão e precisão, limites de detecção apropriadamente baixos e um amplo espectro de analitos (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011). Da mesma forma, devem:

- Assegurar a rapidez das análises, com um tempo mínimo entre a coleta da amostra e a obtenção das concentrações dos analitos;
- Ser de fácil operação;
- Ser economicamente viável (em termos de reagentes e materiais);
- Permitir a determinação seletiva dos analitos;
- Assegurar um elevado nível de automação, minimizando os efeitos do fator humano nos resultados;
- Utilizar pequenas quantidades de solventes e reagentes, reduzindo os resíduos gerados pelo procedimento analítico.

As técnicas de extração são influenciadas principalmente, pela solubilidade em solventes orgânicos empregados para tal finalidade e pelo efeito matriz característico de cada amostra (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

Devido às interferências causadas por essas variáveis na etapa de extração, faz-se necessário uma nova abordagem em análise de resíduos de agrotóxicos e afins, adequando a técnica com as características da amostra, a fim de obter melhores condições de análise ao considerar a grande necessidade por técnicas rápidas e universais. Conseqüentemente, técnicas de extração mais sofisticadas, que reduzem significativamente os interferentes da matriz, e são utilizadas nas etapas de *clean-up* de diversas amostras e/ou concentração de analitos, são discutidas nesta revisão.

Desde a sua introdução, em 1989, a técnica Dispersão da Matriz em Fase Sólida (MSPD, do inglês *Scattering Matrix in Solid Phase*), provou ser uma técnica eficiente para o isolamento de uma vasta gama de medicamentos veterinários e agrotóxicos. Caracteriza-se pelo uso de sorventes (sílica, florissil, C₁₈, dentre outros) em análise de alimentos, podendo eliminar a necessidade por múltiplas extrações (BARGANSKA, SLEBIODA & NAMIESNIK, 2007). A MSPD possui particular aplicação como um processo analítico para a preparação, extração e fracionamento de sólidos e/ou amostras biológicas altamente viscosas (ABHILASH, JAMIL & SINGH, 2007).

A Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), trata-se de um processo de equilíbrio dos analitos entre as fases aquosa (amostra), polimérica (fibra) e gasosa. Durante a etapa de extração ocorre um equilíbrio de partição devido à migração dos analitos entre as três fases. Os compostos de interesse são retidos no revestimento especial da fibra contendo 0,5 µL de polidimetilsiloxano – PDMS, os quais são orientados pelo coeficiente de distribuição do composto entre a fase aquosa e a fase PDMS. Os analitos são desorvidos termicamente no injetor e depositados na coluna do cromatógrafo para posterior análise. Em relação a outras técnicas, a SPME, é uma técnica que não consome grandes quantidades de solventes tóxicos, contribuindo positivamente ao meio ambiente (KENDE *et al.*, 2006). Até agora, poucos autores, descreveram a viabilidade da SPME como uma técnica de extração para amostras complexas, tais como, frutas, vegetais e mel (GHINI *et al.*, 2004).

A Extração Assistida por Microondas (MAE, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*) é uma técnica utilizada para aumentar a eficiência de extração. Ocorre agitação e aquecimento durante a extração, esta técnica é particularmente eficiente para realizar extrações de amostras sólidas. É aplicada somente para compostos termicamente estáveis,

devido ao aumento de temperatura durante a extração. Devido os compostos apolares não absorverem energia de microondas, deve-se utilizar solventes polares, como, por exemplo, a água. As principais aplicações da MAE são como alternativa para o método Soxhlet, pois reduz significativamente a quantidade de solvente e o tempo de realização da extração (RIDGWAY; LALLJIE & SMITH, 2007).

Da mesma forma, a técnica de Microextração Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid – Liquid Microextraction*) foi desenvolvida por Assadi e colaboradores com especial ênfase na simplicidade e curto tempo de extração, além da utilização de pequeno volume de solvente orgânico e facilidade de operação. Esta técnica tem sido aplicada para a análise de hidrocarbonetos aromáticos, fenóis voláteis, agrotóxicos organofosforados, clorobenzenos, clorofenóis, herbicidas triazínilos, trialometas e anilinas (ZANG *et al.*, 2009).

A técnica Extração Sortiva em Barra Magnética (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*), foi introduzida por BALTUSSEN *et al.*, no ano de 1999, e possui similaridade no mecanismo de extração em relação à SPME, porém o fator de pré-concentração é em torno de 100 vezes maior dependendo da quantidade do adsorvente PDMS utilizado (RIDGWAY; LALLJIE & SMITH, 2007). Vários métodos têm sido desenvolvidos utilizando SBSE para análise de alimentos em amostras ambientais e contaminadas.

Com o desenvolvimento destas novas técnicas, é possível suprir algumas desvantagens e reduzir alguns problemas comuns presentes nas etapas de extração, baseando-se na redução do tempo de extração, no volume de resíduos gerados, na redução de interferências da matriz e na facilidade de operação com relação aos avanços apresentados de cada metodologia (DIONÍSIO *et al.*, 2010).

Para iniciar esta transformação, ANASTASSIADES *et al.* (2003) propuseram um método de *clean-up* simples e rápido nomeado Extração em Fase Sólida Dispersiva (DSPE ou d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*) para diferentes extratos de amostras ambientais e alimentos, como pode-se citar, frutas, vegetais, óleos, sedimentos, solo, entre outras. Esta técnica denomina-se QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) e tem sido aplicada com sucesso para a determinação de agrotóxicos e outros contaminantes, antibióticos, bifenilos policlorados (PCBs) e éteres difenil éteres polibromados (PBDEs), em diversos tipos de amostras de alimentos e ambientais.

Durante o desenvolvimento deste método, os seguintes parâmetros foram avaliados: quantidade de amostra, natureza do solvente extrator, forma de agitação, efeito da adição de sais para promover a partição líquido-líquido e facilitar a separação de fases, utilização de

padrão interno e o tipo de sorvente empregado na d-SPE. De forma resumida, o procedimento de preparo otimizado para 10 g de amostra, envolve as seguintes etapas: extração dos analitos com 10 mL de acetonitrila (MeCN) e agitação da amostra por 1 min utilizando vortex. Após, para a etapa de partição/extração, adiciona-se 4 g de sulfato de magnésio (MgSO₄) e 1 g de cloreto de sódio (NaCl), com posterior agitação da amostra por 1 min, em vortex, adição de 50 µL do padrão interno trifenilfosfato, agitação por 30 s e centrifugação do extrato por 5 min e 5000 rpm. Para a última etapa de *clean-up* da amostra, transfere-se uma alíquota de 1 mL de extrato sobrenadante contido na fase orgânica contendo MeCN, em contato com 25 mg de Amina Primária Secundária (PSA) e 150 mg de MgSO₄, agita-se em vortex, por 30 s e centrifuga-se o extrato por 1 min e 6000 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante é injetado no sistema cromatográfico para análise (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

O método QuEChERS apresenta altos percentuais de recuperação para diversas classes de compostos e possibilita o preparo de 6 a 12 amostras em 30-45 min por um único analista, sendo possível extrair de uma mesma amostra compostos de diferentes polaridades, facilitando assim as análises de multirresíduos (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho utilizando o método QuEChERS, e os apresentados por ANASTASSIADES *et al.*, 2003, observa-se que ambos os trabalhos apresentaram conformidade com os parâmetros definidos pela legislação, sendo que todos os parâmetros avaliados forneceram bons resultados. Da mesma forma, pode-se concluir que após a etapa de *clean-up* da amostra, utilizando d-SPE com MgSO₄ e PSA, o efeito matriz foi significativamente reduzido.

2.4.2 Métodos multirresíduos para determinação de agrotóxicos em alimentos

A determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos tem se tornado uma necessidade tendo em vista a toxicidade e a estabilidade destes. Procedimentos tradicionais, desenvolvidos há mais de 30 anos, possuem elevado consumo de tempo, intensas e complicadas etapas de trabalho, e são inviáveis economicamente, além disso, há considerável geração de resíduos e baixos limites de detecção baixos são obtidos com pouca frequência (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

O princípio das metodologias atuais para determinação de resíduos de agrotóxicos deve garantir resultados precisos e verdadeiros com baixos limites de detecção. Por isso, estas metodologias devem assegurar: rapidez e facilidade das análises; aplicabilidade com

reagentes e equipamentos viáveis economicamente; permitir determinação seletiva dos analitos e utilização de pequenas quantidades de solventes e reagentes, diminuindo assim os resíduos gerados. Nos últimos anos, muitas inovações nos processos analíticos para a determinação de resíduos de agrotóxicos, têm sido desenvolvidas (SOLER & PICÓ, 2007).

É de extrema importância que os vários estágios dos procedimentos analíticos sejam validados, a fim de avaliar os resultados com os requerimentos exigidos em cada etapa do procedimento, estas etapas se baseiam em: preparo da amostra para análise, extração de agrotóxicos presentes na amostra, *clean-up* do extrato e por fim, a identificação e determinação dos analitos (FENIK; MACIEJ & BIZIUK, 2011).

Programas nacionais de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos *in natura*, como frutas e vegetais, vêm sendo estabelecidos em diferentes estados. Culturas como o tomate, o morango e a maçã possuem longo histórico de contaminação, estando entre os alimentos avaliados com maiores índices insatisfatórios de resíduos no Brasil. Por isso, a importância do desenvolvimento de métodos de análise multirresíduo de agrotóxicos para o monitoramento da presença destes compostos em alimentos (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

Os métodos multirresíduos apresentam como vantagens a possibilidade de analisar um grande número de compostos, com altos percentuais de recuperação (exatidão) dos analitos, remoção dos possíveis interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (PRESTES, ADAIME & ZANELLA 2011). A diferença de propriedades químicas entre os compostos e a diversidade de matrizes a que estes podem estar presentes são algumas das adversidades apresentadas por este método, porém vários métodos para análises multirresíduos já foram desenvolvidos (PRESTES *et al.*, 2009).

Para a determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes de alimentos utilizando o método de preparo de amostra QuEChERS, os solventes usuais tem sido: acetona, acetato de etila e acetonitrila, todos estes asseguram maiores níveis de recuperações dos analitos. Embora a acetona seja facilmente miscível em água, é impossível fazer esta separação sem a presença de solventes apolares, juntamente com a adição de sais, como o cloreto de sódio, para ocorrer a etapa de partição. Por outro lado, o acetato de etila é parcialmente miscível em água, o que torna desnecessária a adição de solventes apolares para separá-los, sendo que a maioria dos analitos polar não se separa. O extrato de matrizes de alimento com acetonitrila pode ser facilmente separada da água, promovendo o efeito *salting out*, sem a necessidade da adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição, portanto este é o solvente de extração preferencial na metodologia QuEChERS (WILKOWSKA & BIZIUK, 2011).

Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente, uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa (PRESTES *et al.*, 2009), os analitos de interesse são transferidos para a camada orgânica, deixando na fase aquosa os co-extrativos indesejáveis e alguns agrotóxicos altamente polares.

Um método multirresíduo empregando SPE, seguida de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (LC-MS/MS) foi desenvolvido para a determinação de 450 agrotóxicos em suco de frutas, vinho e mel. As amostras foram diluídas com porções de água e acetona, e após extraídas com diclorometano. Após etapa de concentração e *clean-up* utilizando carbono grafitizado e cartuchos de aminopropil, os agrotóxicos foram eluídos com mistura de acetonitrila e tolueno, sendo o eluato concentrado e reconstituído em hexano quando os agrotóxicos foram analisados por GC-MS e em metanol quando estes foram analisados por LC-MS/MS. O limite de detecção do método apresentou uma faixa entre 1,0 e 300 ng g⁻¹ dependendo do agrotóxico analisado. Avaliaram-se três níveis de fortificação entre 2,0 e 3000 ng g⁻¹ e os 450 compostos analisados apresentaram recuperações médias entre 59 e 123%, sendo que 97% do total de compostos analisados apresentaram RSD abaixo de 25%, os outros 3% apresentaram RSD entre 25,0 e 30,4% (PANG, 2006).

A viabilidade da utilização de diferentes métodos para a extração de 12 inseticidas organofosforados e carbamatos foi comparada e testada em amostras de méis. As amostras foram dissolvidas em água quente e analisadas por LC-MS/MS. Quatro métodos de extração diferentes foram testados: QuEChERS, Extração em Fase Sólida (SPE), Extração com Líquido Pressurizado (PLE, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*) e Microextração em Fase Sólida (SPME). A capacidade de detecção (CC_β) para os compostos foi de 0,024 a 1,155 mg kg⁻¹, para QuEChERS, 0,010 a 0,646 mg kg⁻¹ para SPE, 0,007 a 0,595 mg kg⁻¹ para PLE e 0,001 a 0,060 mg kg⁻¹ para SPME. As faixas de recuperações para SPME foram de 28 a 90%, para PLE foram de 82 a 104%, seguido pelo método QuEChERS, de 72 a 100% e 78 a 101% para SPE. A repetibilidade foi expressa em termos de Desvio Padrão Relativo (RSD) e ficou em torno de 20% para todos os compostos testados com os diferentes quatro métodos propostos (BLASCO *et al.*, 2011).

Metodologias como a cromatografia combinada com diferentes técnicas de detecção são frequentemente utilizados para identificar e quantificar resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas, tais como fluidos biológicos, produtos naturais, como o mel, sedimentos de rio e outras. Dentre estes, a cromatografia acoplada à Espectrometria de Massas (MS)

combina as vantagens da cromatografia – alta seletividade e separação eficiente – e da espectrometria de massas – informações estruturais e promove um aumento na seletividade (LANÇAS, 2009).

2.4.2.1 Análise de resíduos de agrotóxicos em mel por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD)

O Detector por Captura de Elétrons (ECD) tornou-se um dos detectores mais amplamente empregados para as amostras ambientais por responder seletivamente aos compostos orgânicos contendo halogênios, como os agrotóxicos e as bifenilas policloradas. A amostra eluída de uma coluna passa sobre uma fonte radioativa emissora de partículas beta, geralmente níquel-63. Um elétron proveniente do emissor causa a ionização do gás de arraste (frequentemente o nitrogênio) e a produção de uma rajada de elétrons. Este detector é altamente sensível e apresenta a vantagem de não alterar a amostra significativamente. Entretanto a resposta linear do detector é limitada a cerca de duas ordens de grandeza (COLLINS, BRAGA & BONATO, 2009).

Tem sido empregado com muito sucesso no estudo de certos compostos presentes ao nível de traço, tais como resíduos de agrotóxicos em alimentos. (LANÇAS, 2009). Porém, apresenta algumas limitações devido à condensação de compostos de elevado ponto de ebulição sobre a superfície onde se encontra o material radioativo, conseqüentemente seu desempenho é diminuído, requerendo limpeza periódica do sistema de detecção.

Um método de análise de resíduos de agrotóxicos em mel, utilizando Extração em Fase Sólida Dispersiva (d-SPE), GC-ECD e GC-NPD, foi desenvolvido para a determinação de 36 agrotóxicos. Este método caracterizou-se por utilizar pequena quantidade de solventes e de amostra e, mostrou-se eficiente para a determinação desses resíduos para três diferentes níveis de concentração, obtendo recuperações entre 70 e 120%, com desvio padrão relativo (RSDr) entre 1 e 22%. O limite de detecção do método apresentou uma faixa entre 0,001 e 0,108 mg kg⁻¹ e o limite de quantificação apresentou uma faixa entre 0,02 e 0,05 mg kg⁻¹ (BARAKAT *et al.*, 2007).

2.4.3 Efeito Matriz em GC

Esse efeito pode ser notado pela significativa diferença de resposta obtida em padrões preparados no solvente daqueles preparados no extrato da matriz, quando uma boa precisão é obtida, diz-se que o efeito foi eliminado ou compensado. Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar este efeito é reduzir a quantidade de componentes da matriz que coeluem com os analitos no detector, para isto, métodos de extração mais seletivos e etapas mais extensivas de *clean-up* devem ser desenvolvidas (PICÓ, BLASCO & FONT, 2004).

O efeito de matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como: mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo, isso ocorre, por exemplo, quando há perdas de quantidade do agrotóxico no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta e dificultando a integração; erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo. Este problema é mais fácil de ser contornado com a utilização de um espectrômetro de massas para monitoramento de analitos; aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos; extinção do sinal no detector, ou seja, o sinal do analito é diminuído gerando subestimação do resultado, fato comum aos detectores fotométricos de chama (PINHO *et al.*, 2009).

Este efeito é mais pronunciado em análises de amostras complexas, como frutas, vegetais, mel, sucos, vinhos, óleo de oliva, tecidos animais, leite humano, solos, etc. (TADEO, SANCHEZ-BRUNETE & PÉREZ, 2004).

A intensidade do efeito de matriz para dado agrotóxico é influenciada pela natureza da amostra e pelo tipo de co-extrativos (tamanho das moléculas, polaridade, estabilidade térmica, volatilidade, etc.). Esse efeito é mais significativo na análise de agrotóxicos quando estes se encontram em concentrações mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta (PINHO *et al.*, 2009).

Várias abordagens têm sido propostas para reduzir os efeitos da matriz durante a determinação de agrotóxicos em matrizes de alimentos. A estratégia mais óbvia é a redução da quantidade de componentes da matriz ao entrar no sistema cromatográfico, ao aplicar, por exemplo, uma etapa de *clean-up* do extrato (FRENICH *et al.*, 2009).

Mesmo os modos MS/MS em série, estão propensos a detectar componentes coextrativos da matriz, os quais podem levar a uma melhoria do sinal cromatográfico, ou a

uma diminuição da resposta do analito, em relação ao sinal do solvente puro (HAJSLOVA & ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

Diversas maneiras são utilizadas para compensar o efeito matriz em GC, dentre elas, citam-se: uso do método de adição de padrão; uso de padrão interno deuterado; preparo das soluções analíticas no extrato da matriz; uso de analitos protetores, limpeza dos extratos, entre alternativas (TOMAS *et al.*, 2005).

Os analitos protetores são compostos que interagem fortemente com os sítios ativos do sistema cromatográfico, ocorrendo assim, diminuição da degradação e/ou adsorção dos analitos de interesse, sendo, portanto, a solução mais conveniente para os problemas ocasionados pelo efeito matriz na análise de resíduos de agrotóxicos. A adição destes compostos nas soluções analíticas preparadas tanto no extrato da matriz como no solvente, faz com que ocorra um aumento da resposta em ambas as soluções minimizando as perdas dos analitos de interesse, além de proporcionar baixos valores de Limites de Detecção (LOD) (ALBERO, SANCHEZ-BRUNETE & TADEO, 2001).

O objetivo de adicionar analitos protetores é promover uma melhor resposta dos analitos nas soluções padrões preparadas em solvente, tornando deste modo a preparação da curva de calibração mais fácil e menos laboriosa, comparada aos padrões preparados no extrato da matriz (KIRCHNER *et al.*, 2007).

Após a extração de agrotóxicos da amostra, uma etapa adicional pode ser realizada para separar satisfatoriamente os analitos de co-extrativos remanescentes, denominado limpeza dos extratos, ou *clean-up*. Comumente, são empregados procedimentos como cromatografia de permeação em gel, cromatografia por adsorção, extração em fase sólida dispersiva e, mais recentemente, a extração com partição em baixa temperatura.

2.5 Validação de métodos analíticos

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de contaminantes em alimentos como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam enquadrados nas determinações legais (PASCHOAL & RATH, 2008).

De acordo com LANÇAS (2004), validação é o ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa a diminuir os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado.

Os laboratórios que realizam as análises em alimentos precisam ter capacidade técnica comprovada para tal compromisso, a qual é garantida pelas normas de credenciamento estabelecidas por órgãos responsáveis, que no Brasil são representados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (ANVISA, 2006) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, (INMETRO, 2007) que disponibilizam guias para procedimentos de validação de métodos analíticos (Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003, ANVISA, 2003 e o documento de caráter informativo, INMETRO DOQ-CGCRE-008, de 03/20035 respectivamente). Há ainda órgãos internacionais, como União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), Organização Internacional para Padronização (ISO), (ISO/EC 17025, 1999), Conferência Internacional em Harmonização (ICH), que também estabelecem procedimentos de validação como critério fundamental no credenciamento de laboratórios.

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. (RIBANI *et al.*, 2004).

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. As figuras de mérito são os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas, e são descritas como: curva analítica e determinação da sua faixa de linearidade, seletividade, sensibilidade do método, representada pelos Limites de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ), precisão, exatidão e robustez. (RIBEIRO & FERREIRA, 2008).

2.5.1 Linearidade e curva analítica

A linearidade é expressa pela sua habilidade em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações dos analitos nas amostras, correspondentes a uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2007).

De acordo com LANÇAS (2004), é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado.

Na prática, a linearidade é determinada por intermédio de gráficos de calibração, seguidos de um tratamento estatístico. No caso de gráficos de calibração, ou curvas de

calibração, deve-se construir um gráfico relacionado à resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo (LANÇAS, 2004).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático de regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação, **r**. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de regressão maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 e os valores do coeficiente de determinação, r^2 , são tidos como satisfatórios a partir de 0,98 (RIBANI *et al.*, 2004).

A curva de calibração pode ser construída preparando-se as soluções analíticas dos agrotóxicos, em solvente ou no extrato da matriz. A curva preparada em solvente relaciona o sinal do instrumento com a concentração do analito, sem considerar a interferência da matriz.

O número mínimo de pontos geralmente aceitos nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos, (ANVISA, 2003 & ICH, Conferência Internacional de Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonisation*, 1996) ou mais que 6 (INMETRO, 2007).

A faixa linear dinâmica, descrita pela equação abaixo, só é válida em intervalos de concentrações ou massas no qual se pode construir uma curva analítica linear. A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. A ANVISA (2003) especifica um intervalo compreendido entre 80 e 120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para impurezas. (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2007).

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração do analito;

a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = coeficiente linear - intersecção com o eixo y, quando x = 0.

2.5.2 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser determinado pelo método (INMETRO, 2007). O LOD corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. O LOQ corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada. (LANÇAS, 2004).

Os mesmos critérios de LOD podem ser adotados para LOQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LOQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LOQ, a partir da equação:

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

2.5.3 Detectabilidade

A detectabilidade do método indica sua capacidade de discriminar, com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito (LANÇAS, 2004). A detectabilidade pode ser determinada por intermédio da inclinação do gráfico de calibração. No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método.

2.5.4 Precisão

A precisão mede o quão bem os resultados obtidos se assemelham entre si. Descreve a reprodutibilidade e das medidas – em outras palavras, a proximidade entre os resultados que foram obtidos exatamente da mesma forma (LANÇAS, 2004). É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo que a precisão avalia as proximidades entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra (INMETRO, 2007).

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (S), que utiliza um número significativo de medições (normalmente maior que 20).

$$\text{RSD \%} = \frac{S}{X_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

S = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = média das medidas em replicatas.

Para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de RSD% de até 20% são aceitáveis (BRITO *et al.*, 2003). A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

Repetitividade: é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, ou seja, mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo equipamento utilizado sob as mesmas condições de análise, mesmo local e repetições do ensaio em curto espaço de tempo. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) (INMETRO, 2008).

Precisão intermediária: também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), como por exemplo: diferentes analistas, diferentes equipamentos, e diferentes dias de análise (INMETRO, 2007).

Reprodutibilidade: é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra efetuadas sob condições variadas de análise (mudança de operador, local, equipamentos, etc). Geralmente é obtida através de estudo de colaboração entre laboratórios (RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.5 Exatidão

A exatidão mede o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência como o valor aceito (INMETRO, 2007)

A exatidão é com frequência mais difícil de ser determinada porque o valor verdadeiro é geralmente desconhecido. Então, um valor aceito precisa ser utilizado em seu lugar. A exatidão é expressa em termos do erro absoluto ou erro relativo (SKOOG *et al.*, 2008) e é calculada de acordo com a equação 4.

$$R\% = \frac{C_1 \times C_2}{C_3} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu, na otimização e validação do método QuEChERS modificado para a extração de agrotóxicos em mel. A quantificação de agrotóxicos foi realizada por GC-ECD, onde se avaliou os melhores parâmetros analíticos para determinação de todos os compostos.

Os parâmetros analíticos avaliados na etapa de validação foram: linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, Limite de Detecção (LOD), de Limite de Quantificação (LOQ) e efeito matriz.

3.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento do método está descrita a seguir:

- Agitador vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balança analítica AND, modelo SV-200 (Japão);
- Centrífuga Thermo Fisher Scientific, modelo IEC CENTRA CL2 (Waltham, MA, EUA);
- Centrífuga 12 x 15 mL (Centribio, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3 (Millipore, Bedford, MA, EUA);
⇒ Sistema GC-ECD, Varian (Palo Alto, EUA) CP 3800 (Figura 3), equipado com:
 - Amostrador automático CP 8410;
 - Injetor modelo 1079 com Controle Pneumático Eletrônico (EPC);
 - Detector por Captura de Elétrons (ECD), isótopo ^{63}Ni ;
 - Sistema de aquisição de dados através do software Star Workstation 6.0.
- Coluna capilar VF-5 (5% fenil e 95% metilpolisiloxano) de sílica fundida, 30 m de comprimento; 0,25 mm de d.i. e 0,25 μm de espessura de filme;

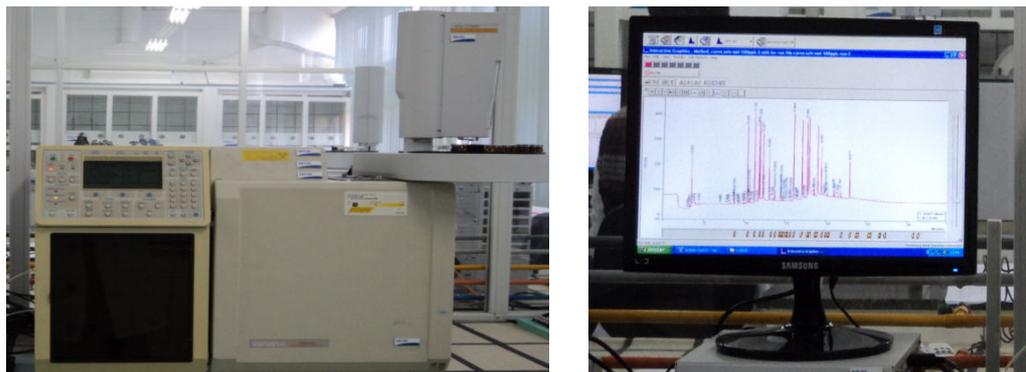


Figura 3 – Sistema GC-ECD utilizado no trabalho.

3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Ácido etilenodiaminotetracético sódico (Na_2EDTA) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Synth, Brasil);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3® (resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$);
- Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Gás nitrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil);
- Gás hélio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil);
- Sulfato de magnésio anidro (J.T. Baker, Japão);
- Cloreto de sódio P. A. (Merck, Brasil);
- Amina primária secundária (PSA) com tamanho de partículas de $40 \mu\text{m}$ - Bondesil (Varian, EUA);
- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 2,0 mL;
- Vidraria comum de laboratório;
- Padrões sólidos dos agrotóxicos, adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer, Alemanha, conforme Tabela 11.

3.3 Padrões analíticos dos agrotóxicos analisados

A tabela 11 lista algumas informações sobre os compostos analisados neste estudo.

Tabela 11 - Relação de todos os agrotóxicos analisados por GC-ECD, com informações de pureza, classe, grupo químico e fórmula molecular.

Agrotóxicos	Grau de pureza (%)	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular*
4,4-DDE	98,5	I	Organoclorado	C ₁₄ H ₈ Cl ₄
Bifentrina	99,5	A/I	Piretróide	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂
Bromofós metílico	99,5	I	Organofosforado	C ₈ H ₈ BrCl ₂ O ₃ PS
Cialotrina lambda	98,0	I	Piretróide	C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃
Cipermetrina	92,0	I/ Form	Piretróide	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃
Clortalonil	98,5	F	Ftalonitrila	C ₈ Cl ₄ N ₂
Clorpirifós etílico	99,5	A/I	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Clorpirifós metílico	97,0	Organ	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Cresoxim metílico	99,5	F	Estrobilurina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄
Dieldrin	97,5	I	Organoclorado	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O
Endosulfam alfa	96,0	I/Form/A	Clorociclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S
Endosulfam beta	98,0	I/Form/A	Clorociclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S
Endosulfam sulfato	99,5	I/Form/A	Clorociclodieno	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S
Endrim	99,5	I	Organoclorado	C ₁₂ H ₈ Cl ₆ O
Fipronil	96,5	I	Pirazol	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS
HCH-gama	98,5	I	Organoclorado	C ₆ H ₆ Cl ₆
Heptacloro	98,5	I	Organoclorado	C ₁₀ H ₅ Cl ₇
Heptacloro epóxido	98,0	I	Organoclorado	C ₁₀ H ₅ Cl ₇ O
Hexaclorobenzeno	99,5	I	Fungicida	C ₆ Cl ₆
Malationa	99,0	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Quintozeno**	99,9	Fg	Cloroaromático	C ₆ Cl ₅ NO ₂
Tetradifona	98,5	A	Clorodifenilsulfona	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S
Trifloxistrobina	99,0	Fg	Oximinoacetato	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄
Trifluralina	97,5	H	Dinitroanilina	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄

**Padrão interno.

A: acaricida; F: formicida; Fg: fungicida; H: herbicida; I: inseticida; Form: formicida; Organ: organoclorado.

*As estruturas moleculares destes compostos estão apresentadas no anexo 1, ao final deste trabalho.

Preparou-se individualmente, 10 mL da solução analítica estoque 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico considerando a pureza dos padrões sólidos, conforme recomendado na literatura (GARP, 1999). A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila grau HPLC, as

soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após, foram preparadas soluções analíticas individuais de cada composto em estudo, na concentração de 100 mg L^{-1} , em acetonitrila. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura na concentração 10 mg L^{-1} contendo todos os agrotóxicos (em acetonitrila). A partir da solução padrão 10 mg L^{-1} , preparou-se uma mistura na concentração $1,0\text{ mg L}^{-1}$ para agrotóxicos.

Para injeção no sistema GC-ECD, as soluções analíticas foram preparadas nas concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 75,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os agrotóxicos, em acetonitrila e no extrato da matriz (mel).

3.4 Otimização do sistema cromatográfico GC-ECD para determinação dos agrotóxicos

Devido à complexidade da matriz trabalhada vários ensaios, Tabela 12, foram feitos a fim de obter resultados confiáveis frente à análise cromatográfica. Após a escolha do melhor método analítico, realizou-se a etapa de validação do método.

A otimização das condições cromatográficas foram feitas através de testes com variações de temperatura de injeção do sistema cromatográfico, tempo e volume de injeção da amostra. Conforme item 4.1, segue a otimização dos principais parâmetros do sistema cromatográfico GC-ECD para determinação dos agrotóxicos em estudo.

3.5 Otimização do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em mel

Neste trabalho foram realizadas modificações no método QuEChERS original proposto por ANASTASSIADES *et al.* (2003), e também no método proposto por BLASCO *et al.*, (2011). No entanto, foram realizados alguns ensaios anteriores a otimização do método de análise para amostras de mel, sendo esta uma importante etapa da análise para obtenção de resultados confiáveis. (PRESTES, 2011). Os ensaios, segundo Tabela 12, foram otimizados para avaliação da extração dos agrotóxicos analisados por GC-ECD.

Tabela 12 - Relação dos diferentes ensaios realizados para os agrotóxicos analisados neste trabalho para escolha do melhor método de análise.

Ensaio	Nível de fortificação	Extração	Clean-up
E1	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	2,5 g amostra (45 °C) + 5,0 mL de EDTA Na ₂ 0,1 mol L ⁻¹ (45 °C) + 5,0 mL de acetonitrila, agitação em vortex (3 min) + 6,0 g MgSO ₄ + 1,5 g NaCl, agitação manual (1 min) e centrifugação (8 min e 3500 rpm)	a) Todo o extrato cartuchos diol (500 mg) e injeção; b) todo o extrato cartuchos STRATA-X (500 mg) e injeção; c) todo o extrato em cartuchos C ₁₈ (500 mg), injeção.
E2	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	a) 2,5 g amostra (45 °C) + 5,0 mL de EDTA Na ₂ 0,1 mol L ⁻¹ (45 °C) + 5,0 mL de acetonitrila, agitação em vortex (3 min), + 4,0 g MgSO ₄ + 3,0 g NaCl, agitação manual (1 min) e centrifugação (8 min e 3500 rpm) e análise; b) Utilizou-se mesmo teste, mas com 1,5 g NaCl.	a) 1,0 mL sobrenadante + 120 mg de MgSO ₄ + 100 mg de PSA, agitação manual (1 min), centrifugação (8 min e 3500 rpm) e injeção; b) Igual <i>clean-up</i> .
E3	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	5,0 g amostra (45 °C) + 10,0 mL de água (45 °C) + 10,0 mL de acetonitrila, agitação em vortex (3 min) + 6,0 g MgSO ₄ + 1,5 g NaCl, agitação manual (1 min) e centrifugação (8 min e 3500 rpm).	4,0 mL sobrenadante + 600 mg de MgSO ₄ + 500 mg de PSA, agitação manual (1 min), centrifugação (8 min e 3500 rpm) e injeção.
E4	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	2,5 g amostra (45 °C) + 5,0 mL de água (45 °C) + 5,0 mL de acetonitrila 1% (v/v) ácido acético, agitação em vortex (3 min), + 6,0 g MgSO ₄ + 1,5 g NaCl, agitação manual (1 min), centrifugação (8 min e 3500 rpm) e injeção.	2,0 mL sobrenadante + 150 mg de MgSO ₄ + 50 mg de PSA, agitação manual 1 min, centrifugação (8 min e 3500 rpm) e injeção.
E5	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	2,5 g amostra (45 °C) + 5,0 mL de EDTA Na ₂ 0,1 mol L ⁻¹ (45 °C) + 5,0 mL acetonitrila, agitação em vortex (3 min), + 6,0 g MgSO ₄ + 1,5 g NaCl, agitação manual (1 min), centrifugação (8 min e 3500 rpm) e injeção.	a) 2,0 mL sobrenadante + 120 mg de MgSO ₄ + 50 mg de PSA, agitação manual (1 min), centrifugação (8 min e 3500 rpm) e injeção; b) Igual <i>clean-up</i> , porém com 100 mg de PSA e injeção.

3.5.1 Otimização da etapa de *clean-up* dispersivo

Os extratos orgânicos obtidos após etapa de extração de amostras de mel foram submetidos a uma etapa de *clean-up* a fim de melhorar a qualidade dos mesmos para posterior análise cromatográfica. Observou-se que os valores de recuperação para alguns dos agrotóxicos ficaram acima de 120%, possivelmente devido à presença de interferentes provenientes da matriz do mel, bem como, para outros este valor ficou abaixo de 70%. Sendo assim, constatou-se a necessidade de otimização da etapa de *clean-up* dispersivo, através da utilização de alguns sorventes, tais como: amina primária secundária (PSA), C₁₈, diol e sulfato de magnésio.

A avaliação do *clean-up* foi realizada transferindo-se diretamente 2 mL do extrato líquido “branco” para um tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), seguido de fortificação com os agrotóxicos estudados. Após, realizou-se a adição dos sorventes que foram testados, sendo realizada uma agitação em vortex por 1 min, seguido de centrifugação a 3500 rpm por 8 min, com posterior análise por GC-ECD. Desta forma, foi possível escolher os sorventes mais eficientes para este método de extração, sem ocorrer perdas dos analitos de interesse.

3.5.2 Escolha da amostra para etapa de validação

Diferentes amostras de méis foram testadas, a fim de comprovar a ausência de agrotóxicos, ou seja, para confirmar que se trata de amostra “branco”. A amostra utilizada para a etapa de validação foi obtida de colméias que estão próximas de flores silvestres, tais como, a aroeira vermelha, espécie *Schinus terebinthifolia*, árvore brasileira da família das *Anacardiaceae*; flores de eucalipto, gênero *Eucalyptus*; unha de gato, família das *Rubiáceas* e citrus, gênero de plantas da família *Rutaceae*.

Quanto a classificação físico-química, realizada em laboratório de análises físico-químicas, o mel utilizado neste estudo, caracteriza-se por apresentar teor de umidade de 19,6%, teor de acidez de 23 mEq kg⁻¹, apresentou teores de açúcares e sólidos solúveis dentro da faixa permitida, de acordo com a legislação vigente, como citado no item 2.2.4, tais substâncias encontradas foram: aminoácidos, proteínas e enzimas, sendo portanto, um mel puro.

3.6 Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos em mel empregando GC-ECD

O método QuEChERS modificado foi utilizado para validação e os seguintes parâmetros foram avaliados: curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz.

3.6.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada a partir das soluções analíticas contendo todos os agrotóxicos em estudo, preparadas conforme descrito no item 3.3, no solvente acetonitrila e no extrato do mel, nas concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 75,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas analíticas no solvente foram injetadas uma vez e as curvas no extrato da matriz (mel) foram injetadas três vezes e os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do *software Workstation Version 6.0* da Varian. A partir desses dados foi avaliado o coeficiente de determinação (r^2), obtendo assim a linearidade das curvas analíticas.

3.6.2 Limite de Detecção (LOD) e limite de Quantificação (LOQ)

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas, de cada um dos compostos estudados, procedeu-se à determinação da estimativa do LOD do instrumento (LODi) e do método (LODm), bem como do LOQ do instrumento (LOQi) e do método (LOQm) (PRESTES, 2011).

A partir das áreas e do RSD% (6 réplicas), de cada composto presente nas seis soluções analíticas estudadas, aplicando-se a equação 5, em que obteve-se o LOD correspondente a 3 vezes o ruído da linha de base, e LOQ correspondente à concentração que produz uma relação sinal-ruído igual a 10, equação 6.

$$\text{LOD } (\mu\text{g L}^{-1}) = 3 \text{ S/R} \quad (5)$$

$$\text{LOQ } (\mu\text{g L}^{-1}) = 10 \text{ S/R} \quad (6)$$

Onde:

S: sinal das áreas obtidas;

R: ruído da linha de base.

Multiplicando-se o valor estimado do LOD_i pelo fator de concentração ou diluição do método de extração (fator = 2), obtém-se a estimativa do LOD_m, em $\mu\text{g kg}^{-1}$. A partir do LOD_i, aplicando-se a equação 7, obtém-se o LOQ_i.

$$\text{LOQ}_i (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{LOD}_i \times 3 \quad (7)$$

Multiplicando-se o LOQ_i pelo fator de concentração ou diluição do método de extração, obtém-se o LOQ_m estimado. Mas, considera-se o valor verdadeiro do LOQ_m ($\mu\text{g kg}^{-1}$), como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentar recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20%.

3.6.3 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método

Neste trabalho, para o estudo da exatidão do método, foram utilizados ensaios de fortificação, avaliando-se, dessa maneira, a recuperação dos compostos em estudo. Foram realizadas seis fortificações das amostras “branco” em três níveis diferentes de concentração, totalizando 18 análises. A recuperação dos compostos foi avaliada nas concentrações de 10, 0; 20, 0 e 50, 0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A exatidão, expressa em percentagem de recuperação, foi calculada conforme a equação 8 (INMETRO, 2007):

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

C₁ = Concentração determinada na amostra fortificada;

C₂ = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C₃ = Concentração usada para fortificação.

O procedimento de extração das amostras fortificadas foi realizado 6 vezes, para cada um dos níveis de fortificação e, para isso, utilizaram-se amostras “branco”, isto é, livre da

presença dos agrotóxicos em estudo, sendo que cada nível de fortificação foi injetado uma vez, obtendo-se um $n= 6$ (6 extrações x 1 injeção).

Inicialmente, para o procedimento de extração do método QuEChERS modificado, pesou-se $2,5 \pm 0,1$ g de mel homogêneo, diretamente em tubos de polipropileno (capacidade 50 mL), com aquecimento até 45 °C para melhor homogeneização do mel. Logo após, efetuou-se a fortificação em 3 níveis, utilizando-se micropipetadores automáticos, nas concentrações de 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os compostos analisados.

Após fortificação, os méis foram homogeneizados através de agitação em vortex por 3 min. Adicionou-se, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 5,0 mL de solução Na_2EDTA 0,1 mol L^{-1} na temperatura de 45 °C, em cada tubo e, após efetuou-se agitação em vortex, por 3 min. Em seguida, adicionou-se 5,0 mL de acetonitrila em cada tubo e, após fechá-los, agitou-se em vortex por mais 3 min, a fim de obter completa homogeneização da amostra. Logo após, acrescentou-se 6,0 e 1,5 g, respectivamente, de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. Repetiram-se as agitações manualmente por 1 min, assegurando-se da completa interação entre o extrato líquido e os reagentes sólidos, com posterior etapa de centrifugação a 3500 rpm, durante 8 min.

Para a etapa de *clean-up* dispersivo, transferiu-se diretamente 2 mL de extrato líquido sobrenadante para outro tubo de polipropileno (capacidade de 15 mL), já contendo 120 mg de sulfato de magnésio anidro e 100 mg de amina primária secundária, sendo novamente agitados manualmente por 1 min, e também centrifugados como citado anteriormente.

Após, em *vial* com capacidade para 2 mL, foram adicionados 1,0 mL do extrato obtido após o *clean-up* dispersivo para injeção no sistema GC-ECD.

As Figuras 4 e 5 representam as etapas de extração/partição e *clean-up* realizados durante o procedimento de extração de amostras de mel.

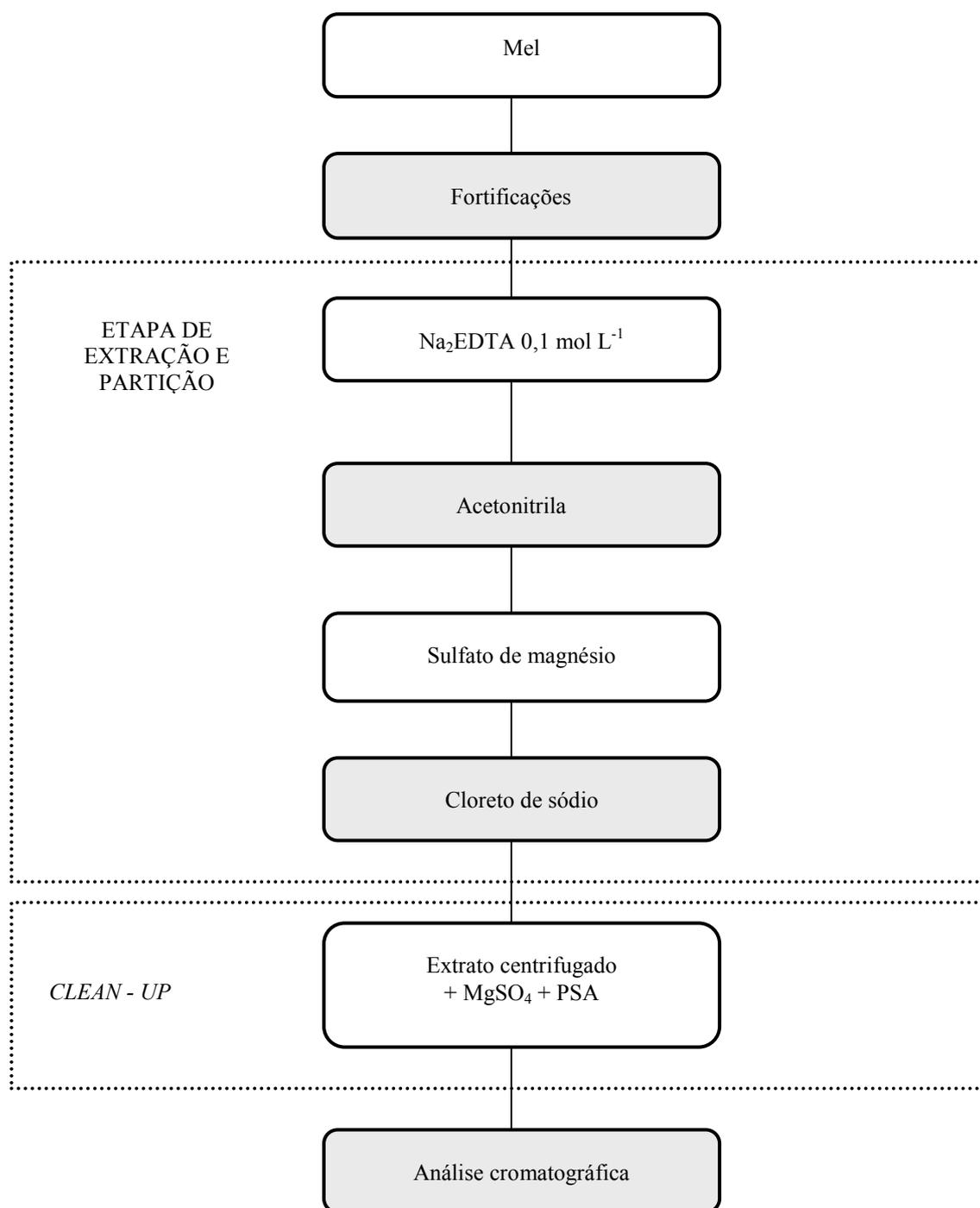


Figura 4 - Representação esquemática do método de determinação de resíduos de agrotóxicos em mel.

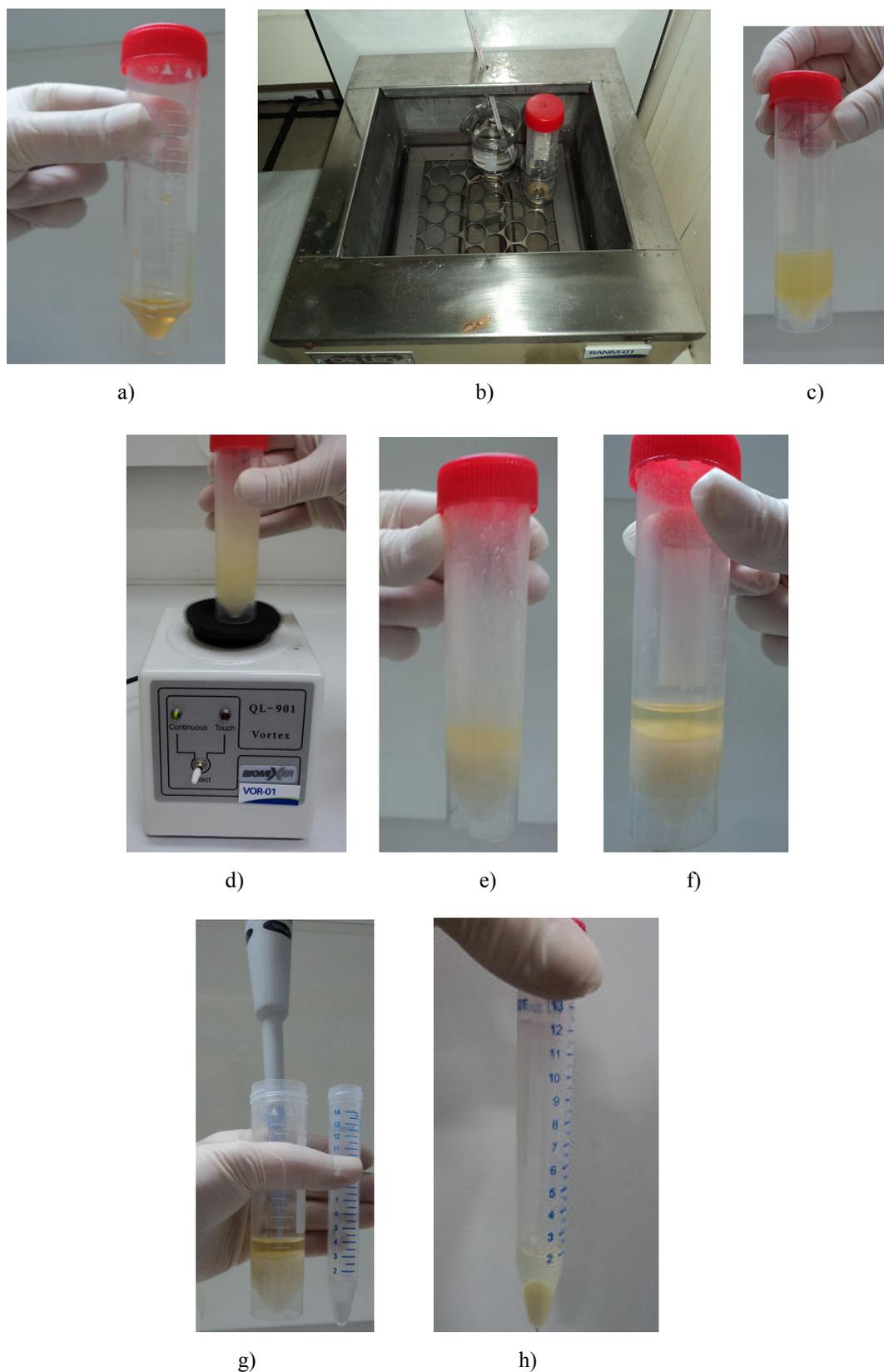


Figura 5 – Algumas etapas e materiais utilizados durante o procedimento de extração e *clean-up* do método QuEChERS modificado: a) tubo para extração com amostra de mel; b) tubo contendo a amostra e a solução de Na_2EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em banho maria para aquecimento a $45 \text{ }^\circ\text{C}$; c) extrato após adição de Na_2EDTA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e MeCN; d) agitação de frasco após adição das soluções; e) adição dos sais MgSO_4 e NaCl para a etapa de partição; f) extrato

após etapa de centrifugação; g) extrato centrifugado para posterior etapa de *clean-up*; h) extrato de *clean-up* após centrifugação.

3.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão pode ser avaliada através de um valor numérico (RSD) que é calculado através da Equação 9.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{S}{X_m} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

S = estimativa de desvio padrão absoluto;

$$s = \{(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2};$$

x_i = valores individuais;

X_m = média das medidas em replicatas;

n = número de medidas.

Neste trabalho, o estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se três injeções de cada concentração das soluções analíticas preparadas no extrato da matriz, no sistema GC-ECD.

A precisão do método, em termos de repetitividade (RSDr) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Foram realizadas seis extrações de cada nível de fortificação e cada um dos extratos foi injetado uma vez.

A precisão intermediária (RSDpi) do método foi avaliada utilizando dias diferentes para a injeção dos padrões dos agrotóxicos e das amostras fortificadas.

3.7 Avaliação do efeito matriz na resposta cromatográfica

Para desenvolvimento de um método analítico, os possíveis efeitos de matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração, mesmo para comprovar a ausência ou presença do fenômeno sobre uma larga faixa de concentração do analito na matriz. Para isso, duas séries de soluções padrão foram preparadas, sendo uma em solvente puro (acetoneitrila) e a outra em extratos da matriz (mel).

Para a avaliação da existência de efeito matriz nos extratos do mel nas análises cromatográficas realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas obtidas empregando-se soluções analíticas em acetonitrila e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas em extrato de mel “branco”. O cálculo foi efetuado através da equação 10:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas na matriz (mel);

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente (acetonitrila).

Dessa maneira, verificou-se se que a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2001). Neste caso, recomenda-se a construção das curvas analíticas em extrato da matriz para minimizar o efeito matriz.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização do sistema cromatográfico GC-ECD para determinação dos compostos

Para a otimização das condições cromatográficas utilizadas na separação dos agrotóxicos selecionados, foram preparadas soluções analíticas contendo uma mistura dos princípios ativos dos agrotóxicos em estudo, observando dessa maneira os tempos de retenção (t_R) e o perfil de separação desses compostos.

As condições cromatográficas utilizadas para o sistema GC-ECD, neste experimento, para análise dos 23 compostos em mel, foram:

- Programação da temperatura do injetor por Vaporização com Temperatura Programada (PTV): temperatura inicial de 100 °C (0,1 min), aumento de temperatura até 280 °C por 28,0 min, após diminuição da temperatura até 100 °C;
- Injeção *splitless* com programação da válvula do injetor PTV: inicialmente válvula do *split* aberta na razão de 1/50, após 0,01 min válvula do *split* fechada, após mais 2,0 min válvula do *split* aberta na razão de 1/40 e após 10,0 min, válvula *split* aberta na razão 1/20;
- Volume de injeção: 1 µL;
- Programação da temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 50 °C (1,0 min), com incremento até 65 °C por 10 °C min⁻¹, posteriormente com 180 °C por 25 °C min⁻¹ e até 280 °C por 5 °C min⁻¹ totalizando 35 min de corrida cromatográfica;
- Gás de arraste: hélio na vazão inicial de 1,3 mL min⁻¹;
- Programação da pressão do gás de arraste: pressão inicial de 16,4 psi mantida por 1,0 min, após incremento de pressão de 0,20 psi min⁻¹ até 21 psi;
- Vazão do gás *make-up*: nitrogênio ultra puro na vazão de 28 mL min⁻¹;
- Coluna capilar: apolar VF-5 (5% fenil-95% metil silicone) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme;
- Temperatura do detector: 300 °C.

Tabela 13 - Agrotóxicos analisados com seus respectivos tempos de retenção (t_R).

Analitos	t_R (min)
Triclorfom	8,7
Trifluralina	10,3
Hexaclorobenzeno	11,1
Quintozeno	11,7
Lindano (HCH-gama)	11,8
Clorpirifós metílico	11,9
Clorotalonil	12,3
Cresoxim metílico	12,8
Heptacoloro	13,6
Malationa	14,4
Clorpirifós etílico	14,7
Bromofós metílico	15,1
Fipronil	15,5
Heptacoloro epóxido	16,0
Endossulfam alfa	17,0
4,4-DDE	17,6
Dieldrin	17,8
Endrim I	18,5
Endossulfam beta	18,9
Endrim II	19,4
Trifloxistrobina	20,1
Endossulfam sulfato	20,9
Bifentrina	21,8
Tetradifona	22,9
Cialotrina lambda	23,7

A Figura 6 apresenta um cromatograma obtido por GC-ECD para uma solução analítica na matriz (mel) contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico estudado.

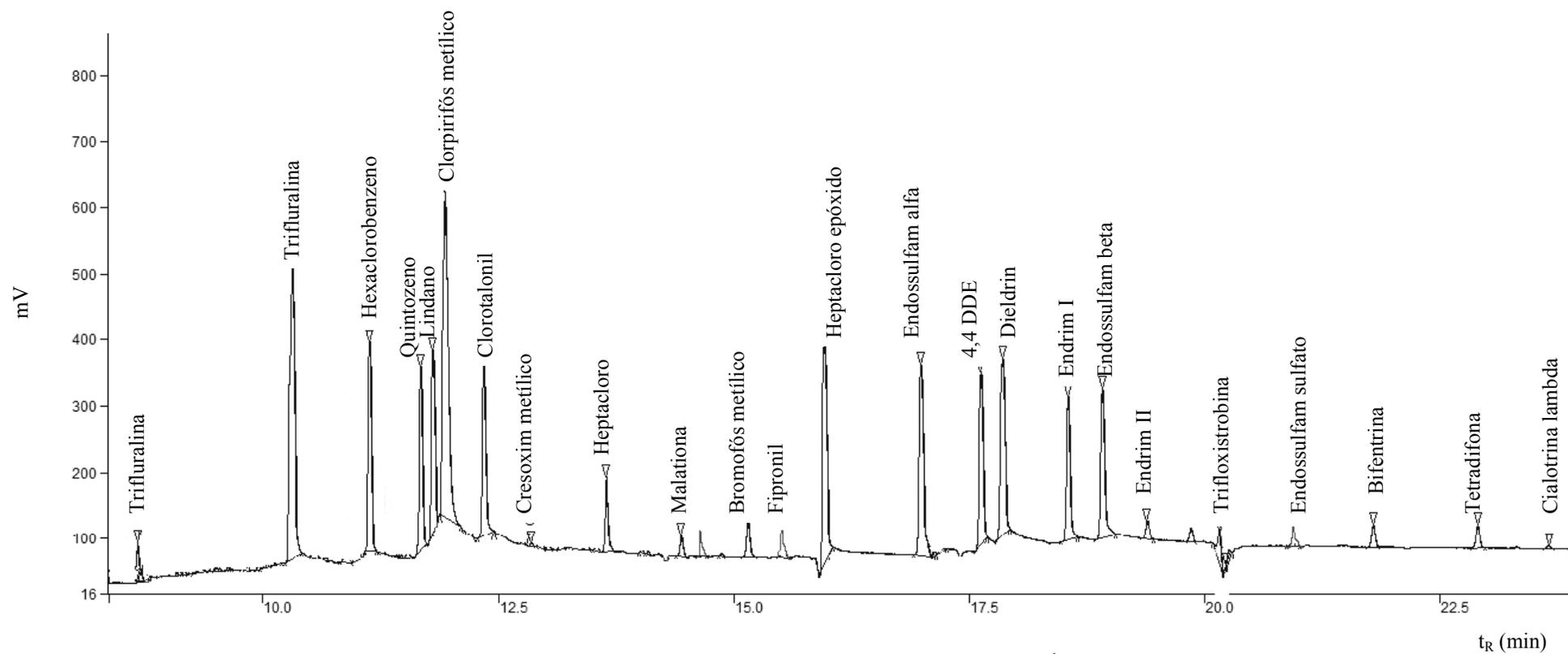


Figura 6 - Cromatograma obtido para um solução analítica na matriz (mel) contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos em estudo.

4.2 Otimização do método de extração QuEChERS modificado

4.2.1 Avaliação dos ensaios de extração

A partir dos testes preliminares foi possível avaliar quais dos métodos de extração apresentaram as melhores recuperações para os compostos em estudo. Os ensaios de extração do E1 a E5 foram otimizados para extração dos agrotóxicos em mel, seguido de determinação por GC-ECD. De maneira geral, observa-se na Tabela 14, que para alguns desses ensaios realizados, os compostos apresentaram baixos valores de recuperação (< 70%), enquanto que para outros, valores maiores que 120% foram encontrados. Isto demonstra a grande dificuldade para otimização do método QuEChERS modificado para extração desses compostos em amostra de mel.

Tabela 14 - Recuperações médias (%) obtidas nos ensaios de extração.

Compostos	Valores de recuperação (%)							
	E1 a	E1 b	E1 c	E2	E3	E4	E5 a	E5 b
Triclorfom	91,3	126,0	35,9	38,6	67,7	25,6	84,3	82,9
Trifluralina	102,6	33,3	22,1	98,3	94,9	58,0	95,1	102
Hexaclorobenzeno	103,4	127,1	93,8	85,9	81,9	119,9	85,9	80,2
Lindano	103,8	375,1	65,6	101,2	98,6	71,3	93,3	101,3
Cresoxim metílico	104,1	237,6	56,6	64,5	86,5	282,5	71,2	93,9
Heptacloro	93,7	46,8	31,9	109,3	98,1	54,2	82,4	85,8
Malationa	141,5	79,9	57,1	86,9	86,5	284,9	87,1	102,9
Cloripirifós	99,5	88,9	23,3	102,0	99,9	57,4	80,4	106,1
Bromofós metílico	93,4	64,9	59,5	122,8	90,5	39,3	71,4	85,0
Fipronil	103,8	72,9	42,4	82,0	64,4	93,0	82,3	97,3
Heptacloro Epóxido	550,7	265,3	55,5	91,9	90,3	370,4	88,4	101,5
Endossulfan alfa	1058,0	61,4	43,2	132,8	83,2	62,4	59,8	108,7
4,4 DDE	92,1	108,3	63,8	94,1	100,4	46,1	69,8	100,2
Dieldrin	42,5	30,0	59,6	103,9	100,3	47,8	59,0	105,8
Endrin I	90,5	96,5	60,0	85,8	85,8	33,9	72,8	101,8
Endosulfam beta	84,5	81,1	-	93,6	97,4	57,4	77,6	109,5
Endrin II	87,0	100,3	-	95,3	35,5	66,0	75,9	98,8
Trifloxistrobina	96,8	56,3	-	104,7	81,3	91,8	87,5	110,2
Endosulfam sulfato	50,8	-	-	119,7	97,2	82,4	83,5	105,8
Bifentrina	73,9	-	-	122,6	83,6	72,9	86,1	92,1
Tetradifona	101,8	-	-	131,6	98,0	-	85,6	111,4
Cialotrina - lambda	88,4	-	-	123,4	150,2	-	128,2	131,8

Os ensaios demonstrados caracterizaram-se por testar diferentes quantidades de sais utilizados na etapa de extração, porém a maior dificuldade foi quanto a relação tipo de sorvente e quantidade necessária na etapa de *clean-up*. De acordo com o item 3.5, os ensaios de extração E1: E1 a, E1 b e E1 c utilizaram diferentes tipos de cartuchos para a etapa de limpeza do extrato (*clean-up*), porém não se obteve sucesso com nenhum destes ensaios, pois não ocorreu remoção eficiente dos interferentes contidos nos extratos da matriz, principalmente pela alta quantidade de açúcar. Os testes E2 a E5 foram realizados de maneira semelhante, sendo que a única diferença entre eles consiste na quantidade de PSA e $MgSO_4$ utilizados nos testes de *clean-up*. O ensaio E5 foi o que apresentou valores de recuperação mais próximos da faixa entre 70 e 120%, além disso, apresentou um extrato mais limpo em relação aos demais ensaios, conseqüentemente, foram testadas diferentes quantidades destes sorventes, com a finalidade de obter valores aceitáveis de recuperações.

Para garantir, de maneira simples, uma maior eficiência do procedimento de preparo de amostra, usualmente, é utilizada a menor quantidade possível de amostra, desde que esta garanta representatividade estatística ao resultado final (LUTZ, 2010).

A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de agrotóxicos com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e *clean-up*, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, além de observar a legislação ambiental (PRESTES *et al.*, 2009). Dessa forma, os solventes e os volumes de solventes escolhidos para extração dos agrotóxicos neste estudo foram: 5 mL de uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Na_2EDTA (VIDAL, *et al.*, 2009) e 5 mL de acetonitrila, pois apresentaram resultados de recuperação satisfatórios em relação a outros solventes testados, como a água ultrapura, por exemplo.

De acordo com a Tabela 15, contendo os dados sobre a constante de equilíbrio para a reação de um metal com um ligante é chamada de constante de formação, K_f , ou constante de estabilidade. Este valor, para um complexo com EDTA, é definido em termos da espécie Y^{4-} que reage com o íon metálico. A Tabela mostra que os valores das constantes de formação, para a maioria dos complexos de EDTA, são muito grandes, e tendem a ser ainda maiores quanto mais carga positiva tiverem os cátions a serem complexados (HARRIS, 2009). O efeito quelato é a capacidade de ligantes multidentados formarem complexos metálicos mais estáveis que os formados por ligantes monodentados que tenham estrutura semelhante.

Pode-se concluir que a utilização da solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2EDTA foi necessária para melhor homogeneizar as amostras de mel, bem como, para obter extratos lípidos. Esta

homogeneização foi auxiliada pelo aquecimento desta solução e da amostra de mel, a uma temperatura de 45 °C. Foram utilizados outros reagentes a fim de obter estes mesmos resultados durante a etapa de extração, juntamente com a adição de acetonitrila, porém os extratos obtidos ao final de cada procedimento de extração apresentaram maior viscosidade, sendo indicativo de que pigmentos provenientes da matriz ainda estavam presentes no extrato sobrenadante. Logo, a utilização da solução Na₂EDTA mostrou ser eficiente, pois se obteve maior homogeneização da amostra de mel durante a etapa de extração e extratos mais límpidos na presença da solução 0,1 mol L⁻¹ Na₂EDTA. O volume utilizado de mel:solução (1:2, m/v), proporcionou bons resultados de recuperação.

Tabela 15 – Constantes de formação de alguns complexos metal – EDTA.

Íon	log k_f
Li ⁺	2,79
Na ⁺	1,66
K ⁺	0,80
Be ²⁺	9,20
Mg ²⁺	8,79
Ca ²⁺	10,69
Sr ²⁺	8,73
Ba ²⁺	7,86
Ra ²⁺	7,10
Sc ³⁺	23,10
Y ³⁺	18,09
La ³⁺	15,50
V ²⁺	12,70
Cr ²⁺	13,60
Mn ²⁺	13,87
Fe ²⁺	14,32
Co ²⁺	16,31
Ni ²⁺	18,62
Cu ²⁺	18,80
Ti ³⁺	21,30
V ³⁺	26,00
Cr ³⁺	23,40

Adaptação: Harris (2009)

Nota: A constante de formação de equilíbrio para a reação $M^{n+} + Y^{4-} \rightleftharpoons MY^{n-4}$. Os valores da tabela são válidos a 20 °C e para uma força iônica de 0,1 mol L⁻¹.

A acetonitrila também foi utilizada como solvente de extração, pois proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades. Além disso, a acetonitrila não é classificada como um agente carcinogênico e não é persistente no meio ambiente, e sua baixa volatilidade reduz a exposição do analista (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Conforme item 3.5, no qual são apresentados os ensaios de extração realizados, foram testadas diferentes quantidades de $MgSO_4$ e $NaCl$ na etapa de partição, sendo que a quantidade escolhida foi de 6,0 g de $MgSO_4$ e 1,5 g de $NaCl$, pois apresentaram melhores resultados de recuperação para os agrotóxicos estudados, comparada as outras quantidades avaliadas. A adição destes sais é utilizada para promover o efeito “*salting out*” em vários métodos multirresíduos, incrementando o nível de recuperação para analitos mais polares, além de diminuir a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PRESTES *et al.*, 2009).

A adição de $MgSO_4$ e $NaCl$ promove uma etapa de partição líquido-líquido, facilitando a remoção de componentes polares da matriz. Além disso, o $MgSO_4$ anidro é um agente secante muito eficiente, sendo sua hidratação um processo exotérmico, tendo como resultado um aquecimento do tubo utilizado entre 40 e 45 °C durante as etapas de extração/partição. Este aquecimento é favorável para extração dos agrotóxicos e ajuda a confirmar que a água está sendo removida da solução (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

4.2.2 Otimização da etapa de *clean-up* dispersivo

Vários estudos sugerem uma etapa de *clean-up* dos extratos para reduzir ou eliminar co-extrativos das amostras antes da análise cromatográfica (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998). No entanto, esta etapa pode resultar na perda parcial de agrotóxicos além de aumentar o tempo e o custo das análises (SCHENCK, 2002 & LEHOTAY, 2007). Para este método, esta etapa foi de fundamental importância para a obtenção de extratos sem a presença de interferentes provenientes da matriz.

A utilização de diferentes sorventes no ensaio E1, tais como, diol e C_{18} , não foi eficiente para efetuar a remoção total da pigmentação e interferentes presentes no extrato da matriz e, portanto, não se obteve sucesso na utilização deste ensaio.

PSA é um adsorvente de troca aniônica fraco, com a habilidade de remover ácidos graxos, açúcares, alguns pigmentos e outros co-extratos da matriz que formam pontes de

hidrogênio (MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004). A estrutura bidentada do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. As taxas de recuperação dos agrotóxicos obtidos pelo método QuEChERS modificado, utilizando diferentes quantidades de PSA em combinação com $MgSO_4$ rendeu bons resultados para este estudo. Embora a utilização de PSA resulte em extratos incolores, observou-se que aumentando a quantidade de PSA utilizado na etapa de *clean-up*, os valores de recuperação diminuem para alguns compostos. A explicação que justifica esse fato é que o PSA quando utilizado como sorvente, pode reter agrotóxicos contendo grupos ácido carboxílico em sua estrutura, reduzindo o potencial de recuperação destes compostos (LEHOTAY, 2007). Por outro lado, ao diminuirmos a quantidade de PSA, os extratos resultantes apresentam-se de forma mais escura e, como consequência são obtidos cromatogramas com maiores quantidades de interferência, e os valores de recuperação para a maioria dos compostos são mais altos, pois possuem maior interferência de co-extrativos presentes na matriz do extrato.

Foi utilizado também $MgSO_4$ como sorvente para esta etapa de *clean-up*, o qual apresenta como vantagem a remoção da água residual do extrato final, antes da injeção no sistema cromatográfico. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de co-extrativos polares da matriz (LUTZ, 2010). Desta maneira, o ensaio E5 b, caracterizado por possuir 120 mg de $MgSO_4$ e 100 mg de PSA foi o escolhido para extração de amostras de mel, pois apresentou cromatogramas mais limpos e, além disso, obteve-se melhores resultados de recuperação para os agrotóxicos estudados. O sorvente PSA utilizado na etapa de *clean-up* foi eficiente para efetuar a remoção de cera e açúcar presentes no extrato de mel, e então foi otimizada a quantidade de 100 mg PSA, juntamente com $MgSO_4$ para cada 2 mL de extrato. A representação esquemática do método otimizado está representada na Figura 7.

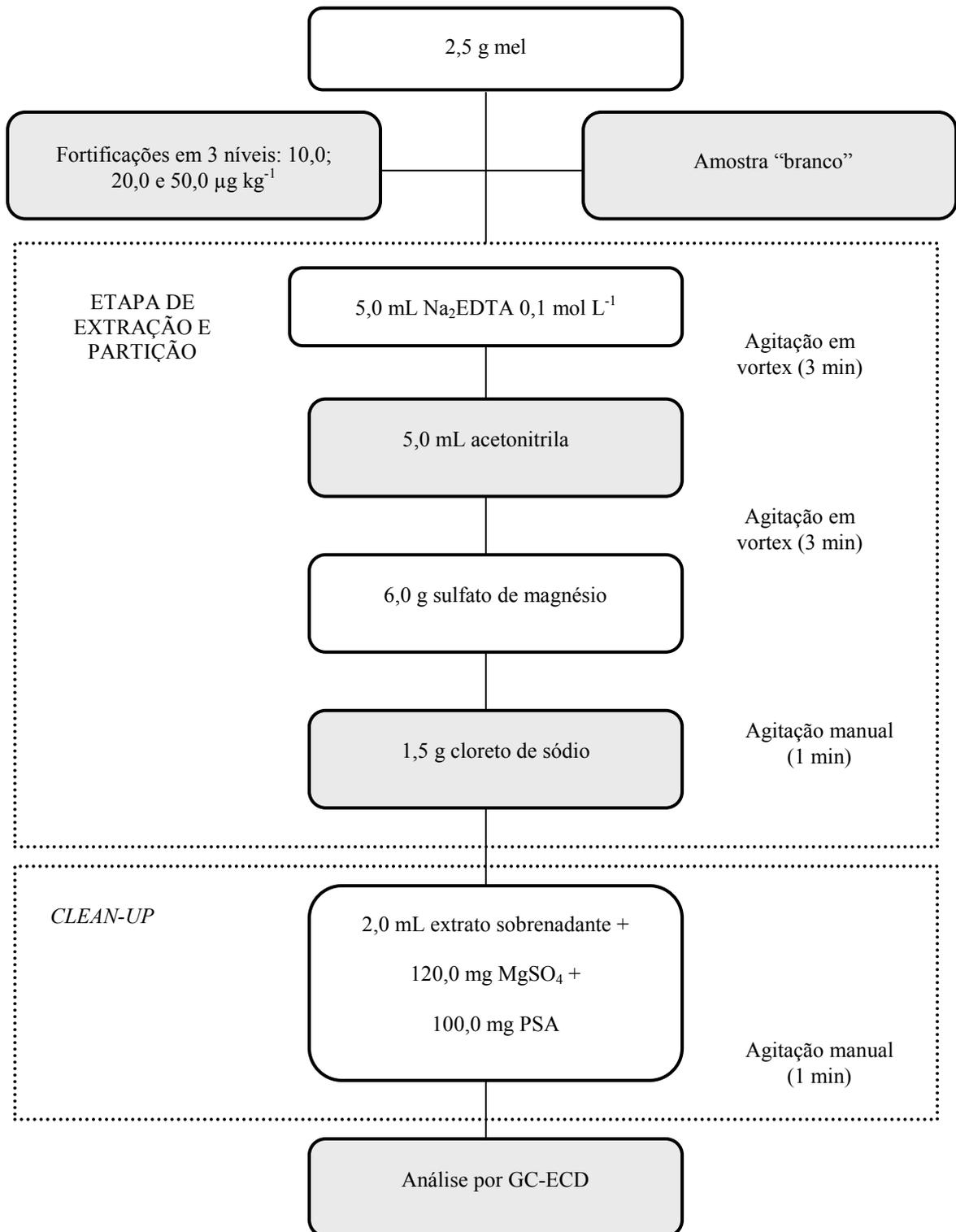


Figura 7 - Representação esquemática do método otimizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em mel, utilizando o método QuEChERS modificado.

4.2.3 Validação do método QuEChERS modificado

A partir dos testes previamente apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado (Figura 7) utilizado para a validação do método proposto e para a determinação da concentração residual dos agrotóxicos nas amostras de mel.

Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em solvente (acetoneitrila) e no extrato de mel (método QuEChERS modificado), assim foi possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz na determinação dos valores de LOD e LOQ (instrumento e método), da linearidade das curvas analíticas (faixa linear, equação da curva e coeficiente de determinação), uma vez que o efeito matriz pode influenciar os resultados, dependendo dos compostos e da técnica cromatográfica empregada.

Para a etapa de validação do método QuEChERS modificado foram necessárias amostras branco e, foram realizadas fortificações em 3 níveis de concentração (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Após extração das amostras, ocorreu a injeção no sistema GC-ECD.

A Figura 8 apresenta o cromatograma obtido por GC-ECD para amostra de mel “branco”, em que se percebe a inexistência de qualquer pico no tempo de retenção dos compostos estudados.

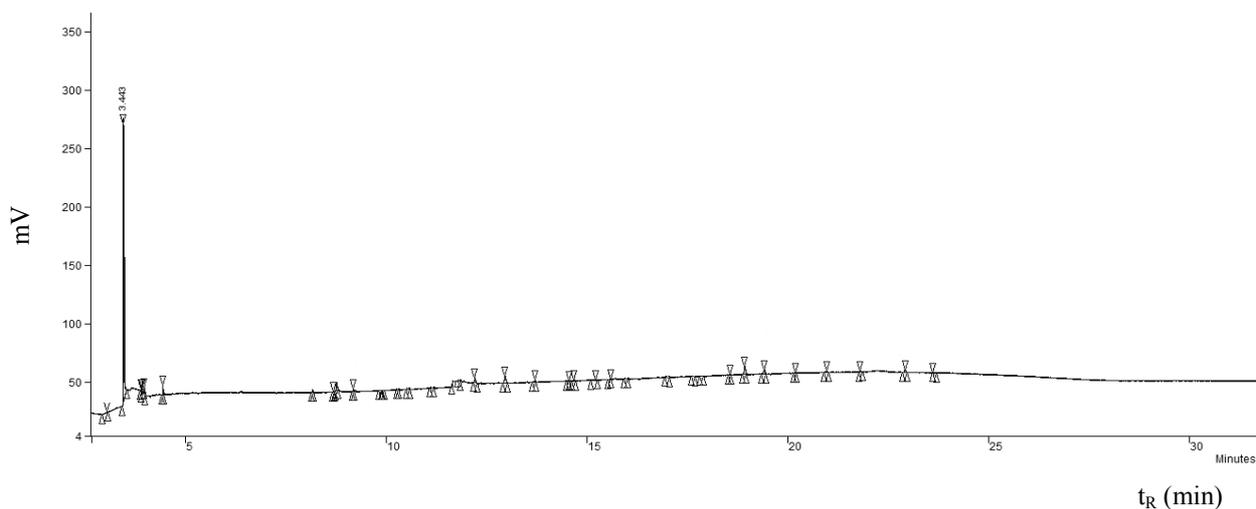


Figura 8 - Cromatograma obtido para amostra “branco” de mel.

4.2.4 Seleção do padrão interno

A seleção de um Padrão Interno (PI) deve obedecer aos seguintes critérios: “idealmente, a substância utilizada como padrão interno deve apresentar características físico – químicas similares às substâncias a serem quantificadas, ter tempo de retenção próximo a essas substâncias, não reagir com as substâncias ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada não coeluir com os agrotóxicos estudados na amostra. Este último requisito não é necessário quando a detecção é feita por espectrometria de massas, na qual cada composto produz um espectro característico” (KRULL E SWARTZ, 1998; CUADROS - RODRÍGUEZ *et al.*, 2001; LANÇAS, 2004).

Desta forma, selecionou-se como padrão interno de quantificação o composto quintozeno, pois não coelue com os compostos em estudo e não é permitido para uso agrícola, de acordo com o PNCRC (2010).

4.2.5 Análise dos solventes e reagentes pelo método QuEChERS modificado

Ao efetuar-se o procedimento de extração, não se observou nenhuma contaminação dos solventes e reagentes utilizados para extração do mel (Figura 9).

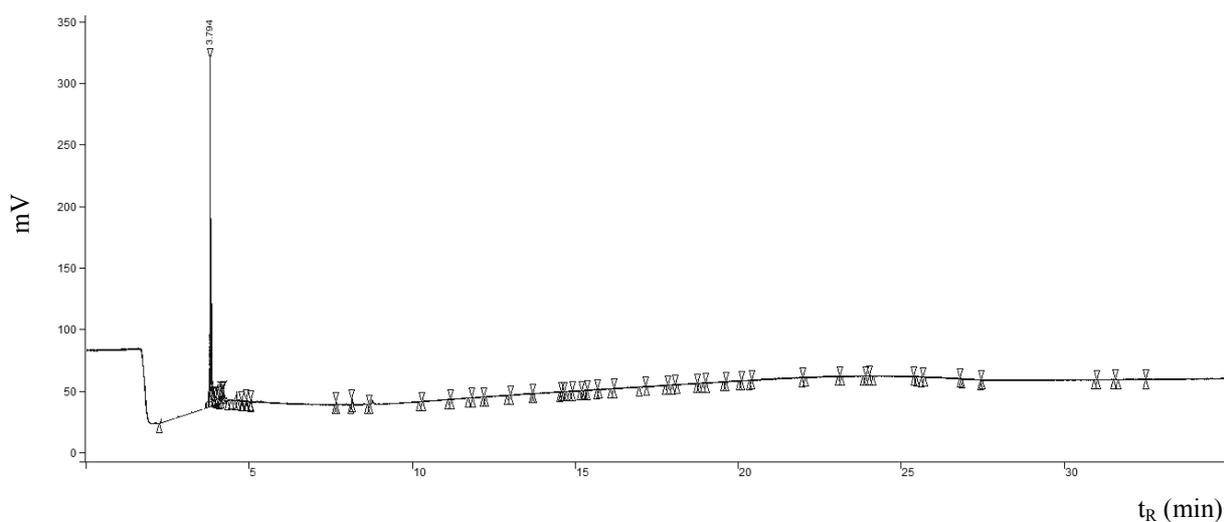


Figura 9 - Cromatograma obtido para solventes e reagentes utilizados durante o procedimento de extração de mel.

4.2.6 Curva analítica e linearidade

As Tabelas 16 e 17 apresentam as equações das curvas analíticas em solvente (acetoneitrila) e no extrato da matriz, o coeficiente de determinação (r^2) e o intervalo linear para os agrotóxicos estudados.

Tabela 16 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos em acetoneitrila, empregando QuEChERS modificado e GC-ECD.

Agrotóxicos	Equação da reta ($y = ax + b$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Triclorfom	$y = 6488,8x - 7174,5$	0,9910	5,0 – 100,0
Trifluralina	$y = 122373x - 124322$	0,9906	5,0 – 100,0
Hexaclorobenzeno	$y = 211863x - 178559$	0,9952	5,0 – 100,0
Lindano	$y = 171590x - 194286$	0,9916	5,0 – 100,0
Clorpirifós metílico	$y = 95738x - 103467$	0,9947	5,0 – 100,0
Clorotalonil	$y = 2193,5x - 2703,9$	0,9889	10,0 – 100,0
Cresoxim metílico	$y = 45759x - 74299$	0,9531	20,0 – 100,0
Heptacloro	$y = 22037x - 22299$	0,9913	5,0 – 100,0
Malationa	$y = 2048,9x - 2336$	0,9936	10,0 – 100,0
Clorpirifós etílico	$y = 7695,6x - 5868,5$	0,9930	5,0 – 100,0
Bromofós metílico	$y = 1885,9x - 3395,9$	0,8856	50,0 – 100,0
Fipronil	$y = 1365,4x - 2029,8$	0,9688	20,0 – 100,0
Heptacloro epóxido	$y = 302578x - 322127$	0,9912	5,0 – 100,0
Endossulfam alfa	$y = 237139x - 249716$	0,9949	5,0 – 100,0
4,4-DDE	$y = 207367x - 220396$	0,9908	5,0 – 100,0
Dieldrin	$y = 247437x - 276141$	0,9914	5,0 – 100,0
Endrim I	$y = 7883,9x - 7727,5$	0,9949	5,0 – 100,0
Endossulfam beta	$y = 179040x - 209558$	0,9910	5,0 – 100,0
Endrim II	$y = 63208x - 68419$	0,9920	5,0 – 100,0
Trifloxistrobina	$y = 6587,3x - 8221,1$	0,9916	5,0 – 100,0
Endossulfam sulfato	$y = 19939x - 21090$	0,9920	5,0 – 100,0
Bifentrina	$y = 10109x - 9772,1$	0,9949	5,0 – 100,0
Tetradifona	$y = 34510x - 35868$	0,9934	5,0 – 100,0
Cialotrina-lambda	$y = 240,51x - 381,13$	0,9438	20,0 – 100,0

Tabela 17 - Resultados obtidos para as curvas analíticas dos agrotóxicos no extrato da matriz, empregando QuEChERS modificado e GC-ECD.

Agrotóxicos	Equação da reta ($y = ax + b$)	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Triclorfom	$y = 58645x - 47344$	0,9912	5,0 – 100,0
Trifluralina	$y = 3000000x - 3000000$	0,9942	5,0 – 100,0
Hexaclorobenzeno	$y = 382514x - 367874$	0,9975	5,0 – 100,0
Lindano	$y = 262038x - 243748$	0,9931	5,0 – 100,0
Clorpirifós metílico	$y = 2000000x - 3000000$	0,9801	10,0 – 100,0
Clorotalonil	$y = 47207x - 46689$	0,9913	5,0 – 100,0
Cresoxim metílico	$y = 47207x - 46689$	0,9924	5,0 – 100,0
Heptacloro	$y = 28551x - 24069$	0,9917	5,0 – 100,0
Malationa	$y = 26003x - 24246$	0,9922	5,0 – 100,0
Clorpirifós etílico	$y = 5080,1x - 7350,2$	0,9888	10,0 – 100,0
Bromofós metílico	$y = 8329,2x - 7260,9$	0,9955	5,0 – 100,0
Fipronil	$y = 12031x - 18083$	0,9873	10,0 – 100,0
Heptacloro epóxido	$y = 412186x - 388857$	0,9948	5,0 – 100,0
Endossulfam alfa	$y = 283861x - 244988$	0,9957	5,0 – 100,0
4,4-DDE	$y = 94676x - 90692$	0,9918	5,0 – 100,0
Dieldrin	$y = 132473x - 138164$	0,9905	5,0 – 100,0
Endrim I	$y = 66959x - 69797$	0,9933	5,0 – 100,0
Endossulfam beta	$y = 100424x - 104999$	0,9907	5,0 – 100,0
Endrim II	$y = 17109x - 19134$	0,9923	5,0 – 100,0
Trifloxistrobina	$y = 213885x - 214709$	0,9992	5,0 – 100,0
Endossulfam sulfato	$y = 5246,2x - 4866,9$	0,9927	5,0 – 100,0
Bifentrina	$y = 23614x - 23853$	0,9920	5,0 – 100,0
Tetradifona	$y = 23728x - 22266$	0,9907	5,0 – 100,0
Cialotrina – lambda	$y = 4367,8x - 7023,1$	0,9532	10,0 – 100,0

Observando-se os coeficientes angulares “a” das equações das retas em solvente e no extrato da matriz, pode-se perceber que trifluralina e clorpirifós metílico apresentam maior sensibilidade para curva preparada no extrato matriz, dentre os agrotóxicos analisados por GC-ECD.

A partir dos resultados das equações das retas obtidas, conforme Tabelas 16 e 17, nota-se que os coeficientes de determinação (r^2) foram todos maiores que 0,99 para 78,3% para as curvas analíticas preparadas em solvente (acetonitrila), no entanto, para as curvas preparadas no extrato da matriz, a linearidade foi maior que 0,99 para 86,9% dos compostos.

Os compostos cialotrina-lambda, clorotalonil, cresoxim metílico e fipronil não apresentaram área média para no mínimo 2 concentrações, enquanto o composto bromofós metílico não apresentou área média para 4 concentrações, quando as soluções analíticas foram preparadas em acetonitrila. Os compostos clorpirifós metílico, clorpirifós etílico e cialotrina-lambda, não apresentaram área média para 2 concentrações, para as soluções analíticas preparadas no extrato da matriz, com valores r^2 menores que 0,99.

4.2.7 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método

Os valores de limite de detecção e de quantificação foram obtidos através da relação sinal/ruído como apresentados no item 3.7.2. Na Tabela 18 estão listados os valores de LOD e LOQ do instrumento e do método para os agrotóxicos estudados. As soluções analíticas utilizadas para este fim foram preparadas no extrato da matriz.

O método QuEChERS modificado otimizado neste trabalho alcançou baixos Limites de Detecção ($LOD_m = 3,0$ a $6,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) e baixos Limites de Quantificação ($LOQ_m = 10,0$ a $20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Estes valores de limites de detecção e quantificação são considerados satisfatórios de acordo com o método apresentado e validado, considerando a complexidade da matriz analisada.

Tabela 18 - Valores de LOD e LOQ do instrumento e do método.

Agrotóxicos	Limites do instrumento ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Limites do método ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	LOD _i	LOQ _i	LOD _m	LOQ _m
Triclorfom	1,5	5,0	3,0	10,0
Trifluralina	1,5	5,0	3,0	10,0
Hexaclorobenzeno	1,5	5,0	3,0	10,0
Quintozeno	1,5	5,0	3,0	10,0
Lindano	1,5	5,0	3,0	10,0
Clorpirifós metílico	3,0	10,0	6,0	20,0
Clorotalonil	1,5	5,0	3,0	10,0
Cresoxim metílico	1,5	5,0	3,0	10,0
Heptacloro	1,5	5,0	3,0	10,0
Malationa	1,5	5,0	3,0	10,0
Clorpirifós etílico	3,0	10,0	6,0	20,0
Bromofós metílico	1,5	5,0	3,0	10,0
Fipronil	3,0	10,0	6,0	20,0
Heptacloro epóxido	1,5	5,0	3,0	10,0
Endossulfam alfa	1,5	5,0	3,0	10,0
4,4-DDE	1,5	5,0	3,0	10,0
Dieldrin	1,5	5,0	3,0	10,0
Endrim I	1,5	5,0	3,0	10,0
Endossulfam beta	1,5	5,0	3,0	10,0
Endrim II	1,5	5,0	3,0	10,0
Trifloxistrobina	1,5	5,0	3,0	10,0
Endossulfam sulfato	1,5	5,0	3,0	10,0
Bifentrina	1,5	5,0	3,0	10,0
Tetradifona	1,5	5,0	3,0	10,0
Cialotrina-lambda	3,0	10,0	6,0	20,0

4.2.8 Ensaios de fortificação para avaliação da recuperação do método QuEChERS

As Tabelas 19 e 20 apresentam os valores de recuperação obtidos para as fortificações, em diferentes níveis de concentração, para todos os agrotóxicos analisados em amostras de mel, utilizando-se o método descrito na Figura 7.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz, de acordo com o método de extração utilizado.

O objetivo foi o de avaliar a repetitividade do método para os 23 agrotóxicos e a precisão intermediária, os quais foram fortificados nas amostras de méis, nos níveis 10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, extraídos pelo método QuEChERS modificado, purificados através da técnica de SPE dispersiva (item 2.4.1) e analisados por GC-ECD.

Tabela 19 - Valores de recuperação e RSD (%) para avaliar a repetitividade do método utilizado, aos três níveis de fortificação estudados (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Agrotóxicos	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	10		20		50	
	Rec. média (%)	RSD (%)	Rec. média (%)	RSD (%)	Rec. média (%)	RSD (%)
Triclorfom	88,2	12,0	97,2	9,3	101,6	11,2
Trifluralina	96,3	11,2	99,2	9,7	99,3	12,3
Hexaclorobenzeno	74,8	1,6	73,0	1,7	77,1	3,5
Lindano	106,1	2,5	104,3	1,6	106,4	1,9
Clorpirifós metílico	95,4	15,0	109,5	17,6	104,9	13,4
Clorotalonil	91,1	5,7	99,8	6,3	99,3	4,1
Cresoxim metílico	94,2	12,9	95,8	12,8	117,6	19,5
Heptacloro	70,8	6,5	76,9	2,2	87,0	2,5
Malationa	119,1	12,6	112,5	18,4	81,0	15,3
Clorpirifós etílico	114,5	18,3	112,2	16,9	85,5	12,6
Bromofós metílico	71,9	20,1	77,6	20,4	99,6	21,7
Fipronil	114,9	14,8	116,2	16,5	89,6	17,2
Heptacloro epóxido	113,5	1,6	118,3	5,1	92,2	2,6
Endossulfam alfa	83,9	1,2	95,9	5,9	102,4	1,4
4,4-DDE	76,4	5,4	71,9	4,4	100,6	3,3
Dieldrin	76,1	9,6	85,3	13,2	90,1	5,9
Endrim I	72,4	6,1	74,8	2,6	102,0	1,9
Endossulfam beta	106,6	4,3	117,0	4,0	84,3	3,5
Endrim II	71,7	5,2	81,7	2,0	108,6	2,0
Trifloxistrobina	79,1	0,4	73,5	4,8	73,3	2,3
Endossulfam sulfato	106,1	4,8	72,1	3,4	109,5	5,7
Bifentrina	72,2	8,9	70,4	8,8	71,8	9,0
Tetradifona	86,2	2,9	80,9	3,7	106,0	2,3
Cialotrina-lambda	141,1	24,1	140,9	22,7	132,6	23,5

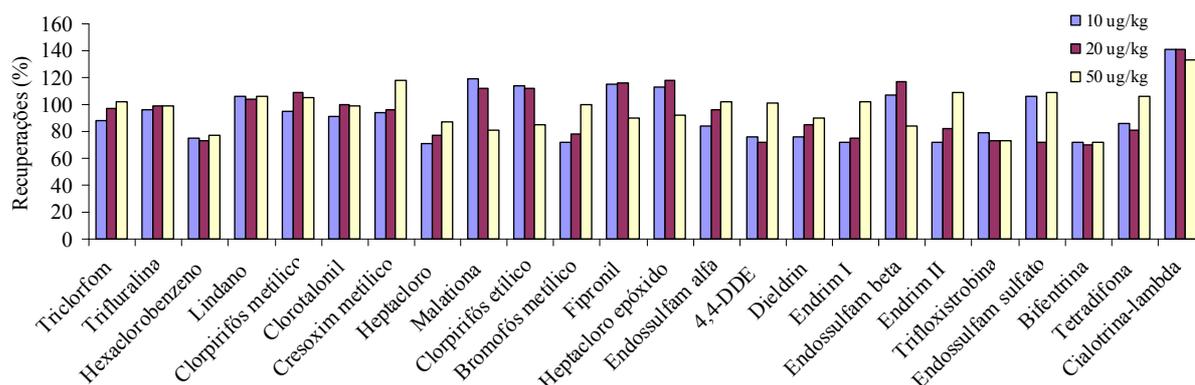


Figura 10 - Percentuais de recuperação para a repetitividade dos agrotóxicos analisados, nos três níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

As Figuras 10 e 11 mostram os percentuais de recuperação e RSD, respectivamente, para a repetitividade do método dos compostos estudados, sendo que todos eles apresentaram valores de recuperação entre 70 e 120%, exceto para cialotrina-lambda, que apresentou valores acima de 120%, da mesma forma, os valores de RSD foram todos menores de 20%, com exceção dos compostos bromofós-metílico e cialotrina-lambda, portanto, o método está de acordo com os parâmetros cromatográficos sugeridos.

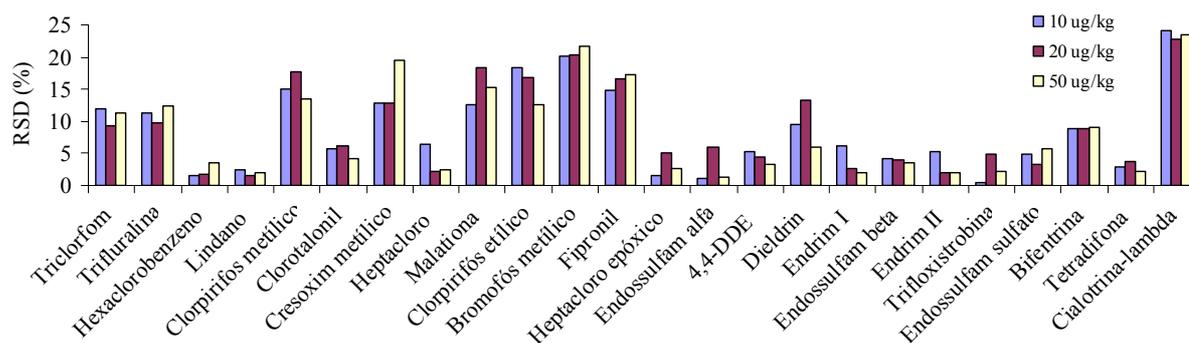


Figura 11 - Percentuais de RSD para a repetitividade dos agrotóxicos analisados, nos três níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabela 20 - Percentuais de recuperação e RSD% obtidos para a precisão intermediária do método, a partir da extração com acetonitrila, do mel fortificado aos níveis de 10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ com os agrotóxicos analisados por GC-ECD.

Agrotóxicos	Níveis de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)					
	10		20		50	
	Rec. média (%)	RSD (%)	Rec. média (%)	RSD (%)	Rec. média (%)	RSD (%)
Triclorfom	97,3	10,0	94,6	12,3	104,2	8,2
Trifluralina	106,2	14,8	96,1	13,5	96,1	10,3
Hexaclorobenzeno	77,2	1,3	78,3	1,2	79,4	2,1
Lindano	108,2	2,1	110,7	0,8	101,5	2,5
Clorpirifós metílico	117,4	13,7	98,5	15,6	95,7	17,1
Clorotalonil	97,2	7,2	106,3	6,0	104,7	3,9
Cresoxim metílico	104,3	14,8	101,3	7,3	113,6	18,0
Heptacloro	91,4	3,4	77,3	2,6	82,3	2,1
Malationa	86,4	9,2	112,5	13,5	78,8	16,0
Clorpirifós etílico	118,7	13,3	103,0	11,4	89,9	11,8
Bromofós metílico	72,8	18,5	82,4	22,5	97,6	19,3
Fipronil	102,4	16,2	119,5	19,2	83,2	15,3
Heptacloro epóxido	108,6	1,3	102,8	4,5	95,7	1,6
Endossulfam alfa	78,5	1,0	91,4	2,7	98,6	2,9
4,4-DDE	85,9	4,5	78,5	7,4	103,8	4,1
Dieldrin	78,8	7,3	80,2	9,2	88,6	5,2
Endrim I	76,7	4,9	72,8	1,3	116,1	3,7
Endossulfam beta	101,2	6,4	108,2	6,8	83,8	2,5
Endrim II	80,7	5,0	77,3	1,9	97,2	4,9
Trifloxistrobina	79,1	2,7	82,8	4,2	81,5	1,2
Endossulfam sulfato	105,7	5,2	75,6	3,0	101,0	4,3
Bifentrina	73,1	6,3	71,3	7,1	77,5	8,6
Tetradifona	84,2	1,1	85,9	2,9	98,6	1,8
Cialotrina-lambda	138,7	26,3	140,1	24,8	145,2	20,2

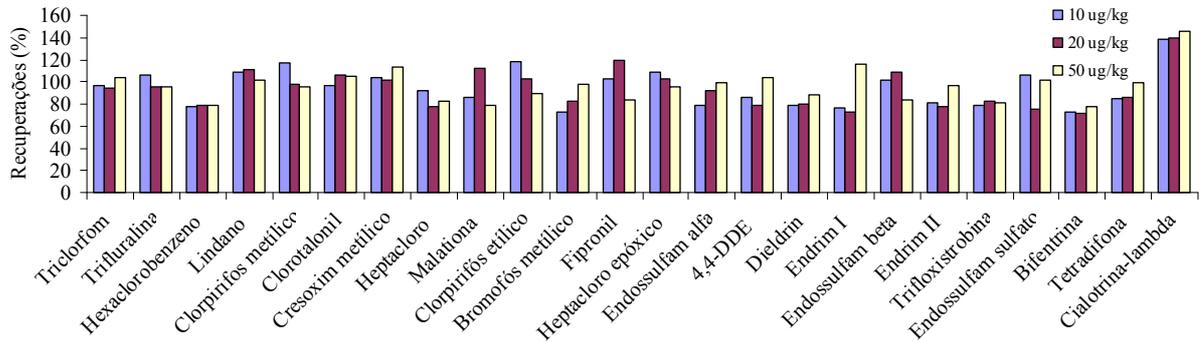


Figura 12 - Percentuais de recuperação para a precisão intermediária dos agrotóxicos analisados, nos três níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

As Figuras 12 e 13 mostram os percentuais de recuperação e RSD, respectivamente, para a precisão intermediária do método. Os valores de recuperação mostraram que todos os compostos estão dentro da faixa aceitável, de 70 a 120%, com exceção de cialotrina-lambda, que apresentou valor de recuperação acima de 120%. Os resultados para a precisão intermediária do método, em termos de RSD, mostraram que os compostos apresentaram valores menores de 20%, com exceção de cialotrina-lambda e bromofós-metílico para o nível de concentração de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O composto cialotrina-lambda é facilmente degradado quando exposto à luminosidade, este fato pode explicar os níveis de recuperação acima de 120% obtidos.

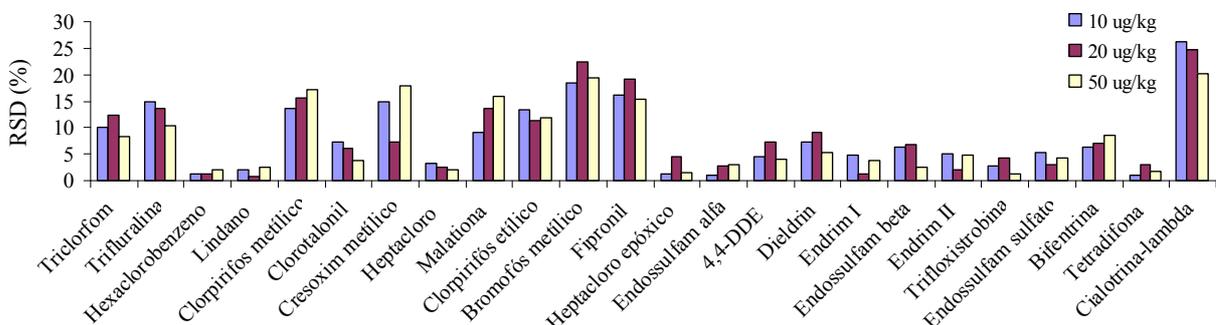


Figura 13 - Percentuais de RSD para a precisão intermediária dos agrotóxicos analisados, nos três níveis de fortificação (10,0; 20,0 e 50,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

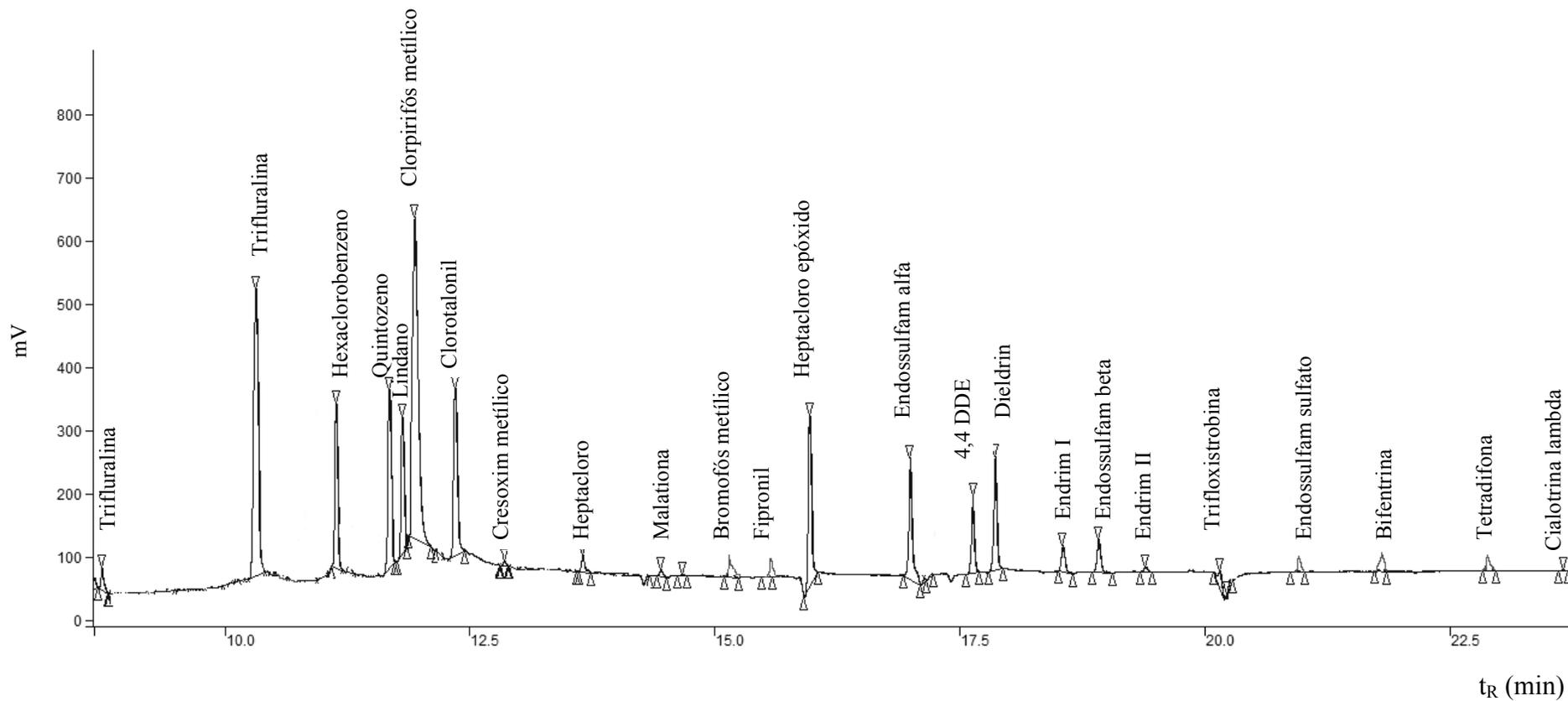


Figura 14 - Cromatograma total dos agrotóxicos obtidos por GC-ECD para a solução analítica $25 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.

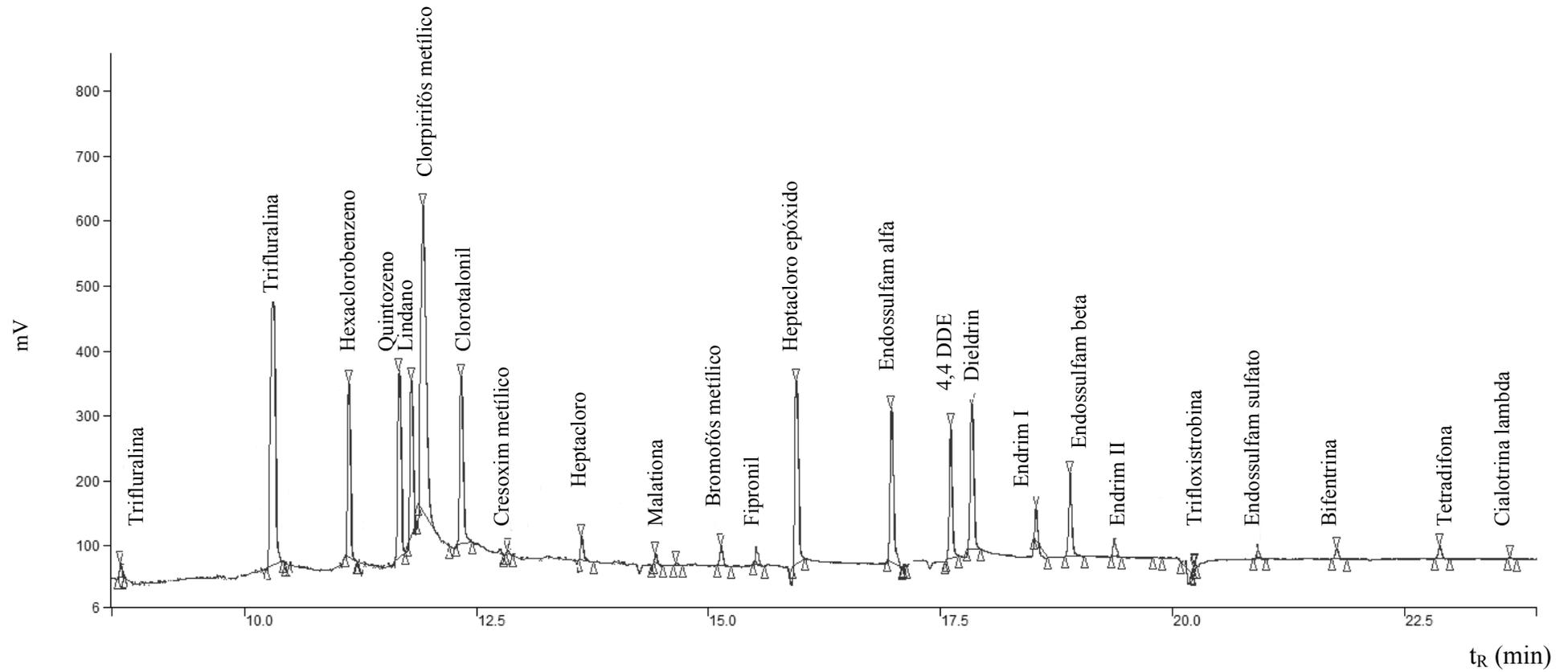


Figura 15 - Cromatograma total dos agrotóxicos obtidos por GC-ECD para a solução analítica fortificada a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.

Verifica-se que os sinais são proporcionais, ou seja, que o sinal da fortificação, $25 \mu\text{g L}^{-1}$, equivale ao sinal do nível correspondente na curva analítica, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figuras 14 e 15, respectivamente), corroborando com os resultados de recuperação já apresentados nas Tabelas e Gráficos acima.

4.2.9 Efeito matriz do extrato de mel nas análises por GC-ECD

O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e também varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina.

Em GC, compostos que não são afetados pelo efeito de matriz são considerados termicamente estáveis, apresentam um limitado potencial de adsorção no injetor em temperaturas elevadas e a matriz é incapaz de providenciar um efeito protetor significativo.

O efeito matriz positivo é usualmente causado pelos componentes da matriz que evitam a suscetibilidade de certos analitos de serem adsorvidos nos sítios ativos do sistema de GC, principalmente no insersor do injetor. Isso resulta em uma maior resposta do detector para os analitos provenientes de solução analítica preparada em solvente orgânico, isso causa o efeito matriz positivo, ou seja, um aumento de sinal. O efeito matriz negativo também pode ocorrer em GC, apesar de mais raramente, quando os componentes da matriz de alguma forma degradam ou reagem com o analito.

Os agrotóxicos que apresentaram efeito matriz positivo foram: cialotrina-lambda, clorotalonil, clorpirifós-metílico, malationa, trifloxistrobina e trifluralina. O efeito matriz negativo foi observado para os seguintes compostos: 4,4-DDE, clorpirifós-etílico, dieldrin, endossulfam beta, endossulfam sulfato, endrim II e tetradifona. A Tabela 21 mostra estes resultados quando obtidos pelo método de extração com acetonitrila e a Figura 16 destaca o efeito matriz observado.

Tabela 21 – Efeito matriz (%) dos agrotóxicos analisados por GC-ECD, a partir de soluções preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz.

Agrotóxicos	Efeito matriz (%)
4,4-DDE	-0,54
Bifentrina	1,33
Bromofós metílico	3,41
Cialotrina-lambda	17,16
Clorotalonil	20,50
Clorpirifós etílico	-0,34
Clorpirifós metílico	19,80
Cresoxim metílico	0,03
Dieldrin	-0,46
Endossulfam alfa	0,19
Endossulfam beta	-0,44
Endossulfam sulfato	-0,74
Endrim I	7,49
Endrim II	-0,73
Fipronil	7,81
Heptacoloro	0,29
Heptacoloro epóxido	0,36
Hexaclorobenzeno	0,80
Lindano	1,40
Malationa	11,70
Tetradifona	-0,31
Triclorfom	8,03
Trifloxistrobina	31,47
Trifluralina	23,50

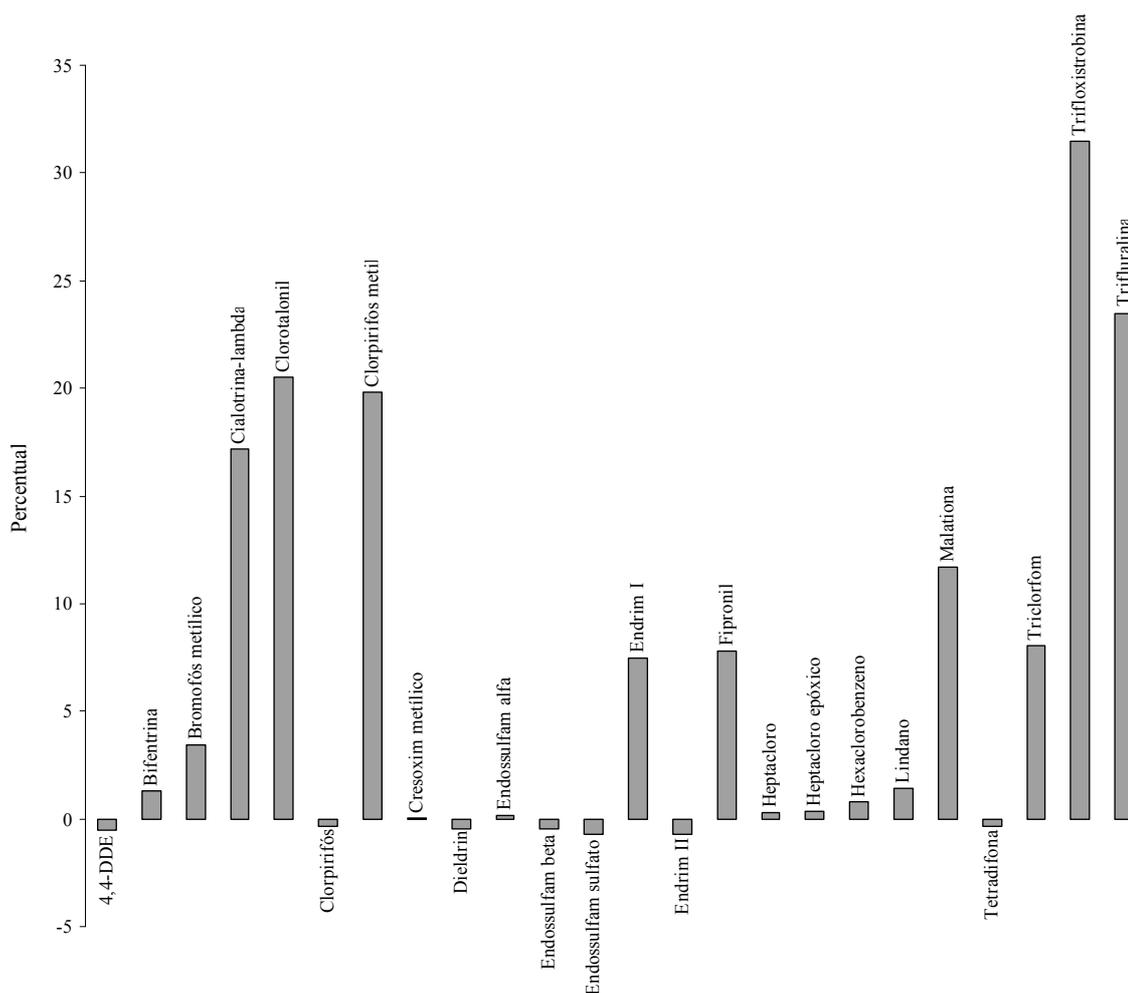


Figura 16 – Percentual de efeito matriz para os agrotóxicos avaliados neste estudo.

O extrato do mel é constituído basicamente de carboidratos, como os monossacarídeos glicose e frutose, apresentando com isso quantidades significativas de componentes endógenos, dessa forma estes interferentes proporcionaram reduções efetivas da resposta cromatográfica para alguns agrotóxicos, sendo observado um efeito matriz negativo. Por outro lado, os polissacarídeos presentes no extrato do mel foram responsáveis por um aumento do efeito matriz na análise de alguns agrotóxicos.

Logo, pode-se observar neste estudo que o efeito matriz foi significativamente reduzido após a etapa de d-SPE utilizando PSA e $MgSO_4$, concluindo que certos tipos de compostos, como os monossacarídeos, protegeram os analitos das interações com a matriz quando adicionados à solução, assumindo a função de analitos protetores.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o método de extração QuEChERS modificado otimizado neste trabalho, apresenta como vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração, ser um procedimento simples e rápido, com um menor número de etapas analíticas, o que diminui a probabilidade de erros, além de ser barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos.

Este método, utilizado para a extração de resíduos de 23 agrotóxicos em amostras de méis, com GC-ECD, demonstrou ser eficiente, apresentando resultados satisfatórios, como as recuperações obtidas, as quais se situaram na faixa entre 70 e 120%, para a grande maioria dos compostos, com valores de RSD < 20%. Logo, este método está de acordo com os valores propostos na literatura para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos.

A etapa de *clean-up* dispersivo, através da utilização de sulfato de magnésio e PSA, como adsorventes, demonstrou ser adequada para o objetivo proposto, pois conseguiu-se remover grande quantidade de açúcar e interferentes provenientes do mel obtendo-se, desta forma, extratos mais limpos. Esta foi uma das maiores dificuldades encontradas durante as etapas de validação do método QuEChERS modificado, visto que é de extrema importância obter extratos limpos para posterior injeção no sistema cromatográfico.

A determinação de resíduos de agrotóxicos em mel mostrou-se eficiente, sendo que os valores de limites de quantificação permitem a realização das análises desses resíduos com confiabilidade, levando-se em consideração que se trata de uma matriz extremamente complexa de trabalhar, pois sua composição química é dependente de uma série de fatores, tais como, condições climáticas, tipos de culturas visitadas pelas abelhas para coleta do néctar, além da contaminação que as colméias podem sofrer por microorganismos patogênicos, como bactérias e fungos, interferindo na sua qualidade microbiológica deste produto.

As curvas analíticas demonstraram linearidade entre 5,0 ou 10,0 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação (r^2) > 0,99 para a maioria dos compostos analisados, apresentando valores adequados, segundo a literatura.

As curvas analíticas, para a confecção das curvas de calibração, foram preparadas em extratos da matriz para a realização dos cálculos de precisão (repetitividade e precisão intermediária), devido ao método ter evidenciado um significativo efeito matriz positivo, ou seja, um aumento de sinal, constatando-se dessa maneira, a necessidade de se utilizar curvas

preparadas no extrato da matriz e não em solvente, evitando-se assim, resultados falsos nas análises.

Portanto, conclui-se que o método mostrou-se adequado à análise de resíduos de agrotóxicos em mel, podendo ser utilizado em análises de rotina de laboratórios, visto que, todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos, atendendo satisfatoriamente os objetivos traçados para este trabalho.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Otimização do método para sua aplicação na análise de resíduos de agrotóxicos em abelhas, a fim de obter maiores informações sobre a contaminação destas através de lavouras que se situam nas proximidades de colméias;

Aplicação do método validado para o monitoramento (identificação e quantificação) dos resíduos dos agrotóxicos utilizados no mel, bem como aumento do número de agrotóxicos a serem analisados;

Determinação, no mel, de outros compostos, como antibióticos, os quais são amplamente utilizados no tratamento de doenças de abelhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHILASH, P. C.; JAMIL, S.; SINGH, N. Matrix solid-phase dispersion extraction versus solid-phase extraction in the analysis of combined residues of hexachlorocyclohexane isomers in plant matrices. **Journal Chromatography A**, v. 1176, p. 41-47, 2007.
- AGROFIT (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS), 2001. Disponível em <[http://inovadefesa.ninh.com/main/search/search?q="+mel](http://inovadefesa.ninh.com/main/search/search?q=). Acesso em 10 maio 2011.
- ALBERO, B.; SANCHEZ-BRUNETE, V.; TADEO, J. L. Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of AOAC International**, v. 84, p. 1165-1171, 2001.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1041–1047, 2002.
- ANASTASSIADES, M.; *et al.* Fast and easy multiresíduo method employing acetonitrila extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v.83, p.412-431, 2003.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2006. Legislação em Vigilância Sanitária. Disponível em <<http://legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=178#>>. Acesso em 15 maio 2011.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2010. Brasília. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em 10 maio 2011.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Classificação e Rotulagem de agrotóxicos, 2005. Disponível em <<http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/secex/ghs/curso>>. Acesso em 22 maio 2011.
- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 26 maio 2011.
- APACAME (ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE APICULTORES CRIADORES DE ABELHAS MELLÍFICAS EUROPÉIAS), 2007. Disponível em <<http://www.apacame.org.br/index1.htm>>. Acesso em 25 mar. 2011.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, 622 p.
- BARAKAT, A. A. *et al.* Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, vol. 5, p. 97-100, 2007.

- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. v. 1. 215 p.
- BARGANSKA, Z.; SLEBIODA, M.; NAMIESNIK, J. Determination of antibiotic residues in honey. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1035-1041, 2011.
- BARGANSKA, Z.; SLEBIODA, M.; NAMIESNIK, J. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 151-162, 2007.
- BENETTI, C. et al. Unauthorised antibiotic treatments in beekeeping development and validation of a method to quantify and confirm tylosin residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 87-92, 2004.
- BLASCO, C. *et al.* Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. **Journal of Chromatography A**, in press, 2011.
- BRABANDER, H. F. *et al.* Residue analysis: Future trends from a historical perspective. **Journal Chromatography A**, v. 1216, p. 7964-7976, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da União**. Brasília, seção 1, p. 16-17, 2000.
- BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em <<http://www.andef.com.br/legislacao/lei7802.htm>>. Acesso em 10 mar. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11/07/1989. Diário Oficial da União. Brasília 08/01/2002, seção 1, página 1, 2002.
- BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.
- CAMPOS, G. *et al.* Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 1-5, 2003.
- CBA (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE APICULTORES), 2010. Exportações de mel. Disponível em <<http://www.brasilapicola.com.br/historia-brasil-apicola>>. Acesso em 20 maio 2011.

CBA (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE APICULTORES). Histórico e consumo de mel. 2007. Disponível em <<http://www.brasilapicola.com.br/historia-brasil-apicola>>. Acesso em 15 mar. de 2011.

Codex Alimentarius, Guide to Codex Maximum Residue Limits of Pesticides and Extraneous Maximum Residue Limits adopted by the Codex Alimentarius Commission 22nd Session. **Food and Agriculture of the United Nations**. 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006, 405 p.

CRANE, E. **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann, 1975, 608 p.

CUADROS-RODRÍGUEZ L. *et al.*, Calibration in Chemicals measurement processes. II. A methodological approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p. 620-636, 2001.

DENOBILO, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxicilina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 1-10, 2004.

DIONÍSIO, A. G. G. *et al.* Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 19-29, 2010.

DIRETIVA 2001/110/EC do Conselho de 20 de dezembro de 2001, relativa ao mel. Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:010:0047:0052:EN:PDF>. Acesso em 03 maio 2011.

DOQ-CGCRE-008, documento de orientação sobre validação de métodos analíticos, 2003. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em 10 maio 2011.

DÖTTERL, S., VERECKEN, N. J. The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. **Canadian Journal of Zoology**, v. 88, p. 668-697, 2010.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). Histórico sobre mel. Embrapa Meio Norte, 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em 25 mar. 2011.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). Importância da Apicultura no Pantanal Sul-Mato-Grossense. Embrapa Pantanal. Disponível em <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC56.pdf>>. Acesso em 15 mar. 2011.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). Produção de mel. Embrapa Meio Norte, 2008. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/mel.htm>>. Acesso em 25 mar. 2011.

- EVANS, J. D.; SPIVAK, M. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. **Journal of Invertebrate**, v. 103, p. 62-72, 2010.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 25 mar. 2011.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&&language=EN>>. Acesso em 25 mar. 2011.
- FENIK, J., MACIEJ, T., BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 814-826, 2011.
- GHINI, S. *et al.* Occurrence and Distribution of Pesticides in the Province of Bologna, Italy, Using Honeybees as Bioindicators. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 47, p. 479-88, 2004.
- FREITAS, D. G. F. *et al.* Rentabilidade e Competitividade da Apicultura no Estado do Ceará. 2005. In: **XLIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL**, 1., 2005, Ribeirão Preto. Disponível em <<http://www.economiarural.ufc.br/periodicos.htm>>. Acesso em 17 maio 2011.
- FRENICH, A. G. *et al.* Compensation for matrix effects in gas chromatography–tandem mass spectrometry using a single point standard addition. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4798-4808, 2009.
- GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, p. 105-112, 2006.
- GARCIA-RODRIGUEZ, J., M. *et al.* Exposure to pesticides and cryptorchidism: Geographical evidence of a possible association. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 1090-95, 1996.
- GARP – ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS, **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**, 1999.
- HAJSLOVA, J., ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-97, 2003.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2009. p. 250-269.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2010. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>>. Acesso em 15 mar. de 2011.

- IIAC (INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA), 2009. Disponível em <<http://www.iica.org.br/Docs/CadeiasProdutivas/Cadeia%20Produtiva%20de%20Flores%20e%20Mel.pdf>>. Acesso em 18 maio 2011.
- INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL), Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM). Conceitos fundamentais e Gerais e Termos Associados, v. 01, 2008.
- INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL), **DOQ-CGCRE-008**, Revisão 02 – Junho/2007. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, Step 4, Consensus Guideline, 1996.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/EC 17025, 1999.
- IOIRICH, N. **As Abelhas Farmacêuticas com Asas**. 1 ed, São Paulo: Mir Moscovo, URSS, 1985, 228 p.
- JOKANOVIC M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 60, p. 166-139, 2001.
- KENDE A. *et al.* Combination of stir bar sorptive extraction–retention time locked gas chromatography–mass spectrometry and automated mass spectral deconvolution for pesticide identification in fruits and vegetables. **Microchemical Journal**, v. 84, p. 63-69, 2006.
- KIRCHNER, M. *et al.* Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectans. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 271-280, 2007.
- KRULL I.; SWARTZ, M. Quantitation in Method Validation. **LC–GC**, v. 16, p. 1084-1090, 1998.
- KUJAWSKI, M. W.; NAMIESNIK, J. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 785-793, 2008.
- KUJAWSKI, M. W.; NAMIESNIK, J. Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS. **Food Control**, v. 22, p. 914-919, 2011.
- LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: Editora RiMa, 2004, 62 p.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

- LEHMBERG, L.; DWORSCHAK, K.; BLÜTHGEN N. Defensive behavior and chemical deterrence against ants in the stingless bee genus *Trigona* (Apidae, Melliponini). **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 47, p. 17–21, 2008.
- LEHOTAY, S. J. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 485-520, 2007.
- LUTZ, G. M. **Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. 2010. 149 f. Dissertação (Dissertação em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria.
- MAETERLINCK, M. **A vida das abelhas**. 1 ed. São Paulo: Martin Claret, 2001, 159 p.
- MDIC (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR), 2011. Disponível em <<http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobreapicultura/mercado/exportacoes/Exportacoes%20mel%20-%20marco%2011.pdf>>. Acesso em 03 mar. 2011.
- MALASPINA, O. *et al.* **Plantas Tóxicas e Defensivos Agrícolas: Efeitos nas Abelhas**. Centro de Estudos de Insetos Sociais, Depto. de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Disponível em <<http://www.xibla.com.br/PDF/Osmar%20Malaspina.pdf>>. Acesso em 20 jun. 2011.
- MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v.23, p. 303-309, 2006.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), 2010a. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/camaras-setoriais-e-tematicas>>. Acesso em 20 maio 2011.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO), 2010b. **Instrução Normativa nº 42, de 20 de Dezembro de 1999**. Disponível em <http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/geral_pcnr.htm>. Acesso em 13 abr. 2011.
- MARCHINI, L. C. *et al.* Physicochemical composition of *Apis mellifera* honey samples from São Paulo State, Brasil. **Química Nova**, v. 30, p. 1653-1657, 2007.
- MASTOVSKA, 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.
- MDS (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL E COMBATE À FOME), 2011. Disponível em <<http://www.mds.gov.br/saladeimprensa/noticias/noticias/noticias/projeto-do-mds-aumenta-producao-e-incentiva-agricultores-familiares-gauchos/?searchterm=mel>>. Acesso em 25 maio 2011.
- MURADIAN, L. B. A. *et al.* Chemical Composition and Botanical Evaluation of dried Bee Pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 18, p. 105-111, 2005.

- ORHAN, F. *et al.* Complementary and alternative medicine in children with asthma. **Annals of Allergy, Asthma, and Immunology**, v. 90, p. 611–615, 2003.
- OSOWSKI, C. A. **As abelhas e a Colméia**. Associação Gaúcha de Apicultores, 2003, Viamão, RS.
- OZCAN, M.; ARSLAN, D.; CEYLAN, D. A. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. **Food Chemistry**, v. 99, p. 24 – 29, 2006.
- PAMPLONA, L. C. *et al.* Physicochemical analyses indicated to the quality control of royal jelly with honey. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 608-612, 2004.
- PANG, G. F. *et al.* Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solidphase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, p. 777-810, 2006.
- PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S. Validação de Métodos Cromatográficos para a Determinação de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 1190-1198, 2008.
- PICÓ, Y., BLASCO, C., FONT, G. Environmental and Food Applications of LC-tandem Mass Espectrometry in Pesticide-Residue Analysis: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v.23, p. 45-85, 2004.
- PINHO, G. P. *et al.* Efeito matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 987-995, 2009.
- PORRINI, C. *et al.* Use of honey bees as Bioindicators of environmental pollution in Italy. **Apiacta**, v. 38, p. 63-70, 2003.
- PRESTES, O. D. *et al.* 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, 2009.
- PRESTES, O. D. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS**. 2011, 130 f. Tese (Doutorado em Química Analítica)-Universidade Federal de Santa Maria.
- PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p 51-64, 2011.
- PRESTES, O. **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. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

- RIAL-OTERO, R. *et al.* Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Journal of Chromatography A**, v. 71, p. 503-514, 2007.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, p. 149-158, 2009.
- RIBEIRO, F. A. de L., FERREIRA, M. M. C., 2008. Planilha De Validação: Uma nova Ferramenta para Estimar Figuras de Mérito na Validação de Métodos Analíticos Univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.
- RIDGWAY, K., LALLJIE, S.P.D., SMITH, R.M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36-53, 2007.
- RISSATO, S. R. *et al.* Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. **Química Nova**, vol. 29, p. 950-955, 2006.
- SANCHES, S. M. *et al.* **Pesticidas: R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.53-58, 2003.
- SANTOS, A. I. Abelhas e plantas melíferas da mata atlântica, restinga e dunas do litoral norte do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 43, p. 191-223, 1999.
- SCHENCK, F. J. *et al.* Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 85, p. 1168-1177, 2002.
- SCHIRMER, L. R. **Abelhas ecológicas**. São Paulo: Nobel, 1986, 218 p.
- SEBRAE (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS), 2009. Disponível em <<http://www.sebrae.com.br/uf/bahia/setores-de-atuacao/agronegocios/apicultura>>. Acesso em 18 maio 2011.
- SEBRAE (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS), 2011. Disponível em <<http://www.agenciasebrae.com.br/noticia/12062204/agronegocios/exportacao-de-mel-registra-us-81-milhoes-em-maio/2011>>. Acesso em 02 maio 2011.
- SEELEY, T. D.; VISSCHER, P. K.; PASSINO, K. M. Group decision making in honey bee swarms. **American Scientist**, v. 94, p. 220-229, 2006.
- 15º SEMINÁRIO ESTADUAL DE APICULTURA, Santa Maria, 2010.
- SILVA, L. R. *et al.* Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. **Microchemical Journal**, v. 93, p. 73-77, 2009.

- SINITOX (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS), 2010. Disponível em <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo>. Acesso em 12 jun. 2011.
- SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. p. 993.
- SOLER, C.; PICÓ, Y. Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 26, p. 117-131, 2007.
- STEFANELLO, M. E. A. *et al.* Óleo Essencial de *Gochnatia polymorpha* (LESS) CABR. ssp *floccosa* CABR., **Química Nova**, v. 29, p. 999-1002, 2006.
- TADEO, J. L.; SANCHEZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R. A. *et al.* **Journal Food Protection Protection**, v.67, p. 2565-2569, 2004.
- TOMAS, C. *et al.* Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC-MS analysis of pesticide residues. **Journal Separation Science**, v. 28, p. 1048–1060, 2005.
- TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z.; Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, p. 135-142, 2002.
- UAGRO (UNIDADE DE ATENDIMENTO COLETIVO AGRONEGÓCIO), 2011. Disponível em <<http://agropecuariadepequenoporte.wordpress.com/2010/12/03/setor-apicola-firma-nova-parceria-com-a-apex-brasil/>>. Acesso em 20 maio 2011.
- UNIÃO EUROPÉIA, Limites Máximos de Resíduos de Pesticidas em arroz, 2007. Disponível em < file:///H:/LMR-UE-MEL.htm>. Acesso em 23 jun. 2011.
- VIDAL, J. L. M., *et al.* Multiclass Analysis of Antibiotic Residues in Honey by Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 57, p. 1760-1767, 2009.
- VIDAL, R.; FREGOSI, E. V. Características, análises físico-químicas, adulterações e transformações. **Barretos: Instituto tecnológico científico “Roberto Rios”**, p. 95, 1984.
- VIEIRA, R. E. *et al.* Biologia floral e polinização por abelhas em siratro (*Macroptilium atropurpureum* Urb.). **Acta Scientiarum**, v. 24, p. 857-861, 2002.
- VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Análises físico-químicas de méis de São Paulo. **Mensagem Doce**, v. 53, p. 17-19, 1999.
- WANG, J. *et al.* Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. **Food Research International**, v. 43, p. 2329-2334, 2006.
- WIESE, H. **Apicultura: Novos tempos**. 2. ed. Guaíba: Agrolivros, 2005, 173-287 p.
- WILKOWSKA, A., BIZIUK, M. determination of pesticide residues in food matrices using the quechers methodology. **Food Chemistry**, v. 125, p. 803-812, 2011.

WITTMANN, D. & HOFFMANN, M. Bees of Rio Grande do Sul, southern Brazil (Insecta, Hymenoptera, Apoidea). **Iheringia, Série Zoologia**, v. 70, p. 17-43, 1990.

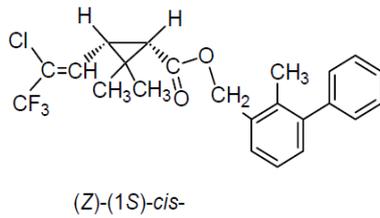
ZANG, X. *et al.* Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, p. 161-168, 2009.

ZROSTLÍKOVA, J. *et al.* Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p. 73-86, 2001.

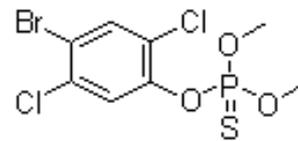
ANEXO

Anexo 1 – Fórmulas estruturais dos agrotóxicos presentes neste trabalho.

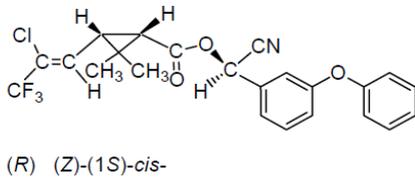
Bifentrina



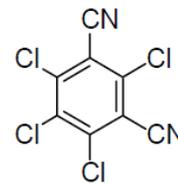
Bromofós-metílico



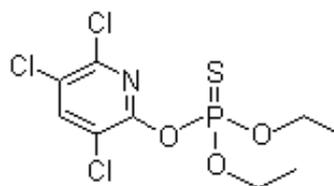
Cialotrina-lambda



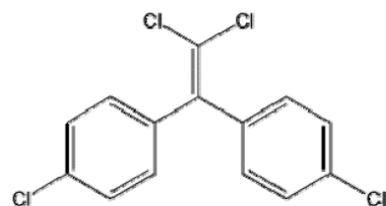
Clorotalonil



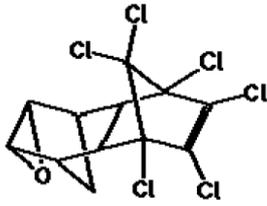
Clorpirifós etílico



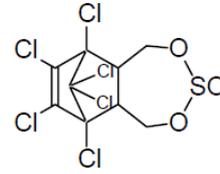
4,4 DDE



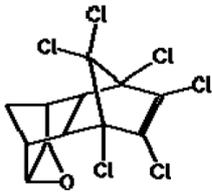
Dieldrin



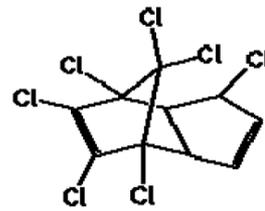
Endossulfam alfa/beta e sulfato



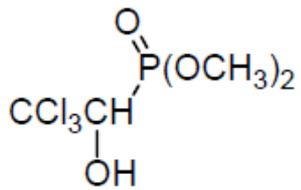
Endrim



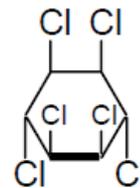
Heptacloro/ Heptacloro epóxido



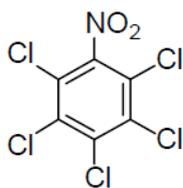
Triclorfom



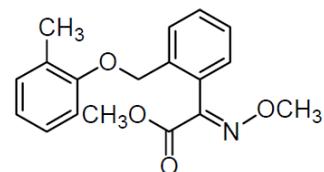
Hexaclorobenzeno/ Lindano



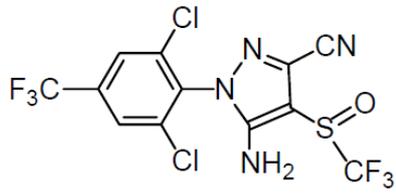
Quintozeno



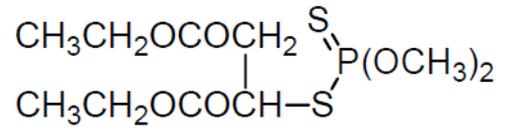
Cresoxim metílico



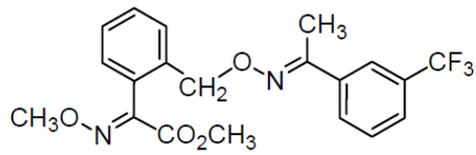
Fipronil



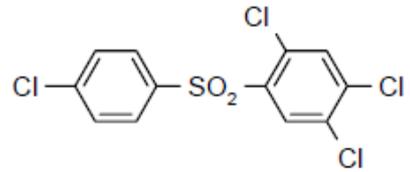
Malationa



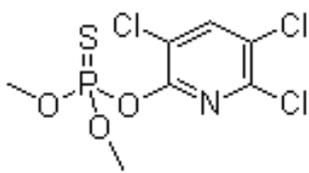
Trifloxistrobina



Tetradifona



Clorpirifós metílico



Trifluralina

