



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

Nathália Saibt

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA
(*Apis mellifera*) EMPREGANDO MINI-QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Santa Maria – RS, Brasil

2022

Nathália Saibt

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA (*Apis mellifera*) EMPREGANDO MINI-QuEChERS E UHPLC-MS/MS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS, Brasil

2022

Nathália Saibt

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA
(*Apis mellifera*) EMPREGANDO MINI-QuEChERS E UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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 a obtenção do título de **Doutora em Ciências**.

Aprovada em 28 de outubro de 2022

Renato Zanella, Dr. (UFSM, Orientador)

Betina Blochtein, Dra.

Clóvia Marozzin Mistura, Dra. (UPF)

Débora Orso, Dra. (SENAC)

Fernanda Cristina Breda Mello, Dra. (UFSM)

Santa Maria - RS, Brasil
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Saibt, Nathália
DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA
(Apis mellifera) EMPREGANDO MINI-QuEChERS E UHPLC-MS/MS
/ Nathália Saibt.- 2022.
108 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientadora: Martha Bohrer Adaime
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Abelha 2. agrotóxicos 3. preparo de amostra 4.
cromatografia I. Zanella, Renato II. Bohrer Adaime ,
Martha III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, NATHÁLIA SAIPT, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Zanella pela orientação e pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) / Centro de Pesquisa em Cromatografia e Espectrometria de Massas (CPCEM). Comecei na iniciação científica e término minha trajetória com o título de doutora. Foram anos de aprendizado e muito crescimento pessoal.

À banca de defesa da tese, professoras Dr^a. Betina Blochtein, Dr^a. Clóvia Marozzin Mistura, Dr^a. Débora Orso e Dr^a. Fernanda Cristina Breda Mello, pela disponibilidade de avaliar este trabalho e por suas contribuições.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSM, pelos ensinamentos no decorrer do curso, principalmente aos professores Dr. Renato Zanella, Dr. Osmar Damian Prestes e Dr^a Martha Bohrer Adaime agradeço a vocês pela ajuda, sugestões e ensinamentos ao longo desta jornada.

Agradeço aos funcionários do PPGQ, Ademir e Miguel, sempre prestativos e atenciosos com os alunos.

À Universidade Federal de Santa Maria pelo ensino gratuito e de qualidade, o qual foi de suma importância para a minha formação acadêmica.

À CAPES pelo auxílio financeiro fornecido.

Agradeço de forma muito especial aos meus familiares pelo apoio, paciência e palavras de incentivo.

Aos amigos e colegas do LARP/CPCEM que tornaram esta caminhada mais fácil.

A todos que, de alguma forma, ajudaram e incentivaram este trabalho.

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA (*Apis mellifera*) EMPREGANDO MINI-QuEChERS E UHPLC-MS/MS

Autora: Nathália Saibt
Orientador: Renato Zanella

O Brasil tem clima favorável para a produção agrícola extensiva, que, em geral, está associada ao uso intensivo de agrotóxicos. O efeito prejudicial dos agrotóxicos na saúde das abelhas é um tema de preocupação global. Na última década, o distúrbio do colapso das colônias tem impactado as colônias de abelhas em muitas partes do mundo e os motivos propostos incluem a redução da disponibilidade de alimentos, diminuição da diversidade de flores, parasitas, práticas modernas de apicultura e exposição contínua à agrotóxicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para determinação multirresíduo de agrotóxicos em abelhas utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Para o preparo das amostras foram avaliados os solventes de extração, sais de partição e sorventes para limpeza dos extratos. O processamento e a extração de 1 g de amostra de abelha são realizados simultaneamente no mesmo tubo com o auxílio de ultraturrax, empregando água ultrapura e acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido fórmico. A partição foi obtida com sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio, e a limpeza do extrato com os sorventes PSA e C18. Os agrotóxicos foram analisados usando um sistema UHPLC-MS/MS triplo quadrupolo. O método mini-QuEChERS proposto mostrou-se rápido e eficaz para a determinação de 176 agrotóxicos em abelha, com limites de quantificação do método entre 5 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, além de excelente exatidão (recuperação entre 70 e 120%) e precisão ($\text{RSD} \leq 18\%$). O método proposto foi aplicado em 16 amostras de abelhas de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul e nove agrotóxicos foram confirmados, sendo que todas as amostras apresentaram pelo menos um agrotóxico. O inseticida fipronil estava presente em 87% das amostras analisadas.

Palavras-chave: abelha, agrotóxico, preparo de amostra, cromatografia.

ABSTRACT

MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN BEE (*Apis mellifera*) BY MINI-QuEChERS AND UHPLC-MS/MS

Author: Nathália Saibt
Advisor: Renato Zanella

Brazil has a favorable climate for extensive agricultural production, which is generally associated with the intensive use of pesticides. The harmful effect of pesticides on bee health is a topic of global concern. In the last decade, colony collapse disorder has affected bee colonies in many parts of the world and proposed reasons include reduced food availability, decreased diversity of flowers, parasites, modern beekeeping practices and continued exposure to pesticides. Therefore, the objective of this work was to develop and validate a method for multiresidue determination of pesticides in bees using ultra-high performance liquid chromatography coupled to serial mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). For sample preparation, extraction solvents, partition salts and sorbents for cleaning the extracts were evaluated. Processing and extraction of 1 g of bee sample are performed simultaneously in the same tube with the aid of ultra-turrax using ultrapure water and acetonitrile containing 1% (v/v) of formic acid. Partitioning was achieved with anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride, and the extract was cleaned with PSA and C18 sorbents. Pesticides were analyzed using a triple quadrupole UHPLC-MS/MS system. The proposed mini-QuEChERS method proved to be fast and effective for the determination of 176 pesticides in bees, with method quantification limits between 5 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, in addition to excellent accuracy (recovery between 70 and 120%) and precision ($\text{RSD} \leq 18\%$). The proposed method was applied to 16 bee samples from different regions of the state of Rio Grande do Sul and nine pesticides were confirmed, and all samples showed at least one pesticide. The insecticide fipronil was present in 87% of the samples analyzed.

Keywords: bee, pesticides, sample preparation, chromatography.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Produção brasileira de mel entre os anos 2015-2021. | 18 |
| Figura 2 - | Produção de mel por região brasileira entre os anos 2015-2020. | 19 |
| Figura 3 - | Resultados das 43 amostras de abelhas mortas no Rio Grande do Sul. | 21 |
| Figura 4 - | Esquema de um analisador de massas triplo quadrupolo. | 28 |
| Figura 5 - | Representação das principais versões do método QuEChERS original, acetato e citrato. | 32 |
| Figura 6 - | Esquema de preparo de amostras para os testes T ₁₋₁ e T ₁₋₂ . | 45 |
| Figura 7 - | Esquema de preparo de amostras para os testes T ₂₋₁ a T ₂₋₃ . | 46 |
| Figura 8 - | Esquema de preparo de amostras para os testes E ₁ a E ₆ . | 47 |
| Figura 9 - | Diferentes diluições testadas. | 48 |
| Figura 10 - | Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução preparada no extrato da matriz de abelha na concentração de 10 µg L ⁻¹ . | 57 |
| Figura 11 - | Resultados dos testes de processamento de amostra e avaliação da etapa de limpeza do extrato em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados. | 58 |
| Figura 12 - | Processador e homogeneizador ultraturrax utilizado neste trabalho. | 59 |
| Figura 13 - | Cromatograma análise <i>full scan</i> dos extratos dos testes T ₁₋₁ a T ₂₋₃ . | 60 |
| Figura 14 - | Resultados dos testes das diferentes versões do QuEChERS em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados. | 61 |
| Figura 15 - | Resultados dos testes das diferentes combinações de sorventes utilizados para limpeza do extrato em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados. | 62 |
| Figura 16 - | Coloração dos extratos finais dos testes de diferentes sorventes. | 63 |
| Figura 17 - | Análise dos extratos por GC-MS no modo <i>full scan</i> . | 63 |
| Figura 18 - | Resultados dos testes das diferentes diluições do extrato em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados. | 65 |
| Figura 19 - | Representação do método mini-QuEChERS modificado proposto para a extração de agrotóxicos em abelha. | 66 |
| Figura 20 - | Cromatograma UHPLC-MS/MS comparativo entre a amostra A1 contendo resíduos de fipronil (30 µg kg ⁻¹) e o correspondente LOQ (5 µg kg ⁻¹). | 94 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabela 1 - | Definição dos produtos apícolas conforme a legislação brasileira. | 17 |
| Tabela 2 - | Resultados das amostras analisadas pelo projeto Colmeia Viva. | 22 |
| Tabela 3 - | Classe, agrotóxico e suas respectivas toxicidades por contato e oral para as abelhas. | 25 |
| Tabela 4 - | Diferentes preparos de amostras para determinação de agrotóxicos em abelhas. | 30 |
| Tabela 5 - | Principais sorventes e suas finalidades. | 33 |
| Tabela 6 - | Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos. | 34 |
| Tabela 7 - | Informações dos agrotóxicos, fórmula molecular, classe, solubilidade, log P e pKa; | 38 |
| Tabela 8 - | Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em abelha no sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS. | 43 |
| Tabela 9 - | Relação dos testes realizados para análise de remoção dos coextrativos para 1 mL de extrato. | 48 |
| Tabela 10 - | Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (tR), íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação. | 52 |
| Tabela 11 - | Curvas analíticas no solvente e na matriz. Coeficientes de determinação, valores de faixa linear e ion <i>ratio</i> para cada agrotóxico. | 68 |
| Tabela 12 - | Resultados obtidos para o efeito matriz dos agrotóxicos determinados por UHPLC-MS/MS. | 73 |
| Tabela 13 - | Percentuais de recuperação (Rec.) e RSD dos agrotóxicos empregando o método mini-QuEChERS modificado no ensaio de repetitividade. | 76 |
| Tabela 14 - | Percentuais de recuperação (Rec) e RSD dos agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado, para matriz abelha no ensaio de precisão intermediária. | 85 |
| Tabela 15 - | Valores de LOD e LOQ do método para cada agrotóxico estudado. | 92 |
| Tabela 16 - | Resultados da análise de amostras reais. | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEMEL – Associação Brasileira dos Exportadores de Mel

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18 – Octadecilsilano

CPCEM – Centro de Pesquisa em Cromatografia e Espectrometria de Massas

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

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI – Ionização por eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

EU – União Europeia, do inglês *European Union*

FAO – Organização das Nações Unidas para a alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GC-MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

HAc – Ácido acético

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

LMR – Limite Máximo de Resíduo

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

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

m/z – Razão massa carga

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS/MS – Espectrometria de massas em série

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

pKa – constante de dissociação ácida

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

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

r^2 – Coeficiente de determinação

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

SANTÉ – Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*

SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SRM – Monitoramento Seletivo de Reações, do inglês *Selected Reaction Monitoring*

t_R – Tempo de retenção

UHPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (do inglês *ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*)

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Objetivo geral..... | 15 |
| 1.2 | Objetivos específicos..... | 15 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 2.1 | APICULTURA..... | 16 |
| 2.1.1 | Breve histórico da introdução da <i>Apis mellifera</i> no Brasil..... | 16 |
| 2.1.2 | Importância das abelhas..... | 16 |
| 2.1.2.1 | Produção de mel..... | 18 |
| 2.1.2.2 | Polinização..... | 19 |
| 2.1.3 | Declínio das abelhas..... | 20 |
| 2.1.3.1 | Registros de mortandade de abelhas no Brasil..... | 21 |
| 2.2 | AGROTÓXICOS..... | 22 |
| 2.2.1 | Efeitos nocivos dos agrotóxicos..... | 24 |
| 2.3 | DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS | 26 |
| 2.3.1 | Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos | 26 |
| 2.3.2 | Preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos | 29 |
| 2.3.2.1 | Método QuEChERS..... | 31 |
| 2.4 | VALIDAÇÃO..... | 33 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 | Instrumentação..... | 35 |
| 3.2 | Reagentes, solventes e materiais | 36 |
| 3.3 | Seleção do padrão interno e do padrão de controle..... | 37 |
| 3.4 | Preparo das soluções analíticas dos compostos selecionados..... | 37 |
| 3.5 | Sistema UHPLC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos em abelha (<i>Apis mellifera</i>) | 43 |
| 3.5.1 | Escolha da fase móvel..... | 43 |
| 3.5.2 | Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS XEVO TQ-XS..... | 43 |
| 3.6 | Desenvolvimento do método de extração para a análise de resíduos de agrotóxicos em abelha..... | 44 |
| 3.6.1 | Testes preliminares..... | 44 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6.2 | Avaliação dos coextrativos por análise de GC-MS/MS..... | 48 |
| 3.7 | Validação do método para a análise de resíduos de agrotóxicos em abelha | 49 |
| 3.7.1 | Seletividade..... | 49 |
| 3.7.2 | Curva analítica e linearidade..... | 49 |
| 3.7.3 | Efeito matriz..... | 49 |
| 3.7.4 | Exatidão e precisão..... | 50 |
| 3.7.5 | LOD e LOQ do método..... | 51 |
| 3.8 | APLICAÇÃO DO MÉTODO..... | 51 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 52 |
| 4.1 | Condições do sistema UHPLC-MS/MS empregado para determinação de agrotóxicos em abelha (<i>Apis mellifera</i>)..... | 52 |
| 4.2 | Desenvolvimento de método para extração de agrotóxicos em abelha | 57 |
| 4.2.1 | Processamento de amostra e etapa de limpeza a baixa temperatura | 58 |
| 4.2.2 | Versões QuEChERS..... | 60 |
| 4.2.3 | Otimização etapa de limpeza..... | 62 |
| 4.2.4 | Fator do método..... | 64 |
| 4.3 | Método de extração otimizado..... | 65 |
| 4.4 | VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO..... | 67 |
| 4.4.1 | Seletividade..... | 67 |
| 4.4.2 | Curva analítica e faixa linear..... | 67 |
| 4.4.3 | Efeito matriz..... | 72 |
| 4.4.4 | Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade) | 75 |
| 4.4.5 | Precisão Intermediária..... | 84 |
| 4.4.6 | Determinação dos valores de LOD e LOQ do método..... | 92 |
| 4.4.7 | APLICAÇÃO DO MÉTODO..... | 93 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 95 |
| 6 | ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS..... | 96 |
| 7 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 97 |
| 8 | REFERÊNCIAS..... | 98 |

1 INTRODUÇÃO

A apicultura é considerada uma atividade importante para o setor agropecuário em nível nacional. Além disso, é uma das atividades capazes de causar impactos positivos, tanto sociais quanto econômicos, e contribuir para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes (EMBRAPA, 2013). O setor apícola une a capacidade geradora de riquezas relacionadas tanto ao aumento da produtividade agrícola quanto à manutenção e desenvolvimento da fauna e flora da biodiversidade nacional. Isto se deve a capacidade polinizadora das abelhas que permite o aumento da disponibilidade de frutos e sementes para a manutenção de ecossistemas. Contando ainda com os produtos derivados das abelhas, geradores de energia, saúde e aplicações das mais variadas no campo da saúde humana até a fixação do homem do campo e geração de emprego e renda (ABEMEL, 2015).

Contudo, as abelhas estão sofrendo com as ações antrópicas. Elas vêm desaparecendo de áreas agrícolas por causa da fragmentação de habitats, grandes áreas de monocultura, desmatamento para a agricultura e pastagem e, principalmente o uso excessivo ou incorreto de agrotóxicos (VIANA, 2010). Dessa forma, faz-se necessário o monitoramento dessas substâncias em amostras de abelha.

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos e amostras ambientais requer a utilização de métodos analíticos confiáveis, de forma a garantir a identificação e a quantificação destes resíduos.

Nos últimos anos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série tornou-se uma das técnicas mais utilizadas em análises, pois oferece elevada detectabilidade, seletividade e especificidade (WANG *et al.*, 2013). A alta detectabilidade obtida no modo de monitoramento de reações selecionadas e a utilização da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*) permite análises mais rápidas, com melhor resolução e picos relativamente mais estreitos se comparados à LC convencional (CHIARADIA *et al.*, 2008). No entanto, apesar dos inúmeros avanços em instrumentação analítica, a etapa de preparo de amostra ainda permanece como uma etapa crítica do processo analítico, sendo fundamental para alcançar resultados confiáveis e manter o desempenho dos equipamentos (FRENICH *et al.*, 2014;

KHALED *et al.*, 2019). A presença de interferentes que são extraídos junto com os analitos de interesse torna a detecção, identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos mais difícil, especialmente em matrizes com diferentes constituintes.

Neste contexto, a análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de abelha é de extrema importância em termos de segurança e do equilíbrio ambiental.

1.1 OBJETIVO GERAL

Considerando o crescente número de casos de perdas de colmeias pela mortalidade de abelhas e a preocupação com a atividade apícola, este trabalho teve como objetivo geral: desenvolver e validar um método de preparo de amostra para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em abelha (*Apis mellifera*) empregando UHPLC-MS/MS.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros necessários para a otimização do preparo de amostra, tais como: tipo de solvente e quantidade de sorvente.
- Avaliar diferentes versões do método QuEChERS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em abelha por UHPLC-MS/MS;
- Selecionar o método de preparo de amostra mais adequado para dar continuidade aos ensaios;
- Validar o método desenvolvido visando atingir limites de detecção e de quantificação adequados;
- Aplicar o método proposto em amostras provenientes de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 APICULTURA

2.1.1 Breve histórico da introdução da *Apis mellifera* no Brasil

A apicultura brasileira começou em 1839, quando o padre Antônio Carneiro importou de Portugal 100 colônias de abelhas da espécie *Apis mellifera*. Entre 1845 e 1880, imigrantes alemães e italianos introduziram outras subespécies de *Apis mellifera* em localidades do Sul e Sudeste do país. Naquele período, a maior parte dos apicultores criava abelhas de forma rústica, possuindo poucas colmeias, apenas para atender às necessidades de consumo (ITAGIBA, 1997).

Em meados de 1950, problemas com a sanidade e surgimento de doenças e pragas, 80% das colmeias do País foram dizimadas e conseqüentemente a produção de mel diminuiu drasticamente. Diante desse quadro, ficou evidente que era preciso aumentar a resistência das abelhas (A.B.E.L.H.A, 2020).

Assim, em 1956, o professor Warwick Estevan Kerr dirigiu-se à África, com apoio do Ministério da Agricultura, com a incumbência de selecionar rainhas de colmeias africanas produtivas e resistentes a doenças. A intenção era realizar pesquisas comparando a produtividade, rusticidade e agressividade entre as abelhas europeias, africanas e seus híbridos e, após os resultados, recomendar a abelha mais apropriada às nossas condições. Entretanto, por falhas de manejo, as abelhas africanas enxamearam o que culminou com o cruzamento destas com as europeias, resultando na abelha africanizada (A.B.E.L.H.A, 2020).

2.1.2 Importância das abelhas

A criação de abelhas da espécie *Apis mellifera* é hoje uma importante atividade agropecuária. Ademais do mel, outros produtos são extraídos das colmeias como o pólen apícola, a cera, o própolis e a geleia real. Na Tabela 1, os produtos apícolas são definidos conforme a legislação brasileira (BRASIL, 2001).

Tabela 1 – Definição dos produtos apícolas conforme a legislação brasileira

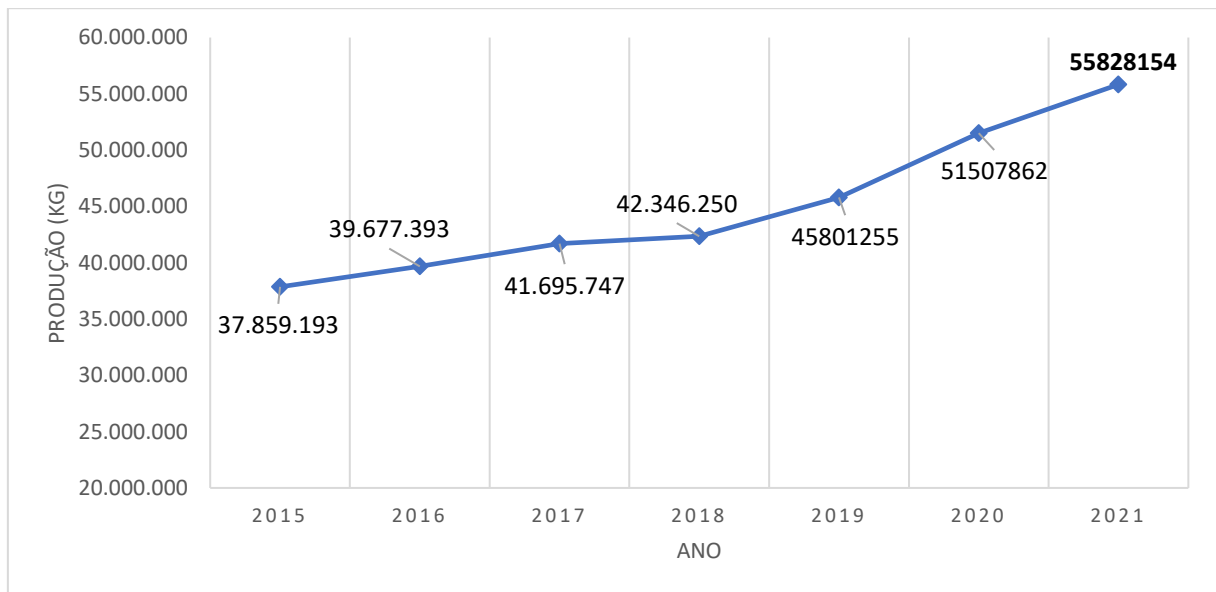
| Produto | Descrição |
|----------------|--|
| Mel | Produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores, das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, e após armazenam até madurar nos favos da colmeia; |
| Própolis | Produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen; |
| Geleia real | Produto da secreção do sistema glandular cefálica (glândulas hipofaríngeas e mandibulares) das abelhas operárias, coletado até 72 h após a produção; |
| Cera | Produto de consistência plástica, de cor amarelada, muito fusível, secretado pelas abelhas para a formação dos favos nas colmeias; |
| Pólen Apícola | Resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia. |
| Apitoxina | Substância de origem glandular, produzida pelas operárias. Compõe-se de água e substâncias ativas como a apamina, melitina, fosfolipase, hialuronidase e aminoácidos. |

Além dos produtos apícolas, as abelhas desempenham um importante papel na polinização. As abelhas dependem das flores para obtenção do alimento. As flores as atraem usando perfumes e suas pétalas vistosas, nas quais às vezes são encontradas certas marcas coloridas, chamadas de guias de néctar, que indicam onde estão suas glândulas produtoras, os nectários (WITTER *et al.*; 2014). O néctar é uma secreção açucarada que é a matéria-prima para a produção de mel, sendo utilizado pelas abelhas como fonte de energia. As flores produzem também o pólen, que as abelhas utilizam como fonte de proteína, principalmente para as crias (DELAPLANE *et al.*; 2000; WITTER *et al.*, 2014). Portanto, é a busca por recursos alimentares que torna as abelhas eficientes conectores entre os grãos de pólen de uma flor e a parte de outra flor (WITTER *et al.*, 2014).

2.1.2.1 Produção de mel

O Brasil tem um grande potencial apícola, em função de sua diversidade de flora, extensão territorial e a variabilidade climática, possibilitando assim produzir mel o ano todo, o que o diferencia dos demais países (ANACLETO & MARCHINI, 2005). Na Figura 1, observa-se a produção brasileira de mel em quilogramas desde o ano 2015 (IBGE, 2021).

Figura 1 – Produção brasileira de mel entre o período 2015-2021

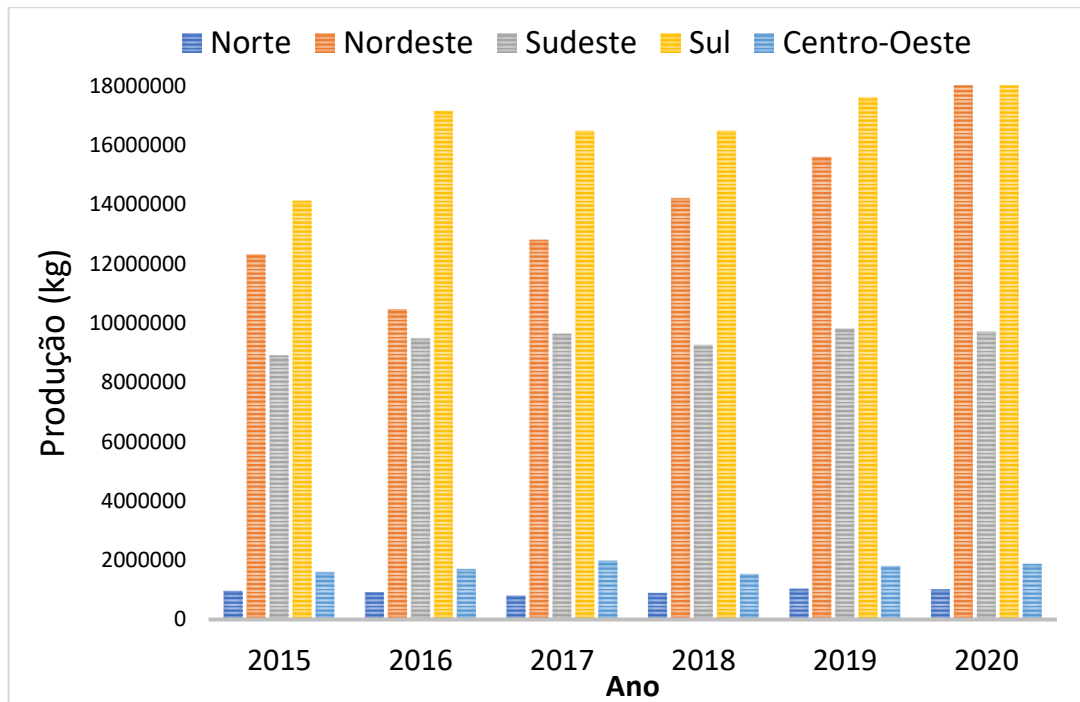


Fonte: Pesquisa Pecuária Municipal (2021).

Em 2020, 89% da produção de mel foi destinado à exportação, movimentando aproximadamente US\$ 98,5 milhões. Desta, 70% foram destinados ao Estados Unidos (EUA), 13% para a Alemanha, 6% para Canadá, 3% para Austrália e 2% para Bélgica, Reino Unido e Holanda. O Brasil ocupa o 7º lugar no ranking dos países exportadores, atrás apenas da China, Argentina, Ucrânia, Índia, México e Espanha conforme a ABEMEL, 2021.

A apicultura está difundida em todas as regiões do Brasil. Na Figura 2, observa-se a produção de mel por região brasileira em quilogramas desde o ano 2015 (IBGE, 2020).

Figura 2 – Produção de mel por região brasileira entre o período de 2015-2020



Fonte: Pesquisa Pecuária Municipal (2020).

Conforme podemos observar a Região Sul representa 38,1% da produção brasileira de mel, seguida pelas regiões Nordeste (37,5%), Sudeste (18,8%), Centro-oeste (3,6%) e Norte (1,9%). A região Sul, destaca-se das demais regiões em função do seu clima e vegetação (ARRUDA, 2015).

2.1.2.2 Polinização

A polinização consiste na transferência dos grãos de pólen das estruturas masculinas (antras) para as estruturas femininas da flor (estigma) em uma mesma planta (autopolinização) ou em plantas diferentes (polinização cruzada).

A polinização é um fator de grande importância na produção em várias culturas agrícolas. Além do aumento no número de frutos, a polinização, quando bem realizada, também leva a um aumento no número e qualidade das sementes (teor de óleos), no tamanho, peso e qualidade do fruto (acidez, teor de açúcares e volume de suco) e na melhoria de seu formato (diminui os índices de deformação), encurtando o ciclo de certas culturas agrícolas e ainda uniformizando o amadurecimento dos frutos, o que diminui as perdas na colheita (WILLIAMS *et al.*, 1974; WITTER *et al.*, 2014).

Uma das vantagens da utilização da espécie *Apis mellifera* para polinização de cultivos é o domínio da técnica de criação, a disponibilidade de colônias para colocar

nos campos e a facilidade de integrar esses polinizadores com programas de manejo de pragas (WITTER *et al.*, 2014).

A *Apis mellifera* é utilizada para incrementar a produção de importantes culturas como o café (*Coffea arabica*), a maçã (*Malus domestica*), a laranja (*Citrus spp.*), e o melão (*Cucumis melo*). No Brasil, apenas duas culturas economicamente expressivas recorrem ao emprego em larga escala de abelhas melíferas para a polinização, a maçã (na Região Sul, especialmente Santa Catarina) e o melão (na Região Nordeste, destacadamente nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte) (SILVA *et al.*, 2015).

2.1.3 Declínio das abelhas

Nos últimos anos, a preocupação com a conservação das abelhas tem crescido bastante devido ao declínio dos polinizadores (ALLEN-WARDELL *et al.*, 1998). Em outubro de 2006, apicultores da costa leste dos Estados Unidos, relataram uma perda alarmante de colônias de abelhas. Até o final daquele mesmo ano, os apicultores na costa oeste daquele país também começaram a relatar tal fenômeno que causou prejuízos sem precedentes (JOHNSON, 2010). No início de 2007, apicultores europeus observaram tal fenômeno na Bélgica, na França, na Holanda, na Grécia, na Itália, em Portugal e na Espanha, também na Suíça e Alemanha, embora em menor grau (DUPONT, 2007). Na Irlanda do Norte, foi relatada diminuição superior a 50% no número de colmeias. Em abril de 2007, novos relatos desse fenômeno foram feitos em Taiwan (MOLGA, 2007). Tais perdas continuaram ao longo dos anos de 2008 e 2009 (VANENGELSDORP *et al.*, 2009). Esse fenômeno passou a ser conhecido como Desordem do Colapso da Colônia (DCC) (RATNIEKS, 2010) e é caracterizado pela perda rápida e inexplicada da população adulta de uma colmeia (UNDERWOOD, 2007).

Diversos fatores já foram apontados como responsáveis pelo novo fenômeno. Segundo JOHNSON (2010), os fatores negativos citados abaixo interferem na saúde das abelhas:

- ✓ Doenças originadas por parasitas: varroa (ácaro), nosema (fungo);
- ✓ Suscetibilidade da espécie;
- ✓ Falhas na nutrição;
- ✓ Problemas sanitários da prática da apicultura;
- ✓ Desmatamento;

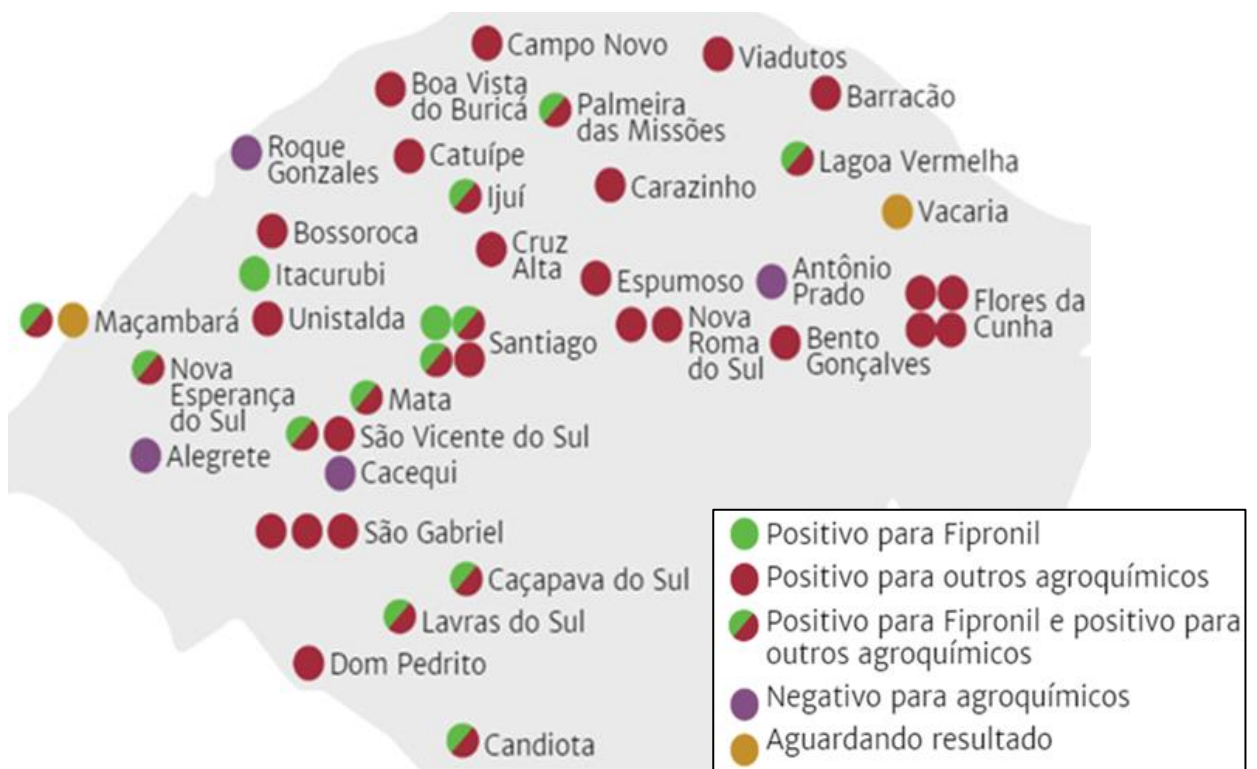
- ✓ Queimadas;
- ✓ Condições climáticas;
- ✓ Uso incorreto de defensivos agrícolas.

2.1.3.1 Registros de mortandade de abelhas no Brasil

No Brasil, a situação não é diferente, apicultores tem registrado perdas de abelhas em suas colmeias.

Em 2019 no Rio Grande do Sul, 43 amostras de abelhas mortas foram analisadas pelo laboratório oficial do Ministério da Agricultura (LANAGRO), onde 38 amostras apresentaram presença de agrotóxicos – o equivalente a 88% – três deram negativo e para duas ainda não havia resultados. Entre os casos positivos, 36% têm relação com o inseticida fipronil, como podemos observar na Figura 3.

Figura 3 - Resultados das 43 amostras de abelhas mortas no Rio Grande do Sul



Fonte: Adaptado de Secretaria da Agricultura do RS (2019).

Em São Paulo, o projeto Colmeia Viva – Mapeamento de Abelhas participativo realizou o monitoramento dos casos de mortandade das abelhas por um período de 3 anos (2017 - 2020). No total foram coletadas 88 amostras de abelhas, os resultados

das análises estão apresentados na Tabela 2 observa-se que 55% das amostras apresentaram resíduos de agrotóxicos.

Tabela 2. Resultados das amostras analisadas pelo projeto Colmeia Viva

| | Ano 1 | Ano 2 | Ano 3 | Ano 4 | Total |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Visitas com coletas de abelhas | 11 | 13 | 47 | 17 | 88 |
| Resultados positivo para resíduos de produtos químicos | 7 | 10 | 28 | 14 | 59 |
| Resultado negativo para resíduos de produtos químicos | 4 | 3 | 19 | 3 | 29 |

Fonte: Colmeia Viva (2020).

2.2 AGROTÓXICOS

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, define toda atividade relacionada aos agrotóxicos e estabelece sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, o controle, a inspeção e a fiscalização. Esta lei define os agrotóxicos, como sendo:

Produtos e os 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; bem como, as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos podem ser classificados segundo a sua função, praga que controlam, o grupo químico de suas substâncias ativas e os efeitos à saúde humana e ao meio ambiente. De acordo com sua função os agrotóxicos podem ser classificados em:

- a) Inseticidas: controlam insetos;

- b) Fungicidas: destroem ou inibem fungos;
- c) Herbicidas: combatem plantas invasoras;
- d) Desfolhantes: eliminam folhas indesejadas;
- e) Fumigantes: combatem bactérias do solo;
- f) Raticidas: combatem ratos e outros roedores;
- g) Moluscocidas: combatem moluscos;
- h) Nematicidas: combatem nematoides;
- i) Acaricidas: utilizados no combate de ácaros.

No Brasil, o processo de registro de agrotóxicos envolve o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável pela avaliação do impacto dos agrotóxicos na saúde humana e pelo estabelecimento dos limites máximos de resíduos (LMRs) (ANVISA, 2011a). Os LMRs referem-se a valores provenientes de experimentos de campo, exigidos para cada cultura, levando em consideração a ingestão diária aceitável (IDA), que é a quantidade máxima de uma substância, que ingerida diariamente durante toda a vida não oferece risco a saúde (FERMAM & ANTUNES, 2009). Atualmente, a legislação determina os limites máximos de resíduos para os agrotóxicos em mel e produtos apícolas.

Além disso, dois programas de monitoramento de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal e animal estão em vigor no Brasil: o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA, e o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (ANVISA, 2010).

O PNCRC foi instituído pela Portaria nº 51, de 6 de maio de 1986, sendo sua adequação realizada pela Portaria nº 527, de 15 de agosto de 1995. É um programa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que tem como objetivo monitorar a efetividade dos controles implementados pelos sistemas de produção e a respectiva qualidade e segurança dos produtos de origem animal disponibilizados para os mercados interno e externo. Este monitoramento é realizado através da verificação da presença e dos níveis de resíduos de medicamentos veterinários, agrotóxicos e contaminantes nas cadeias produtivas de leite, mel, ovos, pescado e carnes - frango, bovina, suína, equina, avestruz, caprina e ovina (MAPA, 2018).

2.2.1 Efeitos nocivos dos agrotóxicos

O uso dos agrotóxicos traz benefícios inquestionáveis para a agricultura, garantindo o controle de pragas e o consequente aumento da produtividade (VEIGA, 2006). Entretanto, muitas dessas contribuições e práticas ocorrem em detrimento da saúde humana e ambiental, e da manutenção da biodiversidade.

Os efeitos sobre a saúde podem ser de dois tipos: 1) efeitos agudos, ou aqueles resultantes da exposição a concentrações de um ou mais agentes tóxicos capazes de causarem dano efetivo aparente em um período de 24 h; 2) efeitos crônicos, ou aqueles resultantes de uma exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos (MULTIGNER, 2005). Entre os efeitos nocivos causados ao homem por estas substâncias, pode-se citar:

- a) Efeitos agudos: fraqueza, dor de cabeça, náuseas, vômitos, espasmos musculares;
- b) Efeitos crônicos: lesões hepáticas e renais, diversos tipos de câncer, danos ao sistema nervoso central, entre outros.

Além disso, a larga utilização de agrotóxicos no processo de produção agropecuária tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, pela sua acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (AMARO & GODINHO, 2012).

Um dos efeitos ambientais indesejáveis dos agrotóxicos é a contaminação de espécies que não interferem no processo de produção que se tenta controlar (espécies não-alvos), dentre as quais se incluem as abelhas. A maioria dos agrotóxicos é nociva para as abelhas em determinada concentração, principalmente os inseticidas (LOZOWICKA, 2013).

As abelhas são expostas aos agrotóxicos por via do contato direto com a nuvem de pulverização, durante o forrageamento. Por contato com as superfícies atingidas pela aplicação do produto, por exemplo, resíduos nas folhas. E ainda por causa do consumo de néctar e de pólen contaminado (MANUAL IBAMA, 2017). Na Tabela 3 observa-se a toxicidade de contato e a toxicidade oral de alguns agrotóxicos para as abelhas, medida pela dose letal mediana (LD₅₀, do inglês *Lethal Dose*) (BAYO & GOKA, 2016). LD₅₀ corresponde à dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população. Considerando que cada abelha *Apis mellifera* tem massa, em média, de 0,1 g, calculou-se o valor de LD₅₀ correspondente em µg kg⁻¹.

Tabela 3 – Classe, agrotóxico e suas respectivas toxicidades por contato e oral para as abelhas

| Classe | Agrotóxicos | LD ₅₀ contato (µg abelha ⁻¹) | LD ₅₀ contato (µg kg ⁻¹) | LD ₅₀ oral (µg abelha ⁻¹) | LD ₅₀ oral (µg kg ⁻¹) |
|-------------|-----------------|---|---|--|--|
| Inseticidas | Carbofurano | 0,16 | 1.600 | | |
| | Clorpirifós | 0,072 | 720 | 0,24 | 2.400 |
| | Clotianidina | 0,039 | 390 | 0,004 | 40 |
| | Diazinona | 0,38 | 3.800 | 0,21 | 2.100 |
| | Fipronil | 0,007 | 70 | 0,001 | 10 |
| | Fenproximoato | 11 | 110.000 | | |
| | Imidacloprido | 0,061 | 610 | 0,013 | 130 |
| | Tau-Fluvalinato | 8,7 | 87.000 | 45 | 450.000 |
| Fungicidas | Azoxistrobina | 200 | 2.000.000 | 25 | 250.000 |
| | Boscalida | 200 | 2.000.000 | 166 | 1.660.000 |
| | Carbendazim | 50 | 500.000 | | |
| | Miclobutanil | 40 | 400.000 | 34 | 340.000 |
| | Propiconazol | 50 | 500.000 | 77 | 770.000 |
| | Tebuconazol | 200 | 2.000.000 | 83 | 830.000 |

Fonte: BAYO & GOKA, 2016.

Em consequência a essa preocupação, foi publicado em 09 de fevereiro de 2017 uma Instrução Normativa que estabelece diretrizes, requisitos e procedimentos para a avaliação dos riscos de ingredientes ativos de agrotóxicos para insetos polinizadores. A norma, destinada a produtos ainda não registrados no país ou em reavaliação, é a primeira a estipular critérios de decisão com base no risco, ou seja, na probabilidade de uma espécie ser afetada pela exposição a agrotóxicos. Esta condiciona o registro de agrotóxicos à apresentação de informações que permitam o uso adequado desses produtos, sem efeitos que comprometam a sobrevivência, a reprodução e o desenvolvimento das abelhas, com o objetivo de oferecer mais proteção a abelhas e outros polinizadores (BRASIL, 2017).

2.3 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS

2.3.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos

Em virtude da crescente preocupação com relação à presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos e em amostras ambientais, diferentes metodologias para a determinação desses resíduos são realizadas. Dentre as técnicas para determinação de resíduos de agrotóxicos destacam-se a cromatografia gasosa e a líquida.

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua interação entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida em uma coluna, sendo esta aplicada à análise de compostos voláteis ou volatizáveis que sejam termicamente estáveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009).

Como a maioria dos compostos não são suficientemente voláteis para ser analisados por cromatografia gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) tem tido grande destaque. Na HPLC o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel (líquida) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; HARRIS, 2012). A HPLC baseia-se na diferente distribuição dos analitos e componentes da matriz entre uma fase estacionária e a fase móvel (um líquido) (HARRIS, 2012).

A fim de obter análises com maior resolução e mais rapidez, tem-se usado a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*). Esta técnica fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, entretanto emprega colunas cromatográficas com dimensões reduzidas (5 a 10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1 a 2,1 mm), recheadas com partículas de FE $\leq 2 \mu\text{m}$, podendo ser utilizadas altas velocidades lineares de fase móvel (FM) (MALDANER; JARDIM, 2012). O seu uso possui inúmeras vantagens, como o emprego de menor volume de amostra, menor consumo de fase móvel, menor tempo de análise, maior resolução dos picos cromatográficos, melhor detectabilidade e maior razão sinal-ruído, o que diminui o valor do limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) (OSHITA; JARDIM, 2015; LOOSE, 2020)

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho.

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O princípio básico da espectrometria de massas é gerar íons de compostos orgânicos ou inorgânicos através de algum método adequado, para separar esses íons pelas suas razões massa/carga (m/z) e detectá-los qualitativa e quantitativamente (GROSS, 2004).

As fontes de ionização mais utilizadas em cromatografia líquida são ionização por eletronebulização ESI (do inglês *electrospray ionization*) e ionização química à pressão atmosférica, APCI (do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) (LANÇAS, 2009).

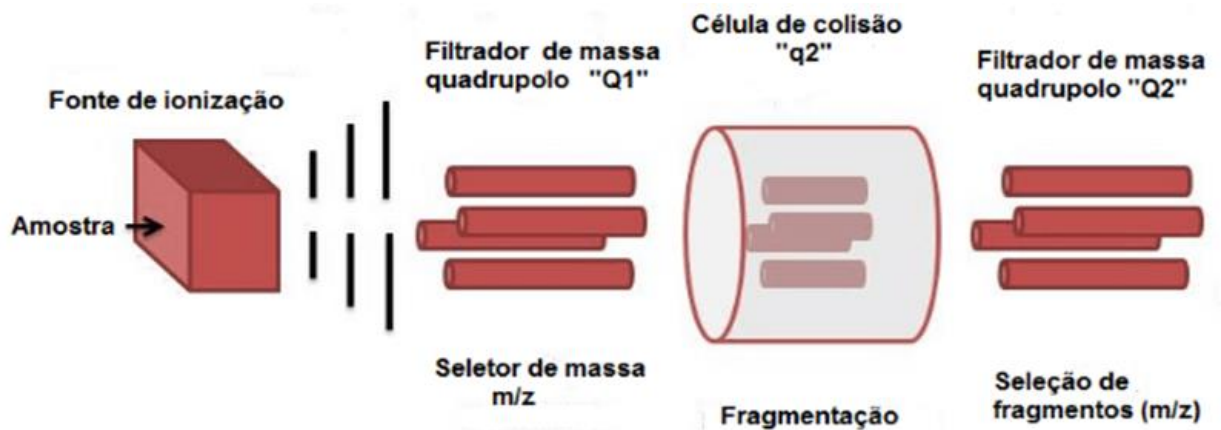
Mais comumente utiliza-se a ionização por eletronebulização, onde a amostra é dissolvida e pressurizada em tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. À medida que ocorre a dessolvatação, assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N_2), o tamanho das gotas é reduzido até que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Assim ocorre a chamada “explosão coulombica”. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, que são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização. Neste processo, apenas a ionização ocorre à pressão atmosférica, o espectrômetro de massas se encontra sob “vácuo” (LANÇAS, 2009).

Os analisadores de massas separam íons de acordo com a razão m/z . A escolha do analisador de massas mais apropriado depende de fatores como: a faixa de massas desejada, a resolução e o recurso disponível. Alguns exemplos são: quadrupolo (e triplo quadrupolo), trapeamento de íons (do inglês *ion trap*) e tempo de voo (do inglês *time-of-flight*) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O analisador de massas tipo triplo quadrupolo (TQ) é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced*

dissociation), e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Na Figura 4 encontra-se esquematizado um analisador de massas triplo quadrupolo.

Figura 4 - Esquema de um analisador de massas triplo quadrupolo



Fonte: Modificado Agilent (2016).

Dentre as técnicas de operação para obtenção do espectro de massas em MS/MS, estão varredura completa (do inglês *full scan*), Monitoramento do Íon Seleccionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*), Varredura do Íon Produto, Varredura do Íon Precursor e Monitoramento Seletivo de Reações (SRM, do inglês *Select Reaction Monitoring*).

No modo de varredura SRM é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no Q1 e seus correspondentes íons produto que são filtrados em Q3. Este método permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a sensibilidade para o monitoramento, associado ao aumento na seletividade (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

2.3.2 Preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos

O desenvolvimento de procedimentos para o preparo de amostras tem utilizado várias técnicas e sendo constantemente estudado devido à grande variedade de agrotóxicos utilizados na agricultura e as diferentes complexidades das matrizes.

Tipicamente, o preparo de amostras visa extrair os analitos da amostra a ser analisada, e esse procedimento varia com o grau de seletividade, velocidade e conveniência. A otimização do preparo de amostras é de fundamental importância para a obtenção de resultados exatos e precisos. Idealmente, a técnica de preparo de amostras deve ser rápida, de baixo custo, de fácil execução e ser compatível com o instrumento analítico (BORGES *et al.*, 2015). Além de concentrar/isolar o analito, o preparo de amostras tem como objetivo eliminar os interferentes, porém são necessários métodos que sejam simples, baratos, rápidos, que empreguem pequenas ou nenhuma quantidade de solventes e, principalmente, sejam compatíveis com o instrumento analítico. Dessa forma, as tendências atuais apontam no sentido de miniaturização das técnicas de preparo de amostras, visando à proteção ambiental e à diminuição dos custos das análises, usando uma quantidade mínima ou nula de solventes orgânicos (BORGES *et al.*, 2015).

Na literatura tem sido relatado o uso de diferentes técnicas de preparo de amostra para a extração de resíduos de agrotóxicos em abelhas. A Tabela 4, apresenta alguns destes métodos.

Tabela 4 – Diferentes preparos de amostras para determinação de agrotóxicos em abelhas

| Processamento de amostra | Extração | Partição | Limpeza | Referências |
|---|--|-----------------|---|---------------------------------------|
| Nitrogênio | 2 g de abelhas + 10 mL H ₂ O (vortex - 5min) + 10 mL ACN 0,1% ácido acético (vortex - 20 min) | Sais citrato | 7 mL 900 mg MgSO ₄ + 150 mg PSA + 150 mg C18 (vortex 1 min + centrifugação) | MARTINELLO <i>et al.</i> , 2021 |
| 0,14 g (2 abelhas) tubo de 50 mL maceradas com bastão de vidro | 15 mL de ACN 1% ácido acético - agitação vortex por 1 min | Sais acetato | Sobrenadante - 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA - Agitação vortex 1 min / Centrifugação por 5 min | PRADO <i>et al.</i> , 2020 |
| 1 g de abelha + 2 peças de homogeneizador de cerâmica (Agilent) + 4 mL água ultrapura - Agitação vortex 120 s | 5 mL de ACN 0,1% ácido acético - Agitação vortex 1 min / Banho ultrassônico 10 min | Sais acetato | 1 mL Sobrenadante - 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg GCB Agitação - vortex 30 s / Centrifugação 4500 rpm por 5 min. Filtração 0,22 µm | GARCÍA-VALCÁRCEL <i>et al.</i> , 2019 |
| 2 g cria de abelha + 5 mL H ₂ O agitação manual / Repouso 5 min | 5 mL de ACN sonicadas por 21 s // amplitude 75%, pulso: 5 s; repouso: 2 s. Agitação extrator axial automático (AGYTAX [®] , Cirta Lab. S.L.) por 15 min | Sais citrato | 1 mL - Cartucho SPE 40 mg Z-Sep (pré-condicionado 1 mL ACN) | MURCIA MORALES <i>et al.</i> , 2020 |
| 5 g abelhas + 30 g de bolas de aço inoxidável | 3 mL de água ultrapura, 3 mL de heptano e 10 mL de ACN com TEA a 2% | Sais citrato | 8 mL sobrenadante Freezer 15 h -18 °C / 6 mL extrato PSA + C18 vortex 10 s / centrifugação 5000 rpm 2 min | GAËLLE <i>et al.</i> , 2018 |

Fonte: A autora (2022).

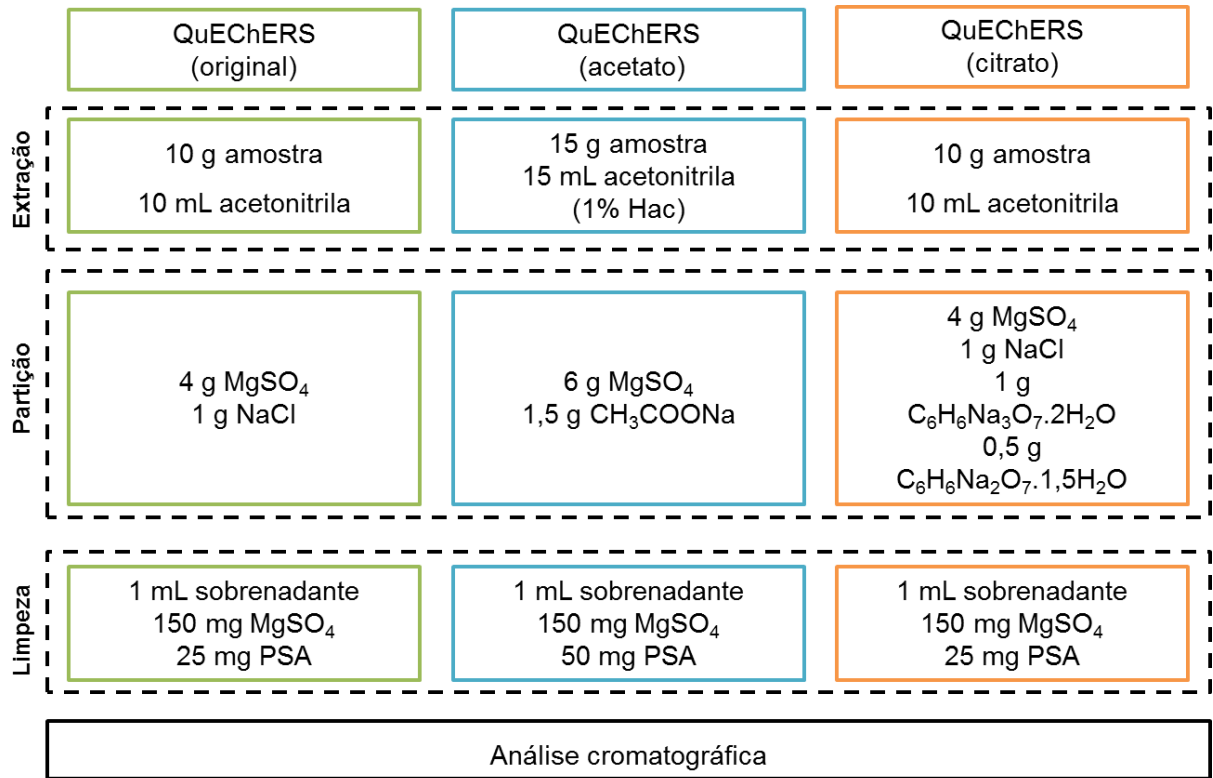
2.3.2.1 Método QuEChERS

Em 2003 foi publicado um novo método de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos denominado QuEChERS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Esse método é muito utilizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, proporcionando exatidão e precisão aceitáveis de agrotóxicos ácidos, neutros e básicos (PRESTES *et al.*, 2011).

Essa técnica é baseada em três etapas principais: (1) extração com acetonitrila; (2) partição promovida pela adição de sais, por exemplo: sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl) e (3) limpeza do extrato empregando a técnica denominada Extração em Fase Sólida Dispersiva (ZANELLA *et al.*, 2015).

Na otimização do método QuEChERS, percebeu-se que a utilização de tampões promovia recuperações satisfatórias para compostos dependentes do pH. Assim LEHOTAY e colaboradores (2005) desenvolveram o método QuEChERS-acetato, no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio e adição de ácido acético à acetonitrila. Em 2007, ANASTASSIADES e colaboradores propuseram o método QuEChERS-citrato, o qual utiliza uma mistura de citrato de sódio di e sesquiidratados como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Na Figura 6 estão representadas as principais etapas do método QuEChERS e suas diferentes versões. CURBELO e colaboradores (2014) utilizaram sais de amônio (formiato e acetato de amônio) para promover a partição e extração de 43 agrotóxicos de diferentes classes. Estes sais são mais voláteis o que facilita a ionização quando a análise é acoplada a espectrometria de massas em série.

Figura 5 - Representação das principais versões do método QuEChERS original, acetato e citrato



Fonte: Adaptado de PRESTES *et al.* (2011).

A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de interferentes provenientes da amostra, por exemplos, ceras, gorduras e pigmentos. Além disso, a acetonitrila proporciona a extração de uma ampla faixa de analitos com diferentes polaridades. Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para LC-MS/MS do que acetona e acetato de etila e pode ser utilizada sem problemas na análise por GC-MS/MS (PRESTES *et al.*, 2011).

A etapa de partição, através da adição de sais, promove o efeito “*salting out*”, sendo utilizada em vários métodos multirresíduo. 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).

A limpeza dos extratos é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico. Um novo método de limpeza do extrato (*clean-up*) denominado extração em fase sólida dispersiva (do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*, d-SPE) foi proposto juntamente com o método QuEChERS. A d-SPE permite que a limpeza do extrato e a redução de água residual sejam efetuadas de forma rápida e simultânea. O sorvente retém as interferências da

matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2011). Diferentes sorventes podem ser utilizados nesta etapa. Na Tabela 5 estão descritos os principais sorventes e suas finalidades.

Tabela 5 - Principais sorventes e suas finalidades

| Sorventes | Coextrativos removidos |
|------------------|---|
| PSA | Açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos e pigmentos |
| C18 | Lipídeos e coextrativos apolares |
| GCB | Pigmentos, esteróis e coextrativos apolares |
| Z-Sep+ | Lipídeos e pigmentos |
| EMR | Lipídeos |

Fonte: Prestes *et al.* (2011).

2.4 VALIDAÇÃO

O objetivo da validação consiste em demonstrar que um determinado método analítico proposto é adequado ao que se propõe; ou seja, garantir que o método analítico seja exato e preciso, além de estável e reproduzível. O processo de validação é a garantia experimental de que o método é adequado à finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados (ALBANO & RAYA-RODRIGUEZ, 2015).

No Brasil, há guias que auxiliam no processo de validação de um método analítico, tais como, o guia de “Orientação sobre validação de métodos analíticos” publicado em 2020 pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2020). Além disso, em 2017 a ANVISA, publicou a resolução - RDC nº166 de julho de 2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos.

Além do Brasil, outros órgãos internacionais também dispõem de guias como, por exemplo, a SANTÉ (Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*) e o *Codex Alimentarius*.

Os parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos avaliados usualmente são: curva analítica e faixa linear, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), *ion ratio*, limite de detecção e de quantificação. Estes estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos

| Parâmetro | Definição | Aplicação | Critério |
|--------------------------|--|---|--|
| Seletividade | Capacidade do método em detectar o analito de interesse mesmo na presença de outros componentes da matriz | Extração de matriz "branco" | Ausência de picos interferentes nos tempos de retenção do analitos |
| Linearidade | Habilidade em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações dos analitos | Curva Analítica ($y = ax + b$) | $r^2 \geq 0,99$ |
| Faixa Linear de trabalho | Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente | Curva Analítica ($y = ax + b$) | $r^2 \geq 0,99$ |
| Efeito Matriz | Supressão ou aumento do sinal analítico devido a influência dos componentes da matriz | Comparação entre curvas em solvente e em extrato branco | $\pm 20\%$ |
| Limite de detecção | Menor concentração da substância em análise que pode ser detectada | S/R = 3 | - |
| Limite de quantificação | Menor concentração da substância em exame que pode ser medida | S/R = 10 | \leq LMR |
| Precisão | Avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes | Repetibilidade; Precisão intermediária | RSD $\leq 20\%$ |
| Exatidão | Grau de concordância entre os resultados individuais de um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro | Ensaio de fortificação | 70-120% |
| <i>Ion Ratio</i> | Razão dos íons de identificação e quantificação | Calculado pela razão das áreas dos íons de identificação e de quantificação em cada injeção | $\pm 30\%$ |

Fonte: INMETRO, 2020; ANVISA, 2017; e SANTE, 2019.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental do presente trabalho baseia-se na otimização e validação de um preparo de amostra utilizando o método mini-QuEChERS para a extração multirresíduo de agrotóxicos em abelhas (*Apis mellifera*) e posterior determinação por UHPLC-MS/MS.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP)/Centro de Pesquisa em Cromatografia e Espectrometria de Massas (CPCEM) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- ◇ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3 (Millipore, EUA);
- ◇ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ◇ Centrífuga refrigerada SL 703 (Solab, Brasil);
- ◇ Agitador vortex – Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ◇ Balanças analíticas de precisão modelo UX-420H e APX-200 (Shimadzu, Japão);
- ◇ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ◇ IKA® T25 digital ultraturrax (IKA, EUA);
- ◇ Sistema UHPLC-MS/MS (Waters, EUA) equipado com:
 - Cromatógrafo a líquido modelo Acquity, composto de sistema controlador de solventes, bomba binária Acquity (Waters, EUA); detector MS do tipo triplo quadrupolo; modelo Xevo TQ-XS e amostrador automático sample manager FTN-I Acquity (Waters, EUA); interface/fonte de ionização por eletronebulização (ESI Zpray™) (Waters, EUA);
 - Nitrogênio com pureza $\geq 99\%$ a partir do gerador de nitrogênio Peak Scientific (Escócia) modelo NM30L-MS;
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm; 1,8 μm) (Waters, EUA).
 - Sistema de aquisição de dados MassLynx V 4.1 (Waters, EUA);

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS

- ◇ Acetonitrila grau HPLC (Supelco, Alemanha);
- ◇ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R, resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- ◇ Ácido fórmico ≥ 98% (Honeywell Fluka, Alemanha);
- ◇ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- ◇ Acetato de sódio anidro (J. T. Baker, EUA);
- ◇ Acetato de amônio (Merck, Alemanha);
- ◇ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ◇ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ◇ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Extran[®] neutro (Merck, Brasil);
- ◇ Formiato de amônio (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Fase fluorada, d.p. 35-70 μm, diâmetro de poro 60 nm, 9% de carbono (Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil);
- ◇ Hidrogenocitrato de sódio sesquidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Hexano (95% n-hexano) (J. T. Baker, EUA);
- ◇ Metanol, grau HPLC (Supelco, Alemanha);
- ◇ Sorvente Bondesil C18 com diâmetro de partícula (d.p.) 40 μm (Agilent, EUA);
- ◇ Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 μm (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Supel[™] QuE Z-Sep+ (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, Japão);
- ◇ Quitosana (obtida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*) (Rio Grande, Brasil);

- ◇ Filtros de PTFE de 13 mm e porosidade de 0,22 μm (Analítica, Brasil);
- ◇ Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- ◇ Microtubo, tipo Eppendorf, capacidade 2 mL (Axygen Scientific, EUA);
- ◇ Padrões sólidos dos compostos em estudo (Tabela 7);
- ◇ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ◇ Vidraria usual de laboratório.

3.3 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE

A fim de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise para cada amostra no sistema cromatográfico, além da localização de fontes de erro, são adicionados o Padrão Interno e o Padrão de Controle (SANTE, 2019). Estas substâncias são adicionadas em diferentes estágios do procedimento analítico e possuem diferentes finalidades.

O trifenilfosfato (TTP, do inglês *triphenyl phosphate*) foi utilizado como padrão interno na concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, nas análises por UHPLC-MS/MS. O padrão interno foi utilizado somente para verificação da resposta do equipamento, não sendo utilizado para quantificação.

Como padrão de controle foi utilizada a atrazina deuterada para a avaliação do procedimento de extração, uma vez que é adicionado à amostra anteriormente à extração dos analitos, nas concentrações empregadas para avaliação dos ensaios de recuperação.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS

Os compostos selecionados para este estudo foram adquiridos das empresas LGC Standards, Sigma-Aldrich e Chemservice, listados na Tabela 7, juntamente com a classe e propriedades físico-químicas.

Tabela 7 – Informações dos agrotóxicos, fórmula molecular, classe, solubilidade, log P e pKa

| Compostos | Fórmula molecular | Classe | Solubilidade água 20 °C (mg L ⁻¹) | Log P | pKa (25 °C) |
|-------------------|---|--------|---|-------|--------------|
| 2,4-D | C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃ | H | 24300 | -0,82 | 3,40 |
| Acefato | C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS | I | 790000 | -0,85 | 8,35 |
| Acetamiprido | C ₁₀ H ₁₁ CIN ₄ | I | 2950 | 0,8 | 0,7 |
| Alacloro | C ₁₄ H ₂₀ CINO ₂ | H | 240 | 3,09 | 0,62 |
| Ametrim | C ₉ H ₁₇ N ₅ S | H | 200 | 2,63 | 10,07 |
| Atrazina | C ₈ H ₁₄ CIN ₅ | H | 35 | 2,7 | 1,7 |
| Azaconazol | C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ N ₃ O ₂ | F | 300 | 2,36 | 3 |
| Azametifós | C ₉ H ₁₀ CIN ₂ O ₅ PS | I | 1100 | 1,05 | - |
| Azinfós-metil | C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂ | I | 28 | 2,96 | 5 |
| Azinfós-etil | C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂ | I | 4,5 | 3,18 | - |
| Azoxistrobina | C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅ | F | 6,7 | 2,5 | Não dissocia |
| Benalaxil | C ₂₀ H ₂₃ NO ₃ | F | - | - | - |
| Bitertanol | C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂ | F | 3,8 | 4,1 | Não dissocia |
| Boscalida | C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O | F | 4,6 | 2,96 | Não dissocia |
| Bromoconazol | C ₁₃ H ₁₂ BrCl ₂ N ₃ O | F | 48,3 | 3,24 | 2,75 / -4,02 |
| Buprofezina | C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS | I | 0,46 | 4,93 | Não dissocia |
| Carbaril | C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ | I | 9,1 | 2,36 | 10,4 |
| Carbendazim | C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ | F | 8,0 | 1,48 | 4,2 |
| Carbofurano | C ₁₂ H ₁₅ NO ₃ | I | 322 | 1,8 | Não dissocia |
| Carbofurano-3-OH | C ₁₂ H ₁₅ NO ₃ | I | - | - | - |
| Carboxina | C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S | F | 134 | 2,3 | 0,5 |
| Cletodim | C ₁₇ H ₂₆ CINO ₃ S | H | - | - | - |
| Clorantraniliprol | C ₁₈ H ₁₄ BrCl ₂ N ₅ O ₂ | I | 0,88 | 2,86 | 10,88 |
| Clorfenvinfós | C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P | I | 145 | 3,8 | - |
| Clorimuron-etil | C ₁₅ H ₁₅ CIN ₄ O ₆ S | H | 1200 | 0,11 | 4,2 |
| Clorpirifós-metil | C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS | I | 2,74 | 4,00 | - |
| Clortiofós | C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₃ PS ₂ | I | - | 4,34 | - |
| Clofentizina | C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄ | A | 0,0342 | 4,09 | - |
| Clomazona | C ₁₂ H ₁₄ CINO ₂ | H | 1212 | 2,58 | Não dissocia |
| Clorpirifós | C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS | I | 1,05 | 4,7 | Não dissocia |
| Clotianidina | C ₆ H ₈ CIN ₅ O ₂ S | I | 340 | 0,905 | 11,1 |
| Cianazina | C ₉ H ₁₃ CIN ₆ | H | 171 | 2,1 | 12,9 |
| Ciazofamida | C ₁₃ H ₁₃ CIN ₄ O ₂ S | F | 0,107 | 3,2 | Não dissocia |
| Cimoxamil | C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃ | F | 780 | 0,67 | 9,3 |
| Ciproconazol | C ₁₅ H ₁₈ CIN ₃ O | F | 93 | 3,09 | Não dissocia |
| Ciprodinil | C ₁₄ H ₁₅ N ₃ | F | - | - | 4,44 |
| Demetom sulfona | C ₆ H ₁₅ O ₅ PS ₂ | I | - | -0,47 | - |

| Compostos | Fórmula molecular | Classe | Solubilidade água 20 °C (mg L ⁻¹) | Log P | pKa (25 °C) |
|-----------------------|--|--------|---|-------|--------------|
| Diazinona | C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS | I | 60 | 3,69 | 2,6 |
| Diclotofós | C ₈ H ₁₆ NO ₅ P | I | 1000000 | -0,5 | - |
| Diclosulam | C ₁₃ H ₁₀ Cl ₂ FN ₅ O ₃ S | H | 6,32 | 0,85 | 4,0 |
| Difenoconazol | C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃ | F | 15,0 | 4,36 | 1,07 |
| Diflubenzuron | C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂ | I | 0,08 | 3,89 | - |
| Dimetoato | C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂ | I | 25900 | 0,75 | Não dissocia |
| Dimetomorfe | C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄ | F | - | - | -1,3 |
| Dimoxistrobina | C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₃ | F | 4,3 | 3,59 | Não dissocia |
| Diniconazol | C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O | F | 4 | 4,3 | - |
| Diuron | C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O | H | 35,6 | 2,87 | Não dissocia |
| EPN | C ₁₄ H ₁₄ NO ₄ PS | I | 0,5 | 5,02 | - |
| Epoxiconazol | C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O | F | 7,1 | 3,3 | Não dissocia |
| Etefom | C ₂ H ₆ ClO ₃ P | O | - | - | - |
| Etiofencarbe | C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S | I | 1900 | 2,04 | - |
| Etofemproxi | C ₂₅ H ₂₈ O ₃ | I | 0,0225 | 6,9 | Não dissocia |
| Etoprofós | C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂ | I | 1300 | 2,99 | Não dissocia |
| Etoxisulfurom | C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₇ S | H | 5000 | 1,01 | 5,28 |
| Famoxadona | C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₄ | F | 0,059 | 4,65 | Não dissocia |
| Fenamidona | C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS | F | 7,8 | 2,8 | Não dissocia |
| Fenamifós | C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS | N | 345 | 3,3 | Não dissocia |
| Fenarimol | C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O | F | 13,7 | 3,69 | - |
| Fenazaquim | C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O | A | 0,102 | 5,51 | 2,44 |
| Fenbuconazol | C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄ | F | - | - | Não dissocia |
| Fenhexamida | C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂ | F | 24,0 | 3,51 | 7,3 |
| Fenoxicarbe | C ₁₇ H ₁₉ NO ₄ | I | 7,9 | 4,07 | Não dissocia |
| Fempropatrina | C ₂₂ H ₂₃ NO ₃ | I | 0,33 | 6,04 | - |
| Fempiroximato | C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄ | A | 0,023 | 5,01 | Não dissocia |
| Fentiona | C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂ | I | 4,2 | 4,84 | - |
| Fipronil | C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS | I | - | - | Não dissocia |
| Fluasifope-P-butílico | C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄ | H | 0,93 | 4,5 | - |
| Flupicolid | C ₁₄ H ₈ Cl ₃ F ₃ N ₂ O | F | - | - | - |
| Fluquinconazol | C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O | F | 1,15 | 3,24 | 0,9 / -4,4 |
| Fluroxipir | C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃ | H | 6500 | 0,04 | 2,94 |
| Flusilazol | C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si | F | 41,9 | 3,87 | 2,5 |
| Flutolanil | C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂ | F | 8,01 | 3,17 | Não dissocia |
| Flutriafol | C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O | F | 95,0 | 2,3 | 2,3 |
| Furathiocarb | C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ S | I | - | - | - |
| Hexitiazoxi | C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S | A | 0,1 | 2,67 | Não dissocia |
| Imazalil | C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O | F | 184 | 2,56 | 6,49 |

| Compostos | Fórmula molecular | Classe | Solubilidade água 20 °C (mg L ⁻¹) | Log P | pKa (25 °C) |
|----------------------|--|--------|---|---------|------------------|
| Imazamox | C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₄ | H | 626000 | 5,36 | 2,3 / 3,3 / 10,8 |
| Imazapique | C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃ | H | 2230 | 2,47 | 2,0 / 3,6 / 11,1 |
| Imazapyr | C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃ | H | 9740 | 0,11 | 1,9 / 3,6 / 11 |
| Imazaquin | C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₃ | H | 102000 | -1,09 | 3,45 / 11,03 |
| Imazetapir | C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₃ | H | 1400 | 1,49 | 2,1 / 3,9 |
| Imidacloprido | C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂ | I | 610 | 0,57 | Não dissocia |
| Indoxacarbe | C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇ | I | 0,2 | 4,65 | Não dissocia |
| Iprodiona | C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃ | F | 6,8 | 3,0 | Não dissocia |
| Iprovalicarbe | C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃ | F | 17,8 | 3,2 | Não dissocia |
| Cresoxim metílico | C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ | F | - | - | - |
| Linurom | C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂ | H | 63,8 | 3,0 | Não dissocia |
| Malationa | C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂ | I | 148 | 2,75 | Não dissocia |
| Mecarbam | C ₁₀ H ₂₀ NO ₅ PS ₂ | I | 1000 | 2,29 | Não dissocia |
| Metaflumizone | C ₂₄ H ₁₆ F ₆ N ₄ O ₂ | I | - | - | - |
| Mepanipirim | C ₁₄ H ₁₃ N ₃ | F | - | - | - |
| Mefosfolam | C ₈ H ₁₆ NO ₃ PS ₂ | I | 57 | 1,04 | - |
| Mepronil | C ₁₇ H ₁₉ NO ₂ | F | 12,7 | 3,66 | - |
| Metalaxil | C ₁₅ H ₂₁ NO ₄ | F | 1,75 | 1,75 | - |
| Metconazol | C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O | F | 30,4 | 3,85 | 11,38/1,08 |
| Metamidofós | C ₂ H ₈ NO ₂ PS | I | 200000 | (-)0,79 | - |
| Metidationa | C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃ | I | 240 | 2,57 | - |
| Methiocarbe | C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S | I | 27 | 3,18 | Não dissocia |
| Metiocarbe sulfona | C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S | I | 27 | 3,18 | Não dissocia |
| Metiocarbe sulfóxido | C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S | I | 27 | 3,18 | Não dissocia |
| Metomil | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S | I | 55000 | 0,09 | Não dissocia |
| Metoxifenoazida | C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃ | I | 3,3 | 3,72 | 12,20 |
| Metolachlor | C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂ | H | - | - | - |
| Metribuzim | C ₈ H ₁₄ N ₄ OS | H | 10700 | 1,75 | 1,3/12,8 |
| Metsulfurom metílico | C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S | H | 2790 | (-)1,87 | 3,75 |
| Mevinfós | C ₇ H ₁₃ O ₆ P | I | 600000 | 0,127 | - |
| Molinato | C ₉ H ₁₇ NOS | H | 1100 | 2,86 | Não dissocia |
| Monocrotofós | C ₇ H ₁₄ NO ₅ P | I | 818000 | (-)0,22 | - |
| Monolinurom | C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂ | H | 735 | 2,2 | - |
| Miclobutanil | C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄ | F | 132 | 2,89 | 2,3 |
| Nicosulfuron | C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O ₆ S | H | 7500 | 0,61 | 4,78/7,58 |
| Nuarimol | C ₁₇ H ₁₂ ClFN ₂ O | F | 26 | 3,18 | - |
| Ometoato | C ₅ H ₁₂ NO ₄ PS | I | 500000 | (-)0,9 | - |
| Oxadixil | C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄ | F | 3400 | 0,65 | - |
| Oxamil | C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S | I | 148100 | (-)0,44 | (-)2,11 |

| Compostos | Fórmula molecular | Classe | Solubilidade água 20 °C (mg L ⁻¹) | Log P | pKa (25 °C) |
|----------------------|--|--------|---|--------|--------------|
| Paraoxon-ethyl | C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P | I | - | - | - |
| Parationa metílica | C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS | I | 55 | 3 | - |
| Penconazol | C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃ | F | 73 | 3,72 | 1,51 |
| Pencicurom | C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O | F | 0,3 | 4,68 | Não dissocia |
| Pendimetalina | C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄ | H | 0,33 | 5,4 | 2,8 |
| Penoxsulam | C ₁₆ H ₁₄ F ₅ N ₅ O ₅ S | H | 408 | -0,602 | 5,1 |
| Picoxystrobin | C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄ | F | 3,1 | 3,6 | Não dissocia |
| Phorate | C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃ | I | 50 | 3,86 | - |
| Phosalone | C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂ | I | 1,4 | 4,01 | - |
| Phosmet | C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂ | I | 15,2 | 2,8 | Não dissocia |
| Piperonyl butoxide | C ₁₉ H ₃₀ O ₅ | O | 14,3 | 4,75 | - |
| Pirimicarb | C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂ | I | 3100 | 1,7 | 4,4 |
| Pirimiphos-ethyl | C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O ₃ PS | I | 93,0 | 4,85 | - |
| Pirimiphos methyl | C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS | I | 11 | 4,2 | 4,3 |
| Procloraz | C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂ | F | 26,5 | 3,5 | 3,8 |
| Procymidone | C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂ | F | 2,46 | 3,3 | Não dissocia |
| Profenofos | C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS | I | 28 | 1,7 | Não dissocia |
| Prometryn | C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S | H | 33 | 3,34 | 4,1 |
| Propanil | C ₉ H ₉ Cl ₂ NO | H | 95,0 | 2,29 | 19,1 |
| Propargite | C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S | A | 0,215 | 5,7 | Não dissocia |
| Propiconazole | C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂ | F | 150 | 3,72 | 1,09 |
| Propoxur | C ₁₁ H ₁₅ NO ₃ | I | 1800 | 0,14 | - |
| Propyzamide | C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO | H | 9,0 | 3,27 | 10,38 |
| Prothiofos | C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ O ₂ PS ₂ | I | 0,07 | 5,67 | - |
| Pyraclostrobin | C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄ | F | 1,9 | 3,99 | Não dissocia |
| Pyrazophos | C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS | F | 4,2 | 3,8 | - |
| Pyrazosulfuron-ethyl | C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O ₇ S | H | 14,5 | 3,16 | 3,7 |
| Pyridaben | C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS | I | 0,022 | 6,37 | Não dissocia |
| Pyridaphenthion | C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS | I | 100 | 3,2 | - |
| Pyridate | C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂ O ₂ S | H | 1,49 | 4,01 | Não dissocia |
| Pyrimethanil | C ₁₂ H ₁₃ N ₃ | F | 110 | 2,84 | 3,52 |
| Pyriproxifen | C ₂₀ H ₁₉ NO ₃ | I | 0,37 | 5,37 | 6,87 |
| Quinalphos | C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS | I | 17,8 | 4,44 | - |
| Quinclorac | C ₁₀ H ₅ Cl ₂ NO ₂ | H | 0,065 | -1,15 | 4,34 |
| Quinoxifen | C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO | F | 0,047 | 5,1 | Não dissocia |
| Quizalofop-ethyl | C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄ | H | 0,31 | 4,28 | - |
| Rotenona | C ₂₃ H ₂₂ O ₆ | I | - | - | - |
| Saflufenacil | C ₁₇ H ₁₇ ClF ₄ N ₄ O ₅ S | H | 2100 | 2,6 | 4,41 |
| Simazine | C ₇ H ₁₂ ClN ₅ | H | 5 | 2,3 | 1,62 |

| Compostos | Fórmula molecular | Classe | Solubilidade água 20 °C (mg L ⁻¹) | Log P | pKa (25 °C) |
|--------------------|---|--------|---|-------|--------------|
| Espinosade A | C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀ | I | - | - | - |
| Espinosade D | C ₄₂ H ₆₇ NO ₁₀ | I | - | - | - |
| Tebuconazol | C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O | F | 36 | 3,7 | 5,0 |
| Tebufenozide | C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂ | I | 0,83 | 4,25 | Não dissocia |
| Tebufenpyrad | C ₁₈ H ₂₄ ClN ₃ O | A | 2,39 | 4,93 | Não dissocia |
| Teflubenzuron | C ₁₄ H ₆ Cl ₂ F ₄ N ₂ O ₂ | I | 0,01 | 4,3 | 9,2 |
| Terbufos | C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃ | I | 4,5 | 4,51 | - |
| Terbutylazine | C ₉ H ₁₆ ClN ₅ | H | 6,6 | 3,4 | 1,9 |
| Tetraconazole | C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O | F | 156,6 | 3,56 | 0,65 |
| Tetradifon | C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S | A | 0,078 | 4,61 | - |
| Thiabendazole | C ₁₀ H ₇ N ₃ S | F | 30 | 2,39 | 4,73 |
| Thiacloprid | C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S | I | 184 | 1,26 | Não dissocia |
| Thiamethoxam | C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S | I | 4100 | -0,13 | Não dissocia |
| Thiobencarb | C ₁₂ H ₁₆ ClNOS | H | 16,7 | 4,23 | Não dissocia |
| Thiodicarb | C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃ | I | 22,2 | 1,62 | Não dissocia |
| Thiophanate methyl | C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂ | F | 18,5 | 1,40 | 7,28 |
| Tolclofos-methyl | C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS | F | 0,708 | 3,8 | Não dissocia |
| Tolyfluanid | C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂ | F | 0,9 | 3,9 | Não dissocia |
| Triadimefon | C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂ | F | 70 | 3,18 | - |
| Triadimenol | C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂ | F | 72 | 3,18 | Não dissocia |
| Trichlorfon | C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P | I | 120000 | 0,43 | - |
| Tricyclazole | C ₉ H ₇ N ₃ S | F | 596 | 1,4 | Não dissocia |
| Trifloxysulfuron | C ₁₄ H ₁₄ F ₃ N ₅ O ₆ S | H | - | 2,41 | - |
| Trifloxystrobin | C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄ | F | 0,61 | 4,5 | Não dissocia |
| Triflumizole | C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O | F | 10,5 | 4,77 | 3,7 |
| Triflumuron | C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃ | I | 0,04 | 4,9 | - |
| Triticonazole | C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O | F | 9,3 | 3,29 | Não dissocia |
| Vamidotion | C ₈ H ₁₈ NO ₄ PS ₂ | I | 4000 | -4,21 | - |
| Zoxamide | C ₁₄ H ₁₆ Cl ₃ NO ₂ | F | 0,681 | 3,76 | Não dissocia |

Legenda: A: Acaricida; F: Fungicida; H: Herbicida; I: Inseticida; N: Nematicidas; O: outros.

Fonte: A autora (2022).

As soluções estoque foram preparadas, primeiramente em uma concentração de 1000 mg L⁻¹ de cada substância em estudo, levando em consideração a pureza dos padrões sólidos. As soluções foram preparadas em acetonitrila grau HPLC. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura contendo todos os compostos na concentração de 5 mg L⁻¹ que será utilizada para realizar os ensaios de fortificação e

avaliar a linearidade do método. Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura abaixo de -4 °C.

3.5 SISTEMA UHPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA (*Apis mellifera*)

As condições de operação do sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS foram baseadas no método de análise de resíduos de agrotóxicos amplamente utilizado nas análises de rotina do LARP/CPCEM-UFSM.

3.5.1 Escolha da fase móvel

A fase móvel empregada neste trabalho foi (A) a solução aquosa, com ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹, e (B) solução de acetonitrila:metanol (v/v) com ácido fórmico 0,1% e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹, conforme gradiente descrito na Tabela 8. O tempo total de corrida foi de 19 min.

Tabela 8 – Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em abelha no sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS

| Tempo (min) | %A | %B |
|-------------|----|----|
| 0 | 99 | 1 |
| 0,50 | 99 | 1 |
| 3,50 | 60 | 40 |
| 12,5 | 15 | 85 |
| 12,6 | 1 | 99 |
| 15 | 1 | 99 |
| 15,1 | 99 | 1 |
| 19 | 99 | 1 |

Vazão constante de 0,5 mL min⁻¹

Fonte: A autora (2022).

3.5.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS XEVO TQ-XS

A seguir estão descritas as condições do sistema UHPLC-MS/MS Xevo TQ-XS utilizadas para otimização do método e análise dos agrotóxicos em amostras de abelha.

- ◇ Temperatura da coluna: 45 °C;
- ◇ Voltagem capilar (ESI+): 2,4 kV;

- Voltagem capilar (ESI-): 2,1 kV;
- ◇ Temperatura de dessolvatação: 600 °C;
- ◇ Temperatura da fonte: 150 °C;
- ◇ Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 1000 L h⁻¹;
- ◇ Vazão do spray: 150 L h⁻¹;
- ◇ Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min⁻¹;
- ◇ Volume de injeção: 5 µL;
- ◇ Tempo de residência (*dwell time*): 0,01 s;
- ◇ Tempo de aquisição: 30 s.

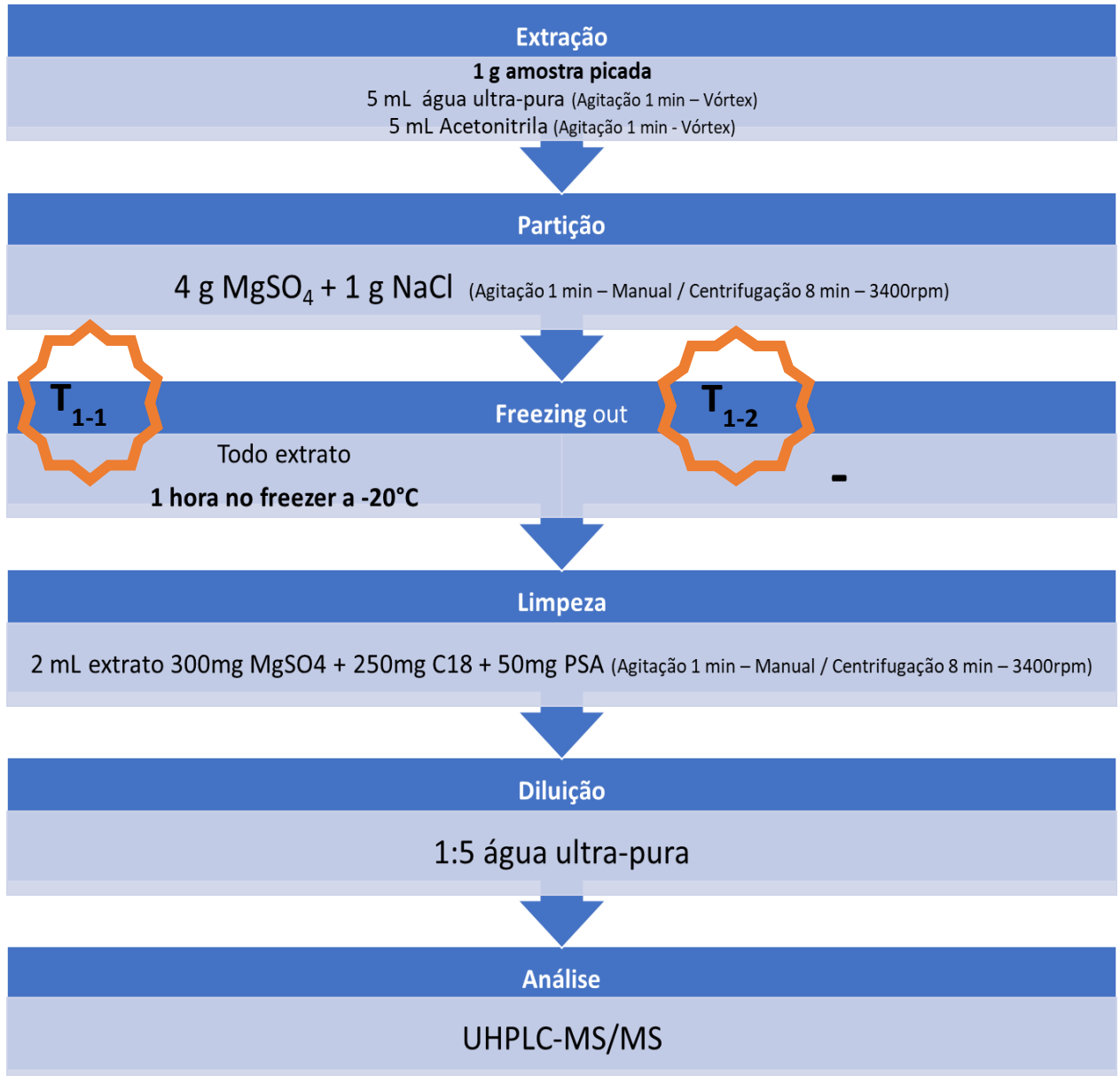
A espectrometria de massas em série foi operada no modo de monitoramento SRM e ionização por eletronebulização no modo positivo e negativo. Neste estudo foram selecionadas duas transições características para cada composto, sendo a transição mais intensa utilizada para quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para identificação, também dita de confirmação dos mesmos.

3.6 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA

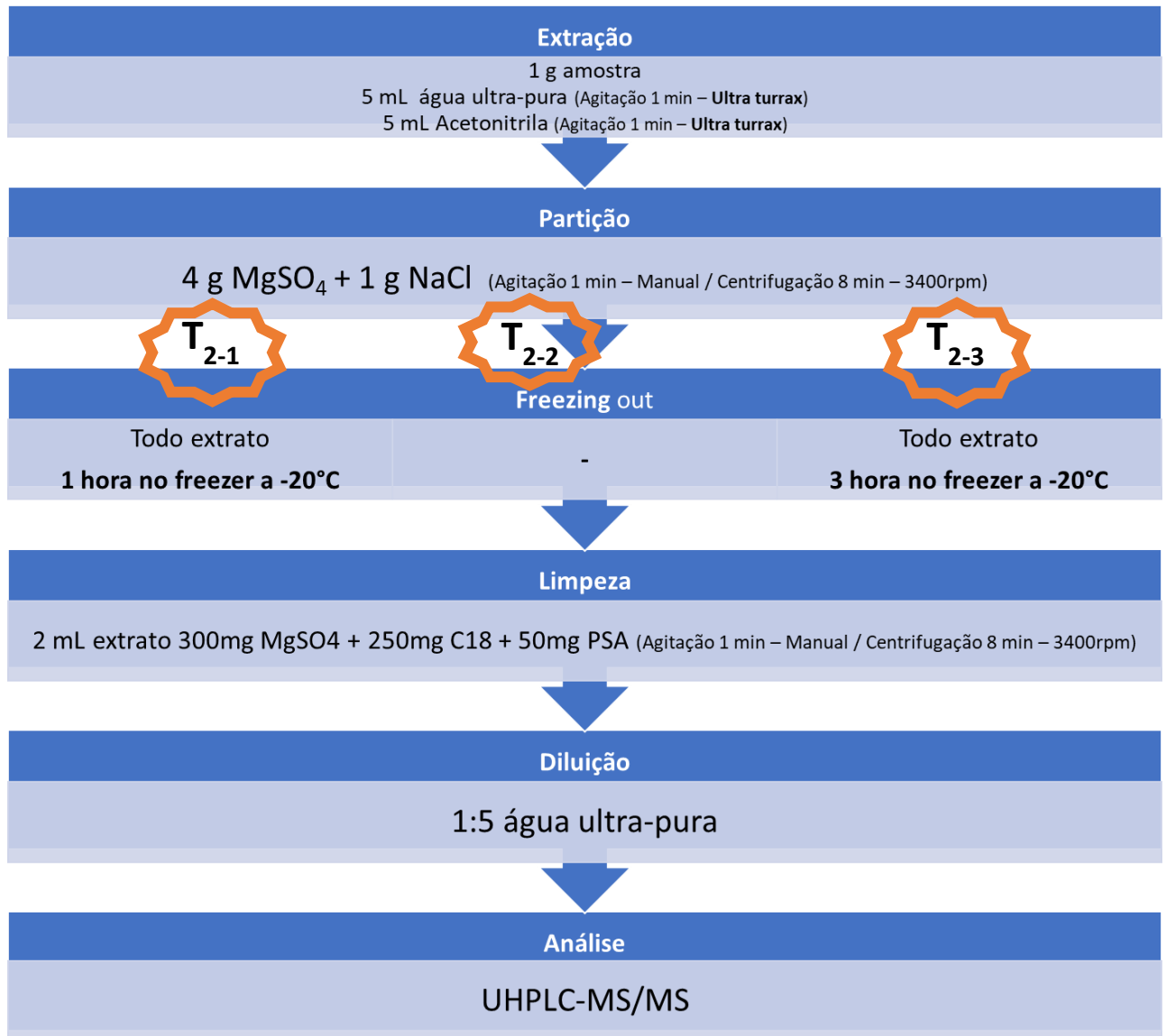
3.6.1 Testes preliminares

Os testes de preparo de amostra descritos a seguir foram realizados na matriz abelha. A recuperação para cada teste foi realizada na análise pontual através de fortificação em triplicata e padrão na matriz na concentração de 50 µg L⁻¹ (no equipamento).

Inicialmente, o processamento de amostra e a etapa de limpeza do extrato utilizando a baixa temperatura foram avaliados. As Figuras 6 e 7 descrevem os testes realizados, bem como suas variações.

Figura 6 - Esquema de preparo de amostras para os testes T₁₋₁ e T₁₋₂

Fonte: A autora (2022).

Figura 7 - Esquema de preparo de amostras para os testes T₂₋₁ a T₂₋₃

Fonte: A autora (2022).

Em seguida, as diferentes versões do método QuEChERS foram avaliadas. A Figura 8. apresenta os testes realizados.

Figura 8 - Esquema de preparo de amostras para os testes E₁ a E₆

Fonte: A autora (2022).

A etapa de limpeza do extrato também foi avaliada. Após a extração utilizando o método QuEChERS modificado, os extratos foram submetidos a etapa de limpeza, avaliando-se diferentes sorventes, conforme Tabela 9.

Tabela 9 – Relação dos testes realizados para análise de remoção dos coextrativos para 1 mL de extrato

| Ensaio | MgSO ₄ (mg) | C18 (mg) | PSA (mg) | Z-Sep ⁺ (mg) | Quitosana A (mg) | Quitosana B (mg) | Quitosana C (mg) | EMR (mg) | Fase Fluorada (mg) | Bond Elut NH ₂ (mg) |
|----------------|---------------------------|-------------|-------------|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------|--------------------------|---|
| C ₁ | 150 | 125 | 25 | - | - | - | - | - | - | - |
| C ₂ | 150 | 75 | 25 | - | - | - | - | - | - | - |
| C ₃ | 150 | - | 50 | 50 | - | - | - | - | - | - |
| C ₄ | 150 | - | - | - | 25 | - | - | - | - | - |
| C ₅ | 150 | - | - | - | - | 25 | - | - | - | - |
| C ₆ | 150 | - | - | - | - | - | 20 | - | - | - |
| C ₇ | - | - | - | - | - | - | - | 200 | - | - |
| C ₈ | 150 | - | - | - | - | - | - | - | 30 | - |
| C ₉ | 150 | - | - | - | - | - | - | - | - | 25 |

Fonte: A autora (2022).

Por fim, o fator do método foi avaliado. Diferentes diluições foram testadas, conforme Figura 9.

Figura 9. Diferentes diluições testadas

| Fator 25x | Fator 20x | Fator 15x | Fator 10x | Fator 5x | Sem fator |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------|---|
| 1:5 em Água ultra-pura | 1:4 em Água ultra-pura | 1:3 em Água ultra-pura | 1:2 em Água ultra-pura | Sem diluição | Evaporação de 1000 µL Reconstituição em 200 µL (40 µL ACN 1% ác.fór. +160 µL água) |

Fonte: A autora (2022).

3.6.2 Avaliação dos coextrativos por análise de GC-MS/MS

A verificação da presença de coextrativos foi avaliado através da análise dos extratos por cromatografia gasosa no modo de varredura *full scan*.

3.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA

Neste trabalho os parâmetros: seletividade, curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz serão analisados para a validação do método. Ainda, como critério da análise por UHPLC-MS/MS, foram selecionados 2 íons produto por analito, com sinal/ruído (S/N) ≤ 3 e variação do *ion ratio* $\leq 30\%$ (SANTE, 2019).

3.7.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por comparação dos cromatogramas obtidos com as injeções no sistema UHPLC-MS/MS de extratos de amostras “branco”, ou seja, ausente dos compostos do estudo, e da amostra fortificada com estes compostos. Este ensaio tem por objetivo avaliar a ocorrência de co-eluição de interferentes da matriz e de analitos de interesse.

3.7.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade das curvas analíticas foi realizada através da injeção das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 3.5, nas concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ correspondentes a 5; 10; 20; 50; 100; 200 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estas foram preparadas em solvente (acetonitrila), e foram preparadas no extrato do branco da matriz (abelha).

Posteriormente, realizaram-se os cálculos da média das áreas de cada analito, em seguida foi obtida a regressão linear e o coeficiente de determinação (r^2), a fim de obter a linearidade do método.

3.7.3 Efeito matriz

Para a avaliação do efeito matriz, realizou-se a comparação entre as inclinações das curvas analíticas obtidas, preparadas em solvente, em extrato da matriz “branco”. O cálculo foi efetuado através da Equação 1.

$$\text{Efeito matriz} = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

x_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas na matriz (abelha);

x_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada agrotóxico, preparadas em solvente (acetonitrila).

3.7.4 Exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método proposto foram avaliadas através dos valores de recuperação e RSD, respectivamente. Os níveis de fortificação de 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram utilizados para avaliar a matriz abelha com $n=7$.

Conforme INMETRO, o cálculo de recuperação é realizado de acordo com a Equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), como mostra a Equação 3.

$$\text{RSD(\%)} = \frac{s}{X} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto;

$s = \{\sum(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)\}^{1/2}$

x_i = valores individuais;

X = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

A precisão intermediária foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da análise das amostras branco fortificações nos níveis 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

3.7.5 LOD e LOQ do método

Após a avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas e dos ensaios de fortificação, de cada um dos compostos em estudos, procedeu-se a determinação do limite de detecção e do limite de quantificação do método.

O LOQm foi definido como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresenta recuperações entre 70 e 120%, com RSD% menor ou igual a 20%. O LODm foi obtido através do valor do LOQm para cada composto dividido por 3,33.

3.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos agrotóxicos em dezesseis amostras de abelhas coletados por produtores de mel do Rio Grande do Sul e entregues no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Centro de Pesquisa em Cromatografia e Espectrometria de Massas (CPCEM) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA UHPLC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA (*Apis mellifera*)

A Tabela 10 apresenta os parâmetros utilizados no sistema UHPLC-MS/MS para a determinação dos 189 agrotóxicos, além do padrão de controle e o padrão interno, no modo de aquisição SRM e no modo de ionização ESI+, exceto para os compostos 2,4-D e fipronil, que foram determinados no modo de ionização ESI-. A tabela demonstra os tempos de retenção (t_R), transições com os íons precursores e íons produtos, voltagem do cone (VC) e energias de colisão (EC) selecionados para cada composto, para as etapas de quantificação e identificação dos analito.

Tabela 10 – Agrotóxicos analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI, no modo de aquisição SRM com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores e produtos para a quantificação e confirmação

| Composto | t_R (min) | Íon precursor (m/z) | VC (C) | 1a Transição Quantificação | | 2a Transição Identificação | |
|----------------------|----------------|------------------------|-----------|-------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| | | | | Íon produto (m/z) | EC (eV) | Íon produto (m/z) | EC (eV) |
| 2,4-D | 5,1 | 219,0 | 12 | 124,9 | 26 | 160,8 | 10 |
| Acephate | 1,6 | 183,9 | 20 | 94,6 | 25 | 142,8 | 20 |
| Acetamiprid | 3,5 | 223 | 30 | 56,1 | 15 | 126 | 20 |
| Alachlor | 8,3 | 270,1 | 20 | 162,1 | 20 | 238,1 | 11 |
| Ametryn | 5,9 | 228,1 | 25 | 68,1 | 35 | 181,1 | 20 |
| Atrazina | 5,5 | 216,1 | 48 | 96,0 | 22 | 174,1 | 16 |
| Azaconazole | 5,9 | 300 | 34 | 159 | 28 | 231,1 | 18 |
| Azamethiphos | 4,5 | 325 | 31 | 111,9 | 35 | 138,9 | 24 |
| Azinphos Methyl | 6,8 | 318,0 | 8 | 132,0 | 15 | 261,0 | 8 |
| Azinphos-ethyl | 8,4 | 346,0 | 14 | 77,1 | 36 | 132,0 | 16 |
| Azoxystrobin | 7,4 | 404,1 | 15 | 328,9 | 30 | 372 | 16 |
| Benalaxil | 9,3 | 326,1 | 25 | 91,0 | 30 | 148,0 | 20 |
| Bitertanol | 9,0 | 338,1 | 30 | 70,1 | 8 | 98,9 | 16 |
| Boscalid | 7,6 | 342,9 | 25 | 139,9 | 20 | 307 | 45 |
| Bromuconazole I | 9,0 | 376 | 15 | 70,1 | 20 | 158,9 | 30 |
| Bromuconazole II | 7,5 | 376 | 15 | 70,1 | 40 | 158,9 | 45 |
| Buprofezin | 11,2 | 306,1 | 20 | 115,9 | 16 | 201,0 | 12 |
| Carbaryl | 5,1 | 202,1 | 30 | 117,1 | 24 | 145,1 | 10 |
| Carbendazim | 2,5 | 192,1 | 24 | 132,1 | 30 | 160,1 | 18 |
| Carbofuran | 4,9 | 222,11 | 5 | 123 | 20 | 165,1 | 10 |
| Carbofuran-3-hydroxy | 3,2 | 238 | 34 | 163 | 16 | 181 | 10 |
| Carboxin | 5,2 | 236 | 5 | 87 | 25 | 143 | 15 |

| Composto | t _R (min) | Íon precursor (m/z) | VC (C) | 1a Transição Quantificação | | 2a Transição Identificação | |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------|-------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| | | | | Íon produto (m/z) | EC (eV) | Íon produto (m/z) | EC (eV) |
| Cletodim | 10,4 | 360,0 | 25 | 164,0 | 20 | 268,1 | 10 |
| Chlorantraniliprole | 6,8 | 481,6 | 15 | 283,9 | 23 | 451,1 | 25 |
| Chlorfenvinphos | 9,3 | 358,9 | 28 | 99 | 30 | 155,0 | 12 |
| Chlorimuron ethyl | 7,5 | 415,1 | 46 | 83,0 | 40 | 186,0 | 15 |
| Chlorpyriphos-methyl | 9,8 | 321,8 | 34 | 125,0 | 20 | 289,9 | 16 |
| Clofentezine | 9,5 | 303 | 20 | 102 | 35 | 138 | 15 |
| Clomazone | 6,5 | 240 | 23 | 89 | 46 | 125 | 18 |
| Clorpirifos | 11,2 | 350 | 10 | 97 | 22 | 197,9 | 16 |
| Clothianidin | 3,0 | 250 | 25 | 132 | 15 | 169 | 10 |
| Cyanazine | 4,5 | 241 | 41 | 96 | 25 | 214 | 17 |
| Cyazofamid | 8,8 | 325 | 25 | 107,9 | 15 | 261 | 10 |
| Cymoxanil | 3,6 | 199,2 | 15 | 111,05 | 20 | 128,1 | 10 |
| Cyproconazole I | 7,5 | 292,2 | 5 | 70,2 | 20 | 125,1 | 30 |
| Cyproconazole II | 7,3 | 292,2 | 5 | 70,2 | 20 | 125,1 | 30 |
| Cyprodinil | 8,0 | 226,0 | 5 | 93,0 | 35 | 108,0 | 25 |
| Demeton-S-methyl-sulfon | 2,7 | 263 | 32 | 121 | 17 | 169 | 17 |
| Diazinon | 9,5 | 305,1 | 20 | 96,9 | 35 | 169 | 22 |
| Diclotophos | 2,8 | 238 | 30 | 112 | 10 | 193 | 10 |
| Diclosulam | 6,0 | 406,1 | 46 | 161 | 30 | 378 | 15 |
| Difenconazole I | 9,6 | 406 | 10 | 111,1 | 35 | 251,1 | 25 |
| Diflubenzuron | 8,1 | 311,1 | 34 | 141,1 | 28 | 158,15 | 12 |
| Dimethoate | 3,3 | 230 | 20 | 124,8 | 22 | 198,8 | 10 |
| Dimethomorph | 7,2 | 388,1 | 30 | 165 | 30 | 300,9 | 20 |
| Dimethomorph E | 7,2 | 388,1 | 30 | 165,0 | 40 | 300,9 | 20 |
| Dimethomorph Z | 7,2 | 388,1 | 30 | 165,0 | 40 | 300,9 | 20 |
| Dimoxystrobin | 8,6 | 327,1 | 20 | 116,1 | 21 | 205,2 | 10 |
| Diniconazole | 9,2 | 326,1 | 10 | 70,20 | 25 | 159 | 30 |
| Diuron | 5,7 | 233 | 25 | 72 | 18 | 159,9 | 25 |
| EPN | 10,0 | 324 | 22 | 157 | 25 | 296,0 | 14 |
| Epoxiconazole | 8,0 | 330 | 15 | 101 | 50 | 121,04 | 22 |
| Ethephon | 10,3 | 409,0 | 25 | 145,0 | 40 | 186,0 | 16 |
| Ethiofencarb | 5,3 | 226,1 | 10 | 107 | 15 | 164 | 10 |
| Ethofenprox | 12,8 | 394,3 | 17 | 106,9 | 43 | 135,1 | 28 |
| Ethoprophos | 8,1 | 242,9 | 18 | 97 | 31 | 130,9 | 20 |
| Ethoxysulfuron | 7,5 | 398,9 | 25 | 218 | 24 | 261,0 | 16 |
| Famoxadone | 9,5 | 392,2 | 12 | 238 | 20 | 331,1 | 10 |
| Fenamidone | 7,5 | 312,1 | 5 | 92 | 25 | 236,1 | 14 |
| Fenamiphos | 8,2 | 304,1 | 27 | 202,1 | 36 | 217,1 | 24 |
| Fenarimol | 7,6 | 331 | 40 | 81 | 30 | 268 | 25 |
| Fenazaquin | 11,8 | 307,2 | 5 | 57,2 | 20 | 161 | 15 |
| Fenbuconalozé | 8,2 | 337,0 | 15 | 70,10 | 20 | 125,0 | 30 |
| Fenhexamid | 8,0 | 301,9 | 35 | 55,1 | 35 | 97,11 | 25 |

| Composto | t _R (min) | Íon precursor (m/z) | VC (C) | 1a Transição Quantificação | | 2a Transição Identificação | |
|----------------------|-------------------------|------------------------|-----------|-------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| | | | | Íon produto (m/z) | EC (eV) | Íon produto (m/z) | EC (eV) |
| Fenoxycarb | 8,5 | 302,1 | 10 | 88 | 20 | 116,1 | 11 |
| Fenprothrin | 12,1 | 350,1 | 24 | 97,0 | 34 | 125,0 | 14 |
| Fenpyroximat | 12,0 | 422,2 | 5 | 138,1 | 30 | 366,1 | 20 |
| Fenthion | 9,1 | 279,0 | 25 | 104,9 | 25 | 168,9 | 18 |
| Fipronil | 9,0 | 434,9 | 34 | 249,9 | 28 | 329,9 | 16 |
| Fluazafop-P-butyl | 11,1 | 384,1 | 38 | 282,1 | 22 | 328,1 | 16 |
| Flupicolid | 7,6 | 383,0 | 40 | 172,9 | 20 | 365,0 | 15 |
| Fluquinconazole | 7,8 | 376,0 | 25 | 306,9 | 25 | 348,8 | 20 |
| Fluroxypyr | 4,1 | 254,9 | 28 | 180,8 | 22 | 208,8 | 16 |
| Flusilazole | 8,4 | 316 | 5 | 165 | 25 | 247 | 20 |
| Flutolanil | 8,0 | 324,1 | 25 | 65 | 35 | 262,1 | 20 |
| Flutriafol | 5,5 | 302,1 | 25 | 70,1 | 16 | 122,9 | 30 |
| Furathiocarb | 11,0 | 383,2 | 20 | 194,9 | 15 | 252 | 10 |
| Hexythiazox | 11,3 | 353 | 10 | 168,1 | 25 | 228,1 | 15 |
| Imazalil | 5,5 | 297,1 | 31 | 69,05 | 18 | 159 | 22 |
| Imazamox | 9,9 | 306,1 | 25 | 218,0 | 30 | 278,0 | 20 |
| Imazapic | 3,5 | 276,2 | 35 | 163,0 | 26 | 231,2 | 20 |
| Imazapyr | 3,0 | 262,2 | 38 | 69,2 | 26 | 86,1 | 26 |
| Imazaquin | 4,5 | 312,2 | 40 | 86,2 | 28 | 267,2 | 20 |
| Imazethapyr | 4,1 | 290,2 | 45 | 177,1 | 25 | 245,2 | 20 |
| Imidacloprid | 3,2 | 256,1 | 25 | 174,9 | 20 | 209 | 12 |
| Indoxacarb | 10,3 | 528,1 | 30 | 202,9 | 40 | 217,9 | 25 |
| Iprodione | 8,3 | 330,1 | 35 | 245,0 | 15 | 288,1 | 12 |
| Iprovalicarb I | 7,8 | 321,1 | 20 | 119,1 | 20 | 203,1 | 10 |
| Iprovalicarb II | 7,8 | 321,1 | 20 | 119,1 | 20 | 203,1 | 10 |
| Kresoxim-methyl | 9,0 | 314,2 | 30 | 115,9 | 12 | 131 | 25 |
| Linuron | 6,8 | 249 | 20 | 159,9 | 20 | 181,9 | 16 |
| Malathion | 8,0 | 331,0 | 30 | 98,9 | 25 | 126,9 | 12 |
| Mecarbam | 8,5 | 330,0 | 21 | 97,0 | 35 | 227,1 | 8 |
| Metaflumizone | 11,0 | 505,0 | 35 | 301,8 | 24 | 327,29 | 12 |
| Mepanipyrim | 7,6 | 224,1 | 15 | 77,0 | 35 | 106,0 | 25 |
| Mephosfolan | 4,5 | 270,1 | 34 | 75,1 | 22 | 140,0 | 24 |
| Mepronil | 7,8 | 270,1 | 15 | 91 | 35 | 119 | 25 |
| Metalaxyl | 6,0 | 280,1 | 10 | 192,1 | 20 | 220,1 | 15 |
| Metconazole | 9,0 | 320,1 | 5 | 70 | 25 | 125 | 30 |
| Methamidophos | 1,2 | 141,9 | 30 | 93,9 | 12 | 124,8 | 14 |
| Methidathion | 6,5 | 303 | 30 | 84,9 | 20 | 144,8 | 10 |
| Methiocarb | 6,8 | 226 | 25 | 121 | 20 | 169 | 10 |
| Methiocarb sulfone | 3,7 | 258,1 | 31 | 107,1 | 38 | 122,1 | 19 |
| Methiocarb sulfoxide | 3,1 | 242,0 | 26 | 122,0 | 28 | 185,0 | 14 |
| Methomyl | 2,5 | 162,9 | 15 | 88 | 10 | 105,9 | 10 |
| Methoxyfenozide | 8,0 | 369,2 | 15 | 149,1 | 15 | 313,23 | 10 |

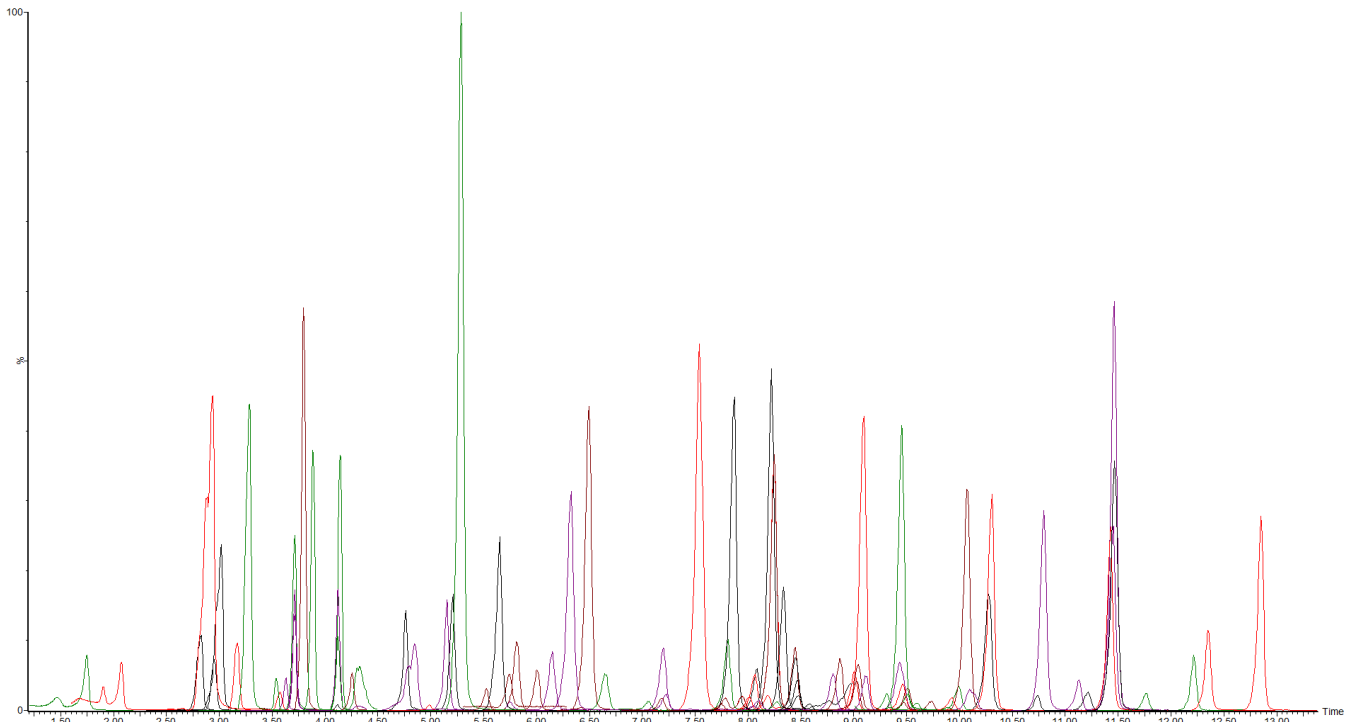
| Composto | t _R (min) | Íon precursor (m/z) | VC (C) | 1a Transição Quantificação | | 2a Transição Identificação | |
|----------------------|-------------------------|------------------------|-----------|-------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| | | | | Íon produto (m/z) | EC (eV) | Íon produto (m/z) | EC (eV) |
| Metolachlor | 8,5 | 284,1 | 17 | 176,1 | 25 | 252,1 | 15 |
| Metribuzin | 4,5 | 215 | 5 | 89 | 20 | 131 | 20 |
| Metsulfuron methyl | 4,8 | 382,0 | 28 | 167,0 | 16 | 198,9 | 22 |
| Mevinphos I | 3,4 | 225,1 | 15 | 127,1 | 15 | 193,1 | 10 |
| Mevinphos II | 3,4 | 225,1 | 30 | 127,1 | 15 | 193,1 | 5 |
| Molinate | 7,3 | 188,0 | 17 | 55,0 | 24 | 126,0 | 13 |
| Monocrotophos | 2,5 | 224,1 | 15 | 98,1 | 12 | 127,1 | 16 |
| Monolinuron | 5,3 | 215,04 | 15 | 99 | 30 | 126,01 | 15 |
| Myclobutanil | 7,6 | 289,1 | 25 | 70,2 | 15 | 125,1 | 30 |
| Nicosulfuron | 4,5 | 411,0 | 26 | 106,0 | 32 | 182,0 | 22 |
| Nuarimol | 6,5 | 315 | 25 | 81 | 15 | 252 | 20 |
| Omethoate | 1,8 | 214 | 25 | 124,8 | 22 | 182,8 | 10 |
| Oxadixyl | 4,0 | 279,1 | 20 | 132,3 | 25 | 219 | 12 |
| Oxamyl | 2,3 | 237 | 15 | 72 | 10 | 90 | 10 |
| Paraoxon-ethyl | 5,9 | 276,1 | 28 | 220,1 | 17 | 248,2 | 16 |
| Parathion-methyl | 2,5 | 263,9 | 38 | 79,0 | 36 | 109,0 | 22 |
| Penconazole | 8,6 | 284 | 15 | 70,1 | 15 | 159 | 25 |
| Pencycuron | 9,9 | 329,1 | 30 | 124,9 | 30 | 218 | 16 |
| Pendimethalin | 11,2 | 282,2 | 12 | 194,1 | 17 | 212,2 | 10 |
| Penoxsulam | 6,0 | 484,2 | 42 | 164,1 | 40 | 195,1 | 30 |
| Picoxystrobin | 9,0 | 368,0 | 10 | 145,1 | 25 | 205,1 | 10 |
| Phorate | 9,5 | 261,0 | 15 | 75,0 | 12 | 199,0 | 5 |
| Phosalone | 9,9 | 367,9 | 12 | 110,9 | 42 | 181,9 | 14 |
| Phosmet | 7,0 | 318,0 | 28 | 77 | 46 | 160,0 | 22 |
| Piperonyl butoxide | 11,0 | 356,3 | 20 | 119 | 35 | 176,9 | 10 |
| Pirimicarb | 4,5 | 239,1 | 25 | 72,4 | 18 | 182,1 | 15 |
| Pirimiphos-ethyl | 11,3 | 334,1 | 42 | 182,1 | 25 | 198,1 | 23 |
| Pirimiphos Methyl | 9,8 | 306,3 | 42 | 108,1 | 30 | 164,1 | 22 |
| Prochloraz | 9,0 | 375,8 | 10 | 70,1 | 24 | 265,8 | 16 |
| Procymidone | 9,2 | 368,0 | 10 | 145,0 | 22 | 205,0 | 10 |
| Profenofos | 10,5 | 372,9 | 30 | 127,9 | 40 | 302,6 | 20 |
| Prometryn | 7,1 | 242,0 | 25 | 158 | 25 | 200,1 | 20 |
| Propanil | 6,5 | 217,9 | 31 | 127,0 | 22 | 161,9 | 16 |
| Propargite | 12,0 | 351,3 | 30 | 57,1 | 20 | 175,2 | 10 |
| Propiconazole | 8,8 | 342,1 | 15 | 69,1 | 20 | 158,9 | 25 |
| Propoxur | 4,7 | 210,1 | 15 | 92,9 | 25 | 110,9 | 12 |
| Propyzamide | 7,5 | 256,1 | 31 | 173,0 | 23 | 190,0 | 16 |
| Prothiofos | 12,6 | 344,9 | 20 | 240,7 | 20 | 268,8 | 12 |
| Pyraclostrobin | 9,7 | 388,1 | 25 | 163 | 25 | 193,9 | 12 |
| Pyrazophos | 9,5 | 374,0 | 33 | 194,0 | 32 | 222,1 | 22 |
| Pyrazosulfuron-ethyl | 7,5 | 415,0 | 28 | 82,9 | 45 | 182,0 | 20 |
| Pyridaben | 12,4 | 365,1 | 5 | 147,1 | 24 | 309,1 | 12 |

| Composto | t _R (min) | Íon precursor (m/z) | VC (C) | 1a Transição Quantificação | | 2a Transição Identificação | |
|--------------------|-------------------------|------------------------|-----------|-------------------------------|------------|-------------------------------|------------|
| | | | | Íon produto (m/z) | EC (eV) | Íon produto (m/z) | EC (eV) |
| Pyridaphenthion | 8,0 | 341,0 | 31 | 92,0 | 34 | 189,0 | 22 |
| Pyridate | 12,9 | 379,0 | 28 | 207,0 | 18 | 351,1 | 10 |
| Pyrimethanil | 6,2 | 200 | 25 | 82 | 24 | 107 | 24 |
| Pyriproxifen | 11,0 | 322,1 | 5 | 96 | 15 | 227,1 | 10 |
| Quinalphos | 8,9 | 299,0 | 15 | 96,9 | 30 | 162,9 | 24 |
| Quinclorac | 3,7 | 241,9 | 20 | 161,0 | 36 | 196,0 | 28 |
| Quinoxifen | 10,7 | 308 | 15 | 161,9 | 35 | 197 | 30 |
| Quizalofop-ethyl | 10,5 | 373,0 | 30 | 91,1 | 32 | 299,1 | 18 |
| Rotenone | 8,5 | 395 | 10 | 192,1 | 20 | 213,1 | 24 |
| Saflufenacil | 7,5 | 501,1 | 26 | 198,0 | 38 | 349,0 | 20 |
| Simazine | 4,5 | 202,0 | 40 | 96,0 | 22 | 124,0 | 16 |
| Spinosad A | 9,6 | 732,6 | 35 | 98,1 | 35 | 142 | 30 |
| Spinosad D | 10,2 | 746,5 | 40 | 98,1 | 35 | 142 | 31 |
| Tebuconazole | 8,5 | 308,2 | 30 | 70,1 | 24 | 124,9 | 40 |
| Tebufenozide | 8,9 | 353,2 | 10 | 105 | 20 | 133,1 | 10 |
| Tebufenpyrad | 10,7 | 334 | 15 | 117 | 25 | 145 | 25 |
| Teflubenzuron | 10,2 | 380,9 | 35 | 140,9 | 30 | 158 | 20 |
| Terbufos | 11,0 | 289,0 | 12 | 103,0 | 8 | 233,0 | 2 |
| Terbutylazine | 7,0 | 230,0 | 28 | 96,0 | 28 | 174,0 | 16 |
| Tetraconazole | 8,0 | 372 | 15 | 70,1 | 20 | 159 | 25 |
| Tetradifon | 7,6 | 294,0 | 56 | 197,2 | 21 | 225,0 | 19 |
| Thiabendazole | 2,7 | 202 | 45 | 130,9 | 30 | 174,9 | 25 |
| Thiacloprid | 3,8 | 253 | 35 | 90 | 40 | 125,8 | 20 |
| Thiamethoxam | 2,7 | 292 | 25 | 132 | 20 | 211,2 | 10 |
| Thiobencarb | 9,5 | 258,1 | 25 | 89,1 | 35 | 125,1 | 15 |
| Thiodicarb | 5,3 | 355,0 | 17 | 88,1 | 16 | 108,1 | 16 |
| Thiophanate methyl | 4,7 | 343 | 25 | 93 | 35 | 151 | 20 |
| Tolclofos-methyl | 9,5 | 300,9 | 30 | 111,0 | 41 | 124,9 | 16 |
| Tolylfluanid | 9,5 | 347,0 | 20 | 137,1 | 35 | 238,0 | 13 |
| Triadimefon | 7,6 | 294,1 | 30 | 69,1 | 20 | 196,9 | 16 |
| Triadimenol | 7,3 | 296,1 | 30 | 70 | 10 | 98,9 | 15 |
| Trichlorfon | 3,1 | 256,9 | 25 | 108,8 | 20 | 126,8 | 18 |
| Tricyclazole | 3,6 | 190 | 10 | 136 | 25 | 163 | 20 |
| Trifloxysulfuron | 5,8 | 438,0 | 30 | 139,0 | 45 | 182,0 | 20 |
| Trifloxystrobin | 10,4 | 409,2 | 25 | 145 | 40 | 185,9 | 14 |
| Triflumizole | 9,9 | 346,1 | 15 | 73,1 | 18 | 278 | 10 |
| Triflumuron | 9,3 | 359 | 5 | 139,1 | 30 | 156,1 | 20 |
| Triticonazole | 7,7 | 318,1 | 5 | 70,1 | 20 | 124,9 | 30 |
| Vamidotion | 3,1 | 288 | 25 | 118 | 25 | 146 | 10 |
| Zoxamide | 9,2 | 336,0 | 15 | 159 | 35 | 187,1 | 20 |
| Atrazine d5 | 5,5 | 221,1 | 26 | 101,0 | 18 | 179,3 | 15 |
| Triphenylfosfato | 9,5 | 327,2 | 40 | 152,1 | 37 | 215,2 | 28 |
| Chlorthiophos | 9,3 | 360,9 | 28 | 98,9 | 30 | 154,9 | 12 |

Fonte: A autora (2022).

A Figura 10 apresenta um cromatograma UHPLC-MS/MS reconstruído de íons totais (TIC) obtido para uma solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando o extrato da amostra branco de abelhas, contendo todos os agrotóxicos avaliados neste estudo.

Figura 10 - Cromatograma de íons totais obtido por UHPLC-MS/MS a partir de uma solução preparada no extrato da matriz de abelha na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: A autora (2022).

Devido ao grande número de analitos, as faixas de aquisição foram de 0,5 min e o tempo de residência (0,01 s), favorecendo a aquisição dos dados e, desta forma, apesar da sobreposição de vários analitos, a espectrometria de massas em série (MS/MS) possibilitou a quantificação e identificação de 189 agrotóxicos em estudo em apenas 19 min de análise.

4.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA

A otimização do preparo de amostra é de fundamental importância para se obter resultados precisos e exatos. Idealmente, a técnica de preparo de amostras deve ser rápida, de baixo custo, de fácil execução e ser compatível com o instrumento analítico. Neste trabalho, foram avaliadas diferentes formas de processamento de

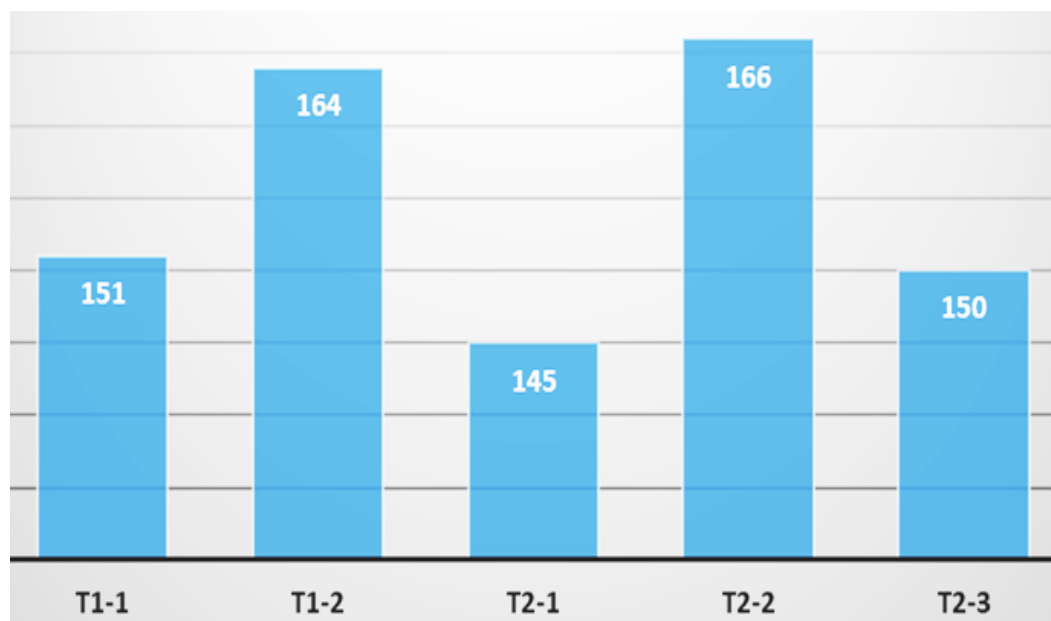
amostra, diversos solventes de extração e sais de partição e, por último, variações de sorventes para a etapa de limpeza. A seguir será discutido cada etapa avaliada para a otimização do preparo de amostra.

4.2.1 Processamento de amostra e etapa de limpeza a baixa temperatura

O processamento da amostra é uma etapa crucial para a análise dos compostos, pois garante uma melhor homogeneização e correta análise. Na literatura, foram encontrados trabalhos de análise de resíduos de agrotóxicos em abelhas com diferentes formas de processamento, desde o uso de abelhas inteiras até o uso de abelhas liofilizadas.

Neste trabalho, foi avaliado o processamento da amostra utilizando o ultraturrax e o uso de amostra picada com tesoura. Em todos os testes foi adicionado uma quantidade de água para melhorar a homogeneidade e garantir a eficiência da extração. Além disso, foi avaliado concomitante o uso da técnica de limpeza utilizando baixa temperatura. Na Figura 11, observa-se os resultados em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados referentes aos testes de processamento da amostra e avaliação da etapa de limpeza do extrato a baixa temperatura.

Figura 11 – Resultados dos testes de processamento de amostra e avaliação da etapa de limpeza do extrato em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados



Fonte: A autora (2022).

O teste que apresentou melhor resultado em termos de recuperação de analitos foi o teste (T₂₋₂) que empregou o uso do ultraturrax para processamento da amostra e sem a etapa de limpeza a baixa temperatura. O ultraturrax (Figura 12) foi escolhido como processador a fim de triturar e homogeneizar as amostras, uma vez que aumenta significativamente a superfície de contato solvente/matriz, proporcionando uma melhor extração dos compostos.

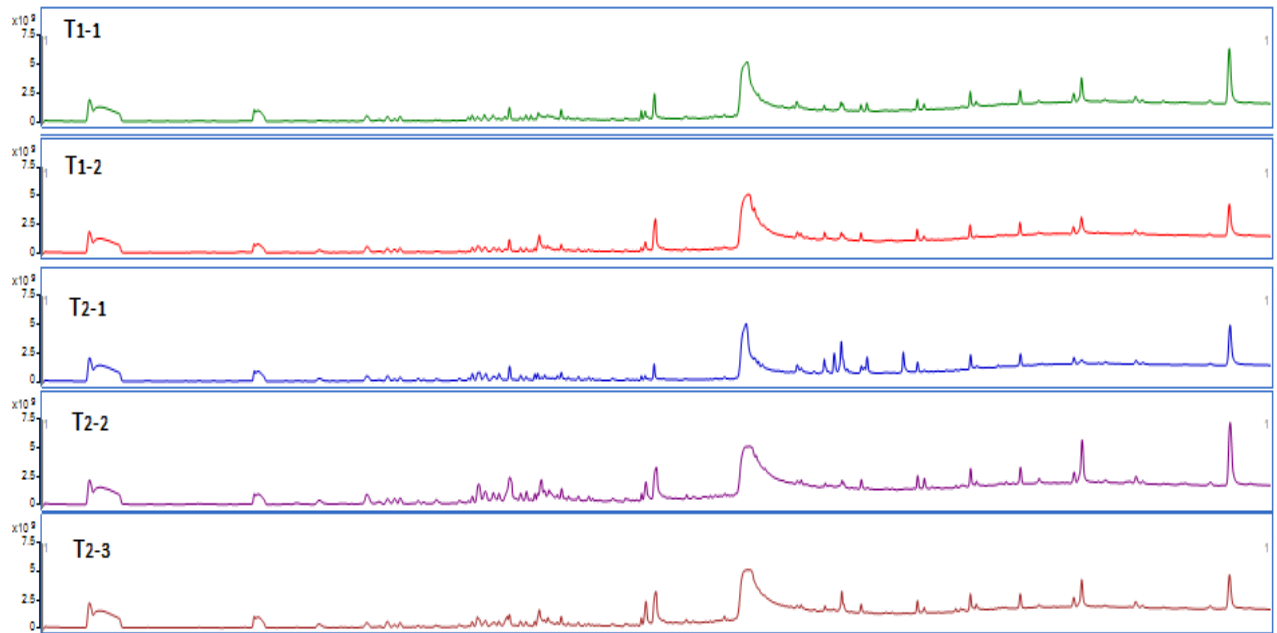
Figura 12 - Processador e homogeneizador ultraturrax utilizado neste trabalho



Fonte: A autora (2022).

A precipitação a baixa temperatura (PBT) tem sido utilizada para remover lipídios coextraídos de amostras, como por exemplo, leite (GOULART *et al.*, 2008), manteiga (MARTHE *et al.*, 2010) e peixe (HONG *et al.*, 2004). Na figura 13, observa-se o cromatograma da análise *full scan* dos extratos dos testes T₁₋₁ a T₂₋₃ para avaliação do perfil dos coextrativos.

Figura 13 - Cromatograma análise *full scan* dos extratos dos testes T₁₋₁ a T₂₋₃



Fonte: A autora (2022).

Nos testes T₁₋₂ e T₂₋₁ os extratos foram submetidos a uma temperatura de aproximadamente -18 °C por 1 h, no teste T₂₋₃ o extrato ficou em freezer por 3 h. Segundo CHUNG e colaboradores (2011) os lipídios têm pontos de fusão mais baixos do que o solvente, de modo que os lipídeos congelados precipitam, enquanto os agrotóxicos permanecem dissolvidos no solvente. No entanto, foi observada uma pequena diferença na diminuição de coextrativos utilizando a técnica de precipitação a baixa temperatura. Na literatura foram encontrados relatos de uso da mesma técnica, porém utilizando um tempo de freezer maior (15 h) a -18 °C (GAËLLE *et al.*, 2018), como também variando a temperatura no caso de MORALES e colaboradores (2020) o extrato foi submetido a -76 °C por 3 min.

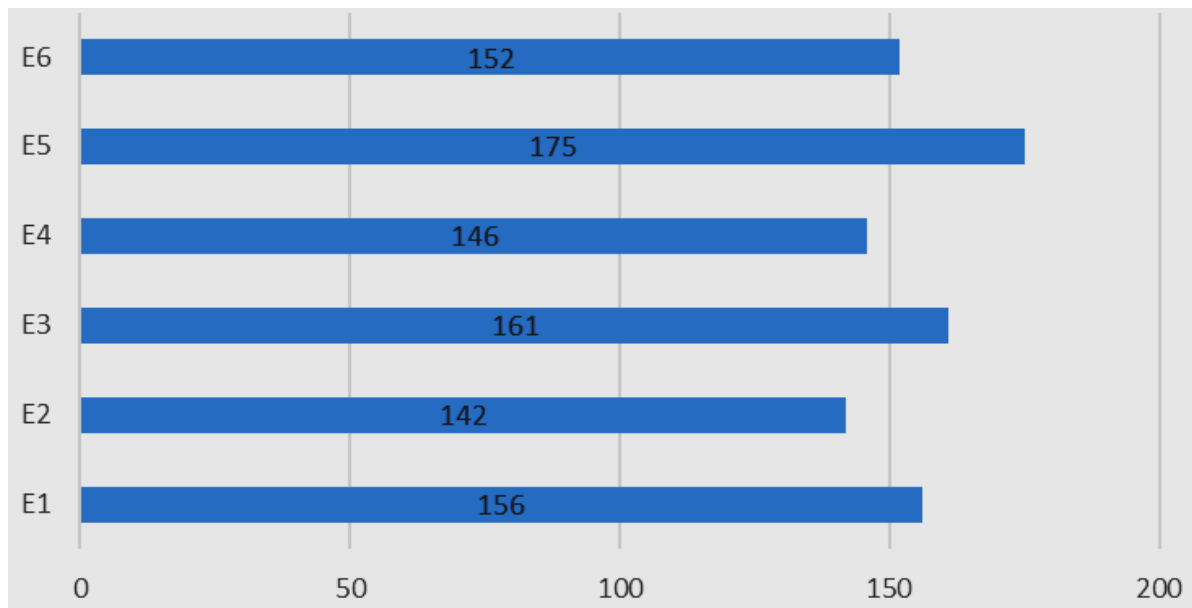
Desse modo, a etapa de freezer foi eliminada e com base na recuperação do maior número de compostos o teste T₂₋₂ foi escolhido para dar continuidade aos experimentos.

4.2.2 Versões QuEChERS

O QuEChERS é uma técnica de preparo de amostra, baseada em três etapas principais: (1) extração com acetonitrila; (2) partição promovida pela adição de sais e (3) limpeza do extrato empregando a técnica denominada extração em fase sólida dispersiva. Neste trabalho, as suas diferentes variações foram estudadas na busca

da melhor condição de análise. Na Figura 14, observa-se os resultados dos testes das diferentes versões do QuEChERS em termos de número de compostos com resultados adequados (recuperação 70-120%, RSD \leq 20%).

Figura 14 – Resultados dos testes das diferentes versões do QuEChERS em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados



Fonte: A autora (2022).

Conforme estes resultados, o método QuEChERS acidificado 1% com ácido fórmico mostrou-se o mais adequado, com 175 compostos obtendo resultados de recuperação e RSD na faixa aceitável.

A utilização de acetonitrila é uma opção interessante, pois permite a extração de compostos com faixa de polaridade mais ampla e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de analitos que geralmente apresentam problemas de estabilidade (ZANELLA *et al.*, 2015). A constante de dissociação ácida (pKa) e o log P são importantes parâmetros que podem influenciar a partição dos agrotóxicos entre as fases aquosa e orgânica e, assim, o ajuste do pH pode afetar a extração. A adição de ácido fórmico tem sido utilizada para a estabilização de alguns compostos lábeis ao pH durante a extração da amostra (KACZYŃSKI, 2017; MASTOVSKA & LEHOTAY, 2004). Além disso, ácido fórmico em acetonitrila pode facilitar a extração de compostos com alta lipofilicidade (JIANG *et al.*, 2012).

A etapa de partição, através da adição de sais, promove o efeito “salting out”, sendo utilizada em vários métodos multiresíduo. Esta etapa, possibilita a retirada de

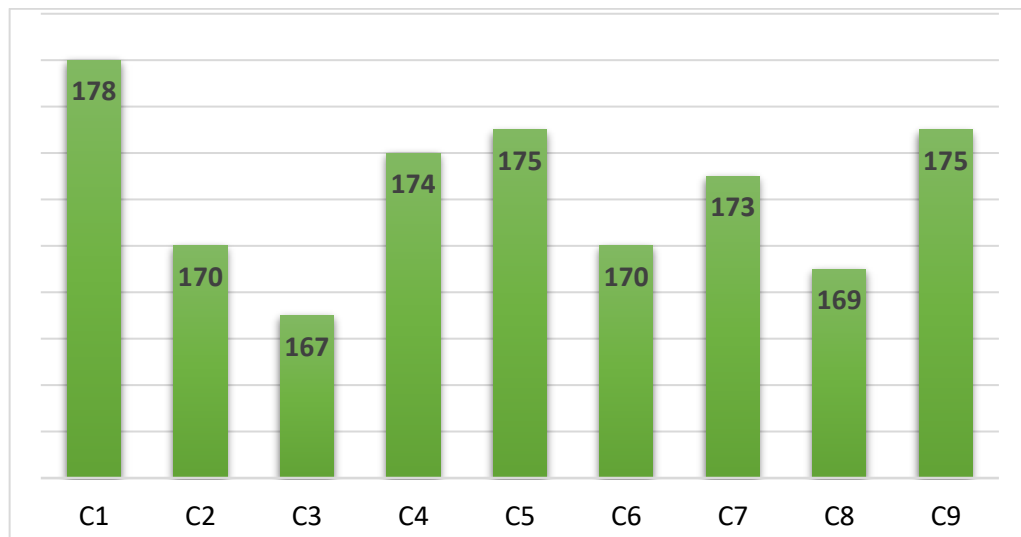
água do sistema, além de transferir os analitos da fase aquosa para a fase orgânica (STAN, 2000).

O uso de acetonitrila acidificada como solvente de extração na presença dos sais $MgSO_4$ e $NaCl$ permitiu o isolamento simultâneo de um amplo espectro de agrotóxicos, porém muitos interferentes também foram coextraídos.

4.2.3 Otimização etapa de limpeza

A etapa de limpeza é de grande importância, pois visa à remoção de interferentes no extrato da matriz obtido. Nessa etapa deve-se optar pelo procedimento que, ao mesmo tempo, remova as interferências do extrato, mas não interfira na recuperação dos compostos em análise. Neste trabalho, a avaliação da etapa de limpeza foi realizada através da técnica de d-SPE com o uso de diferentes combinações de sorventes. A figura 15 apresenta os resultados em termos de recuperação dos compostos para os testes com diferentes combinações de sorventes.

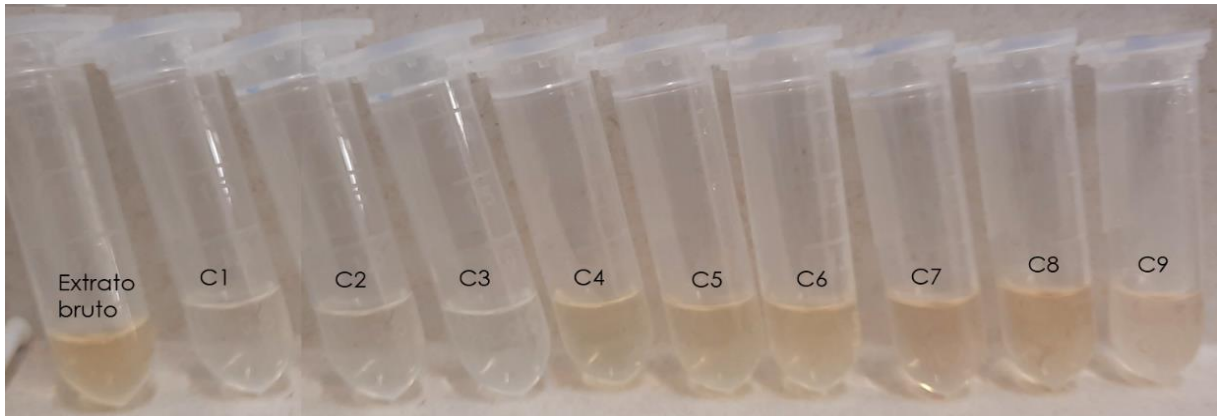
Figura 15 – Resultados dos testes das diferentes combinações de sorventes utilizados para limpeza do extrato em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados



Fonte: A autora (2022).

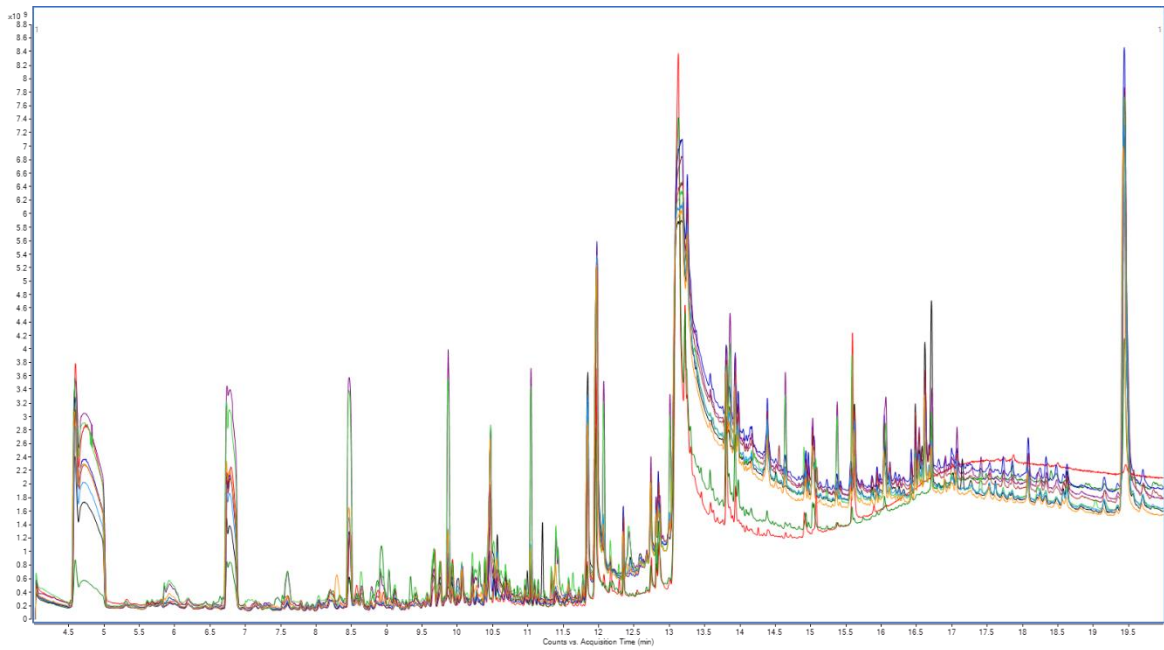
Em termos de recuperação o teste C1 apresentou melhores resultados, recuperando 178 agrotóxicos. Porém, nesta etapa a quantidade de coextrativo também foi avaliada através da coloração dos extratos (Figura 16) e da análise por GC-MS no modo *full scan* dos extratos (Figura 17).

Figura 16. Coloração dos extratos finais dos testes de diferentes sorventes

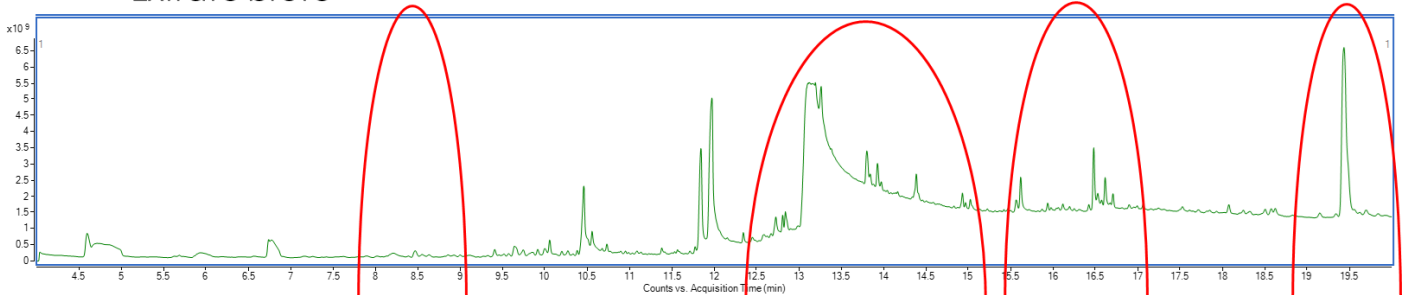


Fonte: A autora (2022).

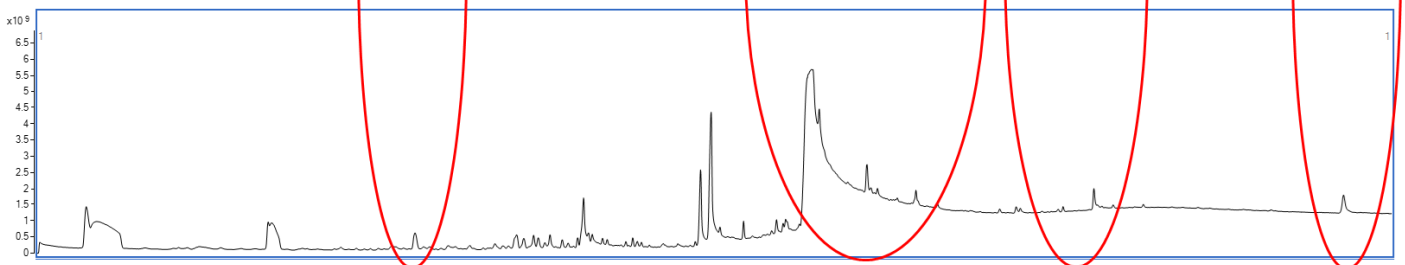
Figura 17. Análise dos extratos por GC-MS no modo *full scan*



Extrato bruto



Extrato C1



Podemos observar que os testes C1, C2 e C3 apresentaram um extrato incolor, enquanto os demais apresentaram uma leve coloração. Analisando o cromatograma por *full scan* observa-se uma resposta menor no teste C1, através da diminuição dos picos em destaque na Figura 18.

O uso exclusivo de EMR, quitosana e fase fluorada, não foram eficientes para a remoção dos coextrativos, uma vez que a amostra em estudo apresenta diferentes constituintes. A literatura aponta o uso do EMR para a remoção de lipídeos (BLANCO *et al.*, 2016; MATARRITA *et al.*, 2016). A quitosana é indicada para a remoção de interferentes polares presentes na amostra. ARIAS e colaboradores (2014), relatam que a quitosana é mais eficiente em pH 3, devido à presença de íons H⁺, os grupos amino encontrados na quitosana são protonados e o processo de adsorção entre as interferências e a quitosana ocorre devido à atração eletrostática. No caso da fase fluorada, estudos indicam que ela apresenta modo de retenção para compostos polares.

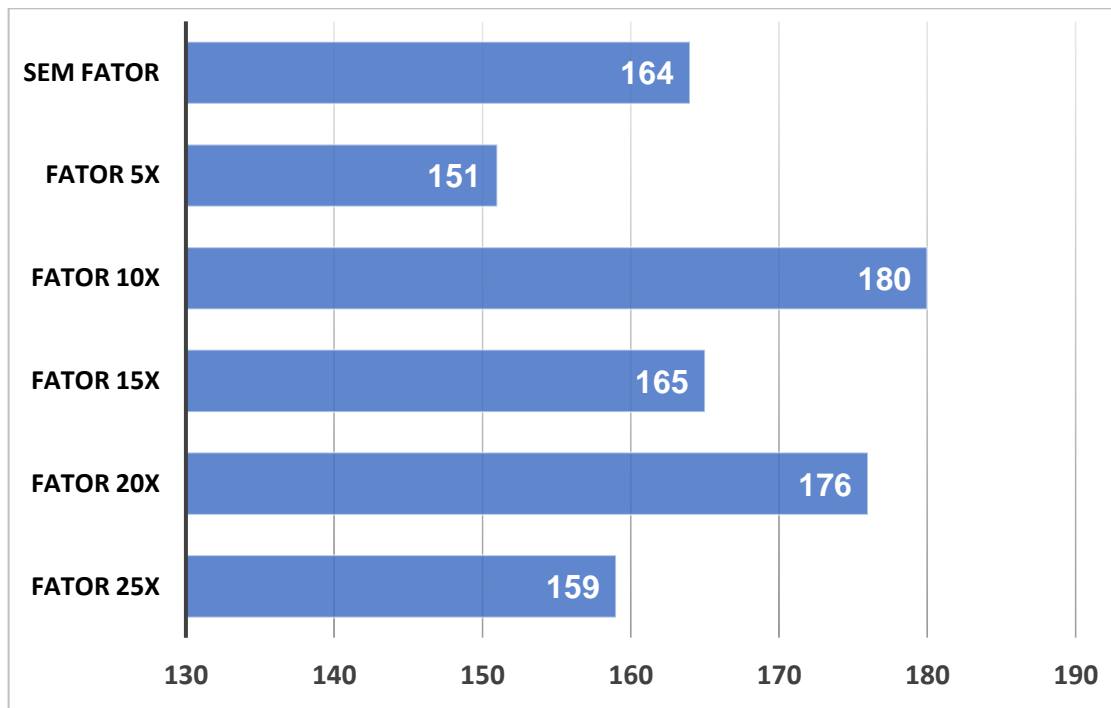
A combinação de C18 e PSA (teste C1) permitiu uma boa limpeza do extrato, além de ótima recuperação dos compostos estudados. A estrutura do PSA tem um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres, açúcares e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte (ZANELLA *et al.*, 2015) O sorvente C18 é mais utilizado para matrizes com teor de gordura maior que 2%, pois remove com boa eficiência os interferentes apolares, tais como substâncias graxas e lipídeos.

Portanto, a validação do método proposto utilizou a mistura dos sorventes MgSO₄, C18 e PSA na etapa de limpeza do extrato, pois forneceu resultados satisfatórios tanto em relação à efetiva extração dos compostos, quanto em relação à limpeza do extrato.

4.2.4 Fator do método

A fim de reduzir o fator de diluição do método e alcançar um menor valor de LOQ, foram realizados testes com diferentes diluições. Na Figura 18 são apresentados os resultados em termos de recuperação dos testes com as diferentes diluições.

Figura 18 – Resultados dos testes das diferentes diluições do extrato em termos de recuperação dos agrotóxicos analisados



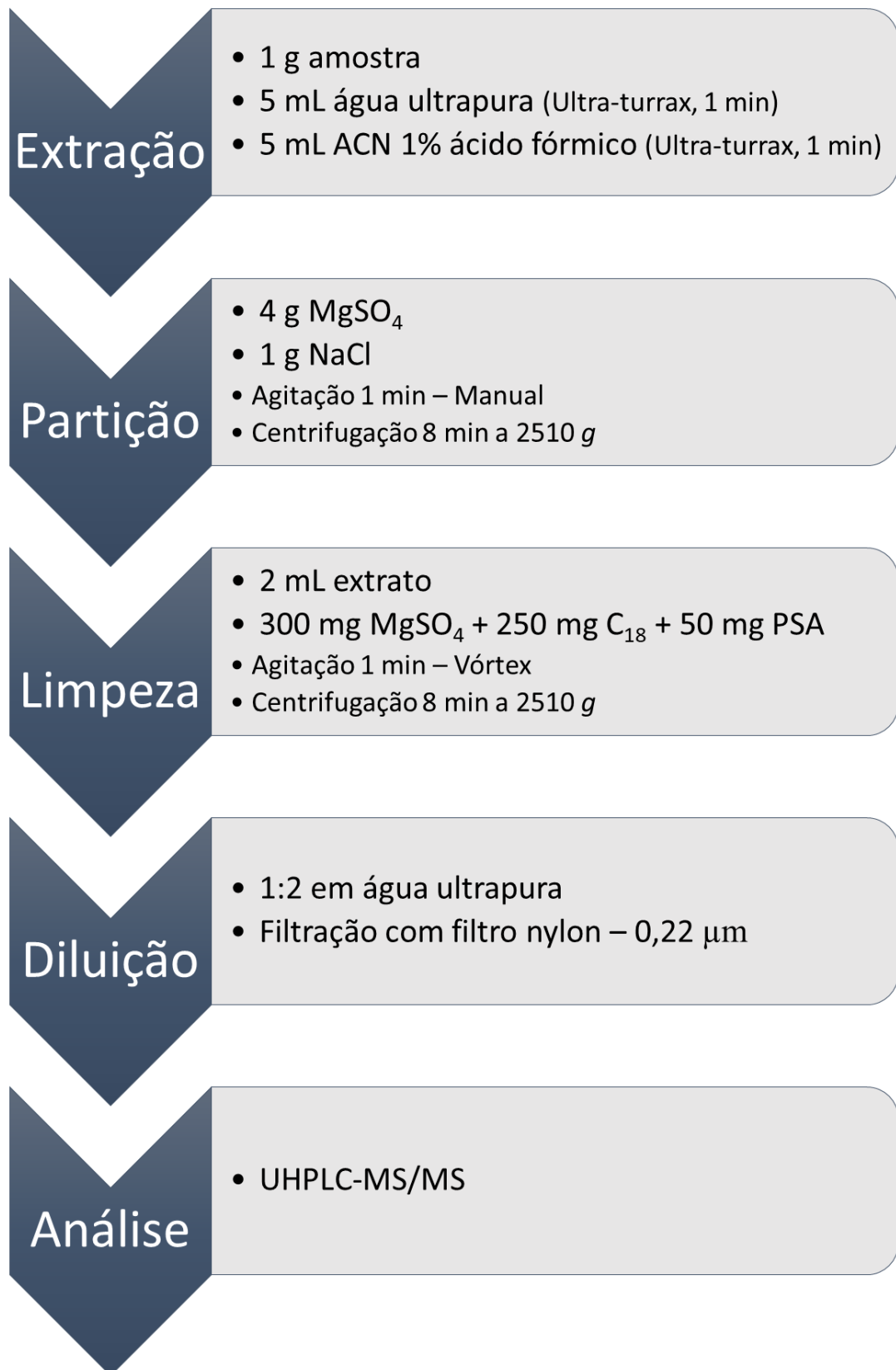
Fonte: A autora (2022).

Como podemos observar o fator de 10x permitiu uma recuperação de um maior número de compostos. Entretanto, a faixa com menor efeito matriz foi observado no teste com maior diluição. Visto que o trabalho visa alcançar baixos limites de quantificação, se deu preferência em trabalhar com o fator de diluição de 10x.

4.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO OTIMIZADO

A Figura 19 apresenta o fluxograma do método mini-QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos da matriz abelha.

Figura 19 – Representação do método mini-QuEChERS modificado proposto para a extração de agrotóxicos em abelha



Fonte: A autora (2022).

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO

A validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos seguiu os seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica e faixa linear, efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limites de detecção e de quantificação. Posteriormente, o método foi aplicado em amostras reais.

4.4.1 Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos por injeção do extrato de amostra “branco” e extrato de amostra fortificada no sistema cromatográfico. Esta avaliação tem por objetivo verificar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo. No caso da matriz em estudo, não foi possível encontrar amostras isentas de agrotóxicos, sendo necessário descontar a área dos analitos presentes na amostra “branco”. A amostra branco de abelha utilizada para os testes e validação do método de extração apresentava resíduos dos compostos carbofuram, etefom, procimidona e terbutilazina.

4.4.2 Curva analítica e faixa linear

A faixa de trabalho de cada agrotóxico estudado foi determinada através das injeções em triplicata das soluções analíticas preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz abelha, nas concentrações 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de determinação (r^2), para as curvas analíticas em solvente e na matriz de abelha, a faixa linear, bem como o *ion ratio* para cada agrotóxico.

Tabela 11 – Curvas analíticas no solvente e na matriz. Coeficientes de determinação, valores de faixa linear e *ion ratio* para cada agrotóxico

| Compostos | Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Curvas | | <i>Ion ratio</i> |
|-------------------------|--|-------------------|-----------------|------------------|
| | | Solvente r^2 | Matriz r^2 | |
| 2,4 D | 0,5 - 50 | 0,999376 | 0,998874 | 11 |
| Acephate | 0,5 - 50 | 0,999867 | 0,999921 | 19 |
| Acetamiprid | 0,5 - 50 | 0,999758 | 0,999847 | 25 |
| Alachlor | 0,5 - 50 | 0,999649 | 0,999828 | 14 |
| Ametryn | 0,5 - 50 | 0,999653 | 0,999835 | 23 |
| Atrazina | 0,5 - 50 | 0,999628 | 0,999849 | 23 |
| Azaconazole | 0,5 - 50 | 0,999721 | 0,999837 | 28 |
| Azamethiphos | 0,5 - 50 | 0,999701 | 0,99985 | 12 |
| Azinphos Methyl | 0,5 - 50 | 0,999702 | 0,999804 | 15 |
| Azinphos-ethyl | 0,5 - 50 | 0,999969 | 0,999372 | 16 |
| Azoxystrobin | 0,5 - 50 | 0,999575 | 0,999454 | 29 |
| Benalaxil | 0,5 - 50 | 0,999709 | 0,999788 | 23 |
| Bitertanol | 0,5 - 50 | 0,99975 | 0,999755 | 15 |
| Boscalid | 0,5 - 50 | 0,999694 | 0,999825 | 15 |
| Bromuconazole I | 0,5 - 50 | 0,999797 | 0,999733 | 19 |
| Bromuconazole II | 0,5 - 50 | 0,999704 | 0,999884 | 20 |
| Buprofezin | 0,5 - 50 | 0,999419 | 0,9994 | 19 |
| Carbaryl | 0,5 - 50 | 0,999826 | 0,999943 | 25 |
| Carbendazim | 0,5 - 50 | 0,998474 | 0,999495 | 16 |
| Carbofuran | 0,5 - 50 | 0,999746 | 0,999707 | 12 |
| Carbofuran-3-hydroxy | 0,5 - 50 | 0,999679 | 0,999718 | 15 |
| Carboxin | 0,5 - 50 | 0,999708 | 0,999989 | 25 |
| Cletodim | 0,5 - 50 | 0,999886 | 0,999873 | 21 |
| Chlorantraniliprole | 0,5 - 50 | 0,999663 | 0,999626 | 18 |
| Chlorfenvinphos | 0,5 - 50 | 0,999695 | 0,999754 | 14 |
| Chlorimuron ethyl | 0,5 - 50 | 0,999702 | 0,999746 | 11 |
| Chlorpyrifos-methyl | 0,5 - 50 | 0,99617 | 0,996222 | 15 |
| Clofentezine | 0,5 - 50 | 0,999792 | 0,999888 | 13 |
| Clomazone | 0,5 - 50 | 0,999779 | 0,999943 | 14 |
| Clorpirifos | 0,5 - 50 | 0,999714 | 0,999714 | 17 |
| Clothianidin | 0,5 - 50 | 0,999846 | 0,99987 | 12 |
| Cyanazine | 0,5 - 50 | 0,999772 | 0,999854 | 25 |
| Cyazofamid | 0,5 - 50 | 0,999653 | 0,999807 | 19 |
| Cymoxanil | 0,5 - 50 | 0,999584 | 0,999607 | 13 |
| Cyproconazole I | 0,5 - 50 | 0,999726 | 0,99966 | 25 |
| Cyproconazole II | 0,5 - 50 | 0,999463 | 0,999609 | 20 |
| Cyprodinil | 0,5 - 50 | 0,999805 | 0,999819 | 12 |
| Demeton-S-methyl-sulfon | 0,5 - 50 | 0,999743 | 0,999627 | 23 |
| Diazinon | 0,5 - 50 | 0,999679 | 0,99979 | 29 |

| Compostos | Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Curvas | | Ion ratio |
|-------------------|---|----------|----------|--------------|
| | | Solvente | Matriz | |
| | | r^2 | r^2 | |
| Diclotophos | 0,5 - 50 | 0,9995 | 0,999782 | 18 |
| Diclosulam | 0,5 - 50 | 0,999625 | 0,999669 | 27 |
| Difenconazole I | 0,5 - 50 | 0,999473 | 0,999884 | 15 |
| Diflubenzuron | 0,5 - 50 | 0,999285 | 0,999766 | 14 |
| Dimethoate | 0,5 - 50 | 0,999465 | 0,999839 | 25 |
| Dimethomorph | 0,5 - 50 | 0,999759 | 0,999654 | 16 |
| Dimethomorph E | 0,5 - 50 | 0,999798 | 0,999598 | 28 |
| Dimethomorph Z | 0,5 - 50 | 0,999744 | 0,999612 | 29 |
| Dimoxystrobin | 0,5 - 50 | 0,999699 | 0,999874 | 11 |
| Diniconazole | 0,5 - 50 | 0,999729 | 0,999788 | 18 |
| Diuron | 0,5 - 50 | 0,999731 | 0,999909 | 20 |
| EPN | 0,5 - 50 | 0,999858 | 0,99981 | 19 |
| Epoxiconazole | 0,5 - 50 | 0,999669 | 0,999791 | 13 |
| Ethephon | 0,5 - 50 | 0,999713 | 0,99994 | 17 |
| Ethiofencarb | 0,5 - 50 | 0,999738 | 0,999737 | 16 |
| Ethofenprox | 0,5 - 50 | 0,999695 | 0,999881 | 11 |
| Ethoprophos | 0,5 - 50 | 0,999336 | 0,999677 | 13 |
| Ethoxysulfuron | 0,5 - 50 | 0,999842 | 0,999861 | 20 |
| Famoxadone | 0,5 - 50 | 0,999529 | 0,998887 | 13 |
| Fenamidone | 0,5 - 50 | 0,999773 | 0,999744 | 23 |
| Fenamiphos | 0,5 - 50 | 0,999808 | 0,999476 | 25 |
| Fenarimol | 0,5 - 50 | 0,999522 | 0,999647 | 15 |
| Fenazaquin | 0,5 - 50 | 0,999258 | 0,999267 | 13 |
| Fenbuconalozé | 0,5 - 50 | 0,999672 | 0,999826 | 17 |
| Fenhexamid | 0,5 - 50 | 0,99939 | 0,999745 | 28 |
| Fenoxycarb | 0,5 - 50 | 0,999542 | 0,999801 | 13 |
| Fenpropathrin | 0,5 - 50 | 0,999751 | 0,999669 | 18 |
| Fenpyroximat | 0,5 - 50 | 0,999642 | 0,999789 | 18 |
| Fenthion | 0,5 - 50 | 0,99968 | 0,999371 | 14 |
| Fipronil | 0,5 - 50 | 0,999631 | 0,998034 | 29 |
| Fluazafop-P-butyl | 0,5 - 50 | 0,998912 | 0,998151 | 16 |
| Flupicolid | 0,5 - 50 | 0,999663 | 0,999777 | 14 |
| Fluquinconazole | 0,5 - 50 | 0,999826 | 0,999789 | 14 |
| Fluroxypyr | 0,5 - 50 | 0,999567 | 0,996837 | 19 |
| Flusilazole | 0,5 - 50 | 0,999597 | 0,999772 | 12 |
| Flutolanil | 0,5 - 50 | 0,999605 | 0,999741 | 20 |
| Flutriafol | 0,5 - 50 | 0,999845 | 0,999775 | 24 |
| Furathiocarb | 0,5 - 50 | 0,999411 | 0,999132 | 15 |
| Hexythiazox | 0,5 - 50 | 0,999665 | 0,999728 | 12 |
| Imazalil | 0,5 - 50 | 0,99971 | 0,999944 | 12 |
| Imazamox | 0,5 - 50 | 0,999728 | 0,999932 | 29 |
| Imazapic | 0,5 - 50 | 0,999671 | 0,999152 | 11 |

| Compostos | Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Curvas | | Ion ratio |
|----------------------|--|-------------------|-----------------|-----------|
| | | Solvente r^2 | Matriz r^2 | |
| Imazapyr | 0,5 - 50 | 0,999776 | 0,99969 | 16 |
| Imazaquin | 0,5 - 50 | 0,999592 | 0,999928 | 19 |
| Imazethapyr | 0,5 - 50 | 0,999773 | 0,999609 | 11 |
| Imidacloprid | 0,5 - 50 | 0,999471 | 0,999413 | 12 |
| Indoxacarb | 0,5 - 50 | 0,999604 | 0,999798 | 15 |
| Iprodione | 0,5 - 50 | 0,999851 | 0,999834 | 12 |
| Iprovalicarb I | 0,5 - 50 | 0,999682 | 0,999656 | 14 |
| Iprovalicarb II | 0,5 - 50 | 0,999658 | 0,999721 | 17 |
| Kresoxim-methyl | 0,5 - 50 | 0,999794 | 0,999436 | 18 |
| Linuron | 0,5 - 50 | 0,999569 | 0,999765 | 12 |
| Malathion | 0,5 - 50 | 0,999606 | 0,999656 | 12 |
| Mecarbam | 0,5 - 50 | 0,999727 | 0,999244 | 17 |
| Metaflumizone | 0,5 - 50 | 0,999238 | 0,996629 | 23 |
| Mepanipyrim | 0,5 - 50 | 0,999639 | 0,993974 | 24 |
| Mephosfolan | 0,5 - 50 | 0,999598 | 0,999806 | 29 |
| Mepronil | 0,5 - 50 | 0,999549 | 0,999578 | 19 |
| Metalaxyl | 0,5 - 50 | 0,999699 | 0,999807 | 16 |
| Metconazole | 0,5 - 50 | 0,999748 | 0,999696 | 16 |
| Methamidophos | 0,5 - 50 | 0,99988 | 0,999946 | 17 |
| Methidathion | 0,5 - 50 | 0,999879 | 0,999842 | 20 |
| Methiocarb | 0,5 - 50 | 0,999745 | 0,999738 | 15 |
| Methiocarb sulfone | 0,5 - 50 | 0,99941 | 0,999732 | 29 |
| Methiocarb sulfoxide | 0,5 - 50 | 0,999772 | 0,999965 | 13 |
| Methomyl | 0,5 - 50 | 0,999005 | 0,998506 | 14 |
| Methoxyfenozide | 0,5 - 50 | 0,999399 | 0,999806 | 23 |
| Metolachlor | 0,5 - 50 | 0,999614 | 0,999848 | 24 |
| Metribuzin | 0,5 - 50 | 0,999487 | 0,999898 | 16 |
| Metsulfuron methyl | 0,5 - 50 | 0,999849 | 0,999592 | 11 |
| Mevinphos I | 0,5 - 50 | 0,999713 | 0,99984 | 14 |
| Mevinphos II | 0,5 - 50 | 0,99971 | 0,999844 | 17 |
| Molinate | 0,5 - 50 | 0,999972 | 0,9998 | 26 |
| Monocrotophos | 0,5 - 50 | 0,999434 | 0,999698 | 19 |
| Monolinuron | 0,5 - 50 | 0,999883 | 0,999814 | 24 |
| Myclobutanil | 0,5 - 50 | 0,999611 | 0,999805 | 30 |
| Nicosulfuron | 0,5 - 50 | 0,999817 | 0,999658 | 23 |
| Nuarimol | 0,5 - 50 | 0,999689 | 0,999619 | 24 |
| Omethoate | 0,5 - 50 | 0,999751 | 0,999697 | 16 |
| Oxadixyl | 0,5 - 50 | 0,999778 | 0,999929 | 18 |
| Oxamyl | 0,5 - 50 | 0,999688 | 0,999554 | 15 |
| Paraoxon-ethyl | 0,5 - 50 | 0,999868 | 0,999691 | 27 |
| Parathion-methyl | 0,5 - 50 | 0,999729 | 0,999808 | 14 |
| Penconazole | 0,5 - 50 | 0,999457 | 0,999809 | 21 |

| Compostos | Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Curvas | | Ion ratio |
|----------------------|--|-------------------|-----------------|-----------|
| | | Solvente r^2 | Matriz r^2 | |
| Pencycuron | 0,5 - 50 | 0,9995 | 0,999747 | 29 |
| Pendimethalin | 0,5 - 50 | 0,999824 | 0,999528 | 10 |
| Penoxsulam | 0,5 - 50 | 0,99982 | 0,999086 | 17 |
| Picoxystrobin | 0,5 - 50 | 0,999618 | 0,999766 | 13 |
| Phorate | 0,5 - 50 | 0,999874 | 0,999638 | 19 |
| Phosalone | 0,5 - 50 | 0,999551 | 0,999808 | 23 |
| Phosmet | 0,5 - 50 | 0,999647 | 0,999678 | 15 |
| Piperonyl butoxide | 0,5 - 50 | 0,999031 | 0,99927 | 23 |
| Pirimicarb | 0,5 - 50 | 0,999904 | 0,998185 | 23,9 |
| Pirimiphos-ethyl | 0,5 - 50 | 0,999735 | 0,99974 | 15 |
| Pirimiphos Methyl | 0,5 - 50 | 0,999487 | 0,999875 | 10 |
| Procloraz | 0,5 - 50 | 0,999839 | 0,999727 | 22 |
| Procymidone | 0,5 - 50 | 0,999528 | 0,999779 | 13 |
| Profenofos | 0,5 - 50 | 0,999728 | 0,999882 | 23 |
| Prometryn | 0,5 - 50 | 0,99959 | 0,999778 | 18 |
| Propanil | 0,5 - 50 | 0,99966 | 0,999929 | 19 |
| Propargite | 0,5 - 50 | 0,999618 | 0,999461 | 12 |
| Propiconazole | 0,5 - 50 | 0,99977 | 0,999782 | 21 |
| Propoxur | 0,5 - 50 | 0,999884 | 0,999838 | 28 |
| Propyzamide | 0,5 - 50 | 0,999691 | 0,999642 | 17 |
| Prothiofos | 0,5 - 50 | 0,993711 | 0,990024 | 19 |
| Pyraclostrobin | 0,5 - 50 | 0,99954 | 0,999789 | 12 |
| Pyrazophos | 0,5 - 50 | 0,999729 | 0,999696 | 12 |
| Pyrazosulfuron-ethyl | 0,5 - 50 | 0,999752 | 0,999801 | 17 |
| Pyridaben | 0,5 - 50 | 0,999617 | 0,999757 | 14 |
| Pyridaphenthion | 0,5 - 50 | 0,999706 | 0,999687 | 20 |
| Pyridate | 0,5 - 50 | 0,999849 | 0,999751 | 16 |
| Pyrimethanil | 0,5 - 50 | 0,999838 | 0,999886 | 15 |
| Pyriproxifen | 0,5 - 50 | 0,999207 | 0,999048 | 23 |
| Quinalphos | 0,5 - 50 | 0,999643 | 0,999758 | 16 |
| Quinclorac | 0,5 - 50 | 0,99902 | 0,999102 | 28 |
| Quinoxifen | 0,5 - 50 | 0,999538 | 0,99971 | 21 |
| Quizalofop-ethyl | 0,5 - 50 | 0,999847 | 0,999861 | 16 |
| Rotenone | 0,5 - 50 | 0,999657 | 0,999774 | 14 |
| Saflufenacil | 0,5 - 50 | 0,999759 | 0,999836 | 20 |
| Simazine | 0,5 - 50 | 0,999602 | 0,999864 | 20 |
| Spinosad A | 0,5 - 50 | 0,999476 | 0,99985 | 15 |
| Spinosad D | 0,5 - 50 | 0,999699 | 0,999936 | 18 |
| Tebuconazole | 0,5 - 50 | 0,999833 | 0,999774 | 13 |
| Tebufenozide | 0,5 - 50 | 0,999672 | 0,99971 | 17 |
| Tebufenpyrad | 0,5 - 50 | 0,999788 | 0,999818 | 19 |
| Teflubenzuron | 0,5 - 50 | 0,999637 | 0,999542 | 23 |

| Compostos | Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Curvas | | Ion ratio |
|--------------------|--|-------------------|-----------------|-----------|
| | | Solvente r^2 | Matriz r^2 | |
| Terbufos | 0,5 - 50 | 0,999448 | 0,999664 | 15 |
| Terbuthylazine | 0,5 - 50 | 0,999595 | 0,999913 | 16 |
| Tetraconazole | 0,5 - 50 | 0,999506 | 0,999683 | 21 |
| Tetradifon | 0,5 - 50 | 0,999753 | 0,999255 | 18 |
| Thiabendazole | 0,5 - 50 | 0,999461 | 0,999745 | 15 |
| Thiacloprid | 0,5 - 50 | 0,999523 | 0,999611 | 18 |
| Thiamethoxam | 0,5 - 50 | 0,998963 | 0,998568 | 29 |
| Thiobencarb | 0,5 - 50 | 0,999748 | 0,999885 | 13 |
| Thiodicarb | 0,5 - 50 | 0,999738 | 0,999623 | 27 |
| Thiophanate methyl | 0,5 - 50 | 0,99965 | 0,99986 | 18 |
| Tolclofos-methyl | 0,5 - 50 | 0,999148 | 0,998809 | 16 |
| Tolyfluanid | 0,5 - 50 | 0,999588 | 0,998356 | 27 |
| Triadimefon | 0,5 - 50 | 0,99963 | 0,999743 | 12 |
| Triadimenol | 0,5 - 50 | 0,999675 | 0,999768 | 11 |
| Trichlorfon | 0,5 - 50 | 0,999788 | 0,999913 | 23 |
| Tricyclazole | 0,5 - 50 | 0,999935 | 0,999881 | 12 |
| Trifloxysulfuron | 0,5 - 50 | 0,999795 | 0,999234 | 25 |
| Trifloxystrobin | 0,5 - 50 | 0,999571 | 0,999858 | 17 |
| Triflumizole | 0,5 - 50 | 0,999643 | 0,999879 | 18 |
| Triflumuron | 0,5 - 50 | 0,999897 | 0,999323 | 16 |
| Triticonazole | 0,5 - 50 | 0,997684 | 0,998898 | 12 |
| Vamidothion | 0,5 - 50 | 0,999428 | 0,999528 | 29 |
| Zoxamide | 0,5 - 50 | 0,999677 | 0,99974 | 20 |
| Atrazine d5 | 0,5 - 50 | 0,99955 | 0,999842 | 18 |
| Chlorthiophos | 0,5 - 50 | 0,999755 | 0,999763 | 12 |

Fonte: A autora (2022).

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os modelos são lineares e adequados, visto que todos os agrotóxicos apresentam coeficiente de determinação (r^2) maior ou igual que 0,99. Desta forma, este parâmetro está de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO. Além disso, o *ion ratio*, se manteve na faixa de aceitação de $\pm 30\%$ para todos os compostos.

4.4.3 Efeito matriz

O efeito da matriz pode gerar supressão ou aumento do sinal analítico. Isto é causado pela interação entre os analitos e coextrativos da matriz na amostra preparada, que pode suprimir ou aumentar a ionização do analito na fonte de ionização, resultando em um menor ou maior sinal medido o que afeta a exatidão do

resultado quantitativo (ZHANG *et al.*, 2011). Segundo a SANTE 2019 o efeito matriz é considerado aceitável se os valores estiverem na faixa de -20 a 20% (SANTE, 2019). Na Tabela 12 são apresentados os resultados obtidos para o efeito matriz para cada agrotóxico analisado.

Tabela 12 - Resultados obtidos para o efeito matriz dos agrotóxicos determinados por UHPLC-MS/MS

| Composto | Efeito Matriz (%) | Composto | Efeito Matriz (%) |
|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| 2,4 D | 44,5 | Mephosfolan | -11,2 |
| Acefato | -3,2 | Mepronil | 25,0 |
| Acetamiprido | 1,4 | Metalaxyl | -1,9 |
| Alaclor | -1,3 | Metconazole | 6,8 |
| Ametrina | -11,8 | Methamidophos | -2,1 |
| Atrazina | -4,8 | Methidathion | -4,2 |
| Azaconazol | 6,2 | Methiocarb | -1,2 |
| Azamethiphos | 5,5 | Methiocarb sulfone | 39,8 |
| Azinphos Methyl | 9,5 | Methiocarb sulfoxide | -33,6 |
| Azinphos-ethyl | 11,3 | Methomyl | -6,3 |
| Azoxystrobin | 4,3 | Methoxyfenozide | 4,5 |
| Benalaxil | -1,7 | Metolachlor | -6,8 |
| Bitertanol | 7,0 | Metribuzin | -27,0 |
| Boscalid | 2,9 | Metsulfuron methyl | 12,7 |
| Bromuconazole I | 4,8 | Mevinphos I | -13,4 |
| Bromuconazole II | 13,0 | Mevinphos II | -14,9 |
| Buprofezin | -5,6 | Molinate | 0,9 |
| Carbaryl | -14,1 | Monocrotophos | 0,6 |
| Carbendazim | -7,2 | Monolinuron | -6,4 |
| Carbofuran | 30,7 | Myclobutanil | 12,6 |
| Carbofuran-3-hydroxy | 1,0 | Nicosulfuron | 44,2 |
| Carboxin | -42,0 | Nuarimol | 9,4 |
| Cletodim | -4,7 | Omethoate | -3,5 |
| Chlorantraniliprole | 6,8 | Oxadixyl | -11,9 |
| Chlorfenvinphos | 1,1 | Oxamyl | -2,5 |
| Chlorimuron ethyl | 4,2 | Paraoxon-ethyl | -3,5 |
| Chlorpyriphos-methyl | 1,2 | Parathion-methyl | 4,8 |
| Clofentezine | 7,8 | Penconazole | 7,3 |
| Clomazone | -7,8 | Pencycuron | 10,7 |
| Clorpirifos | -1,2 | Pendimethalin | 0,8 |
| Clothianidin | -79,7 | Penoxsulam | 34,7 |
| Cyanazine | 29,4 | Picoxystrobin | -3,1 |
| Cyazofamid | 0,3 | Phorate | 2,3 |
| Cymoxanil | -16,5 | Phosalone | 8,0 |
| Cyproconazole I | 1,2 | Phosmet | 9,3 |
| Cyproconazole II | 4,7 | Piperonyl butoxide | 0,6 |
| Cyprodinil | -9,4 | Pirimicarb | -41,1 |

| Composto | Efeito Matriz (%) | Composto | Efeito Matriz (%) |
|-------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| Demeton-S-methyl-sulfon | 5,7 | Pirimiphos-ethyl | -3,2 |
| Diazinon | -36,9 | Pirimiphos Methyl | -7,6 |
| Dicrotophos | -9,0 | Procloraz | 3,7 |
| Diclosulam | 8,8 | Procymidone | -2,8 |
| Difenconazole I | 3,0 | Profenofos | -2,6 |
| Diflubenzuron | 6,4 | Prometryn | -6,0 |
| Dimethoate | -11,8 | Propanil | -3,8 |
| Dimethomorph | 9,8 | Propargite | 10,1 |
| Dimethomorph E | 10,3 | Propiconazole | 5,5 |
| Dimethomorph Z | 9,7 | Propoxur | -6,5 |
| Dimoxystrobin | -2,7 | Propyzamide | -1,8 |
| Diniconazole | 3,4 | Prothiofos | 9,3 |
| Diuron | -3,1 | Pyraclostrobin | -0,1 |
| EPN | 10,1 | Pyrazophos | 16,7 |
| Epoxiconazole | 6,8 | Pyrazosulfuron-ethyl | 3,1 |
| Ethephon | -5,1 | Pyridaben | -0,6 |
| Ethiofencarb | -2,3 | Pyridaphenthion | 12,3 |
| Ethofenprox | 2,7 | Pyridate | 16,2 |
| Ethoprophos | -0,6 | Pyrimethanil | -7,5 |
| Ethoxysulfuron | 7,7 | Pyriproxifen | 2,5 |
| Famoxadone | -23,8 | Quinalphos | 7,0 |
| Fenamidone | 6,0 | Quinclorac | -27,1 |
| Fenamiphos | 22,4 | Quinoxifen | -7,9 |
| Fenarimol | 23,9 | Quizalofop-ethyl | -1,3 |
| Fenazaquin | -15,4 | Rotenone | 20,6 |
| Fenbuconalozé | 3,5 | Saflufenacil | 5,9 |
| Fenhexamid | 4,0 | Simazine | -13,5 |
| Fenoxycarb | 3,2 | Spinosad A | -2,9 |
| Fenpropathrin | 2,1 | Spinosad D | -10,0 |
| Fenpyroximat | 2,8 | Tebuconazole | 24,4 |
| Fenthion | 4,1 | Tebufenozide | 5,9 |
| Fipronil | 12,8 | Tebufenpyrad | 4,0 |
| Fluazafop-P-butyl | 10,1 | Teflubenzuron | -19,1 |
| Flupicolid | 42,2 | Terbufos | -1,4 |
| Fluquinconazole | 4,9 | Terbuthylazine | -6,2 |
| Fluroxypyr | 1,2 | Tetraconazole | 5,2 |
| Flusilazole | 4,2 | Tetradifon | 23,9 |
| Flutolanil | 7,1 | Thiabendazole | -16,0 |
| Flutriafol | 3,7 | Thiacloprid | -19,6 |
| Furathiocarb | 8,4 | Thiamethoxam | 13,1 |
| Hexythiazox | -16,8 | Thiobencarb | -2,3 |
| Imazalil | -9,5 | Thiodicarb | 10,9 |
| Imazamox | -8,6 | Thiophanate methyl | 19,3 |
| Imazapic | -13,4 | Tolclofos-methyl | 9,3 |
| Imazapyr | 7,1 | Tolyfluanid | -25,2 |
| Imazaquin | 1,8 | Triadimefon | 22,1 |
| Imazethapyr | 15,4 | Triadimenol | 8,1 |

| Composto | Efeito Matriz (%) | Composto | Efeito Matriz (%) |
|-----------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Imidacloprid | 0,4 | Trichlorfon | -40,3 |
| Indoxacarb | 36,1 | Tricyclazole | -15,0 |
| Iprodione | 7,9 | Trifloxysulfuron | 22,3 |
| Iprovalicarb I | 13,7 | Trifloxystrobin | -5,5 |
| Iprovalicarb II | 13,9 | Triflumizole | -11,7 |
| Kresoxim-methyl | 2,1 | Triflumuron | 2,3 |
| Linuron | -0,4 | Triticonazole | 47,8 |
| Malathion | 11,8 | Vamidotion | -53,3 |
| Mecarbam | 4,9 | Zoxamide | 4,3 |
| Metaflumizone | 19,8 | Chlorthiophos | 1,1 |

Fonte: A autora (2022).

De acordo com PINHO e colaboradores (2010), o efeito da matriz sobre os analitos apresenta relação proporcional crescente ao aumento da complexidade da matriz em estudo. A análise de agrotóxicos em abelhas é um desafio devido à complexidade do corpo do inseto e presença de todos os tipos de compostos naturais, como cera de abelha, quitina e proteínas (KILJANEK *et al.*, 2016).

Visto a complexidade da amostra em estudo o efeito matriz variou entre -79,7% e 87,5%. Dos 189 agrotóxicos analisados, 160 compostos ficaram na faixa de -20 a 20%, 18 compostos apresentaram efeito matriz maior que 21% e 11 compostos apresentaram EM acima de -21%. Assim, a identificação e quantificação dos compostos foi feita utilizando a calibração na matriz.

4.4.4 Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade)

Os parâmetros de exatidão e recuperação dos analitos foram avaliados através da injeção de cinco níveis de concentração em sete repetições. A Tabela 13 apresenta os resultados das recuperações (n= 7) percentuais e o RSD% para os 189 agrotóxicos que foram fortificados em abelha, nos níveis de 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, extraídos pelo método QuEChERS modificado.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz. Neste trabalho seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, no qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120%, com RSD \leq 20% (SANTE, 2019).

Tabela 13 – Percentuais de recuperação (Rec.) e RSD dos agrotóxicos empregando o método mini-QuEChERS modificado no ensaio de repetitividade

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|----------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| 2,4 D | 78,4 | 15,7 | 71,0 | 12,3 | 78,5 | 8,3 | 71,5 | 8,4 | 70,5 | 5,6 |
| Acefato | 81,9 | 8,0 | 76,1 | 6,1 | 78,6 | 2,7 | 79,4 | 4,5 | 75,2 | 4,2 |
| Acetamiprido | 120,0 | 5,5 | 110,7 | 17,4 | 104,1 | 2,3 | 96,4 | 2,3 | 94,5 | 4,9 |
| Alacloro | 93,1 | 5,1 | 96,5 | 6,5 | 95,9 | 3,4 | 95,8 | 2,2 | 92,0 | 1,5 |
| Ametrina | 53,1 | 3,1 | 70,7 | 4,6 | 79,7 | 2,1 | 81,1 | 1,4 | 81,0 | 3,0 |
| Atrazina | 88,8 | 1,4 | 88,8 | 3,8 | 91,3 | 2,0 | 91,2 | 0,8 | 89,8 | 1,9 |
| Azaconazole | 84,4 | 2,3 | 86,2 | 3,6 | 87,4 | 2,3 | 86,9 | 1,7 | 85,4 | 1,6 |
| Azamephos | 55,1 | 20,0 | 60,8 | 11,1 | 51,6 | 9,2 | 76,9 | 5,4 | 83,6 | 6,5 |
| Azinphos Methyl | 123,8 | 9,4 | 107,1 | 5,6 | 102,7 | 5,2 | 95,6 | 2,6 | 93,2 | 2,0 |
| Azinphos-ethyl | 84,0 | 19,6 | 88,1 | 13,6 | 98,9 | 5,8 | 98,8 | 4,8 | 96,4 | 2,8 |
| Azoxystrobin | 73,6 | 3,0 | 83,4 | 2,1 | 98,0 | 3,2 | 100,7 | 1,8 | 99,9 | 1,2 |
| Benalaxil | 88,9 | 3,3 | 89,7 | 5,7 | 99,2 | 3,1 | 97,0 | 1,7 | 93,0 | 2,0 |
| Bitertanol | 87,7 | 4,8 | 82,4 | 8,8 | 87,7 | 7,0 | 86,9 | 5,5 | 87,6 | 4,6 |
| Boscalid | 81,4 | 6,3 | 91,2 | 4,4 | 99,6 | 2,5 | 98,8 | 2,8 | 96,7 | 1,4 |
| Bromuconazole I | 82,7 | 3,7 | 76,5 | 5,7 | 79,9 | 3,5 | 76,2 | 1,0 | 72,7 | 3,1 |
| Bromuconazole II | 113,8 | 9,2 | 104,2 | 4,6 | 94,2 | 5,2 | 91,2 | 3,1 | 88,9 | 4,1 |
| Buprofezin | 75,7 | 2,3 | 80,4 | 5,3 | 73,8 | 1,6 | 79,9 | 0,7 | 79,7 | 2,4 |
| Carbaryl | 73,3 | 11,9 | 77,9 | 4,8 | 73,9 | 9,0 | 82,6 | 3,4 | 86,8 | 4,3 |
| Carbendazim | 123,1 | 5,6 | 17,3 | 10,3 | 31,0 | 2,2 | 78,2 | 5,0 | 70,5 | 1,8 |
| Carbofuran | 53,3 | 5,5 | 77,8 | 6,6 | 96,3 | 3,3 | 99,0 | 4,8 | 97,3 | 4,8 |
| Carbofuran-3-hydroxy | 72,6 | 4,4 | 80,4 | 3,9 | 91,7 | 2,2 | 94,1 | 1,7 | 94,2 | 2,8 |
| Carboxin | 90,0 | 5,9 | 96,1 | 8,3 | 93,1 | 6,3 | 97,7 | 6,4 | 100,4 | 8,8 |
| Cletodim | 73,3 | 4,5 | 79,9 | 4,0 | 87,0 | 2,1 | 92,4 | 1,6 | 89,3 | 2,6 |
| Chlorantraniliprole | 37,9 | 7,9 | 87,0 | 8,9 | 71,1 | 4,9 | 80,6 | 2,6 | 86,0 | 1,9 |
| Chlorfenvinphos | 103,2 | 3,6 | 99,1 | 3,7 | 98,2 | 3,6 | 99,6 | 1,9 | 94,6 | 2,4 |
| Chlorimuron ethyl | 80,2 | 6,6 | 83,5 | 4,5 | 84,7 | 4,4 | 86,0 | 7,3 | 87,4 | 7,0 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Chlorpyriphos-methyl | 311,4 | 24,6 | 165,8 | 48,7 | 62,5 | 40,4 | 104,3 | 9,2 | 81,4 | 10,4 |
| Clofentezine | 107,4 | 9,7 | 113,5 | 10,8 | 119,7 | 2,6 | 106,9 | 5,6 | 92,9 | 6,7 |
| Clomazone | 101,9 | 1,7 | 88,4 | 4,1 | 95,0 | 3,5 | 93,6 | 2,9 | 90,5 | 4,6 |
| Clorpirifos | 66,6 | 39,9 | 115,1 | 17,3 | 106,3 | 10,5 | 88,3 | 10,4 | 93,1 | 5,4 |
| Clothianidin | 95,0 | 7,6 | 86,8 | 18,2 | 101,5 | 9,7 | 89,2 | 4,7 | 83,0 | 11,6 |
| Cyanazine | 93,8 | 8,6 | 92,6 | 7,7 | 100,7 | 3,4 | 100,6 | 2,5 | 98,9 | 3,5 |
| Cyazofamid | 94,8 | 3,4 | 94,4 | 2,7 | 101,2 | 3,0 | 101,1 | 0,7 | 97,2 | 2,2 |
| Cymoxanil | 41,7 | 9,1 | 70,9 | 6,5 | 81,8 | 13,3 | 90,1 | 4,7 | 92,7 | 4,9 |
| Cyproconazole I | 77,7 | 9,0 | 81,7 | 7,5 | 93,2 | 6,9 | 94,9 | 3,5 | 92,5 | 3,4 |
| Cyproconazole II | 80,0 | 10,2 | 80,0 | 6,6 | 86,4 | 6,4 | 88,1 | 2,8 | 85,5 | 2,9 |
| Cyprodinil | 66,2 | 4,2 | 70,4 | 9,3 | 78,5 | 4,2 | 75,6 | 2,0 | 73,9 | 3,2 |
| Demeton-S-methyl-sulfon | 83,3 | 7,9 | 90,8 | 3,4 | 98,0 | 2,4 | 98,0 | 1,4 | 97,4 | 1,4 |
| Diazinon | 63,7 | 10,1 | 84,6 | 17,8 | 99,2 | 6,7 | 92,4 | 10,1 | 82,1 | 14,6 |
| Dicrotophos | 62,0 | 8,6 | 74,4 | 3,2 | 86,8 | 1,7 | 89,0 | 0,7 | 88,1 | 3,0 |
| Diclosulam | 96,8 | 7,7 | 99,0 | 3,8 | 104,9 | 3,5 | 101,6 | 1,8 | 98,6 | 1,1 |
| Difenconazole I | 76,2 | 4,7 | 80,5 | 3,0 | 88,9 | 2,5 | 88,4 | 1,5 | 85,2 | 2,2 |
| Diflubenzuron | 102,6 | 9,8 | 104,2 | 16,4 | 100,1 | 8,4 | 99,6 | 4,6 | 93,3 | 3,4 |
| Dimethoate | 72,3 | 3,9 | 85,7 | 5,6 | 97,8 | 2,8 | 97,4 | 1,2 | 97,4 | 4,1 |
| Dimethomorph | 94,8 | 5,1 | 93,7 | 4,1 | 98,7 | 4,4 | 96,9 | 3,2 | 94,1 | 1,5 |
| Dimethomorph E | 93,8 | 6,8 | 91,5 | 5,4 | 97,5 | 3,8 | 95,1 | 3,1 | 93,5 | 1,4 |
| Dimethomorph Z | 93,7 | 4,4 | 94,7 | 3,1 | 98,3 | 4,3 | 96,5 | 2,8 | 94,3 | 1,1 |
| Dimoxystrobin | 73,3 | 6,1 | 86,7 | 3,5 | 98,8 | 2,2 | 98,3 | 1,3 | 95,6 | 2,0 |
| Diniconazole | 111,2 | 5,7 | 92,5 | 6,5 | 90,1 | 5,2 | 88,8 | 4,1 | 83,4 | 2,9 |
| Diuron | 93,9 | 1,8 | 83,0 | 3,0 | 87,0 | 2,8 | 88,7 | 3,1 | 88,3 | 2,9 |
| EPN | 169,5 | 52,9 | 149,0 | 29,2 | 138,4 | 17,2 | 106,1 | 3,6 | 90,7 | 3,7 |
| Epoxiconazole | 86,0 | 5,3 | 88,9 | 6,4 | 93,6 | 3,9 | 92,1 | 1,9 | 91,2 | 0,9 |
| Ethephon | 72,0 | 3,8 | 82,9 | 5,3 | 99,1 | 2,9 | 100,6 | 0,9 | 96,4 | 2,5 |
| Ethiofencarb | 66,9 | 5,1 | 82,2 | 3,4 | 74,9 | 2,1 | 93,9 | 1,6 | 93,7 | 2,2 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|-------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Ethofenprox | 92,2 | 13,4 | 75,5 | 18,4 | 82,6 | 5,3 | 83,3 | 5,7 | 73,3 | 5,1 |
| Ethoprophos | 55,3 | 3,1 | 73,4 | 2,5 | 88,5 | 2,5 | 91,1 | 0,8 | 90,0 | 2,3 |
| Ethoxysulfuron | 82,3 | 4,4 | 84,9 | 4,3 | 78,2 | 8,4 | 80,4 | 8,3 | 80,4 | 8,3 |
| Famoxadone | 125,3 | 27,7 | 94,4 | 15,7 | 106,4 | 11,3 | 103,3 | 12,2 | 92,0 | 13,8 |
| Fenamidone | 89,9 | 6,3 | 95,0 | 2,8 | 101,4 | 3,8 | 99,8 | 2,5 | 97,0 | 1,5 |
| Fenamiphos | 84,6 | 4,1 | 88,6 | 3,1 | 91,7 | 4,6 | 92,2 | 3,5 | 89,7 | 3,8 |
| Fenarimol | 62,5 | 15,6 | 77,1 | 5,2 | 85,5 | 10,5 | 92,0 | 3,8 | 89,6 | 6,6 |
| Fenazaquin | 25,0 | 8,8 | 13,8 | 7,3 | 35,8 | 3,3 | 44,0 | 1,3 | 43,7 | 3,7 |
| Fenbuconalozé | 95,9 | 6,3 | 90,4 | 5,6 | 95,6 | 3,8 | 96,4 | 3,4 | 93,7 | 3,1 |
| Fenhexamid | 57,7 | 7,6 | 81,3 | 7,2 | 94,1 | 3,6 | 99,1 | 4,0 | 95,5 | 2,6 |
| Fenoxycarb | 91,6 | 4,0 | 88,9 | 6,5 | 94,5 | 4,5 | 95,0 | 2,6 | 91,4 | 3,5 |
| Fenpropathrin | 57,5 | 12,0 | 92,6 | 7,1 | 98,3 | 4,6 | 91,7 | 3,3 | 87,2 | 3,3 |
| Fenpyroximat | 90,4 | 6,9 | 90,0 | 5,7 | 78,7 | 3,0 | 79,8 | 2,8 | 79,6 | 1,6 |
| Fenthion | 88,4 | 13,4 | 79,6 | 17,7 | 117,3 | 7,3 | 101,7 | 8,0 | 93,2 | 5,7 |
| Fipronil | 72,9 | 6,0 | 81,8 | 5,6 | 78,3 | 4,5 | 84,5 | 4,3 | 98,6 | 4,5 |
| Fluazafop-P-butyl | 16,9 | 4,4 | 85,7 | 8,2 | 81,7 | 3,9 | 101,5 | 1,6 | 100,3 | 1,3 |
| Flupicolid | 74,9 | 4,5 | 86,4 | 4,6 | 97,2 | 3,0 | 99,7 | 1,7 | 97,3 | 1,9 |
| Fluquinconazole | 76,7 | 12,1 | 87,3 | 5,3 | 100,9 | 5,3 | 100,1 | 2,3 | 97,0 | 2,3 |
| Fluroxypyr | 895,4 | 29,2 | 375,6 | 34,9 | 191,2 | 8,8 | 14,4 | 24,4 | 21,7 | 8,6 |
| Flusilazole | 114,6 | 4,7 | 99,0 | 5,5 | 100,6 | 4,2 | 97,5 | 1,8 | 93,1 | 2,9 |
| Flutolanil | 90,3 | 4,0 | 94,3 | 3,8 | 102,1 | 2,2 | 101,8 | 1,7 | 97,5 | 1,7 |
| Flutriafol | 96,2 | 5,3 | 93,7 | 4,0 | 98,9 | 2,4 | 99,0 | 2,4 | 95,7 | 1,2 |
| Furathiocarb | 18,1 | 5,1 | 86,9 | 3,8 | 71,1 | 5,1 | 82,9 | 7,4 | 84,7 | 5,3 |
| Hexythiazox | 98,9 | 4,4 | 74,0 | 9,5 | 89,3 | 3,6 | 90,2 | 2,0 | 86,7 | 3,2 |
| Imazalil | 55,6 | 10,2 | 64,4 | 3,2 | 65,0 | 4,1 | 61,4 | 2,7 | 59,6 | 4,9 |
| Imazamox | 99,0 | 3,7 | 94,5 | 3,3 | 97,9 | 2,6 | 95,0 | 1,4 | 88,7 | 3,3 |
| Imazapic | 77,2 | 10,0 | 72,3 | 6,0 | 70,8 | 6,1 | 70,1 | 4,0 | 70,0 | 1,8 |
| Imazapyr | 46,8 | 4,4 | 62,9 | 5,3 | 70,6 | 4,9 | 70,2 | 2,9 | 70,7 | 1,5 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|----------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Imazaquin | 81,9 | 8,2 | 87,7 | 7,3 | 88,0 | 2,4 | 89,9 | 3,5 | 86,8 | 5,5 |
| Imazethapyr | 85,9 | 5,8 | 83,0 | 4,5 | 82,5 | 3,5 | 81,7 | 1,8 | 81,5 | 2,1 |
| Imidacloprid | 87,1 | 5,7 | 71,3 | 11,2 | 89,0 | 6,9 | 94,0 | 4,3 | 93,9 | 10,6 |
| Indoxacarb | 100,3 | 7,1 | 97,9 | 1,9 | 105,7 | 2,6 | 103,7 | 2,6 | 98,7 | 3,4 |
| Iprodione | 158,8 | 38,5 | 93,4 | 17,0 | 107,4 | 17,7 | 90,8 | 7,6 | 93,2 | 5,4 |
| Iprovalicarb I | 56,8 | 3,4 | 78,6 | 3,2 | 94,4 | 2,8 | 97,3 | 1,3 | 96,6 | 0,9 |
| Iprovalicarb II | 55,5 | 3,3 | 77,9 | 2,7 | 94,5 | 1,7 | 97,6 | 1,5 | 97,3 | 1,5 |
| Kresoxim-methyl | 65,9 | 23,1 | 83,9 | 11,0 | 116,3 | 9,0 | 99,7 | 6,1 | 87,1 | 6,9 |
| Linuron | 90,7 | 6,2 | 90,6 | 3,8 | 95,9 | 5,5 | 94,3 | 2,5 | 92,1 | 1,2 |
| Malathion | 82,7 | 3,4 | 90,8 | 1,9 | 99,3 | 3,3 | 100,6 | 1,7 | 97,4 | 1,5 |
| Mecarbam | 78,1 | 8,9 | 107,4 | 11,4 | 70,7 | 10,7 | 87,4 | 11,8 | 101,0 | 7,3 |
| Metaflumizone | 76,1 | 4,2 | 19,3 | 7,9 | 71,4 | 3,7 | 96,3 | 2,1 | 101,0 | 1,7 |
| Mepanipyrim | 216,8 | 86,7 | 83,2 | 149,0 | 64,3 | 94,2 | 98,5 | 61,6 | 131,6 | 35,5 |
| Mephosfolan | 72,3 | 7,1 | 83,6 | 2,0 | 94,4 | 2,9 | 95,0 | 2,9 | 93,8 | 3,5 |
| Mepronil | 62,6 | 4,8 | 80,4 | 3,8 | 95,3 | 3,1 | 98,6 | 1,3 | 97,2 | 1,6 |
| Metalaxyl | 71,9 | 3,2 | 82,9 | 2,0 | 94,7 | 2,8 | 94,8 | 1,9 | 93,9 | 2,4 |
| Metconazole | 70,8 | 5,8 | 76,3 | 3,1 | 84,0 | 2,1 | 84,4 | 2,1 | 82,0 | 2,6 |
| Methamidophos | 70,4 | 3,6 | 70,3 | 2,8 | 71,0 | 1,8 | 71,0 | 5,7 | 75,1 | 4,1 |
| Methidathion | 119,6 | 4,9 | 105,2 | 2,9 | 100,7 | 3,8 | 95,4 | 2,0 | 91,0 | 5,0 |
| Methiocarb | 83,1 | 5,9 | 82,3 | 2,2 | 75,4 | 5,1 | 90,2 | 1,7 | 89,5 | 3,0 |
| Methiocarb sulfone | 98,5 | 7,4 | 103,4 | 5,1 | 91,4 | 4,5 | 101,7 | 1,8 | 98,6 | 2,6 |
| Methiocarb sulfoxide | 98,6 | 8,4 | 92,3 | 16,0 | 94,5 | 6,5 | 87,6 | 6,4 | 87,0 | 14,2 |
| Methomyl | 22,1 | 9,2 | 57,2 | 11,9 | 60,2 | 9,1 | 140,5 | 12,2 | 138,4 | 8,0 |
| Methoxyfenozide | 70,1 | 1,7 | 82,0 | 3,3 | 94,8 | 2,7 | 94,9 | 1,4 | 95,7 | 1,6 |
| Metolachlor | 98,8 | 3,6 | 89,1 | 5,7 | 90,4 | 4,4 | 86,9 | 2,8 | 84,8 | 4,6 |
| Metribuzin | 92,4 | 18,2 | 89,4 | 12,2 | 87,5 | 9,3 | 90,2 | 3,0 | 86,4 | 4,7 |
| Metsulfuron methyl | 87,2 | 5,7 | 91,6 | 3,6 | 96,2 | 2,3 | 95,3 | 3,0 | 94,8 | 3,9 |
| Mevinphos I | 74,1 | 4,8 | 84,8 | 4,8 | 90,5 | 3,0 | 96,0 | 1,7 | 95,0 | 2,6 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|--------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Mevinphos II | 77,6 | 3,2 | 87,5 | 3,9 | 90,5 | 4,2 | 96,2 | 3,1 | 94,3 | 2,3 |
| Molinate | 93,6 | 7,7 | 91,4 | 7,2 | 85,8 | 6,2 | 87,3 | 5,1 | 83,7 | 3,3 |
| Monocrotophos | 70,3 | 4,2 | 83,9 | 4,2 | 92,4 | 3,2 | 94,5 | 1,1 | 92,3 | 2,2 |
| Monolinuron | 92,2 | 3,4 | 93,2 | 5,3 | 94,5 | 4,0 | 96,3 | 1,9 | 95,1 | 2,4 |
| Myclobutanil | 88,1 | 3,7 | 92,7 | 3,4 | 98,1 | 3,4 | 97,7 | 1,7 | 94,9 | 2,3 |
| Nicosulfuron | 96,1 | 7,3 | 87,0 | 6,5 | 76,5 | 8,2 | 76,8 | 11,3 | 79,1 | 10,2 |
| Nuarimol | 114,3 | 7,0 | 104,6 | 3,9 | 99,1 | 3,1 | 95,9 | 2,0 | 93,2 | 1,0 |
| Omethoate | 56,8 | 29,0 | 117,5 | 8,3 | 90,6 | 5,8 | 72,7 | 13,4 | 79,8 | 8,5 |
| Oxadixyl | 92,8 | 4,6 | 95,5 | 4,4 | 94,7 | 3,7 | 94,8 | 5,0 | 94,3 | 5,1 |
| Oxamyl | 96,0 | 5,9 | 74,4 | 3,5 | 83,6 | 2,2 | 92,1 | 1,9 | 90,8 | 3,8 |
| Paraoxon-ethyl | 17,5 | 19,5 | 34,6 | 11,1 | 24,3 | 13,2 | 58,2 | 2,9 | 72,4 | 4,3 |
| Parathion-methyl | 53,4 | 39,0 | 73,6 | 5,4 | 98,1 | 6,8 | 95,2 | 2,9 | 98,9 | 3,2 |
| Penconazole | 92,6 | 7,4 | 83,7 | 4,6 | 87,8 | 2,5 | 82,3 | 1,1 | 78,9 | 3,3 |
| Pencycuron | 60,3 | 2,3 | 74,7 | 3,5 | 91,9 | 1,9 | 94,4 | 2,2 | 90,8 | 3,3 |
| Pendimethalin | 49,6 | 4,8 | 70,6 | 7,7 | 89,5 | 3,7 | 89,7 | 1,3 | 87,3 | 2,9 |
| Penoxsulam | 101,3 | 5,6 | 102,6 | 6,1 | 102,4 | 5,1 | 103,8 | 7,4 | 102,2 | 5,5 |
| Picoxystrobin | 62,0 | 1,9 | 78,8 | 1,9 | 99,0 | 1,6 | 100,0 | 2,0 | 98,2 | 2,0 |
| Phorate | 59,7 | 12,7 | 114,8 | 16,7 | 101,5 | 14,3 | 99,5 | 8,3 | 86,2 | 7,3 |
| Phosalone | 107,6 | 7,3 | 100,2 | 5,7 | 108,0 | 3,6 | 107,8 | 3,3 | 97,3 | 2,7 |
| Phosmet | 100,7 | 3,2 | 99,4 | 3,7 | 98,9 | 4,3 | 99,0 | 1,7 | 96,2 | 1,7 |
| Piperonyl butoxide | 11,4 | 3,0 | 75,3 | 5,9 | 81,3 | 2,9 | 89,5 | 0,6 | 91,0 | 1,4 |
| Pirimicarb | 22,9 | 55,8 | 89,2 | 19,3 | 82,7 | 16,1 | 77,0 | 17,3 | 84,1 | 17,2 |
| Pirimiphos-ethyl | 46,3 | 3,6 | 70,4 | 8,1 | 84,3 | 2,1 | 87,7 | 1,0 | 85,5 | 2,0 |
| Pirimiphos Methyl | 105,1 | 2,9 | 94,0 | 4,6 | 100,0 | 2,2 | 95,6 | 1,2 | 89,0 | 3,5 |
| Procloraz | 78,6 | 7,6 | 76,7 | 3,1 | 78,4 | 3,0 | 75,7 | 2,6 | 73,8 | 2,7 |
| Procymidone | 61,2 | 2,2 | 78,4 | 4,6 | 97,4 | 1,7 | 100,0 | 1,5 | 98,5 | 1,7 |
| Profenofos | 82,3 | 4,6 | 84,3 | 3,8 | 93,3 | 2,8 | 92,5 | 1,2 | 87,5 | 2,5 |
| Prometryn | 46,8 | 4,7 | 64,1 | 5,6 | 77,7 | 2,4 | 80,4 | 1,1 | 80,4 | 2,2 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|----------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Propanil | 103,0 | 7,9 | 93,2 | 3,9 | 72,4 | 5,5 | 86,5 | 3,0 | 85,6 | 3,1 |
| Propargite | 58,0 | 4,2 | 75,7 | 7,6 | 91,7 | 2,7 | 92,6 | 2,0 | 87,9 | 1,9 |
| Propiconazole | 87,9 | 3,0 | 86,7 | 1,9 | 90,6 | 2,7 | 87,6 | 2,0 | 84,6 | 2,2 |
| Propoxur | 78,6 | 4,2 | 88,3 | 3,2 | 94,5 | 2,0 | 96,5 | 1,5 | 95,3 | 2,9 |
| Propyzamide | 75,0 | 5,1 | 88,5 | 5,5 | 95,8 | 4,4 | 98,9 | 1,4 | 95,0 | 2,5 |
| Prothiofos | 275,6 | 77,3 | 182,3 | 40,4 | 71,5 | 53,0 | 46,6 | 89,8 | 45,5 | 109,3 |
| Pyraclostrobin | 73,3 | 2,9 | 84,4 | 3,3 | 98,0 | 2,5 | 98,6 | 1,4 | 95,5 | 1,8 |
| Pyrazophos | 82,3 | 5,6 | 90,8 | 2,5 | 100,0 | 3,0 | 100,6 | 2,8 | 100,0 | 2,4 |
| Pyrazosulfuron-ethyl | 84,8 | 2,7 | 87,4 | 2,8 | 92,3 | 3,4 | 92,1 | 4,1 | 91,6 | 4,5 |
| Pyridaben | 99,1 | 4,7 | 70,2 | 8,9 | 80,9 | 2,5 | 82,7 | 1,6 | 80,7 | 1,4 |
| Pyridaphenthion | 85,0 | 3,8 | 91,4 | 2,3 | 100,5 | 2,9 | 100,4 | 1,8 | 97,6 | 1,8 |
| Pyridate | 20,8 | 7,7 | 46,9 | 6,4 | 41,5 | 10,5 | 56,2 | 13,0 | 52,8 | 10,8 |
| Pyrimethanil | 95,7 | 4,2 | 84,0 | 6,0 | 80,2 | 4,1 | 78,5 | 3,4 | 77,3 | 4,3 |
| Pyriproxifen | 88,8 | 4,0 | 75,7 | 8,4 | 83,0 | 2,0 | 93,1 | 1,7 | 91,1 | 2,1 |
| Quinalphos | 119,4 | 3,3 | 107,0 | 3,0 | 104,6 | 3,6 | 98,3 | 3,0 | 94,2 | 3,6 |
| Quinclorac | 49,8 | 22,0 | 46,0 | 12,3 | 43,0 | 10,3 | 42,0 | 9,3 | 41,1 | 5,6 |
| Quinoxifen | 88,4 | 6,6 | 80,4 | 8,7 | 70,3 | 2,2 | 72,0 | 2,7 | 70,3 | 2,5 |
| Quizalofop-ethyl | 71,1 | 4,0 | 79,8 | 4,8 | 85,8 | 2,6 | 93,0 | 2,7 | 89,8 | 4,6 |
| Rotenone | 89,7 | 4,9 | 89,8 | 4,3 | 97,6 | 2,5 | 98,6 | 2,3 | 95,1 | 2,6 |
| Saflufenacil | 113,5 | 11,5 | 106,4 | 6,6 | 109,1 | 4,2 | 104,3 | 2,8 | 101,2 | 1,5 |
| Simazine | 112,5 | 10,7 | 97,5 | 6,6 | 97,2 | 3,6 | 91,5 | 1,9 | 90,7 | 2,6 |
| Spinosad A | 12,2 | 13,1 | 22,9 | 9,7 | 32,2 | 4,9 | 34,2 | 4,0 | 35,1 | 11,3 |
| Spinosad D | 37,9 | 12,6 | 33,5 | 9,6 | 33,5 | 5,6 | 31,0 | 3,8 | 31,7 | 12,0 |
| Tebuconazole | 85,4 | 5,0 | 82,4 | 4,1 | 89,3 | 2,4 | 86,1 | 1,5 | 83,3 | 2,8 |
| Tebufenozide | 95,7 | 4,1 | 94,6 | 3,7 | 97,9 | 1,8 | 95,9 | 1,6 | 93,0 | 1,6 |
| Tebufenpyrad | 80,3 | 4,7 | 72,8 | 6,6 | 87,7 | 2,1 | 89,7 | 1,0 | 86,4 | 3,2 |
| Teflubenzuron | 106,0 | 12,6 | 81,6 | 15,8 | 105,0 | 18,8 | 91,8 | 9,9 | 91,8 | 13,7 |
| Terbufos | 52,5 | 4,9 | 61,5 | 112,7 | 36,2 | 123,3 | 96,1 | 5,5 | 87,3 | 3,7 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|--------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Terbutylazine | 97,8 | 1,0 | 72,5 | 2,7 | 79,9 | 2,3 | 86,3 | 0,8 | 84,9 | 1,5 |
| Tetraconazole | 81,7 | 5,1 | 90,2 | 5,1 | 102,0 | 3,5 | 102,9 | 1,4 | 98,7 | 1,9 |
| Tetradifon | 98,4 | 14,7 | 96,9 | 13,2 | 100,5 | 7,6 | 96,0 | 5,0 | 90,3 | 3,0 |
| Thiabendazole | 41,9 | 6,8 | 52,9 | 5,0 | 60,6 | 3,6 | 63,0 | 1,8 | 63,2 | 3,5 |
| Thiacloprid | 80,3 | 6,3 | 86,9 | 3,9 | 91,4 | 2,1 | 94,3 | 5,1 | 95,8 | 3,2 |
| Thiamethoxam | 12,7 | 6,6 | 59,7 | 3,8 | 88,2 | 3,2 | 97,7 | 1,5 | 99,3 | 2,3 |
| Thiobencarb | 109,3 | 3,8 | 95,5 | 7,6 | 102,0 | 1,8 | 98,1 | 1,3 | 89,5 | 3,8 |
| Thiodicarb | 22,8 | 30,2 | 20,5 | 53,9 | 1,0 | 66,2 | 21,6 | 95,3 | 21,8 | 66,5 |
| Thiophanate methyl | 46,5 | 12,4 | 75,0 | 5,3 | 88,9 | 7,6 | 95,3 | 6,6 | 93,0 | 9,8 |
| Tolclofos-methyl | 64,8 | 96,6 | 63,4 | 18,5 | 65,8 | 62,6 | 99,3 | 8,9 | 99,7 | 9,2 |
| Tolyfluanid | 54,1 | 88,8 | 45,5 | 38,4 | 44,7 | 37,1 | 19,2 | 132,0 | 12,4 | 160,4 |
| Triadimefon | 106,7 | 5,5 | 99,5 | 3,0 | 100,4 | 3,7 | 97,5 | 2,0 | 93,9 | 1,9 |
| Triadimenol | 82,4 | 8,7 | 87,5 | 5,1 | 92,1 | 4,1 | 89,0 | 2,4 | 89,3 | 2,1 |
| Trichlorfon | 118,0 | 5,4 | 91,2 | 12,9 | 95,8 | 6,9 | 86,7 | 5,7 | 87,2 | 18,9 |
| Tricyclazole | 71,7 | 4,3 | 71,4 | 6,6 | 76,2 | 6,4 | 75,0 | 3,3 | 75,0 | 5,7 |
| Trifloxysulfuron | 98,6 | 5,3 | 93,7 | 5,6 | 90,5 | 4,0 | 92,4 | 4,6 | 94,9 | 8,1 |
| Trifloxystrobin | 80,8 | 3,8 | 79,0 | 5,0 | 98,1 | 2,5 | 100,0 | 1,0 | 96,1 | 3,2 |
| Triflumizole | 55,0 | 4,2 | 63,1 | 4,8 | 75,3 | 1,8 | 75,4 | 1,5 | 73,2 | 3,6 |
| Triflumuron | 61,3 | 11,5 | 79,0 | 8,3 | 98,2 | 3,2 | 107,0 | 3,8 | 97,8 | 3,0 |
| Triticonazole | 55,6 | 3,5 | 79,5 | 6,0 | 89,4 | 4,9 | 88,2 | 1,8 | 85,3 | 2,0 |
| Vamidotion | 41,9 | 5,7 | 90,0 | 5,0 | 83,1 | 5,7 | 86,8 | 4,2 | 85,4 | 10,3 |
| Zoxamide | 111,4 | 7,7 | 100,4 | 5,7 | 104,4 | 4,2 | 99,7 | 2,7 | 94,3 | 2,0 |
| Atrazine d5 | 87,8 | 7,7 | 87,7 | 4,5 | 91,3 | 3,3 | 91,7 | 2,7 | 89,7 | 1,9 |
| Chlorthiophos | 107,9 | 3,3 | 99,0 | 3,9 | 98,1 | 3,8 | 99,0 | 2,2 | 94,3 | 2,1 |

Fonte: A autora (2022).

A avaliação dos dados de exatidão do método em relação à repetibilidade demonstra resultados adequados para a maioria dos compostos. No nível de fortificação $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram 128 agrotóxicos, no nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram 164 agrotóxicos, no nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ 169 agrotóxicos, no nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ 175 agrotóxicos e no nível mais alto, $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, 176 agrotóxicos apresentaram resultados adequados. Os compostos fenazaquim, fluroxipir, imazalil, mepanipirim, metomil, protiofós, piridate, quincloraque, Espinoside A, Espinoside D, tiabendazol, tiodicarbe e toliifluanida não apresentaram resultados satisfatórios em nenhum nível de fortificação.

Na otimização de um preparo de amostra para análise multirresíduo vários fatores contribuem para a obtenção de resultados satisfatórios, como por exemplo a escolha do solvente que pode influenciar a extração dos analitos da matriz.

Na literatura foram encontrados trabalhos que alcançaram recuperações adequadas para a análise dos compostos protiofós, tiodicarbe, metomil e quincloraque variando o solvente de extração. Fang e colaboradores (2017) avaliaram o uso de dois solventes para a extração de 20 agrotóxicos em amostras de óleos. O uso de acetonitrila permitiu uma recuperação maior comparada com a acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético para a análise de protiofós. Em 2017, Rahman e colaboradores analisaram tiodicarbe e metomil em amostras de produtos alimentícios derivados de animais, incluindo músculo de frango, carne bovina, suína, ovos de mesa e leite empregando como solvente extrator acetonitrila. Viera e colaboradores (2017), desenvolveram um método para a determinação de 72 agrotóxicos em plantas por UHPLC-MS/MS. O preparo de amostra utilizando acetonitrila 5% (v/v) ácido fórmico permitiu a recuperação do composto quincloraque. Esse resultado pode estar associado ao menor pH do extrato ao usar uma maior porcentagem de ácido fórmico, o que promove melhor recuperação para compostos com valores de pKa baixos.

Além disso, o uso de tampões também pode influenciar a recuperação de compostos. Kiljanek e colaboradores (2016) propuseram um método para a determinação de agrotóxicos e metabólitos em amostras de abelhas utilizando como preparo de amostra o método QuEChERS acetato. O tamponamento do extrato foi proposto pelos autores para garantir uma boa recuperação de extração de compostos dependentes de pH. Uma vez que, compostos ácidos ou básicos podem estar na forma neutra ou ionizada, dependendo do pH do extrato e seu valor de pKa. Na etapa de extração, os compostos ionizados têm tendência a permanecer na fase polar aquosa e não em acetonitrila. Nesse trabalho, as amostras de abelhas foram

extraídas com acetonitrila contendo 1% de ácido acético, a partição foi realizada com sulfato de magnésio e acetato de sódio e então submetidas à limpeza por extração em fase sólida dispersiva (dSPE) usando Z-Sep⁺ e PSA. Com o método proposto os autores obtiveram recuperações e RSD adequados para os compostos fenazaquim, fluroxipir, imazalil, mepanipirim, piridato, espinosade A e espinosade D. Os compostos tiabendazol e tolilfluanida também foram analisados a partir da extração com acetonitrila 1% ácido acético e tamponamento com acetato de sódio, conforme relatado por Carneiro e colaboradores (2013).

Dessa forma, dos 189 compostos inicialmente avaliados, 176 apresentaram resultados considerados adequados, de recuperação e RSD%, durante a etapa de validação do método. Além desses parâmetros, o *ion ratio*, também foi avaliado e a faixa de aceitação de $\pm 30\%$ foi atendida por todos os compostos.

4.4.5 Precisão Intermediária

A precisão intermediária (RSD_{pi}) para os agrotóxicos estudados foi realizada empregando-se dias diferentes daqueles dos estudos de repetitividade. Na tabela 14 podem ser visualizados os valores de recuperação e a precisão intermediária avaliada, nas concentrações 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a matriz abelha.

Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação para a maioria dos compostos variaram na faixa de 70 e 120% com RSD menores que 20%. A quantidade de compostos recuperados nos cinco níveis de fortificações avaliados se manteve a o que demonstra a boa precisão do método. Novamente os compostos fenazaquim, fluroxipir, imazalil, mepanipirim, metomil, protiofós, piridate, quincloraque, Espinoside A, Espinoside D, tiabendazol, tiodicarbe e tolilfluanida não apresentaram resultados satisfatórios.

Tabela 14 – Percentuais de recuperação (Rec) e RSD dos agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado, para matriz abelha no ensaio de precisão intermediária

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|----------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| 2,4 D | 71,7 | 13,1 | 98,6 | 13,8 | 76,0 | 14,0 | 86,7 | 6,6 | 71,0 | 6,0 |
| Acefato | 81,7 | 5,7 | 78,8 | 7,3 | 78,9 | 1,7 | 78,7 | 3,4 | 79,2 | 11,8 |
| Acetamiprido | 116,4 | 9,5 | 105,2 | 12,2 | 110,5 | 3,4 | 94,1 | 10,6 | 89,5 | 7,9 |
| Alacloro | 77,6 | 4,9 | 70,1 | 12,5 | 89,0 | 6,1 | 94,4 | 3,7 | 94,6 | 2,3 |
| Ametrina | 59,3 | 2,7 | 72,0 | 12,1 | 79,5 | 2,4 | 80,8 | 3,5 | 79,6 | 1,6 |
| Atrazina | 75,6 | 3,8 | 86,3 | 7,2 | 91,2 | 3,7 | 85,8 | 2,1 | 84,3 | 2,3 |
| Azaconazole | 73,5 | 2,2 | 85,0 | 8,3 | 85,9 | 2,6 | 85,0 | 1,9 | 84,4 | 1,5 |
| Azamethiphos | 33,9 | 12,2 | 63,1 | 12,9 | 56,1 | 14,8 | 79,7 | 3,1 | 83,8 | 2,3 |
| Azinphos Methyl | 128,5 | 9,3 | 116,8 | 9,2 | 108,8 | 5,0 | 101,1 | 3,9 | 97,5 | 2,2 |
| Azinphos-ethyl | 89,1 | 12,8 | 95,4 | 15,4 | 100,7 | 7,8 | 93,6 | 5,3 | 97,6 | 4,3 |
| Azoxystrobin | 70,9 | 2,1 | 88,7 | 8,6 | 99,7 | 1,2 | 102,0 | 1,9 | 102,7 | 2,1 |
| Benalaxil | 71,1 | 4,8 | 79,4 | 10,4 | 93,2 | 3,0 | 94,9 | 4,5 | 93,1 | 2,3 |
| Bitertanol | 103,8 | 7,6 | 92,1 | 8,0 | 94,1 | 4,8 | 85,8 | 5,4 | 85,2 | 2,7 |
| Boscalid | 79,8 | 4,5 | 75,6 | 10,3 | 86,6 | 4,7 | 93,3 | 1,7 | 92,6 | 3,0 |
| Bromuconazole I | 90,0 | 5,9 | 72,2 | 12,3 | 71,0 | 3,0 | 72,5 | 2,4 | 73,0 | 4,1 |
| Bromuconazole II | 90,7 | 7,5 | 88,3 | 16,1 | 93,4 | 4,0 | 89,6 | 4,1 | 88,3 | 2,8 |
| Buprofezin | 72,1 | 3,4 | 78,7 | 9,8 | 82,5 | 1,6 | 81,0 | 4,5 | 79,5 | 1,1 |
| Carbaryl | 72,2 | 6,6 | 81,7 | 11,1 | 73,3 | 7,3 | 83,0 | 2,8 | 85,0 | 3,0 |
| Carbendazim | 25,9 | 10,5 | 27,3 | 11,9 | 54,9 | 4,0 | 71,9 | 11,6 | 70,4 | 3,0 |
| Carbofuran | 65,8 | 3,2 | 77,0 | 13,6 | 100,4 | 5,3 | 90,0 | 7,6 | 89,1 | 4,2 |
| Carbofuran-3-hydroxy | 79,9 | 3,7 | 86,6 | 8,0 | 92,9 | 3,3 | 86,1 | 3,8 | 85,2 | 2,1 |
| Carboxin | 71,0 | 3,0 | 88,8 | 13,5 | 89,3 | 7,6 | 94,8 | 6,5 | 94,6 | 3,0 |
| Cletodim | 104,5 | 9,5 | 99,6 | 9,9 | 92,5 | 4,3 | 93,2 | 3,4 | 93,1 | 4,1 |
| Chlorantraniliprole | 53,1 | 5,6 | 71,4 | 8,2 | 84,1 | 3,2 | 97,8 | 12,7 | 92,5 | 1,9 |
| Chlorfenvinphos | 87,2 | 5,0 | 70,2 | 11,4 | 84,6 | 2,2 | 92,1 | 2,4 | 95,0 | 2,4 |
| Chlorimuron ethyl | 106,1 | 9,0 | 97,5 | 9,4 | 97,9 | 5,9 | 95,9 | 1,1 | 95,8 | 3,2 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Chlorpyrifos-methyl | 163,2 | 56,3 | 55,6 | 62,8 | 53,7 | 63,6 | 84,5 | 17,7 | 76,1 | 12,2 |
| Clofentezine | 100,6 | 11,8 | 116,4 | 10,9 | 119,5 | 4,5 | 103,8 | 6,6 | 94,4 | 4,7 |
| Clomazone | 75,7 | 2,8 | 84,0 | 8,9 | 87,2 | 3,6 | 90,5 | 4,6 | 89,3 | 2,5 |
| Clorpirifos | 143,2 | 63,8 | 96,2 | 15,3 | 119,1 | 7,0 | 90,5 | 10,0 | 86,3 | 8,1 |
| Clothianidin | 102,8 | 8,1 | 101,6 | 13,1 | 93,7 | 14,5 | 92,3 | 7,4 | 82,6 | 8,4 |
| Cyanazine | 107,3 | 8,0 | 97,2 | 10,4 | 101,6 | 2,1 | 92,4 | 2,0 | 94,7 | 1,8 |
| Cyazofamid | 71,2 | 1,6 | 83,6 | 8,0 | 95,7 | 1,6 | 97,1 | 1,6 | 96,7 | 2,1 |
| Cymoxanil | 18,0 | 8,4 | 81,7 | 14,6 | 74,9 | 7,9 | 82,6 | 4,4 | 89,5 | 7,1 |
| Cyproconazole I | 71,4 | 3,1 | 72,2 | 11,3 | 87,2 | 6,9 | 89,3 | 4,5 | 94,2 | 5,1 |
| Cyproconazole II | 71,1 | 8,2 | 81,2 | 11,2 | 83,3 | 4,1 | 83,6 | 4,9 | 85,6 | 3,2 |
| Cyprodinil | 46,2 | 6,2 | 73,3 | 11,5 | 80,0 | 3,4 | 70,1 | 4,3 | 70,6 | 1,9 |
| Demeton-S-methyl-sulfon | 98,4 | 1,8 | 96,7 | 14,9 | 101,9 | 2,9 | 96,1 | 2,3 | 94,1 | 2,5 |
| Diazinon | 24,0 | 5,4 | 79,4 | 12,1 | 74,8 | 10,0 | 86,1 | 10,4 | 83,0 | 10,2 |
| Diclotophos | 59,3 | 2,9 | 75,8 | 9,4 | 85,3 | 2,8 | 84,8 | 2,5 | 85,1 | 1,7 |
| Diclosulam | 107,0 | 4,5 | 100,1 | 10,1 | 107,3 | 1,8 | 101,2 | 3,3 | 100,4 | 2,5 |
| Difenconazole I | 79,8 | 3,1 | 70,6 | 10,5 | 82,2 | 1,8 | 84,7 | 4,6 | 85,9 | 2,0 |
| Diflubenzuron | 85,3 | 18,1 | 85,5 | 14,5 | 94,8 | 7,7 | 94,9 | 2,9 | 91,5 | 4,6 |
| Dimethoate | 80,4 | 3,6 | 88,4 | 11,2 | 97,8 | 5,1 | 93,9 | 3,4 | 91,7 | 3,2 |
| Dimethomorph | 85,0 | 3,1 | 94,2 | 8,6 | 96,7 | 2,6 | 95,2 | 1,5 | 95,0 | 2,8 |
| Dimethomorph E | 93,8 | 7,3 | 95,8 | 6,0 | 98,2 | 3,2 | 95,1 | 2,6 | 95,0 | 1,8 |
| Dimethomorph Z | 91,3 | 7,6 | 95,5 | 11,7 | 97,1 | 2,5 | 95,2 | 3,2 | 95,2 | 3,0 |
| Dimoxystrobin | 74,2 | 2,8 | 82,8 | 9,5 | 95,6 | 2,2 | 97,8 | 3,2 | 97,8 | 1,3 |
| Diniconazole | 73,4 | 5,1 | 74,0 | 11,8 | 78,7 | 2,4 | 81,1 | 3,9 | 80,5 | 2,1 |
| Diuron | 96,8 | 1,2 | 90,3 | 9,6 | 88,2 | 4,5 | 87,0 | 4,0 | 86,0 | 1,0 |
| EPN | 117,5 | 49,4 | 73,3 | 107,2 | 127,1 | 8,7 | 105,5 | 11,2 | 88,7 | 4,8 |
| Epoxiconazole | 75,6 | 10,1 | 88,8 | 8,9 | 96,2 | 4,3 | 91,9 | 2,5 | 90,5 | 2,7 |
| Ethephon | 84,9 | 4,1 | 90,3 | 8,5 | 99,2 | 2,6 | 98,8 | 4,5 | 97,5 | 1,5 |
| Ethiofencarb | 61,6 | 3,3 | 84,7 | 9,4 | 83,0 | 3,0 | 92,9 | 2,9 | 92,9 | 3,0 |
| Ethofenprox | 97,4 | 11,8 | 93,8 | 19,2 | 97,9 | 14,9 | 78,8 | 9,9 | 71,1 | 5,1 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|-------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Ethoprophos | 38,1 | 3,3 | 70,8 | 12,8 | 82,6 | 2,9 | 89,8 | 3,0 | 90,1 | 1,9 |
| Ethoxysulfuron | 78,9 | 9,2 | 89,9 | 7,1 | 84,8 | 8,5 | 89,0 | 1,4 | 89,1 | 4,2 |
| Famoxadone | 27,9 | 22,4 | 78,7 | 13,4 | 89,4 | 19,4 | 93,0 | 9,5 | 94,7 | 7,6 |
| Fenamidone | 100,7 | 2,5 | 99,4 | 10,9 | 103,3 | 3,1 | 99,1 | 2,9 | 97,9 | 2,9 |
| Fenamiphos | 70,2 | 3,2 | 81,0 | 10,3 | 91,1 | 1,3 | 89,6 | 4,3 | 90,5 | 3,0 |
| Fenarimol | 41,4 | 23,4 | 74,8 | 13,0 | 92,9 | 10,0 | 84,7 | 4,9 | 88,9 | 4,0 |
| Fenazaquin | 60,8 | 11,1 | 50,1 | 14,6 | 47,0 | 3,9 | 46,6 | 5,3 | 44,0 | 2,6 |
| Fenbuconalozé | 81,0 | 6,0 | 85,1 | 11,5 | 88,5 | 2,5 | 89,0 | 5,4 | 91,8 | 2,2 |
| Fenhexamid | 62,6 | 9,9 | 81,0 | 11,9 | 90,1 | 4,3 | 91,4 | 5,8 | 88,3 | 5,2 |
| Fenoxycarb | 87,3 | 1,7 | 71,2 | 11,4 | 85,3 | 3,6 | 87,8 | 5,5 | 87,6 | 5,6 |
| Fenpropathrin | 140,4 | 51,0 | 111,7 | 11,4 | 101,9 | 9,6 | 83,1 | 8,7 | 83,0 | 5,7 |
| Fenpyroximat | 103,0 | 9,1 | 89,2 | 10,1 | 82,3 | 1,5 | 80,0 | 6,4 | 78,2 | 3,5 |
| Fenthion | 90,9 | 8,2 | 93,5 | 19,6 | 119,1 | 6,3 | 104,1 | 6,8 | 99,5 | 5,4 |
| Fipronil | 74,8 | 4,4 | 89,7 | 7,9 | 71,8 | 3,7 | 96,0 | 11,0 | 101,0 | 4,1 |
| Fluazafop-P-butyl | 58,3 | 5,7 | 75,7 | 9,1 | 86,5 | 1,8 | 93,4 | 6,5 | 94,5 | 2,5 |
| Flupicolid | 70,5 | 2,8 | 82,4 | 8,7 | 94,6 | 2,8 | 97,6 | 3,7 | 97,2 | 1,9 |
| Fluquinconazole | 72,2 | 5,6 | 81,1 | 13,4 | 93,9 | 4,2 | 93,4 | 4,4 | 94,0 | 2,9 |
| Fluroxypyr | 173,1 | 27,3 | 485,6 | 16,3 | 48,8 | 50,7 | 20,3 | 34,5 | 51,4 | 39,8 |
| Flusilazole | 70,8 | 3,1 | 79,7 | 11,1 | 88,2 | 2,9 | 89,0 | 4,5 | 90,5 | 2,6 |
| Flutolanil | 72,5 | 2,8 | 80,7 | 8,2 | 95,6 | 2,7 | 98,8 | 3,1 | 97,0 | 1,4 |
| Flutriafol | 88,3 | 2,5 | 90,1 | 4,6 | 97,2 | 2,4 | 94,0 | 2,7 | 93,8 | 2,3 |
| Furathiocarb | 39,0 | 23,0 | 76,4 | 7,9 | 76,8 | 11,8 | 73,6 | 9,0 | 81,6 | 4,9 |
| Hexythiazox | 119,2 | 4,6 | 92,8 | 10,3 | 87,0 | 6,3 | 84,6 | 6,2 | 80,4 | 3,2 |
| Imazalil | 67,0 | 7,6 | 63,3 | 18,5 | 62,8 | 7,7 | 57,7 | 3,6 | 57,9 | 7,0 |
| Imazamox | 99,6 | 4,4 | 79,3 | 11,5 | 89,5 | 2,3 | 91,8 | 4,1 | 90,5 | 1,0 |
| Imazapic | 89,5 | 8,3 | 74,2 | 13,2 | 74,0 | 4,6 | 75,5 | 5,3 | 77,0 | 2,5 |
| Imazapyr | 44,9 | 6,5 | 64,1 | 12,5 | 79,3 | 4,1 | 77,9 | 6,0 | 72,2 | 2,0 |
| Imazaquin | 75,9 | 7,9 | 82,3 | 9,6 | 85,5 | 4,9 | 82,5 | 4,0 | 84,6 | 1,7 |
| Imazethapyr | 99,9 | 3,0 | 87,4 | 10,9 | 84,1 | 2,5 | 73,7 | 3,0 | 75,1 | 2,2 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|----------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Imidacloprid | 79,7 | 7,1 | 75,4 | 10,9 | 80,7 | 12,3 | 80,8 | 5,3 | 76,7 | 4,9 |
| Indoxacarb | 105,8 | 5,9 | 99,4 | 8,8 | 104,2 | 5,4 | 101,6 | 4,3 | 99,4 | 2,1 |
| Iprodione | 53,9 | 17,1 | 93,4 | 12,0 | 92,0 | 11,3 | 95,1 | 17,0 | 93,0 | 5,5 |
| Iprovalicarb I | 60,8 | 0,4 | 85,4 | 8,0 | 95,0 | 2,5 | 97,0 | 2,6 | 96,4 | 1,7 |
| Iprovalicarb II | 56,8 | 2,9 | 80,4 | 8,0 | 92,7 | 2,1 | 96,8 | 3,0 | 96,7 | 1,9 |
| Kresoxim-methyl | 59,1 | 25,5 | 98,1 | 14,4 | 100,5 | 7,7 | 99,4 | 5,6 | 96,4 | 4,1 |
| Linuron | 80,0 | 1,5 | 77,5 | 10,7 | 85,1 | 2,9 | 90,9 | 2,8 | 91,2 | 2,3 |
| Malathion | 70,5 | 2,4 | 80,7 | 5,8 | 94,1 | 2,3 | 98,9 | 2,4 | 97,0 | 2,9 |
| Mecarbam | 81,1 | 15,8 | 104,6 | 17,1 | 80,0 | 10,4 | 90,5 | 11,8 | 93,9 | 6,4 |
| Metaflumizone | 83,8 | 4,6 | 18,5 | 8,8 | 76,1 | 3,0 | 77,6 | 6,9 | 83,0 | 4,1 |
| Mepanipyrim | 166,4 | 91,2 | 181,1 | 83,5 | 52,5 | 67,4 | 110,5 | 56,2 | 106,4 | 33,9 |
| Mephosfolan | 72,6 | 4,0 | 84,2 | 9,6 | 92,0 | 2,8 | 91,2 | 1,7 | 91,7 | 1,3 |
| Mepronil | 43,2 | 3,9 | 72,3 | 8,1 | 90,1 | 3,3 | 96,5 | 3,5 | 96,4 | 2,3 |
| Metalaxyl | 84,9 | 3,0 | 92,8 | 9,5 | 97,7 | 2,1 | 95,5 | 2,3 | 93,6 | 2,1 |
| Metconazole | 72,5 | 4,6 | 73,1 | 11,5 | 80,3 | 4,2 | 81,3 | 4,0 | 82,0 | 2,4 |
| Methamidophos | 72,5 | 8,7 | 73,1 | 7,1 | 72,4 | 2,1 | 87,2 | 2,7 | 82,6 | 3,3 |
| Methidathion | 105,1 | 5,0 | 104,8 | 8,8 | 100,6 | 3,4 | 97,4 | 4,5 | 92,1 | 2,2 |
| Methiocarb | 82,3 | 4,9 | 79,4 | 9,7 | 77,4 | 4,1 | 89,3 | 2,9 | 89,9 | 2,3 |
| Methiocarb sulfone | 88,0 | 10,0 | 87,0 | 5,3 | 95,1 | 2,2 | 87,7 | 3,2 | 89,4 | 3,3 |
| Methiocarb sulfoxide | 119,7 | 8,0 | 99,2 | 11,7 | 89,3 | 8,4 | 83,9 | 6,2 | 77,8 | 7,7 |
| Methomyl | 37,4 | 5,1 | 65,9 | 13,3 | 62,2 | 9,5 | 140,2 | 9,8 | 132,5 | 4,8 |
| Methoxyfenozide | 74,6 | 2,1 | 78,7 | 8,7 | 94,8 | 3,0 | 99,8 | 3,6 | 99,3 | 2,8 |
| Metolachlor | 81,5 | 5,1 | 72,2 | 11,0 | 80,9 | 3,9 | 81,1 | 7,5 | 84,1 | 2,4 |
| Metribuzin | 82,1 | 10,0 | 70,9 | 7,9 | 77,1 | 9,8 | 70,5 | 5,0 | 73,5 | 4,4 |
| Metsulfuron methyl | 97,2 | 3,7 | 99,2 | 6,5 | 100,3 | 2,4 | 98,8 | 2,8 | 99,9 | 4,5 |
| Mevinphos I | 81,1 | 7,3 | 88,5 | 6,6 | 91,2 | 3,2 | 89,2 | 2,3 | 87,5 | 2,2 |
| Mevinphos II | 85,1 | 10,5 | 82,2 | 8,6 | 93,6 | 3,5 | 89,3 | 3,6 | 85,9 | 3,2 |
| Molinate | 80,5 | 14,0 | 86,4 | 11,5 | 84,9 | 2,5 | 83,3 | 3,2 | 81,3 | 2,6 |
| Monocrotophos | 80,3 | 3,0 | 84,8 | 7,1 | 91,3 | 4,1 | 90,7 | 3,7 | 91,4 | 1,8 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|--------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Monolinuron | 70,5 | 1,9 | 83,1 | 9,9 | 91,3 | 3,2 | 90,5 | 3,6 | 91,2 | 1,8 |
| Myclobutanil | 82,1 | 3,0 | 88,3 | 8,4 | 96,7 | 3,0 | 95,2 | 3,1 | 94,1 | 2,0 |
| Nicosulfuron | 73,5 | 5,8 | 80,3 | 7,7 | 78,4 | 8,7 | 78,8 | 2,9 | 83,1 | 2,9 |
| Nuarimol | 104,5 | 2,4 | 94,8 | 7,4 | 95,4 | 3,1 | 91,7 | 3,1 | 90,4 | 3,0 |
| Omethoate | 50,3 | 18,7 | 103,2 | 6,1 | 84,3 | 14,8 | 85,1 | 5,0 | 79,5 | 6,8 |
| Oxadixyl | 81,5 | 4,5 | 89,0 | 2,8 | 94,9 | 4,9 | 84,1 | 3,1 | 76,9 | 2,0 |
| Oxamyl | 71,4 | 3,9 | 89,5 | 9,5 | 89,4 | 2,1 | 97,3 | 1,5 | 95,9 | 1,6 |
| Paraoxon-ethyl | 8,6 | 17,3 | 38,6 | 15,1 | 24,3 | 23,1 | 64,8 | 4,3 | 74,2 | 2,6 |
| Parathion-methyl | 135,5 | 14,2 | 101,4 | 9,4 | 103,8 | 5,3 | 95,6 | 6,8 | 92,9 | 2,5 |
| Penconazole | 97,5 | 5,8 | 99,7 | 9,3 | 73,7 | 2,6 | 76,2 | 2,9 | 77,4 | 2,2 |
| Pencycuron | 44,2 | 3,7 | 72,1 | 9,1 | 89,4 | 2,6 | 93,2 | 1,7 | 94,2 | 1,6 |
| Pendimethalin | 34,0 | 9,3 | 110,6 | 13,7 | 98,3 | 3,8 | 88,1 | 3,9 | 83,7 | 4,0 |
| Penoxsulam | 94,5 | 6,7 | 115,5 | 5,7 | 111,5 | 2,2 | 102,2 | 3,3 | 100,4 | 6,3 |
| Picoxystrobin | 66,6 | 2,1 | 89,2 | 9,9 | 98,5 | 2,7 | 102,2 | 2,9 | 102,5 | 1,6 |
| Phorate | 66,5 | 30,5 | 73,2 | 10,2 | 85,8 | 10,5 | 92,9 | 7,7 | 90,0 | 4,7 |
| Phosalone | 94,4 | 4,8 | 70,4 | 12,2 | 93,0 | 5,3 | 97,6 | 4,0 | 98,3 | 4,1 |
| Phosmet | 80,1 | 4,8 | 90,1 | 7,7 | 97,0 | 1,8 | 95,7 | 3,5 | 95,9 | 2,5 |
| Piperonyl butoxide | 56,7 | 5,1 | 74,8 | 9,9 | 87,6 | 2,2 | 90,6 | 4,8 | 89,7 | 1,5 |
| Pirimicarb | 42,9 | 60,1 | 84,2 | 12,6 | 81,9 | 16,0 | 73,3 | 10,4 | 83,6 | 12,4 |
| Pirimiphos-ethyl | 43,1 | 6,3 | 93,5 | 10,5 | 91,6 | 3,0 | 85,3 | 4,7 | 83,9 | 2,2 |
| Pirimiphos Methyl | 92,9 | 3,9 | 70,2 | 9,5 | 87,2 | 2,7 | 90,5 | 3,9 | 90,1 | 2,0 |
| Procloraz | 85,0 | 4,3 | 85,4 | 11,6 | 70,0 | 4,1 | 70,7 | 3,9 | 74,3 | 2,7 |
| Procymidone | 62,0 | 2,0 | 86,9 | 10,3 | 96,1 | 2,0 | 101,4 | 3,2 | 102,2 | 2,2 |
| Profenofos | 86,2 | 6,6 | 85,6 | 8,1 | 87,2 | 3,2 | 85,7 | 3,0 | 84,9 | 1,7 |
| Prometryn | 56,8 | 3,5 | 69,2 | 10,7 | 77,8 | 2,0 | 79,8 | 3,3 | 79,7 | 1,1 |
| Propanil | 103,0 | 7,5 | 90,3 | 10,3 | 74,1 | 7,6 | 83,4 | 4,8 | 83,7 | 2,3 |
| Propargite | 60,1 | 5,1 | 119,9 | 10,8 | 108,3 | 3,6 | 93,9 | 4,3 | 87,4 | 2,7 |
| Propiconazole | 88,2 | 2,9 | 71,0 | 7,4 | 84,2 | 3,0 | 83,6 | 3,4 | 83,2 | 2,4 |
| Propoxur | 76,9 | 4,7 | 91,3 | 8,4 | 99,5 | 3,0 | 95,1 | 3,6 | 93,0 | 2,8 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|----------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Propyzamide | 80,2 | 3,5 | 89,9 | 10,3 | 95,0 | 2,9 | 95,9 | 3,9 | 93,8 | 2,2 |
| Prothiofos | 276,4 | 80,4 | 129,5 | 81,7 | 85,7 | 126,9 | 34,7 | 143,1 | 22,8 | 151,4 |
| Pyraclostrobin | 99,4 | 3,0 | 78,3 | 9,2 | 92,8 | 2,0 | 96,1 | 2,9 | 97,1 | 2,0 |
| Pyrazophos | 94,0 | 4,2 | 94,0 | 8,6 | 99,7 | 2,6 | 97,3 | 3,8 | 97,9 | 4,2 |
| Pyrazosulfuron-ethyl | 117,8 | 3,7 | 108,4 | 7,6 | 104,9 | 3,5 | 99,6 | 0,8 | 98,2 | 2,2 |
| Pyridaben | 119,8 | 9,5 | 95,5 | 11,0 | 85,7 | 2,3 | 81,1 | 6,1 | 78,5 | 3,7 |
| Pyridaphenthion | 70,2 | 2,5 | 85,3 | 7,8 | 95,6 | 2,7 | 98,0 | 2,3 | 98,0 | 3,0 |
| Pyridate | 57,8 | 24,3 | 55,7 | 13,1 | 50,7 | 13,6 | 55,3 | 10,5 | 55,4 | 11,3 |
| Pyrimethanil | 91,4 | 2,4 | 84,4 | 10,5 | 78,1 | 2,2 | 75,7 | 3,5 | 72,3 | 2,8 |
| Pyriproxifen | 82,5 | 7,2 | 81,2 | 10,4 | 86,7 | 2,7 | 88,0 | 6,0 | 86,3 | 3,6 |
| Quinalphos | 99,6 | 6,0 | 95,7 | 8,8 | 98,5 | 3,4 | 93,9 | 4,2 | 92,6 | 3,0 |
| Quinclorac | 56,4 | 18,6 | 60,3 | 19,9 | 51,8 | 16,4 | 35,3 | 11,4 | 35,3 | 10,0 |
| Quinoxifen | 105,2 | 8,7 | 84,3 | 15,1 | 77,1 | 2,5 | 70,8 | 4,3 | 98,0 | 1,8 |
| Quizalofop-ethyl | 103,0 | 6,0 | 96,6 | 9,3 | 90,5 | 2,6 | 91,5 | 4,7 | 90,9 | 2,7 |
| Rotenone | 87,3 | 4,2 | 78,0 | 10,5 | 90,2 | 2,0 | 94,8 | 3,5 | 98,6 | 2,8 |
| Saflufenacil | 114,0 | 5,3 | 107,5 | 3,3 | 110,1 | 4,8 | 103,1 | 4,0 | 98,0 | 2,7 |
| Simazine | 105,3 | 14,1 | 90,6 | 7,5 | 89,1 | 6,3 | 82,0 | 3,0 | 79,7 | 3,3 |
| Spinosad A | 7,1 | 8,7 | 23,1 | 24,5 | 31,5 | 11,4 | 31,7 | 7,1 | 35,7 | 8,4 |
| Spinosad D | 36,6 | 7,3 | 33,0 | 26,0 | 32,4 | 14,6 | 29,7 | 7,0 | 32,5 | 9,8 |
| Tebuconazole | 71,1 | 2,5 | 77,9 | 11,2 | 85,6 | 1,5 | 82,8 | 3,4 | 84,1 | 2,6 |
| Tebufenozide | 80,1 | 3,8 | 91,7 | 10,4 | 100,8 | 1,3 | 99,2 | 3,3 | 98,9 | 2,7 |
| Tebufenpyrad | 102,2 | 6,3 | 91,5 | 11,6 | 89,4 | 3,6 | 86,8 | 5,3 | 84,8 | 2,6 |
| Teflubenzuron | 103,0 | 7,5 | 117,3 | 12,7 | 105,2 | 19,6 | 86,7 | 17,4 | 87,2 | 14,6 |
| Terbufos | 51,2 | 41,1 | 206,1 | 16,9 | 138,2 | 13,1 | 100,2 | 9,2 | 88,6 | 7,4 |
| Terbutylazine | 87,0 | 2,8 | 70,5 | 5,4 | 78,0 | 2,2 | 82,9 | 2,4 | 83,8 | 2,6 |
| Tetraconazole | 70,0 | 9,1 | 79,2 | 4,9 | 86,3 | 5,5 | 97,4 | 4,4 | 97,1 | 4,0 |
| Tetradifon | 100,7 | 10,4 | 88,8 | 10,1 | 99,7 | 6,4 | 94,5 | 6,7 | 91,4 | 5,4 |
| Thiabendazole | 59,8 | 5,3 | 56,4 | 15,4 | 58,7 | 2,8 | 55,7 | 3,5 | 55,0 | 4,1 |
| Thiacloprid | 111,0 | 9,3 | 84,9 | 7,0 | 82,4 | 4,9 | 73,9 | 5,3 | 74,2 | 1,6 |

| Compostos | Nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|--------------------|---|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|--------|
| | 5 | | 10 | | 20 | | 50 | | 100 | |
| | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) | Rec. (%) | RSD(%) |
| Thiamethoxam | 40,1 | 5,8 | 66,8 | 13,9 | 83,5 | 6,2 | 85,9 | 4,4 | 83,2 | 4,5 |
| Thiobencarb | 84,3 | 10,7 | 72,3 | 10,8 | 81,7 | 3,6 | 87,6 | 5,1 | 89,6 | 2,3 |
| Thiodicarb | 14,9 | 39,3 | 30,3 | 30,7 | 4,8 | 83,6 | 25,1 | 49,8 | 36,8 | 26,7 |
| Thiophanate methyl | 64,6 | 8,7 | 83,1 | 9,0 | 88,0 | 4,5 | 92,7 | 6,3 | 93,6 | 3,2 |
| Tolclofos-methyl | 29,3 | 59,9 | 15,1 | 14,7 | 36,7 | 95,0 | 83,5 | 18,4 | 90,6 | 6,7 |
| Tolyfluanid | 53,9 | 44,1 | 27,7 | 44,5 | 19,0 | 73,0 | 5,6 | 82,2 | 3,7 | 132,1 |
| Triadimefon | 98,2 | 6,0 | 98,8 | 6,4 | 100,5 | 2,6 | 97,3 | 3,5 | 93,9 | 3,1 |
| Triadimenol | 102,8 | 6,0 | 99,8 | 14,2 | 99,1 | 6,1 | 92,7 | 3,4 | 88,7 | 2,5 |
| Trichlorfon | 119,4 | 15,5 | 119,2 | 9,3 | 94,7 | 14,8 | 81,5 | 10,6 | 75,7 | 8,5 |
| Tricyclazole | 97,5 | 3,7 | 86,8 | 6,8 | 84,9 | 3,7 | 72,1 | 3,8 | 72,2 | 5,1 |
| Trifloxysulfuron | 96,9 | 6,9 | 101,6 | 8,1 | 97,8 | 3,4 | 97,7 | 4,0 | 97,3 | 4,9 |
| Trifloxystrobin | 83,6 | 4,9 | 90,4 | 9,8 | 100,0 | 2,3 | 100,6 | 3,9 | 99,0 | 1,5 |
| Triflumizole | 37,4 | 3,1 | 56,0 | 8,3 | 70,4 | 2,3 | 73,0 | 2,8 | 73,3 | 1,6 |
| Triflumuron | 37,0 | 6,5 | 79,8 | 12,9 | 85,2 | 6,7 | 96,0 | 6,0 | 98,4 | 4,1 |
| Triticonazole | 52,8 | 14,5 | 80,3 | 13,3 | 85,4 | 2,1 | 83,9 | 4,3 | 84,3 | 2,7 |
| Vamidotion | 59,6 | 4,9 | 80,4 | 11,2 | 79,2 | 8,8 | 75,7 | 5,3 | 70,9 | 3,6 |
| Zoxamide | 70,7 | 3,3 | 76,7 | 9,6 | 92,3 | 2,5 | 95,8 | 4,4 | 95,7 | 2,4 |
| Atrazine d5 | 82,0 | 5,9 | 81,0 | 13,7 | 87,8 | 4,1 | 87,5 | 3,7 | 87,4 | 1,9 |
| Chlorthiophos | 103,1 | 3,3 | 72,5 | 11,0 | 83,7 | 2,9 | 93,0 | 3,7 | 94,4 | 2,0 |

Fonte: A autora (2022).

4.4.6 Determinação dos valores de LOD e LOQ do método

A Tabela 15 apresenta os valores obtidos de LOD e LOQ do método para os agrotóxicos determinados na matriz abelha.

Tabela 15 - Valores de LOD e LOQ do método para cada agrotóxico estudado

| Compostos analisados | LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| 2,4 D, acefato, acetamiprido, alacloro, atrazina, azaconazole, azinfós-etil, azoxistrobia, benalaxil, bitertanol, boscalida, bromocunazole, buprofezina, carbaril, carbofuran-3-OH, carboxina, cletodim, clorfenvinfós, clorimurum etil, clofentizina, clomazona, clotianidina, cianazina, ciazofamida, ciproconazol, demeton-S-metil-sulfon, diclosulam, difenconazol, diflubenzurum, dimetoato, dimetomorfe, dimetomorfe E, dimetomorfe Z, dimoxistrobina, diniconazol, diuron, epoxiconazol, etefom, etofenprox, etoxisulfuran, fenamidona, fenamifós, fenbuconazol, fenoxicarbe, fenpiroximate, fentiona, fipronil, flupicolid, Fluquinconazole, Flusilazole, Flutolanil, Flutriafol, Hexythiazox, Imazamox, Imazapic, Imazaquin, Imazethapyr, Imidacloprid, Indoxacarb, Linuron, Malathion, Mecarbam, Mephosfolan, Metalaxyl, Metconazole, Methamidophos, Methidathion, Methiocarb, Methiocarb sulfone, Methiocarb sulfoxide, Methoxyfenozide, Metolachlor, Metribuzin, Metsulfuron methyl, Mevinphos, Molinate, Monocrotophos, Monolinuron, Myclobutanil, Nicosulfuron, Nuarimol, Oxadixyl, Oxamyl, Penconazole, Penoxsulam, Phosalone, Phosmet, Pirimiphos Methyl, Procloraz, Profenofos, Propanil, Propiconazole, Propoxur, Propyzamide, Pyraclostrobin, Pyrazophos, Pyrazosulfuron-ethyl, Pyridaben, Pyridaphenthion, Pyrimethanil, Pyriproxifen, Quinalphos, Quinoxifen, Quizalofop-ethyl, Rotenone, Saflufenacil, Simazine, Tebuconazole, Tebufenozide, Tebufenpyrad, Teflubenzuron, Terbutylazine, Tetraconazole, Tetradifon, Thiacloprid, Thiobencarb, Triadimefon, Triadimenol, Trichlorfon, Tricyclazole, Trifloxysulfuron, Trifloxystrobin, Zoxamide e Chlorthiophos | 1,50 | 5 |
| Ametrina, azinfós metílico, carbofurano, clorantraniliprol, clorpirifós, cimoxanil, ciprodinil, diazinona, dicrotofós, etiofencarbe, etoprofós, famoxadona, fenarimol, fenhexamide, fenpropatrina, fluazafop-Pbutílico, furatiocarbe, iprodiona, Iprovalicarbe, cresoxim-metílico, mepronil, ometoato, paratiom-metílico, pencicurona, pendimetalina, picoxistrobina, phorate, piperonil butoxide, pirimicarbe, pirimifós-etil, procimmidona, porpargito, tiofanato-metílico, triflumuron, triticonazol e vamidationa. | 3 | 10 |
| Imazapir, metaflumizone, prometrina, tiametoxam e triflumizol | 6 | 20 |
| Azamethiphos, carbendazim, clorpirifos metílico, EPN, terbufos e tolclofos-metil | 15 | 50 |
| Paraoxon-ethyl | 30 | 100 |

Neste estudo a faixa de LOQm foi de 5 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto de LODm de 1,5 a 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Estes valores são considerados satisfatórios, pois com os limites de quantificação alcançados é possível atingir os valores máximos permitidos para os agrotóxicos em mel e produtos apícolas, estabelecidos pela legislação.

4.4.7 Aplicação do método

A análise das amostras foi realizada com a adição de padrão de controle (atrazina deuterada) na concentração de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e todos os resultados de exatidão e precisão foram satisfatórios (recuperação de 70 a 120%, com RSD <20%). O método proposto foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em 16 amostras de abelhas. A Tabela 16 apresenta os resultados das análises das amostras de abelha. Cabe ressaltar que a razão entre os íons de identificação e quantificação encontrados na amostra estão dentro da variação aceitável da razão entre os íons.

Tabela 16 – Resultados da análise de amostras reais.

| Código | Localidade | Compostos | | | | | | | | |
|---|------------------------|-----------|-------------|----------|--------------|---------------|------------|-------------|----------|---------------|
| | | Fipronil | Carbendazim | Atrazina | Clotianidina | Imidacloprido | Tiametoxam | Carbofurano | Oxadixil | Azoxistrobina |
| Concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | | | | | | | | | |
| A1 | Frederico Westphalen | 30 | 50 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A2 | Porto Alegre | 40 | 50 | 30 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A3 | Santana do Livramento | 0,03 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A4 | Harmonia | 4180 | n.d | n.d | 30 | 22500 | <LOQ | n.d | n.d | n.d |
| A5 | São Pedro do Butiá | 910 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A6 | Marcelino Ramos | 210 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A7 | Porto Alegre | 1180 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A8 | Coronel Pilar | 10 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A9 | São Francisco de Assis | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | <LOQ | 20 | n.d |
| A10 | Júlio de Castilho | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | 10 |
| A11 | Antônio Prado | 40 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A12 | Pontão | 30 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A13 | Santiago | 10 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A14 | Santiago | 20 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A15 | Flores da Cunha | 20 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| A16 | Antônio Prado | 30 | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| Dose letal (LD ₅₀) oral ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | | 10 | | | 40 | 130 | | | | 250.000 |

Fonte: A autora (2022); BAYO & GOKA (2016).

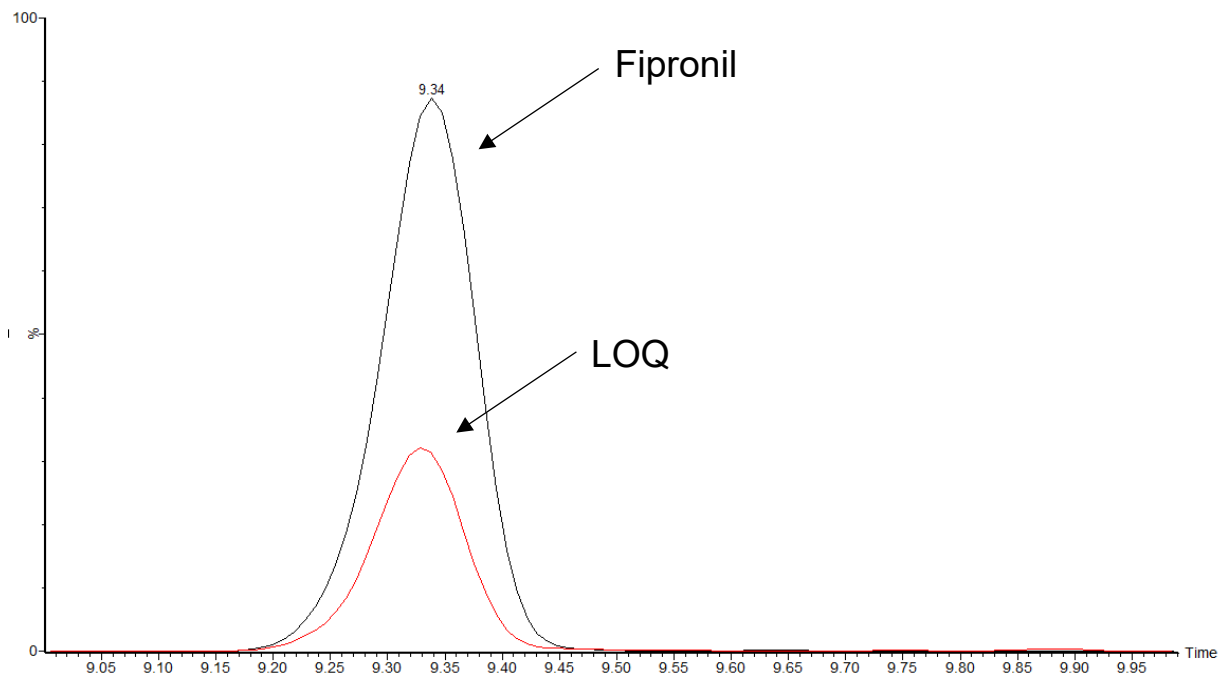
Conforme a Tabela 17, todas as amostras analisadas apresentaram pelo menos um resíduo de agrotóxico. O composto fipronil estava presente em 87% das amostras analisadas. Além dele foi possível observar resíduos de carbendazim, atrazina, clotianidina, imidacloprido, tiametoxam, carbofurano, oxadixil e azoxistrobina. Dos nove agrotóxicos encontrados, 4 são da classe de inseticidas, 4 fungicidas e 1 herbicida.

É evidente que a toxicidade oral de alguns agrotóxicos para as abelhas, medida pela dose letal mediana (LD_{50}) a qual corresponde à dose necessária da substância para matar 50% de uma população, é bem abaixo das concentrações encontradas na grande maioria das amostras analisadas, especialmente para os inseticidas fipronil e imidacloprido.

Hrynko, Kaczyński e Łozowicka (2021) compilaram os resultados de análises de resíduos de agrotóxicos em 1.369 amostras de abelhas publicados no período de 2010 e 2020. Foram relatados a detecção de 155 compostos de diferentes classes químicas, sendo que 55,6% dos compostos pertencem a classe dos inseticidas.

A Figura 20 apresenta o cromatograma comparativo do sinal analítico obtido por UHPLC-MS/MS para a amostra de abelha A1 contendo o inseticida fipronil e o LOQ deste analito para o método desenvolvido.

Figura 20 – Cromatograma UHPLC-MS/MS comparativo entre a amostra A1 contendo resíduos de fipronil ($30 \mu\text{g kg}^{-1}$) e o correspondente LOQ ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$)



Fonte: A autora (2022).

5 CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu em otimizar o método mini-QuEChERS para a determinação de uma gama de agrotóxicos em abelhas (*Apis mellifera*). Foram avaliadas maneiras de processamentos da amostra, as versões do método QuEChERS bem como diferentes sorventes a serem utilizados na etapa de limpeza (*clean-up*). Os resultados demonstraram que o mini-QuEChERS utilizando acetonitrila 1% ácido fórmico, sais de partição sulfato de magnésio e cloreto de sódio com etapa de limpeza (d-SPE) com os sorventes C18 e PSA foi o mais adequado, considerando que recuperou o maior número de compostos. As condições do sistema de análise UHPLC-MS/MS proporcionou a determinação simultânea dos agrotóxicos com seletividade e detectabilidade.

O método proposto neste trabalho foi validado, de acordo com os parâmetros do Guia de Validação da SANTE (2019). Todos os analitos deste estudo atingiram limites de quantificação que atendem aos LMRs estabelecidos pela legislação. Foram encontrados resíduos de agrotóxicos nas 16 amostras analisadas.

O método de preparo de amostra desenvolvido e validado neste estudo, por processar e extrair a amostra na mesma etapa, tem como vantagem um menor tempo de execução e minimiza o manuseio da amostra. Além disso, é um método inovador quando comparado aos outros métodos de preparo de amostras de abelhas encontrados na literatura e, ainda, foi eficiente na extração dos analitos visto que possibilita a determinação simultânea de 176 agrotóxicos.

Dessa forma, conclui-se que o método mini-QuEChERS proposto para a determinação de agrotóxicos em abelhas (*Apis mellifera*), mostrou-se eficaz, bem como o uso do sistema UHPLC-MS/MS, podendo ser aplicados em análises de rotina, uma vez que atendem as legislações de acordo com os parâmetros de validação métodos cromatográficos.

6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados durante a realização de atividades laboratoriais devem ser adequadamente tratados ou descartados, visto que podem apresentar riscos à saúde pública e ao meio ambiente.

Os resíduos sólidos e líquidos produzidos no decorrer do desenvolvimento deste trabalho foram armazenados em recipientes apropriados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria. A destinação final destes resíduos é realizada por uma empresa terceirizada, especializada nessa área.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Desenvolver um método de análise cromatográfica por GC-MS/MS para expandir o escopo para analitos não passíveis de análise por cromatografia líquida;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do método de extração QuEChERS modificado para outros produtos apícolas;
- ✓ Aplicar o método proposto em monitoramentos amplos para avaliar a ocorrência de agrotóxicos nessas matrizes em diferentes épocas do ano e regiões.

8 REFERÊNCIAS

ABEMEL (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL), 2015 Disponível em < <https://brazilletsbee.com.br/o-setor.aspx> >. Acesso em: 5 jan 2021.

ABEMEL (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL), 2015 Disponível em <<http://brazilletsbee.com.br/o-setor.aspx>>. Acesso em: 5 jan 2021.

A.B.E.L.H.A (Associação Brasileira de Estudos das Abelhas), 2020 Disponível em < <https://abelha.org.br/historico/>>. Acesso em: 25 jan 2022.

ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, G. E. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1360, p. 66–75, 2014.

AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e Abelhas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, p. 53-62, 2012.

ALVES, M. L. T. M. F. Produção de pólen apícola. **Apta Regional**, v. 10 , n.2, 2013b.

ANACLETO, D. A.; MARCHINI L. C. Análise faunística de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) coletadas no cerrado do Estado de São Paulo. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 27, p. 277-284, 2005.

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

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM E.; TASDELENB.; STAJNBAHER D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. **Crop Protection, Public Health, Environmental Safety**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p. 439, 2007.

ALBANO, F. M.; RODRIGUEZ, R. T. M. Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais – Guia Prático. 2 ed. Porto Alegre : **Rede Metrológica RS**, 2015.

ARES, M. A.; AYUSO, I.; BERNAL, L. J.; NOZAL, J. M.; BERNAL, J. Trace analysis of sulforaphane in bee pollen and royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1012-1013, p. 130–136, 2016.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2012b. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE n ° 27, de 17/05/2012.

ANVISA (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA), 2011a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/2408e3804fddb924be6fffacfa6b37f1>>. Acesso em: 11 jun. 2021.

ALLEN-WARDELL, G.; BERNHARDT, P.; BITNER, R.; BURQUEZ, A.; BUCHMANN, S.; CANE, J.; COX, P. A.; DALTON, V.; FEINSINGER, P.; INGRAM, M.; INOUE, D.; JONES, C. E.; KENNEDY, K.; KEVAN, P.; KOOPOWITZ, H.; MEDELLIN, R.; MEDELLIN-MORALES, S.; NABHAN, G. P.; PAVLIK, B.; TEPEDINO, V.; TORCHIO, P.; WALKER, S. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. **Conservation Biology**, v. 12, p. 8-17, 1998.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, 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. Brasília: **Diário Oficial da União**. DF, 12 de julho de 1989.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento Instrução Normativa nº 02, de 09 de fevereiro de 2017.

BRASIL, Instrução Normativa n.3 de 2001 de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade, de apitoxina, de cera de abelha, de geléia real, de geléia real liofilizada, de pólen apícola, de própolis, de extrato de própolis. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa>. Acesso em: 12/08/2020.

BLANCO, L. R.; MÉNDEZ, N. R.; MOLINA, R. J.; GONZÁLEZ, M; D.; LÓPEZ, G. B.; REYES, G. F. J.; DÍAZ, M. A. Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1456, p. 89–104, 2016.

BARGAÑSKA, Z.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Determination of Pesticide Residues in Honeybees using Modified QuEChERS Sample Work-Up and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 19, p. 2911-2924, 2014.

BAYO, S. F.; GOKA, K. Impacts of Pesticides on Honey Bees. **Beekeeping and Bee Conservation**, p. 78-97, 2016.

BAIRD, C. Química Ambiental. 2 ed. Porto Alegre: **Bookman**, 622p, 2002.

BARRETO, L. M. R. C.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O.; DIB, A. P. S. Produção de Pólen no Brasil. Taubaté: **Cabral**, p. 100, 2006.

ARRUDA, L. R. P.; BACIC, Z. L. I.; MALBURG, L. J.; PALLADINI, A. L. Produtos das Abelhas. Edição: **Epagri/GMC**, Florianópolis, 2015.

BURROWS, H. D.; CANLE, L. M.; SANTABALLA, J. A.; STEENKEN, S. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 67, p. 71-108, 2002.

BORGES, B. K.; PEREIRA, C. A.; MANO, V. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1 ed. Rio de Janeiro: **LTC**, cap 1, 2015.

CODLING, G.; NAGGAR, A. Y.; GIESY, P. J.; ROBERTSON, J. A. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. **Chemosphere**, v. 144, p. 2321–2328, 2016.

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

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia, 2 ed, **Unicamp**:Campinas, cap: 8 e 9, 2009.

CARPES, T. Estudo das Características Físico-Químicas e Biológicas do Polén Apícola de *Apis mellifera* da região Sul do Brasil. Tese, **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, Brazil, 2008.

CAMARGO, R. C. R.; RÊGO, J. G. S.; LOPES, M. T. R.; PEREIRA, F. M. Boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado, 2003 Disponível em: <www.infoteca.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: dez. 2021.

CHUNG, S. W. C.; CHEN, B. L. S.; Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, 5555, 2011.

CHUANJIANG, T.; DAHUI, L.; XINZHONG, Z.; SHANSHAN, C.; LIJUAN, F.; XIUYING, P.; JIE, S.; HUI, J.; CHONGJIU, L. Residue analysis of acephate and its metabolite methamidophos in open field and greenhouse pakchoi (*Brassica campestris* L.) by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 165, p.685–692, 2010.

COSCOLLÀA, C.; CASTILLO, M.; PASTOR, A.; YUSÀ, V. Determination of 40 currently used pesticides in airborne particulate matter (PM 10) by microwave-assisted extraction and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 693, p. 72–81, 2011.

CURBELO, G. A. M.; LEHOTAY, J. S.; BORGES, H. J.; DELGADO, R. A. M. Use of ammonium formate in QuEChERS for high-throughput analysis of pesticides in food by fast, low-pressure gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 75–84, 2014.

DELAPLANE, K. S.; MAYER, D. F. **Crop Pollination by Bees**. Wallingford, UK: CABI, 2000.

DIAS, J. V. CUTILLAS, V.; ANA LOZANO, A.; PIZZUTTI, I. R.; ALBA, F. R. A. Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1462, p. 8–18, 2016.

DONATO, F.F.; MARTINS, M.L.; MUNARETTO, S.J.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **J Braz Chem Soc**. v.26, p. 2077-2087, 2015.

DUPONT, G. Les abeilles malades de l'homme, **Le Monde**, 29 August 2007. Disponível em: <http://www.lemonde.fr/cgibin/ACHATS/acheter.cgi?offre=ARCHIVES&type_item=ART_ARCH_30J&objet_id=1002393&clef=ARCTRK-NC_01>. Acesso em: 31 out. 2021.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16665113/pesquisadores-avaliam-mortalidade-de-abelhas-no-brasil>>. Acesso 15 mar. 2021.

EMBRAPA. Histórico sobre mel. 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 10 set 2021.

EU (EUROPEAN UNION) pesticides database, disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eupesticidesdatabase/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>. Acesso em: 20 jun. 2021.

FERMAM, R. K. S.; ANTUNES, A. M. S. Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: estudo de caso. **Revista de economia e agronegócio**, v.7, p. 1679-1614, 2009.

GAËLLE, D.; GIROUD, B.; JABOT, C.; VULLIET, E. Exposure assessment of honeybees through study of hive matrices: analysis of selected pesticide residues in honeybees, beebread, and beeswax from French beehives by LC-MS/MS. **Environ Sci Pollut Res** v. 25, p. 6145–6153, 2018.

GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I.; MARTÍNEZ-FERRER, M. T.; CAMPOS-RIVELA, J. M.; GUIL, M. D. H.; Analysis of pesticide residues in honeybee (*Apis mellifera* L.)

and in corbicular pollen. Exposure in citrus orchard with an integrated pest management system. *Talanta*, v. 204, 153-162, 2019.

GONZALO, R. E.; MARTÍN, S. M. J.; CAMAZANO, S. M. Determination of acephate by liquid chromatography in the presence of aqueous soil extracts. *Journal of Chromatography*, v. 585, p. 324-328, 1991.

GROSS, J. H. Mass spectrometry. A textbook. 1 ed. Alemanha: **Springer**, 2004.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R. DE; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J.H. DE. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta*, v. 75, 1320, 2008.

HERNÁNDEZ, S. L.; DOMÍNGUEZ, H. D.; MARTÍN, T. M.; NOZAL, J. M.; HIGES, M.; YAGÜE, B. L. J. Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *Journal of Chromatography A*, v.1428, p. 220–227, 2016.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. 8 ed. Rio de Janeiro: **LTC**, 2012.

HONG, J.; KIM, H.; KIM, D.; SEO, J.; KIM, K.; Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1038, 27, 2004.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, ver. 4, 2011.

IBGE, Produção da pecuária municipal, BRASIL, 2021. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 12 fev. 2022.

IBGE, Produção da pecuária municipal, BRASIL, 2020. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 12 fev. 2021.

INOUE, K.; YOSHIMI, Y.; HINO, T.; OKA, H. Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, v. 32, p. 3596–3602, 2009.

ITAGIBA, M.G.O.R. Noções básicas sobre a criação de abelhas. Ed. Nobel, 1997. 109p.

JIN, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, W.; ZHANG, W.; WANG, L.; ZHOU, J.; LI, Y. Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly

by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1298–1307, 2017.

JOHNSON, R. Honey Bee Colony Collapse Disorder, 2010. Disponível em: < <http://www.fas.org/sgp/crs/misc/RL33938.pdf> >. Acesso em: 14 fev. 2021.

KLEIN A-M.; Freitas, B. M.; Bomfim, I. G. A.; Fornoff, F.; Boreux, V.; Oliveira, M. O. (2020) A Polinização Agrícola por Insetos no Brasil. Um Guia para Fazendeiros, Agricultores, Extensionistas, Políticos e Conservacionistas. Albert-Ludwigs University Freiburg, Nature Conservation and Landscape Ecology.

KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; SEMENIUK, S.; GAWEŁ, M.; BORZECKA, M.; POSYNIAK, A. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents. **Journal of Chromatography A**, v. 1435, p. 100–114, 2016.

KUMAR, V.; UPADHYAY, N.; KUMAR, V.; SHARMA, S. A review on sample preparation and chromatographic determination of acephate and methamidophos in different samples. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, p. 624–631, 2015.

KONG, Z.; DONG, F.; XU, J.; LIU, X.; LI, J.; LI, Y.; TIAN, Y.; LIQUN GUO, L.; SHAN, W.; ZHENG, Y. Degradation of acephate and its metabolite methamidophos in rice during processing and storage. **Food Control**, v. 23, p. 149-153, 2012.

LIMA, S. A. M. de. **A apicultura como alternativa social, econômica e ambiental para a XI mesorregião do noroeste do Paraná**. (dissertação). Curitiba – PR, 2005.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, p. 35-61, 2009.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K., LIGHTFIELD, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 615, 2005.

LEHOTAY, S.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548-2560, 2010.

LOZOWICKA, B. The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, p. 210-222, 2013.

LOPEZ, H. S.; LOZANO, A.; SOSA, A.; HERNANDO, D. M.; ALBA, F. R. A. Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study. **Chemosphere**, v. 163, p. 44-53, 2016.

MARTINELLO, M.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; GIULIATO, I.; GALLINA, A.; MUTINELLI, F.; The HoneyBee: An Active Biosampler of Environmental Pollution and a Possible Warning Biomarker for Human Health. *Applied Sciences*, v. 11(14), 6481, 2021.

MORALES, M. M.; RAMOS, M. J. G.; VÁZQUEZ, P. P.; GALIANO, F. J. D.; VALVERDE, M. G.; LÓPEZ, V. G.; FLORES, J. M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. *Sci. Total Environ.*, v. 710, p. 136288, 2020.

MASTOVSKA, K.; DORWEILER, K. J.; LEHOTAY, S. J.; WEGSCHEID, J. S.; SZPYLKA, K. A. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 5959-5972, 2010.

MARTINS, G.L.; FRIGGI, C.A.; PRESTES, O.D.; VICARI, M.C.; FRIGGI, D.A.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. Simultaneous LC-MS/MS Determination of Imidazolinone Herbicides Together with Other Multiclass Pesticide Residues in Soil. *Clean Soil Air Water*. v. 42, p. 1441-1449, 2014.

MARTINS, I. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1 ed. Rio de Janeiro: **LTC**, cap 3, 2015.

MORZYCKA, B.; Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honey bees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 982, p. 267-273, 2002.

MULTIGNER, J. L. Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, Risques & Santé*, v.4, p. 187-194, 2005.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CRUZ, A. S.; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, Ribeirão Preto : FUNPEC, Universidade de São Paulo, p. 41-48, 2008.

MARTHE, D. B.; BITTENCOURT, L. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; *Química Nova*, v. 33, 1389, 2010.

MOLGA, P. La mort des abeilles met la planète en danger, Les Echos, 20 August 2007. Disponível em: <<http://archives.lesechos.fr/archives/2007/LesEchos/19985-63-ECH.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2021.

MATARRITA, J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, v. 1449, p. 17-29, 2016.

MARCHINI, L. C.; dos REIS, V. D. A.; MORETI, A. C. de C. C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, estado de São Paulo. **Ciênc. Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2010/05/controlese-residuos-publicada-norma-de-2010-para-produtos-de-origem-animal>>. Acesso em 11 jun. 2021.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO) – Instrução normativa nº 11 de 20 de outubro, de 2000 – **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1690>. Acesso em: 15 nov. 2021.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**. Preprint Serie, v. 15, p. 107-110, 2009.

ORSO, D.; FLORIANO, L.; RIBEIRO, L. C.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Simultaneous Determination of Multiclass Pesticides and Antibiotics in Honey Samples Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1638-1653, 2016.

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

PRADO, F. S. R.; SANTOS, D. M.; OLIVEIRA, T. M. A.; BURGARELLI, A. M. J.; CASTELE, J. B.; VIEIRA, E. M.; Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 via oral and topic acute exposure. **Environmental Pollution**, v. 265, Part B, 114313, 2020.

PRESTES, O. D; FRIGGI, C. A; ADAIME, M. B; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, O. D; ADAIME, M. B; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostras para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 51-64, 2011.

PARKA, S. M.; KIMA, K. T.; KANG, J. S. Development of an analytical method for detecting nitrofurans in bee pollen by liquid chromatography–electrospray

ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1046, p. 172–176, 2017.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.A: Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo. v. 25, p. 321-326, 2002.

SOMERVILLE, D. C.; AUST. J. **Exp. Agric.** v. 45, p. 1659, 2005.

SOMERVILLE, D. C.; NICOL, H. I.; Aust. J. **Exp. Agric.** v. 46, p. 141, 2006.

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

RATNIEKS, F. L. W.; CARRECK, N. L. Clarity on Honey Bee Collapse. **Science**, v. 327, n. 5962, p. 152-153, 2010.

RODRÍGUEZ, E.; BARRIOB, R. J.; GOICOLEAB, A.; GÓMEZ DE BALUGERA, Z. Determination of diflubenzuron and its main metabolites in forestry matrices by liquid chromatography with on-line diode-array and electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 384, p. 63-70, 1999.

RÚBIES, A.; ANTKOWIAK, S.; GRANADOS, M.; COMPANYÓ, R.; CENTRICH, F. Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food samples. **Food Chemistry**, v. 181, p. 57–63, 2015.

SANTE (2015) Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document n ° SANTE/11945/2015.

SOARES, A. E. E. Captura de enxames com caixas iscas e sua importância no melhoramento de abelhas africanizadas. In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura, 2004.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. GC-MS: Más de um Analizador de Masas, para qué? **Scientia Chromatographica**, v. 2, p.25, 2010.

SILVA, I. C.; ALEIXO, P. K.; SILVA, N. B.; FREITAS, M. B.; FONSECA, I. L. **Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras no Brasil**. São Paulo, Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, 2014.

SILVA, C. I.; FILHO, A. J. S. P.; FREITAS, B. M. Polinizadores manejados no Brasil e sua disponibilidade para a agricultura. **A.B.E.L.H.A**, p.19-30, 2015.

SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 80-92, 2013.

TOTTI, S.; FERNANDEZ, M.; GHINI, S.; PICO, Y.; FINI, F.; MANES, J.; GIROTTI, S. Application of matrix solid phase dispersion to the determination of

imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography–mass spectrometry detection. **Talanta**, v. 69, p. 724–729, 2006.

UNDERWOOD R. B.; VANENGELSDORP, D. Colony Collapse Disorder: Have We Seen This Before?. 2007. Disponível em: <www.beeculture.com/content/ColonyCollapseDisorder.cfm>. Acesso em: 30 out. 2021.

USDA. Colony Collapse Disorder Progress Report, CCD Steering Committee. 2009. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/is/br/ccd/ccd_progressreport.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2021.

VÁZQUEZ, A. P. P.; LOZANO, S.; UCLÉS, M.M.; GÓMEZ RAMOS, A.R.; ALBA, F. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1426, p. 161–173, 2015.

VALLES, B. N.; RETAMAL, M.; MEZCUAA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. A sensitive and selective method for the determination of selected pesticides in fruit by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1264, p. 110–116, 2012.

VEIGA, M. M. Análise da contaminação dos sistemas híbridos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do sudeste do Brasil. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 2391-2399, 2006.

VIANA, B.F.; SILVA, F.O. Polinização por abelhas em agroecossistemas, 2010. Disponível em: <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/16%C2%BA20Cong_Bras_Apic/Anais_1/POLINIZA%C3%87%C3%83O%20POR%20ABELHAS%20EM%20AGROECOSSISTEMAS.pdf>. Acesso em: 14 jun 2021.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; MARTINS, M. L. In: Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1 ed. Rio de Janeiro: **LTC**, cap 24, 2015.

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

WIEST, L. BULETÉ, A.; GIROUD, B.; CÉDRIC FRATTA, C.; SOPHIE AMIC, S.; LAMBERT, O.; POULIQUEN, H.; ARNAUDGUILHEM, C. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5743–5756, 2011.

WILLIAMS, I. H.; FREE, J. B. The pollination of onion (*Allium cepa* L.) to produce hybrid seed. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 11, p. 409-417, jan. 1974.

WITTER, S.; NUNES-SILVA, P.; BLOCHTEIN, B.; LISBOA, B. B.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. **As abelhas e a agricultura**. EDIPUCRS, p.26-28, 2014.

ZHANG, K.; WONG, J. W.; YANG, P.; TECH, K.; DIBENEDETTO, A. L.; LEE, N. S.; HAYWARD, D. G.; MAKOVI, C. M.; KRYNITSKY, A. J.; BANERJEE, K.; JAO, L.; DASGUPTA, S.; SMOKER, M. S.; SIMONDS, R.; SCHREIBER, A. Multiresidue Pesticide Analysis of Agricultural Commodities Using acetonitrile Salt-Out Extraction, Dispersive Solid-Phase Sample Clean-up, and High-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p 7636-7646, 2011.