



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

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS E
ANTIBIÓTICOS EM MEL EMPREGANDO UMA EXTRAÇÃO RÁPIDA
E UHPLC-MS/MS**

TESE DE DOUTORADO

Débora Orso

Santa Maria - RS, Brasil

2015

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS E ANTIBIÓTICOS EM MEL
EMPREGANDO UMA EXTRAÇÃO RÁPIDA E UHPLC-MS/MS**

Débora Orso

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Área de
Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

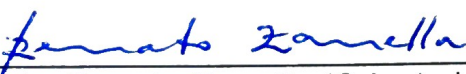
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE AGROTÓXICOS E
ANTIBIÓTICOS EM MEL EMPREGANDO UMA EXTRAÇÃO
RÁPIDA E UHPLC-MS/MS


elaborada por
Débora Orso

como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química

Comissão Examinadora


Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador, UFSM)


Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)


Prof.^a. Dr.^a. Sandra Cadore Peixoto (UNIFRA)


Dr. Arnaud Touffet (Université de Poitiers, França)


Prof.^a. Dr.^a. Martha Bohrer Adaime (UFSM)

Santa Maria, 28 de agosto de 2015

Dedico esse trabalho a quem faz toda a diferença
na minha vida, pessoas que eu me inspiro
para ser cada dia melhor, meus pais, João e Neide.

Obrigada por tudo!

Dedico também ao meu noivo, Tiago, obrigada
pelo incentivo e companheirismo.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, agradeço pela orientação profissional durante esses anos de estudo e pesquisa. Agradeço também pela oportunidade recebida em fazer parte do grupo do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP), durante seis anos de muito aprendizado, experiência adquirida e amizades cultivadas. Muito obrigada, professor Renato!

Ao Prof. Dr. Osmar Damian Prestes, pela co-orientação recebida durante a realização desse trabalho, a qual foi muito importante e por toda a ajuda recebida, obrigada pelo carinho!

À Prof^ª. Dra. Martha Bohrer Adaime, muito obrigada pela oportunidade de fazer parte desse grupo, pela dedicação e confiança recebidas.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, Prof^ª. Dra. Sandra Cadore Peixoto, Prof^ª. Dra. Martha Bohrer Adaime e Dr. Arnaud Touffet pela disposição em participar da defesa da tese, pelas valiosas contribuições e sugestões, bem como, pelos questionamentos, visando à melhoria desse trabalho.

Aos colegas e amigos do LARP, que participaram e contribuíram ativamente para a realização deste trabalho, muito obrigada por tudo. Agradeço pelos dias convividos, pela amizade e pelo carinho de todos, com certeza a lembrança é muito positiva. Agradeço de forma especial à colega e amiga Lucila, a qual sempre se fez presente e muito disposta a ajudar. Desejo a você muitas felicidades e realizações em um futuro brilhante, obrigada por tudo! À colega e amiga Luana Floriano, a qual me ajudou muito na realização desse trabalho, quero que saibas que a tua ajuda foi imprescindível, da mesma forma que a tua amizade, a qual me deixa muito feliz. Desejo a você toda a felicidade desse mundo! À colega e amiga Mariele, sempre muito eficiente e disposta a ajudar em todos os momentos, você foi uma verdadeira amiga-irmã, obrigada pela tua amizade, felicidades! À amiga Danieli, uma pessoa de coração tão grandioso e de tanta sabedoria, obrigada por tudo, a tua amizade é valiosa, minha amiga-irmã! À colega e amiga Natalia Cadavid Muñoz, a “Colômbia”, obrigada pela amizade, companheirismo e por toda a ajuda, você é uma pessoa maravilhosa! Ao amigo Nelson, obrigada pela amizade e ajuda muito importantes para a finalização desse trabalho! Aos professores doutores Maria Tereza e Manoel e aos amigos Nathália Saibt, Mariela, Fábio, Pimperneli, Gabrieli, Maiara, Magali,

Tiele, Marília, Janice, Luana Berwaldt, Gabriel, Marisa, Rômulo, Filipe, Edurado, Mariah, Juliana e Giovana muito obrigada por todo apoio, ajuda, pelas amostras de méis cedidas para a realização desse trabalho e por todos os momentos maravilhosos convividos com vocês.

A todos os membros do LARP, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

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

Ao meu noivo, Tiago, que mesmo distante muito me incentivou. Obrigada pelos momentos de paz e tranquilidade que você soube transmitir nos momentos mais angustiantes.

A todos os demais familiares e amigos, em especial às amigas Giseli, Tanandra e Queli, que de alguma forma torceram e vibraram durante este momento da minha vida.

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

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e a Valéria, pela amizade, gentileza e atenção dispensadas.

Ao CNPq pelo auxílio fornecido.

A Deus, pela força e proteção recebidas, guiando-me sempre para o melhor caminho, ao conceder-me mais esta etapa, caracterizada por muito aprendizado e realizações, obrigada!

RESUMO

Tese de doutorado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

Determinação simultânea de agrotóxicos e antibióticos em mel empregando uma extração rápida e UHPLC-MS/MS

AUTORA: DÉBORA ORSO

ORIENTADOR: Prof. Dr. RENATO ZANELLA

Data e local da defesa: 28 de agosto, Santa Maria.

O declínio da população de abelhas está sendo amplamente discutido por meio de diversos estudos que relacionam este fenômeno com o indiscriminado uso de agrotóxicos e antibióticos, sejam eles aplicados nas colmeias ou pela contaminação indireta das abelhas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método para determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e antibióticos em amostras de mel, utilizando cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) para detecção de 92 compostos de diferentes classes químicas, tais como, inseticidas e antimicrobianos. O método envolve uma etapa de homogeneização das amostras de mel utilizando o tampão McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4), seguido de extração com acetonitrila e limpeza do extrato com sulfato de magnésio e florisil®. O método foi validado com avaliação dos parâmetros de linearidade, levando-se em consideração a normalidade e independência dos dados, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção e efeito matriz. A determinação de resíduos em amostras de mel pelo método proposto é rápida e simples e o método mostrou ser efetivo para análise multirresíduo de agrotóxicos e antibióticos. Os resultados foram satisfatórios para a avaliação da exatidão (62 a 138%), através de ensaios de recuperação em 10 níveis de fortificação, com RSD < 36%, linearidade entre 0,1 e $200 \mu\text{g kg}^{-1}$, coeficiente de determinação (r^2) >0,9901, limite de detecção (LOD) de 0,03 a $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e de quantificação (LOQ) de 0,1 a $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. O limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) foram de 0,1 a 5,0 e 0,12 a $2,81 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. O método foi aplicado em 43 amostras de diferentes origens botânicas de mel, obtidas diretamente de apicultores de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, sendo que 53% apresentaram resíduos dos compostos estudados, todos abaixo do LMR estabelecido para mel pela legislação Brasileira e Europeia.

Palavras-chave: mel, agrotóxicos, antibióticos, cromatografia.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

Simultaneous determination of pesticides and antibiotics in honey using a rapid extraction and UHPLC-MS/MS

AUTHOR: DÉBORA ORSO

ADVISOR: Prof. Dr. RENATO ZANELLA

Date and Place for thesis defense: Santa Maria, August 28th, 2015.

The decline in the bee population is being widely discussed through various studies that relate this phenomenon to the indiscriminate use of pesticides and antibiotics, whether applied in hives or by indirect contamination of bees. Thus, this study aimed to develop and validate a method for simultaneous determination of 80 pesticides and 12 antibiotics in honey samples, using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the detection of 92 compounds of different chemical classes, such as, insecticides and antimicrobial agents. The method involves a homogenization step of honey samples using McIlvaine buffer 0.1 mol L⁻¹ (pH 4), followed by extraction with acetonitrile and clean-up of the extract with magnesium sulfate and florisil[®]. The method was validated with evaluation of linearity parameters, taking into account the normality and independence of the data, accuracy, precision, detection limit, quantification limit, decision limit, detection capability and matrix effect. The determination of residues in honey samples by proposed method is quick and simple and the method proved to be effective for multiresidue analysis of pesticides and antibiotics. The results were satisfactory for evaluating the accuracy (62 to 138%) through recovery assays at 10 spike levels, with RSD <36%, linearity from 0.1 to 200 µg kg⁻¹, coefficient of determination (r^2) >0.9901, limit of detection (LOD) of 0.03 to 1.5 µg kg⁻¹ and quantification (LOQ) from 0.1 to 5.0 µg kg⁻¹. Decision limit (CC α) and detection capability (CC β) were from 0.1 to 5.0 and from 0.12 to 2.81 µg kg⁻¹, respectively. The method was applied to 43 samples from different botanical origins of honey, obtained directly from beekeepers of different regions of the state of Rio Grande do Sul, wherein 53% obtained residues of the selected compounds, all below the MRLs established for honey according Brazilian and European legislation.

Keywords: honey, pesticides, antibiotics, chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Dados sobre a exportação de mel desde 2009 até o ano de 2013...	7
Figura 2 –	Variedades das cores que podem ser encontradas para o mel	14
Figura 3 –	Fluxograma representolvidas durante o processamento do mel	15
Figura 4 –	Esquema de um analisador de massas triplo quadrupolo	28
Figura 5 –	Representação das etapas: 1- homogeneização e extração do mel; 2 – centrifugação para separação das fases orgânica e aquosa e 3 – limpeza das amostras.....	51
Figura 6 –	Ilustração do procedimento de preparo de amostra utilizando o método QuEChERS citrato e o planejamento experimental na etapa de limpeza.....	52
Figura 7 –	Preparo de amostra utilizando extração com acetonitrila e variação dos sorventes testados na etapa de limpeza do método.....	53
Figura 8 –	Preparo de amostra utilizando acetonitrila na etapa de extração, seguido por duas condições de limpeza.....	53
Figura 9 –	Cromatograma de um nível de fortificação na concentração de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na amostra de mel obtida pelo UHPLC-MS/MS.....	60
Figura 10 –	Cromatogramas dos compostos (A) clotianidina, (B) sulfametazina, (C) bromofós metílico e (D) imidacloprido, com suas respectivas transições de quantificação e confirmação.....	60
Figura 11 –	Resultados referentes aos testes utilizando diferentes sorventes com a quantidade de compostos obtida para cada uma das três faixas de recuperação avaliadas.....	65
Figura 12 –	Representação do método de preparo de amostra validado e utilizado para análise de amostras de mel nesse trabalho.....	67
Figura 13 –	Representação de um cromatograma de íons totais (TIC) da amostra “branco” de mel (A) e da amostra fortificada no menor nível da curva analítica $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B), ambos os extratos injetados no sistema UHPLC-MS/MS.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais espécies de abelhas criadas para fins comerciais no Brasil e as culturas que elas polinizam.....	4
Tabela 2 –	Composição do mel.....	8
Tabela 3 –	Níveis máximos permitidos para os componentes presentes no mel unifloral e de melato, de acordo com a legislação brasileira.....	10
Tabela 4 –	Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos para mel pelo PNCRC (Brasil) e União Europeia (EU).....	18
Tabela 5 –	Diferentes metodologias utilizadas para determinação de contaminantes em mel.....	30
Tabela 6 –	Informações de todos os compostos, contendo algumas características importantes de cada um deles.....	43
Tabela 7 –	Relação de amostras de mel obtidas para a etapa de aplicação do método.....	48
Tabela 8 –	Gradiente da fase móvel utilizado para neste trabalho.....	59
Tabela 9 –	Compostos analisados com seus respectivos tempos de retenção, íons precursores e produtos otimizados.....	61
Tabela 10 –	Planejamento experimental obtido em relação às quantidades de sorventes PSA e C18 para a etapa de limpeza do método.....	64
Tabela 11 –	Resultados referentes aos testes gravimétricos.....	65
Tabela 12 –	Resultados dos testes gravimétricos realizados com os sorventes florisil® e PSA.....	66
Tabela 13 –	Resultados dos testes de normalidade, independência, faixa linear e coeficiente de determinação, avaliados para cada composto	70
Tabela 14 –	Resultados do efeito matriz calculados para cada analito avaliado	73
Tabela 15 –	Percentuais dos ensaios de recuperação (R), expressos em termos de repetibilidade e precisão intermediária e resultados de precisão, em termos de desvio padrão relativo (RSD), avaliados para os agrotóxicos em estudo..	76
Tabela 16 –	Resultados de recuperação (R) e RSD para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária para os antibióticos em estudo.....	81
Tabela 17 –	Resultados da precisão intermediária avaliada, utilizando o teste t nos três níveis intermediários de fortificação da curva analítica.....	82
Tabela 18 –	Resultados dos limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) do método proposto	85
Tabela 19 –	Resultados de CC α e CC β para os antibióticos avaliados.....	86
Tabela 20 –	Resultados para 23 amostras positivas obtidas da aplicação do método validado para amostras reais de diferentes origens botânicas.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ABEMEL – Associação Brasileira dos Exportadores de Mel;
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
- C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano;
- CI – Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*;
- CME-UABE – Microextração assistida por ultrassom, do inglês *microextraction assisted by ultrasound*;
- CC α – Limite de decisão;
- CC β – Capacidade de detecção;
- CV – coeficiente de variação;
- d-SPE – extração em fase sólida dispersiva, do inglês *dispersive solid phase extraction*;
- Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;
- EI – Ionização por eletrônico, do inglês *Electronic ionization*;
- ESI: Ionização por eletronebulização, do inglês *Electrospray ionization*;
- EU – União Europeia;
- FAO – Organização das Nações Unidas para a alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*;
- GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês *Gas chromatography mass spectrometry*;
- HMF – hidroximetilfurfural;
- HPLC-MS/MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês *high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry*;
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial;
- ISO – Organização Internacional para Padronização, do inglês *International Organization for Standardization*;
- IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*;
- LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography mass spectrometry*;
- LLE – Extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction*;
- LMDR – Limite mínimo de desempenho requerido;

LMR – Limite máximo de resíduos;

LMPR – Limite mínimo de performance requerido;

LOD – Limite de detecção, do inglês *limit of detection*;

LOQ – Limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*;

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

m/z – razão massa carga;

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos;

pH – potencial hidrogeniônico;

PI – Padrão interno;

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes de origem animal;

pKa – constante de dissociação ácida;

pKb – constante de dissociação básica;

PS – Padrão de substituição;

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

r^2 – coeficiente de determinação;

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*;

RSD_{pi} - Desvio padrão relativo para precisão intermediária;

RSD_r – Desvio padrão relativo para repetitividade;

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas;

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal;

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

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*;

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*;

v/v – volume por volume.

LISTA DE ANEXOS

Anexo I –	Questionário aplicado aos apicultores.....	109
Anexo II –	Fórmulas estruturais dos compostos avaliados nesse trabalho.	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	A apicultura.....	3
2.2	Mel.....	5
2.2.1	Importância econômica do mel.....	6
2.2.2	Requisitos de qualidade do mel.....	8
2.2.2.1	Umidade.....	9
2.2.2.2	Hidroximetilfurfural (HMF).....	10
2.2.2.3	Potencial Hidrogeniônico (pH).....	10
2.2.2.4	Açúcares.....	11
2.2.2.5	Minerais ou cinzas.....	11
2.2.2.6	Acidez.....	12
2.2.2.7	Sólidos insolúveis e atividade diastática.....	12
2.2.2.8	Índice de formol.....	13
2.2.2.9	Viscosidade e condutividade elétrica.....	13
2.2.3	Cor.....	14
2.3	Processo de obtenção do mel.....	15
2.4	Agrotóxicos.....	16
2.4.1	Neonicotinóides.....	20
2.4.2	Organofosforados carbamatos.....	20
2.4.3	Triazina e estrobilurina.....	21
2.5	Antibióticos.....	21
2.5.1	Sulfonamidas.....	22
2.5.2	Eritromicina e estreptomicina.....	23
2.5.3	Lincomicina e tilosina.....	23
2.5.4	Cloranfenicol.....	24
2.6	Ocorrências de resíduos de antibióticos e agrotóxicos no mel.....	24
2.7	A análise cromatográfica na determinação de resíduos de agrotóxicos e antibióticos.....	26
2.7.1	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas.....	28
2.8	Diferentes métodos de preparo de amostras de mel para análise cromatográfica.....	29
2.9	Validação de métodos analíticos.....	31
2.9.1	Seletividade/especificidade.....	31
2.9.2	Linearidade.....	32
2.9.3	Faixa linear e faixa de trabalho.....	33
2.9.4	Avaliação da normalidade.....	33
2.9.5	Avaliação da independência.....	34
2.9.6	Efeito matriz.....	34
2.9.7	Precisão.....	35
2.9.7.1	Repetibilidade.....	35

2.9.7.2	Precisão intermediária.....	36
2.9.8	Exatidão – recuperação/veracidade.....	36
2.9.9	Limite de detecção (LOD).....	37
2.9.10	Limite de quantificação (LOQ).....	38
2.9.11	Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β).....	38
2.10	Planejamento experimental.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1	Instrumentação.....	40
3.2	Reagentes, solventes e materiais utilizados.....	41
3.3	Padrões analíticos dos compostos analisados.....	41
3.3.1	Padrão interno e de substituição.....	47
3.3.2	Amostras de mel.....	47
3.4	Condições otimizadas no sistema UHPLC-MS/MS.....	48
3.4.1	Coluna cromatográfica.....	49
3.4.2	Gradiente de fase móvel.....	49
3.4.3	Fonte de ionização.....	50
3.5	Condições otimizadas no método de preparo de amostra de mel.....	51
3.6	Validação do método para análise de agrotóxicos e antibióticos em mel....	54
3.6.1	Seletividade.....	54
3.6.2	Curva analítica e faixa linear.....	54
3.6.3	Efeito matriz.....	55
3.6.4	Ensaio para avaliar a recuperação/veracidade.....	55
3.6.5	Precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	57
3.6.6	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	57
3.6.7	Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β).....	58
3.7	Aplicação do método.....	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
4.1	Condições cromatográficas.....	59
4.2	Avaliação dos ensaios de extração realizados para análise de resíduos de agrotóxicos e antibióticos em mel.....	63
4.3	Validação do procedimento de preparo da amostra de mel.....	66
4.3.1	Seletividade/especificidade.....	68
4.3.2	Curva analítica – testes de normalidade e independência dos resíduos.....	69
4.3.3	Efeito matriz.....	72
4.3.4	Exatidão – recuperação/veracidade.....	75
4.3.5	Precisão.....	81
4.3.6	Limite de detecção e limite de quantificação.....	84
4.3.7	Limite de decisão e capacidade de detecção.....	86
4.4	Aplicação do método.....	87
5	CONCLUSÃO.....	92
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
7	ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	107
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	108
9	ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

Com uma tendência de crescimento representada nos últimos levantamentos do IBGE, a apicultura brasileira deve permanecer entre as mais produtivas do mundo nos próximos anos. O cenário nacional apresenta alguns pontos fortes, tais como características especiais de flora e clima, necessidade de pouca área para a produção e atividade econômica de baixo impacto ambiental (IBGE, 2012).

O mel, produzido pelas abelhas a partir do néctar das plantas, possui como principais constituintes carboidratos, água, ácidos orgânicos, enzimas e aminoácidos (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2005). No Brasil, há uma grande atenção voltada para a espécie de abelha *Apis mellifera*, por ser a mais conhecida no país e também grande produtora de mel (LIMA & ROCHA, 2012), aliada às vantagens devido às questões econômicas em torno da comercialização do mel brasileiro (SEBRAE, 2014). Por outro lado, a atividade apícola está sujeita a condições naturais que contribuem para a redução da diversidade de abelhas, como por exemplo, períodos de seca, além da ação dos agrotóxicos e demais produtos tóxicos aplicados de forma irresponsável que, por consequência, diminuem a produção de mel (SEBRAE, 2014).

Segundo pesquisa realizada pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG, 2015), as importações de agrotóxicos foram recordes no ano de 2014. O Brasil importou 418 mil toneladas de agrotóxicos, um aumento de 2,4% comparado ao ano de 2013. O uso descontrolado dessas substâncias, além de representar perigo aos seres humanos nos aspectos ocupacionais, alimentares e de saúde pública, pode provocar efeitos ecológicos indesejáveis no meio ambiente. Além de alterações no comportamento das abelhas, que devido ao uso de agrotóxicos podem ocasionar sérios prejuízos ao longo do tempo na manutenção da colônia pela consequente mortalidade das larvas (SILVA *et al.*, 2014).

Da mesma forma, há uma crescente preocupação em relação à aplicação de antibióticos nas colmeias, a fim de tratar ou prevenir doenças causadas por bactérias. A utilização desses resíduos é igualmente importante, em termos de saúde pública e do equilíbrio ambiental proporcionado pelas abelhas. A aplicação desses antibióticos é proibida pela União Europeia e pela diretiva da Comissão

Europeia, os quais afirmam que os méis devem estar livres da contaminação com antibióticos, pois não possuem limites máximos estabelecidos e assim não podem ser exportados (JUAN-BORRÁS *et al.*, 2015).

Neste contexto, a análise de resíduos de agrotóxicos e antibióticos em mel é de extrema importância em termos de segurança e do equilíbrio ambiental proporcionado pelas abelhas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a otimização e a validação de um método multirresíduo de extração simultânea de resíduos de 80 agrotóxicos e 12 antibióticos em amostras de mel, com posterior análise por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS). Posteriormente, esse método foi aplicado para análise de 43 amostras de mel de diferentes origens botânicas e regiões do estado do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A apicultura

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. A cadeia produtiva da apicultura proporciona a geração de empregos e fluxo de renda, principalmente no ambiente da agricultura familiar, sendo, dessa forma, determinante na melhoria da qualidade de vida e fixação do homem no meio rural (EMBRAPA, 2003).

A criação de abelhas da espécie *Apis mellifera* é considerada uma importante atividade agropecuária, mais especificadamente caracterizada como atividade apícola, no Brasil. Além do mel, outros produtos extraídos das colmeias são pólen, cera, própolis e geleia real. A criação racional das abelhas *Meliponini* e *Trigonini* é denominada meliponicultura, conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão ou indígenas, pois essas abelhas possuem ferrão atrofiado (VILLAS-BÔAS, 2012).

O sucesso da polinização das flores só acontece quando há fertilização, ou seja, quando o grão de pólen é transferido de maneira eficiente para o estigma e na quantidade certa para que possa encontrar o óvulo. Como consequência, ocorre a formação de sementes e frutos, dependendo de uma variedade de características tanto das plantas quanto das abelhas (GIMENES, 2000). Durante esse tipo de coleta de pólen, as abelhas usam sua musculatura torácica para vibrar as anteras e liberar o pólen. Isso reduz a gama de polinizadores efetivos, já que espécies como *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* não possuem essa capacidade e, por isso não conseguem retirar o pólen das flores ou, se conseguem, a probabilidade de polinização é pequena (NUNES-SILVA *et al.*, 2010). Das espécies que realizam a polinização por vibração, como mostra a Tabela 1, destaca-se as pertencentes aos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Melipona* e *Xylocopa*.

Tabela 1 – Principais espécies de abelhas criadas para fins comerciais no Brasil e as culturas que elas polinizam.

Nome científico	Nome popular	Produtora de mel	Cultura agrícola	Realiza <i>buzz pollination</i> *
<i>Melípona scutellaris</i>	Uruçu	Sim	Abacate, açai, guaraná e melancia	Sim
<i>Melípona quadrifasciata</i>	Mandacaia	Sim	Abacate, açai, goiaba ¹ , guaraná, melancia, tomate	Sim
<i>Melípona subnitida</i>	Jandaíra	Sim	Abacate, açai, goiaba ¹ , guaraná, melancia, pimentão	-
<i>Melípona rufiventris</i>	Uruçu-amarela	Sim	Abacate, açai, guaraná, melancia	-
<i>Melípona marginata</i>	-	Sim	Abacate, açai, goiaba ¹ , guaraná, melancia	Sim
<i>Melípona compressipes</i>	Tiúba	Sim	Abacate, açai, guaraná, melancia	-
<i>Melípona asilvae</i>	Rajada, manduri	Sim	Abacate, açai, guaraná, melancia	-
<i>Melípona bicolor</i>	Guaraipo	Sim	Abacate, açai, guaraná, melancia	Sim
<i>Apis mellifera</i>	Italiana, europa, abelha-do-mel	Sim	Abacate, algodoeiro, café, caju, canola, cebola, girassol, laranja, maçã, mandioca, manga, melão, pêssego	Não
<i>Xylocopa spp.</i>	-	Não	Maracujá	Sim
<i>Bombus</i>	-	Não	Maracujá, tomate	Sim
<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Sim	Morango, umbu	Não
<i>Scaptotrigona spp.</i>	Tubiba	Sim	Pepino	Não
<i>Plebeia sp.</i>	Mirim	Sim	Sem informações	Não

¹ A goiaba está em destaque por ser a única cultura efetivamente polinizada por essas espécies, as outras são potencialmente polinizadas.

**buzz pollination*: polinização por vibração. Fonte: LIMA & ROCHA. 2012.

Outras características são determinantes na eficiência da polinização, como: quantidade e disponibilidade de pólen carregado pela abelha; qualidade do pólen transferido; número de visitas e fase de atividade diária das abelhas; competição entre as espécies visitadas pelas abelhas e a disponibilidade delas. As abelhas são classificadas ainda como generalistas, aquelas que visitam muitas espécies botânicas e as polinizam com menor eficiência, ou especialistas, as quais coletam com máxima eficiência e operam como polinizadoras especialistas (LIMA & ROCHA, 2012).

Constata-se, assim, que para ambientes naturais e manejados quanto maior a diversidade floral em uma região, maior deve ser a diversidade de polinizadores. A destruição dos habitats dos polinizadores silvestres e, especialmente, os efeitos dos agrotóxicos sobre as colônias constituem os principais obstáculos em busca do uso sustentável de polinizadores na agricultura brasileira. A aplicação de agrotóxicos reduz ainda mais a presença de polinizadores em áreas cultivadas, pois os inseticidas utilizados para matar as pragas têm o mesmo efeito sobre os insetos polinizadores. Já os herbicidas e o cultivo limpo, reduzem a um número mínimo as flores silvestres das quais os insetos se alimentam durante o intervalo das floradas (LIMA & ROCHA, 2012).

A apicultura é uma das poucas atividades agropecuárias que preenche os requisitos do tripé da sustentabilidade:

- O econômico – porque gera renda ao agricultor/ produtor;
- O social – ocupa mão-de-obra familiar no campo e
- O ecológico – não necessita desmatamento para a exploração.

O Brasil tem um grande potencial apícola, em função de sua diversificada flora, extensão territorial e variabilidade climática, possibilitando assim produzir mel o ano todo, o que o diferencia dos demais países que, normalmente, colhem mel uma vez por ano (ANACLETO & MARCHINI, 2005).

2.2 Mel

A legislação brasileira conceitua mel como o 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 e combinam com substâncias específicas próprias, e após armazenam até madurar nos favos da colmeia (MAPA, 2000).

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

Os méis mais apreciados são aqueles originados a partir do néctar floral, sendo que estes podem ser classificados como monoflorais ou multiflorais. O mel

monofloral é procedente de flores de uma mesma família, gênero ou espécie, e possui características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias, enquanto o mel multifloral (ou polifloral) é aquele obtido a partir de diferentes origens florais. Há também o mel de melato, obtido principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (MAPA, 2000).

Segundo CRANE (1983), a composição exata de qualquer mel depende, principalmente, das fontes vegetais das quais ele é derivado, mas também do clima, solo e outros fatores. O sabor, aroma, cor e densidade variam de acordo com as flores das plantas que forneceram néctar, classificando-o em diferentes tipos, de acordo com sua origem botânica (WIESE, 2005).

2.2.1 Importância econômica do mel

O mercado apícola possui alto potencial de crescimento e encontra-se em fase de expansão. No passado, a produção do mel brasileiro era praticamente toda destinada para o mercado interno, porém há pouco tempo atrás, fatores externos acabaram beneficiando a apicultura nacional, fazendo com que ocorresse uma surpreendente elevação das exportações. Tal fato ocorreu quando os maiores exportadores mundiais, China e Argentina, tiveram suas exportações vetadas por questões de ordem sanitária – constatou-se a presença de cloranfenicol, um antibiótico cancerígeno empregado no combate a doenças das abelhas (SEBRAE, 2010; IBGE, 2010).

O mercado mundial de mel é dominado por poucos países, em 2001, o Brasil exportou apenas 2,8 milhões de dólares e sequer aparecia na lista dos maiores exportadores mundiais. Em 2002, o país já ocupava o nono lugar, com exportações de 23,1 milhões de dólares. Porém, em 2004 a demanda pelo produto brasileiro registrou inflexão negativa, bem como o preço obtido pelos produtores.

Segundo dados do IBGE (2010) o país alcançou 38 mil toneladas de mel em 2009. Um dos estímulos para o avanço da atividade pode ter sido o aumento da demanda advinda do exterior, que contou ainda com o fim do embargo para o mel brasileiro pela Comunidade Europeia, em 2008, representando a retomada na participação de um mercado de 12 bilhões de euros.

Em relação ao comportamento sobre os dados de produção de mel realizada pelos estados brasileiros, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2012, o Rio Grande do Sul (RS) representou 20%, Paraná (16%) e Santa Catarina (13%), os quais juntos somam aproximadamente 50% da produção total de mel brasileiro. A Figura 1 apresenta as exportações de mel no estado do RS e no Brasil, em relação à quantidade (mil toneladas), entre os anos de 2010 a 2014, segundo dados da Associação Brasileira de Exportadores de mel (ABEMEL, 2014).

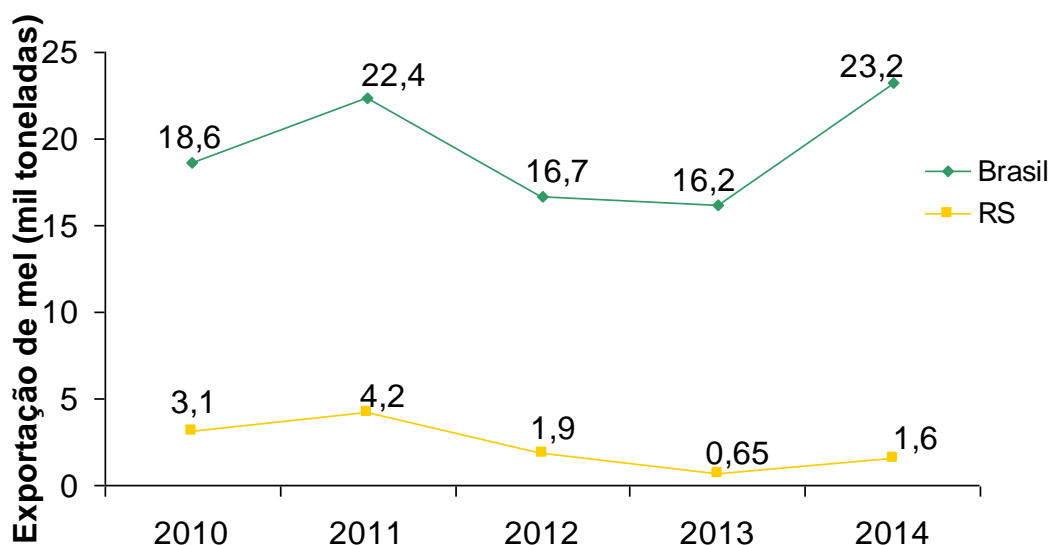


Figura 1 – Dados sobre a exportação de mel brasileiro no estado do RS e no país, entre os anos de 2010 até 2014. Fonte: ABEMEL, 2014.

Os principais destinos das exportações brasileiras, em 2014, foram os Estados Unidos (84%), seguido de Alemanha, Canadá e Reino Unido. Os estados de São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul se destacam como maiores exportadores para esses países. Dados atuais apontam que no ano de 2014, a exportação aumentou 97% em relação ao mesmo período do ano de 2013 (ABEMEL, 2014). A região Sul apresenta maior tradição na apicultura por ter recebido os primeiros enxames para atividade comercial, além das primeiras técnicas de produção, em virtude da colonização italiana (LEÃO, 2012).

A produtividade brasileira ainda se encontra baixa quando comparada internacionalmente, justificada pela limitada utilização tecnológica, aliada a inexistência de uma empresa possuidora de uma marca forte, resultando em um mercado bastante pulverizado e com diversas marcas concorrentes entre si. Com

base nisso, verifica-se que há espaço para fortalecer uma marca para atender a demanda dos consumidores por produtos de alta qualidade com preços competitivos (SEBRAE, 2011; IBGE, 2010).

2.2.2 Requisitos de qualidade do mel

Os parâmetros físico-químicos são importantes para a caracterização e são primordiais para garantir a qualidade desse produto. Além disso, a caracterização regional de méis é de fundamental importância levando-se em consideração a grande diversidade botânica e variação do solo e do clima das diversas regiões. As análises físico-químicas e polínicas contribuem na fiscalização de méis importados e no controle da qualidade do mel produzido no país (BRASIL, 2000).

A qualidade do mel é principalmente determinada pelas características sensorial, química, física e microbiológica. Os critérios físico-químicos de mel são especificados pela diretiva do conselho europeu 2001/110 EC e as análises físico-químicas são indicadas pela legislação brasileira para o controle da qualidade do mel puro: umidade, hidroximetilfurfural (HMF), açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, acidez livre, sólidos insolúveis em água e atividade diastática (BERA & ALMEIDA-MURADIAN, 2007).

Quando se trabalha com mel é comum encontrar variações na sua composição física e química, Tabela 2, tendo em vista que variados fatores interferem na sua qualidade, como condições climáticas, espécie de abelha, processamento, armazenamento e o tipo de florada do mel (MENDES *et al.*, 2009).

Tabela 2 – Principais constituintes presentes no mel.

Componentes (%)	Média (%)	Varição (%)
Água	17,2	13 – 23
Frutose	38,2	27 – 44
Glicose	31,3	22 – 41
Sacarose	1,3	0,2 – 8
Maltose	7,3	3 – 16
Cinzas	0,16	0,02 – 1
Nitrogênio	0,04	0 – 0,1

Fonte: EUROPEAN UNION, 2002; VILHENA & ALMEIDA-MURADIAN, 1999; MAPA, 2000.

Além disso, o mel apresenta teores de proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, substâncias minerais, pólen, sacarose, maltose, maltotriose e outros oligossacarídeos. Possui também pequenas concentrações de fungos, algas, leveduras e outras partículas sólidas resultantes do processo de obtenção do mel (CODEX STAN, 2001).

Os trabalhos de análises físico-químicas de méis são realizados com o objetivo de comparar os resultados obtidos com padrões ditados por órgãos oficiais internacionais, ou com os estabelecidos pelo próprio país. Essa não é só uma preocupação com a qualidade do mel produzido internamente, mas também, tornar possível a fiscalização de méis importados com relação às suas alterações (CARVALHO *et al.*, 2005). As qualidades nutricionais do mel (vitaminas, minerais, valor energético elevado), suas propriedades medicinais (ação antioxidante e antisséptica relacionada aos compostos fenólicos) e suas propriedades sensoriais têm atraído milhares de consumidores.

2.2.2.1 Umidade

A umidade no mel é uma das características mais importantes por influenciar na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização e sabor (SEEMANN & NEIRA, 1988). Este constituinte do mel pode sofrer variações após a sua retirada da colmeia, em função das condições de armazenamento depois da extração (CARVALHO *et al.*, 2005).

O mel é um produto que apresenta características químicas que favorecem um longo período de conservação, como alta concentração em açúcares, baixo pH e teor de umidade. Assim, a vida de prateleira do produto é assegurada por um prazo de dois anos. Entretanto, o teor de umidade pode afetar enormemente a sua qualidade e, conseqüentemente, o prazo de validade. O teor máximo de umidade aceito pela legislação brasileira é de 20% (MAPA, 2000).

O alto teor de umidade, temperatura (maior que 26 °C) e a presença de leveduras indesejáveis causam a fermentação do mel, a qual promove a transformação dos açúcares presentes no produto em álcool e gás carbônico. O álcool na presença de oxigênio é convertido em ácido acético, deixando o meio propício para o desenvolvimento e atuação de microrganismos que aceleram o

processo de fermentação, reduzindo assim, a qualidade do mel (VENTURINI *et al.*, 2007).

2.2.2.2 Hidroximetilfurfural (HMF)

O HMF é um indicador de qualidade que auxilia na identificação das condições inadequadas ou na adulteração do mel com altas concentrações de xarope de açúcar invertido (MAPA, 2000). Além disso, é um dos principais produtos de degradação no mel, sendo o aumento de sua concentração influenciada pelo baixo pH, acidez total, minerais, origem botânica, umidade, temperatura e estresse fotoquímico. A flutuação de HMF em méis monoflorais (ou uniflorais) armazenados à temperatura ambiente, tem sido considerada como um parâmetro muito importante para certificar a qualidade dos méis disponíveis no mercado ou estimar sua estabilidade de prateleira (LE MOS, SANTOS & SANTOS, 2010). A Tabela 3 demonstra os níveis máximos de cada componente permitidos pela legislação brasileira.

Tabela 3 – Níveis máximos permitidos para os componentes presentes no mel unifloral e de melato.

Parâmetros máximos	Mel unifloral	Mel de melato
Açúcares redutores ¹ (g/100 g)	Mínimo 65	Mínimo 60
Sacarose aparente ¹ (g/100 g)	6	15
Umidade (%) ¹	20	20
Sólidos insolúveis ² (g/100 g)	0,1	0,5
Cinzas ² (g/100 g)	0,6	1,2
Hidroximetilfurfural ³ (mg kg ⁻¹)	60	60
Acidez livre (mEq kg ⁻¹) ³	50	50
Atividade diastática ³	8	8

¹Refere-se ao estágio de maturação do mel. ²A pureza do mel. ³Ao grau de deterioração do mel. Fonte: MAPA, 2000.

2.2.2.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH determinado no mel refere-se aos íons hidrogênio presentes em uma solução e pode influenciar na formação de outros componentes, como na velocidade de produção do hidroximetilfurfural. Em geral, todos os méis apresentam pH baixo, sendo formados por ácidos orgânicos, alguns voláteis e outros inorgânicos. Esta

característica pode ser influenciada pela sua origem, sendo geralmente inferior a 4,0 para mel de origem floral e superior a 4,5 para os méis de melato (CARVALHO *et al.*, 2005). Pode ainda ser influenciado pela concentração de diferentes ácidos, de cálcio, sódio, potássio e outros constituintes minerais (SEEMANN & NEIRA, 1988).

Os méis brasileiros obtidos da espécie de abelha *Apis mellifera* possuem o valor de pH variando de 3,2 a 4,6, enquanto os de *meliponíneos* oscilam de 3,2 a 4,8 (CARVALHO *et al.*, 2005).

2.2.2.4 Açúcares

Em relação aos açúcares, elevadas concentrações são responsáveis pelas diversas propriedades físicas e químicas do mel, tais como viscosidade, densidade, higroscopicidade e capacidade de granulação (cristalização) (FINCO, MOURA & SILVA, 2010).

Os açúcares encontrados no mel são: glicose, frutose, sacarose, maltose, isomaltotetraose, maltulose, isomaltulose, nigerose, turanose, cojibiose, neotrehalose, gentiobiose, laminaribiose, leucrose, melesitose, rafinose, isopanose, isomaltetraose, G- α -glicosilsacarose, arabogalactomanose, erlose, dextrantriose, maltotriose, isomaltopentose, centose, 1-cestose, panose, isomaltotriose e 3-a-isomaltosilglicose (CARVALHO *et al.*, 2005). A fração monossacarídica dominante no mel é composta pelos açúcares redutores glicose e frutose, com valores médios de 32,3 e 39,3 g/100 g, respectivamente (MOREIRA & DE MARIA, 2001). Os demais açúcares são representados por dissacarídeos e trissacarídeos. Dentre os dissacarídeos, a sacarose representa em média 2 a 3% dos carboidratos para os méis de *Apis* e quando superior a este valor, geralmente indica um mel verde ou adulterado (WHITE, 1979).

2.2.2.5 Minerais ou cinzas

O conteúdo de cinzas é o critério de qualidade para origem botânica do mel, pois expressa os minerais presentes. Os sais minerais encontrados no mel podem ser modificados por fatores relativos às abelhas, apicultor, clima, solo e origem botânica, sendo que o mel floral tem um menor conteúdo de cinzas em relação ao mel de melato. Atualmente, esta medida é substituída pela medida da condutividade

elétrica. No entanto, o conteúdo de cinzas pode ser mantido como um fator de qualidade durante o período de transição, até que a condutividade seja aceita como padrão mundialmente (BANKOVA *et al.*, 2002).

O mel contém a maioria dos elementos químicos essenciais para o organismo, desta forma a sua inclusão na dieta diária ajudaria a eliminar a deficiência por sais minerais. Inúmeros elementos químicos já foram identificados: potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), magnésio (Mg), manganês (Mn), titânio (Ti), cobalto (Co), molibdênio (Mo), ferro (Fe), cobre (Cu), lítio (Li), níquel (Ni), chumbo (Pb), estanho (Sn), zinco (Zn), ósmio (Os), bário (Ba), gálio (Ga), bismuto (Bi), prata (Ag), ouro (Au), germânio (Ge), estrôncio (Sr), berílio (Be) e vanádio (Va) (WHITE, 1979). Apesar de estarem presentes em pequenas porcentagens no mel, os minerais são considerados importantes do ponto de vista nutricional por serem encontrados na forma diretamente assimilável. Estes minerais ainda possuem influência sobre a coloração do mel, estando presentes em maior concentração nos méis escuros em comparação com os mais claros (CARVALHO *et al.*, 2005).

2.2.2.6 Acidez

A origem da acidez no mel deve-se à variação dos ácidos orgânicos causada pelas diferentes fontes de néctar ou pela ação da enzima glicose oxidase sobre a glicose, originando o ácido glicônico. A ação desta enzima se mantém mesmo durante o armazenamento, pois permanece em atividade no mel mesmo após o processamento (MENDES *et al.*, 2009).

2.2.2.7 Sólidos insolúveis e atividade diastática

A diastase é uma das enzimas do mel que tem a função de digerir a molécula de amido, sendo muito sensível ao calor, podendo assim indicar o grau de conservação e superaquecimento do produto (WHITE, 1992; WHITE, 1994). A ausência da mesma reflete procedimentos e/ou adulterações realizadas no mel, tal como uso de temperatura acima de 60 °C durante o processamento, adição de açúcar invertido ou condições de armazenamento inadequadas (tempo acima de seis meses e temperaturas elevadas). A atividade diastática diminui devido à desnaturação parcial ou total das amilases (MENDES *et al.*, 2009).

Os sólidos insolúveis são as partículas do mel maiores que 15,4 μm de diâmetro e que não são solúveis em água a 80 °C. As partículas inerentes ao mel que compõem os sólidos insolúveis devem estar presentes em quantidades inferiores a 0,1%, exceto no mel prensado (mel obtido por prensagem dos favos) que se tolera até 0,5% (MAPA, 2000).

2.2.2.8 Índice de formol

O índice de formol é importante no mel por representar, predominantemente, os compostos aminados, permitindo assim, avaliar o seu conteúdo em peptídeos, proteínas e aminoácidos. Trata-se de um indicativo da presença de nitrogênio, sendo utilizado para a comprovação da autenticidade do mel. Quando o valor obtido é muito baixo pode indicar a presença de xaropes. Em contrapartida, quando excessivamente alto, mostra que as abelhas foram alimentadas com hidrolisado de proteína (CARVALHO *et al.*, 2005).

2.2.2.9 Viscosidade e condutividade elétrica

A viscosidade, assim como outras propriedades físico-químicas do mel, depende de muitos fatores, incluindo a composição, a temperatura e o conteúdo de água. Geralmente a viscosidade decresce com o aumento da quantidade de água (ABU-JDAYIL *et al.*, 2002). Observa-se que o mel pode fluir três vezes mais rapidamente com a elevação de 7 °C na temperatura (CRANE, 1983; ABU-JDAYIL *et al.*, 2002). Alguns méis possuem propriedade de fluxo anormal (não newtonianos). Os méis provenientes de floradas de *Calluna vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Trifolium repens* e *Leptospermum scoparium* na Nova Zelândia e *Carvia callosa* na Índia, são bem conhecidos por sua consistência parecida com gel. Normalmente eles fluem de forma suficiente em um extrator centrífugo, propriedade conhecida como tixotropia (mudança de viscosidade) a qual ocorre devido ao conteúdo de 0,5 a 1% de proteína no mel (MUNROE, 1943; CRANE, 1983).

A condutividade elétrica tem sido utilizada para indicação da sua adulteração e como método suplementar de determinação da sua origem, isto é, se formado de néctar ou de melato (AGANIN, 1971; CRANE, 1983).

2.2.3 Cor

A cor do mel é uma característica sensorial de fator determinante no mercado mundial. Há uma tendência dos méis claros serem os preferidos pelos consumidores, apresentando assim um maior valor comercial em relação aos escuros. Já, o sabor e o aroma dos méis, bem como de qualquer outro gênero alimentício, são muito mais difíceis de serem avaliados quantitativamente. Existe uma relação imperfeita entre a cor e o sabor, pois se acredita que os méis com sabor agradável são sempre claros, enquanto que os méis escuros têm, normalmente, um sabor forte (WOOTTON, EDWARDS & FARAJI-HAREMI, 1976; CRANE, 1983; GONZÁLES, BURIN & BUERA, 1999).

Durante o armazenamento pode ocorrer o escurecimento do mel e, paralelamente, mudanças em suas propriedades organolépticas, influenciando na sua qualidade e aromas originais (AUBERT & GONNET, 1983). De acordo com MILUM (1948), o escurecimento do mel durante a estocagem depende da cor inicial deste produto. Este escurecimento tem relação com a origem botânica, o processamento, o armazenamento, os fatores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura na qual o mel amadurece na colmeia (SMITH, 1967; SEEMANN & NEIRA, 1988).

A coloração do mel depende quase que exclusivamente da origem floral, podendo variar de claro, vermelho, dourado ou escuro, conforme pode ser observado na Figura 2. Como mencionado anteriormente, quanto mais escuro a coloração do mel, maior o teor de minerais presentes (VENTURINI, SARCINELLI & SILVA, 2007).



Figura 2 – Variedades de cores de mel que podem ser encontradas.

Outros componentes do mel também são determinantes para o escurecimento deste produto, como: proporção de frutose/glicose, conteúdo de nitrogênio e aminoácidos livres, substâncias polifenólicas na forma de sais de ferro, conteúdo de minerais e instabilidade da frutose em solução ácida (SCHADE, MARSH & LECKERT, 1958; BATH & SINGH, 1999).

2.3 Processo de obtenção do mel

O mel é extraído dos favos com o auxílio de alguns equipamentos especiais, sob um processo de higiene e qualidade a serem seguidos (REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL 56/99), Figura 3.

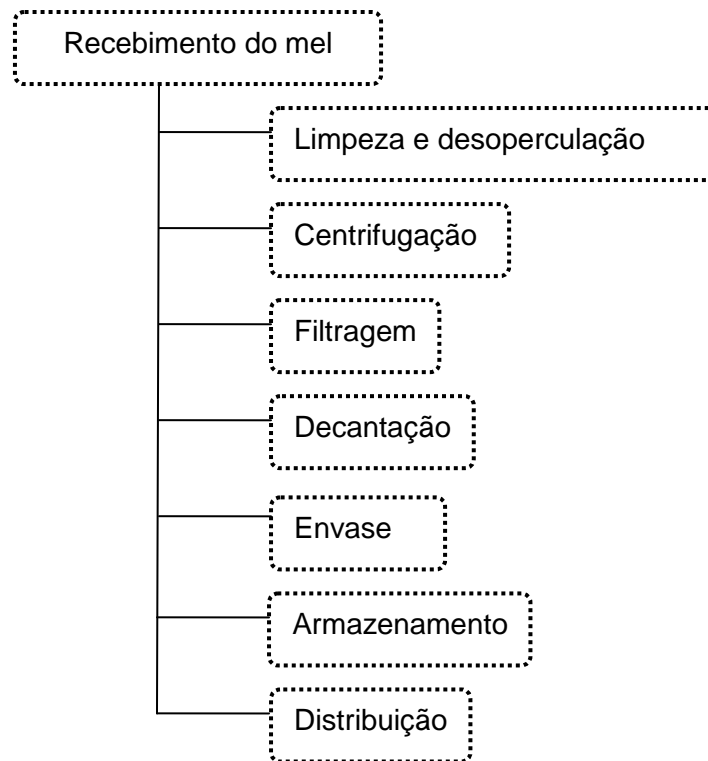


Figura 3 – Fluxograma representativo das etapas envolvidas durante o processamento do mel.

Os principais equipamentos utilizados são: mesa desoperculadora, centrífuga, peneiras e decantador. O mel deve ser armazenado em condições adequadas, em relação à higiene do ambiente e, principalmente, em relação ao controle da temperatura (REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL 56/99). Recomenda-se a utilização de embalagens de vidro ou plásticas, sendo que o vidro é o único

recipiente aceito para a exportação e para a certificação orgânica. As embalagens devem estar totalmente fechadas e na rotulagem deve constar a identificação da vida útil do produto juntamente com a expressão: “Condições de conservação: manter em lugar fresco” (VENTURINI, SARCINELLI & SILVA, 2007).

2.4 Agrotóxicos

O termo agrotóxico, segundo o *Codex Alimentarius*, refere-se a qualquer substância ou mistura que tenha como objetivo prevenir, destruir ou controlar qualquer tipo de praga incluindo espécies de plantas ou animais presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos ou rações animais. O termo inclui substâncias utilizadas como reguladores de crescimento para plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes promotores de amadurecimento de frutos, inibidores de germinação e substâncias que são aplicadas aos grãos antes e depois da colheita para evitar a deterioração do alimento durante o armazenamento e transporte (FAO, 2005). Podem ser classificados em: inseticidas (combatem os insetos), herbicidas (plantas daninhas), fungicidas (fungos), acaricidas (ácaros), moluscocidas (moluscos), rodenticidas (bactérias), entre outros (BAIRD, 2002).

Há décadas os agrotóxicos têm sido utilizados no domínio agrícola para proteger as culturas por meio do controle de pragas e doenças, a fim de garantir boas produções e de alta qualidade. Se utilizados como recomendados, os produtos químicos e seus resíduos não devem provocar efeitos tóxicos. Por outro lado, uma má aplicação com relação à dose, forma de pulverização, concentração e período de aplicação, pode causar a contaminação de diferentes matrizes ambientais, tais como, ar, água ou o próprio solo, plantas, além de espécies animais, como consequência da migração desses compostos (GARCÍA-CHAO *et al.*, 2010).

Embora o emprego de agrotóxicos na agricultura apresente benefícios econômicos, uma vez que auxiliam na qualidade da produção, estas substâncias podem causar diversos efeitos nocivos ao homem, quando presentes nos alimentos. Podem-se citar diversos tipos de câncer, danos ao sistema nervoso central, problemas no sistema reprodutivo e locomotor, deficiência mental, entre outros (BORGES, FIGUEIREDO & QUEIROZ, cap. 24, 2015).

Em relação às características físico-químicas, os agrotóxicos são consideravelmente diferentes, uma vez que podem apresentar caráter ácido, básico e neutro. Os valores de pKa (constante de dissociação ácida) têm efeito sobre a solubilidade do agrotóxico e, através do pKa do composto e do pH do solo é possível prever a forma predominante (ionizável ou molecular) de um agrotóxico ácido e a mesma relação pode ser obtida usando pKb (constante de dissociação básica) para agrotóxicos básicos (BARCELÓ & HENNION, 2003). Quanto maior o valor do pKa, mais fraco é o ácido e menor a ionização do mesmo (CALDAS, ZANELLA & PRIMEL, 2011).

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). 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). A Tabela 4 apresenta os LMRs definidos pelo PNCRC (MAPA, 2013) e pela EU (União Europeia, do inglês *European Union*) para mel.

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 MAPA, que visa garantir a saúde do consumidor por meio de um monitoramento da presença de resíduos de antibióticos, agrotóxicos e contaminantes ambientais em produtos de origem animal, tais como, carnes, leite, pescado e mel (MAPA, 2013). As ações deste plano estão direcionadas a fim de conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos LMRs de substâncias com uso autorizado, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país (MAPA, 2010).

Tabela 4 – Limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos para mel pelo PNCRC (Brasil) e União Europeia (EU).

Compostos	LMR (mg kg ⁻¹)		Compostos	LMR (mg kg ⁻¹)	
	PNCRC	EU		PNCRC	EU
Acefato		0,02	Malationa		0,02
Acetamiprido		0,05	Mepanipirim		0,05
Atrazina			Mepronil		
Azinfós etílico			Metacrifós		
Azinfós metílico			Metalaxil		0,05
Azoxistrobina		0,01	Metidationa		0,02
Boscalida		0,5	Metolaclor		
Bromofós etílico			Metsulfuron metílico		
Carbaril	0,02		Mevinfós		
Carbendazim		1	Monolinurom		
Carbofuram	0,05	0,01	Ometoato		
Carbofuram 3-OH			Oxadixil		0,01
Carboxim			Paraoxon etílico		
Ciproconazol		0,05	Penconazol		
Cloranfenicol	0,0003		Picoxistrobina		
Clorpirifós etílico	0,02		Piraclostrobina		0,05
Clorpirifós metílico			Pirazofós		
Clotianidina		0,01	Piridato		0,05
Diclorvós			Primetanil		0,05
Dietofencarbe			Pirimicarbe		0,05
Difenoconazol		0,05	Pirimifós etílico		
Dimetoato	0,02		Pirimifós metílico	0,05	
Dimoxistrobina		0,05	Profenofós	0,02	0,01
Diniconazol		0,01	Profoxidim		
Diuron		0,05	Propargito		
Emamectina benzoato		0,05	Propoxur		
Epoxiconazol		0,05	Salinomicina		
Eritromicina ABC	0,01		Simazina		
Etofenprox		0,05	Sulfacloropiridazina		
Etrimfós			Sulfadiazina		
Fempropatrina	0,01		Sulfadimetoxina	0,05	
Fempropimorfe			Sulfametazina	0,05	
Fenarimol			Sulfametoxazol		
Fipronil		0,01	Sulfaquinoxalina		
Flusilazol		0,05	Sulfatiazol	0,05	
Flutolanil		0,02	Tebuconazol		0,05
Fluvalinato			Terbutilazina		
Fosmet			Tiacloprido		0,2
Furazolidona	0,001		Tiametoxam		0,01
Hexaconazol			Tilosina	0,01	
Imazalil		0,05	Tolclofós metílico		0,05

Imidacloprido	0,05	Triadimefon	0,1
Iprovalicarbe	0,05	Triazofós	0,01
Isoxaflutol		Triclorfom	0,01
Lincomicina cloridrato		Trifloxistrobina	0,04
Linurom		Triflumizol	

Fonte: MAPA, 2013; EC; EU pesticides database, 2015.

Muitos compostos não apresentam valores de LMR estabelecidos pelas legislações, pois não são permitidos. Assim, alguns países adotam limites próprios, como é o caso da Bélgica que estabeleceu LMRs para as sulfonamidas, lincomicina, tilosina e cloranfenicol e a França para tilosina (REYBROECK *et al.*, 2012), utilizados para tratar doenças causadas por bactérias em abelhas, com consequente contaminação do mel.

Deve-se ressaltar a importância do PNCRC para o país, visto que o não cumprimento das metas anuais previstas para o controle de resíduos acarreta sérios problemas e embargos nas exportações para os principais parceiros comerciais de União Europeia e Estados Unidos, sob a alegação de falhas no sistema de monitoramento desses resíduos (SPISSO, NÓBREGA & MARQUES, 2009).

A maioria dos agrotóxicos é nociva para as abelhas em determinada concentração, principalmente os inseticidas, que são os mais susceptíveis a causar a morte desses insetos, enquanto que os herbicidas e fungicidas representam um perigo menor (LOZOWICKA, 2013).

A União Europeia não aceita o uso de antibióticos na apicultura, da mesma forma há uma política de tolerância zero para esses resíduos em mel. Contudo, algumas organizações, tais como a *United States Food and Drug Administration* (US-FDA) e a Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (do inglês, *Canadian Food Inspection Agency* – CFIA) seguem o uso de vários antibióticos para o tratamento de doenças bacterianas.

A Diretiva da União Europeia 2377/90 possui anexos de que o mel deve ser livre da contaminação por antibióticos. Então, méis contendo essas substâncias não podem ser vendidos na maioria dos países da União Europeia, assim como não há LMR para antibióticos estabelecidos. Em alguns países, como Suíça e Bélgica, os LMRs são estabelecidos por classe de antibióticos, que variam na faixa de 10 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ORMEÑO, GOLDSTEIN & NIINEMETS, 2011).

Os LMRs para agrotóxicos legalmente permitidos em mel, são estabelecidos por diferentes normas nacionais. Países como Alemanha, Itália e Suíça estabeleceram LMRs para amitraz, bromopropilato, coumafós, ciamizol, flumetralina e fluvalinato, os quais oscilam entre 0,01 e 0,1 mg kg⁻¹ na Alemanha; 5 e 500 mg kg⁻¹ na Suíça e 10 mg kg⁻¹ na Itália (RISSATO *et al.*, 2007).

2.4.1 Neonicotinóides

Os neonicotinóides são uma classe relativamente nova de inseticidas quimicamente relacionados à nicotina. Em menos de 20 anos tornou-se a classe de inseticida amplamente utilizada, eles são destinados para o tratamento de girassol, milho, soja, canola, algodão, batata, arroz, açúcar, beterrabas, plantas ornamentais, viveiros de árvores e frutas (JOVANOVA *et al.*, 2015).

A exposição do mel aos neonicotinóides pode levar a contaminação dos produtos apícolas, especialmente o mel, mais comumente consumido, causando potencial ameaça à saúde humana (GBYLIK-SIKORSKA *et al.*, 2015). Dentre os neonicotinóides, o imidacloprido, o tiametoxam e a clotianidina são os mais preocupantes devido à contaminação direta às abelhas, através do forrageamento nas flores das culturas agrícolas, afetando a percepção gustativa, o olfato e a atividade motora desses insetos. Além disso, é a classe de agrotóxicos apontada como os principais causadores da desordem do colapso da colônia (CCD, do inglês *Colony Collapse Disorder*), o qual provoca o desaparecimento e a mortalidade de um grande número de abelhas (LAYCOCK *et al.*, 2013).

2.4.2 Organofosforados e carbamatos

Os agrotóxicos organofosforados são um dos mais encontrados, segundo estudo realizado no Reino Unido, com resíduos em aproximadamente 40% das amostras de mel analisadas. Dentre os compostos frequentemente presentes nas amostras de mel analisadas estão o acefato, clorpirifós e malationa. Os inseticidas organofosforados e carbamatos atuam por meio de toxinas inibidoras da acetilcolinesterase, enzima que participa da transmissão do impulso elétrico entre duas células nervosas. Esses agrotóxicos afetam a habilidade das abelhas se comunicarem na busca por alimentos (LIMA & ROCHA, 2012).

2.4.3 Triazina e estrobilurina

São fungicidas muito utilizados em culturas de trigo, soja e café. Fazem parte de grupos químicos muito encontrados e discutidos em análises de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, em decorrência da contaminação indireta das abelhas com esses compostos, através da polinização dessas culturas. Alguns dos compostos avaliados nesse trabalho, pertencentes a esse grupo são: atrazina e simazina (triazina), azoxistrobina e dimoxistrobina (estrobilurina) (FACCHINI, 2012).

2.5 Antibióticos

A ANVISA classifica antibiótico como uma substância que previne a proliferação de agentes infecciosos ou microrganismos ou que mata agentes infecciosos para prevenir a disseminação da infecção (ANVISA, 2011b).

Os antibióticos são usados no tratamento de abelhas com o intuito de combater infecções associadas às doenças Loque Americana e Loque Europeia, do inglês *American foulbrood* (AFB) e *European foulbrood* (EFB), respectivamente. Os antibióticos usualmente empregados na apicultura para o controle da AFB, a qual o organismo causador é a bactéria *Paenibacillus larvae subsp. larvae* e a EFB, causada pela bactéria *Melissococcus pluton*, são a oxitetraciclina e as sulfonamidas (SAs). Recentemente, foram evidenciadas resistência ao tratamento com esses antibióticos, pois esses criam resíduos no mel, os quais poderão impossibilitar a sua comercialização devido à rejeição pelo comprador e pela não indicação dos seus limites no Regulamento (CE) 2377/90 (BENETTI *et al.*, 2004).

Em termos de saúde pública, a problemática dos antibióticos deve-se à sua estabilidade por longos períodos de tempo no mel, com possíveis reações alérgicas em indivíduos susceptíveis. Os resíduos de antibióticos mais encontrados no mel são tetraciclina, sulfonamidas, estreptomicina, cloranfenicol, nitrofuranos e tilosina (BOGDANOV, 2006).

Os antibióticos veiculados por xarope apresentam maiores riscos de contaminação do mel em relação à pulverização, devido à rápida disseminação do primeiro pela colônia (MARTEL *et al.*, 2006). O pulverizado não é tão apetecível para as abelhas e fica depositado na parte superior dos quadros do ninho (THOMPSON *et al.*, 2006). Como a legislação europeia proíbe a comercialização do mel contendo

quaisquer resíduos de antibióticos, a implantação de métodos analíticos que permitam a detecção e quantificação destes resíduos é fundamental.

Os antibióticos, na sua maioria, atuam como promotores do crescimento e têm sido utilizados de forma indevida, levando principalmente ao desenvolvimento de resistência microbiana no homem. Em geral, animais que são alimentados com antibióticos ganham peso mais rápido, são menos suscetíveis a infecções bacterianas e apresentam maior eficiência alimentar (MARTINS-RAMOS, BORTOLUZZI & MANTOVANI, 2010).

Abaixo estão descritas algumas das classes de agentes antimicrobianos mais utilizados na apicultura, bem como, a finalidade do tratamento, a estabilidade desses antimicrobianos nas colmeias e as consequências provocadas por cada uma dessas classes, tanto para as abelhas, mas principalmente aos consumidores de mel de abelha.

2.5.1 Sulfonamidas

As sulfonamidas (SAs) são agentes antimicrobianos amplamente utilizados na produção alimentícia animal como promotor do crescimento, bem como para propósitos terapêuticos e profiláticos, com emprego na medicina veterinária e humana (THOMPSON *et al.*, 2006). Na manutenção das abelhas, as SAs são frequentemente usadas para tratar as colmeias e combater as doenças, principalmente a AFB, a EFB (THOMPSON & NOOT, 2005) e o ácaro parasita *Varroa jacobsonii* (FORSGREN, 2010). O sulfatiazol é o mais aplicado na criação de abelhas para protegê-las dessas doenças e diminuir a taxa de mortalidade, aumentando a produção de mel (ZHOU *et al.*, 2013).

Por outro lado, os resíduos de SAs em alimentos de origem animal em alta concentração são muito prejudiciais à saúde humana, podendo levar ao desenvolvimento de resistência a doenças. Da mesma forma, a determinação desses resíduos em alimentos é de alto interesse, devido ao seu potencial de caráter carcinogênico e a possibilidade de desenvolvimento de resistência dos antibióticos em seres humanos (BEDENDO, JARDIM & CARASEK, 2010).

Os limites para SAs são estabelecidos em mel pela União Europeia, na ordem de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, embora alguns países possuam limites de ação ou níveis tolerados, como a Bélgica, que possui limite mínimo de performance requerido (LMPR, do

inglês *minimum required performance limit*) de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O estudo de degradação das SAs em mel, realizado através de pesquisas, demonstrou a persistência desses compostos nas amostras após 1 ano de aplicação (REYBROECK *et al.*, 2012).

O procedimento de determinação de SAs em mel tem por objetivo liberar as formas de ligações livres desses compostos, para assim promover recuperações satisfatórias nas análises (SHERIDAN *et al.*, 2008). As SAs avaliadas neste trabalho foram: sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfacloropiridazina, sulfadiazina, sulfaquinoxalina e sulfadimetoxina.

2.5.2 Eritromicina e estreptomicina

A eritromicina, principal representante dos macrolídeos, é produzida pelo *Streptomyces erythreus* e é empregada no tratamento de doenças em abelhas (REYBROECK *et al.*, 2012).

A estreptomicina é um antibiótico aminoglicosídeo utilizado na apicultura para proteger as abelhas contra uma variedade de doenças. Apesar de não ser autorizado em muitos países, como Estados Unidos e União Europeia, seu uso é proposto em manuais de apicultura para tratar a AFB (REYBROECK *et al.*, 2012).

Os LMPRs para estreptomicina e eritromicina estabelecidos pela Bélgica, França e União Europeia são de 20, 10 e 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A estabilidade da estreptomicina, segundo alguns estudos, varia de quatro a seis meses, com amostras de mel armazenadas a temperatura ambiente (REYBROECK *et al.*, 2012).

2.5.3 Lincomicina e tilosina

As lincosamidas, representadas pela lincomicina (produzida pelo *Streptomyces lincolensis*) e o seu derivado de cloro, a clindamicina, impedem a união dos aminoácidos pela inibição da peptidiltransferase bacteriana (REYBROECK *et al.*, 2012). A lincomicina, juntamente com a tilosina foram testadas e aprovadas para o controle da AFB, quando aplicadas nas colônias de mel de abelha (REYBROECK *et al.*, 2012).

A tilosina, um antibiótico macrolídeo, tem sido utilizada na apicultura e referenciada por muitos autores na literatura. O teste de estabilidade indicou maior

estabilidade da tilosina ao ser adicionado em xarope de açúcar em relação às oxitetraciclinas para o tratamento da AFB. O seu uso deve ser interrompido por pelo menos quatro semanas antes de obtenção do mel da colmeia (REYBROECK *et al.*, 2012).

Os LMPRs para lincomicina e tilosina estabelecidos pela Bélgica são de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; na França a lincomicina não é permitida, enquanto a tilosina é recomendada no nível de 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$; e na União Européia, os LMPRs para a tilosina é de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A degradação da tilosina (tilosina A) ocorre em meio ácido para produzir o produto de degradação antimicrobiano ativo, a desmicosina (tilosina B), com um tempo de meia-vida de aproximadamente quatro meses, a 34 °C, e a soma de ambas diminuem ao longo de 9 meses. Por outro lado, a lincomicina apresenta uma persistência alta na colmeia, ao longo de aproximadamente 10 meses após a aplicação (REYBROECK *et al.*, 2012).

2.5.4 Cloranfenicol

O cloranfenicol (CAP) é um potente antibiótico de amplo espectro. Devido à sua ação carcinogênica, foi banido na União Europeia desde 1994 para uso em alimentos de origem animal, incluindo o mel de abelha. O consumo de alimentos contendo resíduos de CAP pode provocar distúrbio sanguíneo com risco de vida, chamado anemia aplástica (REYBROECK *et al.*, 2012).

O LMPR para o CAP foi definido com o valor de 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na Bélgica e 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na União Europeia. Na França o seu uso não é permitido. Em relação à estabilidade, o CAP e seu metabólito glucoronido são estáveis em solvente e na matriz, à temperatura ambiente por, pelo menos, cinco meses (REYBROECK *et al.*, 2012).

2.6 Ocorrências de resíduos de antibióticos e agrotóxicos no mel

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

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos no mel auxilia na avaliação do potencial de risco destes produtos à saúde do consumidor (RISSATO *et al.*, 2006). A determinação desses resíduos em mel e em outros produtos das abelhas tem se tornado crescente, especialmente porque estes compostos podem diminuir as propriedades benéficas do mel e, em quantidades significantes, podem representar uma grave ameaça à saúde humana (KUJAWSKI & NAMIEŚNIK, 2011).

Alguns inseticidas sistêmicos são utilizados como alternativa aos compostos organofosforados e carbamatos metílicos, tais como o fipronil, imidacloprido e tiametoxam. Esses compostos são prejudiciais para as abelhas, insetos não-alvo, as quais podem ser contaminadas durante a polinização de diferentes culturas, como milho, quando ocorre a coleta de néctar e pólen das flores. Além disso, esses produtos químicos tóxicos podem ser introduzidos na cadeia alimentar afetando a saúde humana (GARCÍA-CHAO *et al.*, 2010).

Da mesma forma que os agrotóxicos, o uso de antibióticos se acentuou. Estudos apontam o início da aplicação na apicultura em 1940, situação na qual sulfonamidas, nitrofuranos e macrolídeos já eram utilizados pelos apicultores para prevenir e combater doenças nas abelhas mellíferas (ORMEÑO, GOLDSTEIN & NIINEMETS, 2011).

O mel de abelha pode ser usado para o monitoramento ambiental por ser um bom indicador biológico devido a dois sinais: mortalidade das abelhas e a presença de resíduos em seus corpos, bem como, os produtos da colmeia que podem ser detectados por análises laboratoriais (ORMEÑO, GOLDSTEIN & NIINEMETS, 2011). Em torno de 10 a 25 mil abelhas operárias percorrem, todos os dias, 7 km² em áreas próximas a colmeias, garantindo néctar, água e pólen pelas flores. Durante esse processo, vários microrganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados por elas, os quais ficam retidos na superfície de seu corpo por inalação e fixação (RISSATO *et al.*, 2006; RISSATO *et al.*, 2004).

Esse fato vem atingindo centenas de colônias de abelhas, sendo que no ano de 2006, o fenômeno do colapso de colônias causou prejuízos sem precedentes nos Estados Unidos. No início de 2007, apicultores europeus observaram algo semelhante na Bélgica, França, Holanda, Grécia, Itália, Portugal, Espanha e também na Suíça e Alemanha, embora em menor grau. Esse fenômeno foi denominado desordem do colapso da colônia (DCC) e é caracterizado pela perda rápida e inexplicável da população adulta de uma colmeia (WU *et al.*, 2012). Diversos fatores

já foram apontados como responsáveis por esse evento, tais como, um novo patógeno ou parasita, envenenamento por agrotóxicos, fatores estressantes que possam comprometer o sistema imunológico das abelhas, entre outros (LIMA & ROCHA, 2012). Porém, dados atuais atribuem esse fato ao uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura, e as abelhas, embora elas não sejam o alvo desses agentes tóxicos, são altamente vulneráveis à contaminação por forragear áreas agrícolas contaminadas (DIÁRIO DIGITAL, 2013; BARLAVENTO, 2013; AMBIENTE BRASIL, 2013).

Dessa forma, torna-se essencial, tanto pelo risco a saúde humana quanto economicamente, abordagens com diferentes métodos de extração que visam determinar o conteúdo desses resíduos, sejam eles antibióticos ou agrotóxicos, em mel. Para tal, observa-se a necessidade da utilização de testes de varredura e metodologias analíticas que forneçam informações qualitativas e quantitativas, capazes de identificar e quantificar os analitos presentes em determinada amostra.

2.7 A análise cromatográfica na determinação de resíduos de agrotóxicos e antibióticos

Em virtude da crescente preocupação com relação à presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, diferentes metodologias para determinação desses resíduos são realizadas através da análise cromatográfica. Tanto a cromatografia gasosa, quanto a líquida são amplamente utilizadas, porém a cromatografia líquida alavancou o desenvolvimento de técnicas cromatográficas, a fim de acompanhar as necessidades analíticas para determinações rápidas e seletivas em matrizes complexas (QUEIROZ, FERRACINI & ROSA, 2012).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tornando-se muito utilizada e com bom desempenho analítico. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas reúne vantagens como: alta seletividade e eficiência de separação por parte da cromatografia, além da obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade oriundas da espectrometria de massas (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. Os analitos podem ser ionizados termicamente, por campo elétrico ou por impacto de elétrons energéticos, íons ou fótons. É uma técnica analítica eficaz para quantificar compostos conhecidos e identificar compostos desconhecidos de uma amostra (GROSS, 2004).

As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) foram baseadas no impacto de eletrônico (EI, do inglês *electron impact*) e na ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*), empregadas com sucesso na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) (LANÇAS, 2009). No processo de ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray*), a amostra é dissolvida e pressurizada em um tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar a pressão atmosférica, na forma de um aerossol. À medida que ocorre a dessolvatação, assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂), o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas originais. Uma série de explosões passa a ocorrer com consequente produção de 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. É ideal para análise de moléculas mais polares e de maior massa molecular (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008).

2.7.1 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

O procedimento analítico de uma análise multirresíduo envolve diferentes etapas, incluindo varredura, quantificação e confirmação dos analitos. Esta abordagem abrange um grande número de compostos de interesse que necessitam:

- Ser monitorados, sendo que há muitos analitos de baixa concentração;
- Necessidade para confirmação, elucidação estrutural e /ou identificação;
- Analisar matrizes de alta complexidade contendo os analitos de interesse.

Neste contexto, a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS), representa algumas vantagens em relação à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (HPLC-MS/MS, do inglês *high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) como, por exemplo, a redução do tempo de uma análise multirresíduo. Com um analisador de massas triplo quadrupolo, Figura 4, utilizando-se o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selection reaction monitoring*), tem-se no primeiro estágio, o primeiro quadrupolo (Q1), em que o íon precursor é selecionado e as fragmentações desses íons ocorrem geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision induced dissociation*) na célula de colisão (q2) e os fragmentos específicos são monitorados no terceiro quadrupolo (Q3) para aumentar a sensibilidade e a seletividade da análise (RODRIGUEZ-ALLER *et al.*, 2013).

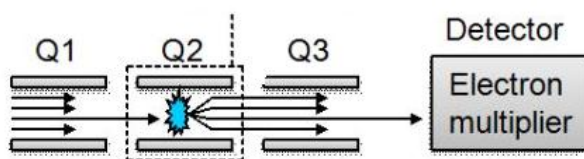


Figura 4 – Esquema de um analisador de massas triplo quadrupolo.

Essa técnica é muito utilizada para análise e detecção de compostos presentes em baixas concentrações em amostras complexas, pois a quantidade de informações a serem obtidas da amostra é maior, comparado com outras técnicas (CHIARADIA, COLLINS & JARDIM, 2008).

2.8 Métodos de preparo de amostras de mel para análise cromatográfica

Os diferentes métodos para preparo de amostras possuem características próprias, cada qual com suas peculiaridades e por isso, essa é a etapa que exige maior atenção e cuidado a fim de obter resultados reprodutíveis, precisos e aptos para serem aplicados em análises de rotina laboratoriais. Algumas das etapas que envolvem esse procedimento resumem-se em realizar a otimização das melhores condições, com posterior validação do método escolhido para o preparo de amostra.

A determinação de resíduos de contaminantes em nível de traço em matrizes complexas, tais como alimentos, requerem preparo das amostras previamente à análise instrumental (PRESTES *et al.*, 2009).

O preparo da amostra deve ser adaptado considerando a instrumentação a ser utilizada e o grau de precisão requerido para análises qualitativas ou quantitativas. Em alguns casos, torna-se necessário o uso do padrão na matriz ou o método de adição padrão, assim como um padrão interno conveniente. Para a determinação de analitos orgânicos em amostras de alimentos, um dos métodos analíticos mais utilizados é a análise cromatográfica combinada com um detector apropriado (RIDGWAY, LALLJIE & SMITH, 2007).

Determinações simultâneas de analitos em alimentos são realizadas com métodos multirresíduos, os quais incluem etapas de limpeza do extrato, pré-concentração, separação e detecção dos compostos de interesse (KENDE *et al.*, 2006). As técnicas mais frequentemente utilizadas para o preparo de amostras de mel são extração em fase sólida e extração com solvente, seguidas por uma etapa de limpeza, a fim de reduzir os interferentes da matriz e aumentar a sensibilidade do método, os quais resultam em valores menores de limite de detecção e de quantificação (KUJAWSKI & NAMIESNIK, 2008).

Na Tabela 5 estão citadas algumas técnicas de preparo da amostra, como extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) com uso de diferentes sorventes e microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), as quais são comumente relatadas em artigos como alternativas para essa etapa.

Tabela 5 – Metodologias utilizadas para determinação de contaminantes em mel.

Compostos analisados	Procedimento de extração/ limpeza	Técnica de análise	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
6 agrotóxicos	SBSE	LC-MS	4-400	75-111	BLASCO <i>et al.</i> , 2004
48 agrotóxicos	SFE	GC-MS	0,8-8,0	76-95	RISSATO, 2006
48 agrotóxicos	SE	GC-MS	0,0015-0,0180	81-103	RISSATO <i>et al.</i> , 2007
15 antibióticos	SPE	LC-MS/MS	0,6-15	45-85	SHERIDAN <i>et al.</i> , 2008
4 agrotóxicos	CME-UAB	GC-MS	0,03-0,47	90-100	FONTANA <i>et al.</i> , 2010
8 agrotóxicos + 2 metabólicos	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS/MS	5-10	60-114	TANNER & CZERWENKA, 2011
15 agrotóxicos	DLLME	GC-ECD + GC-IT-MS	0,15 (GC-ECD) e 0,2 (GC-IT-MS)	86-115 (GC-ECD) e 81-117 (GC-IT-MS)	ZACHARIS <i>et al.</i> , 2012
7 agrotóxicos	DLLME	LC-MS/MS	100	74,3-113,9	JOVANOVIĆ <i>et al.</i> , 2013
30 agrotóxicos	QuEChERS/ d-SPE	LC-MS/MS	2,73-100	80,4-109,5	BARGANSKA <i>et al.</i> , 2013
22 agrotóxicos e metabólitos	QuEChERS/ d-SPE	GC-MS/MS	10-20	71-119	ORSO <i>et al.</i> , 2014
28 agrotóxicos	Ultrassom/ SPE	GC-MS/MS	2,25-4,44	75-102	PANSERI <i>et al.</i> , 2014
27 antibióticos	SPE	LC-MS/MS	0,14-2,5	62-98	GALARINI <i>et al.</i> , 2015

2.9 Validação de métodos analíticos

É a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (INMETRO, 2011). A validação estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico (ANVISA, 2005).

Para a determinação de resíduos de antibióticos em alimentos devem-se levar em consideração os valores de LMR estabelecidos (para as substâncias permitidas). Já para as que não possuem LMR, devem-se tomar como referência os valores estabelecidos em normativas publicadas que estabelecem esses limites (MAPA, 2011).

Os parâmetros de validação devem estar claramente descritos no procedimento documentado e, incluir, quando aplicável: seletividade/especificidade, linearidade, faixa linear e faixa de trabalho, limite de detecção e de quantificação, recuperação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez (INMETRO, 2011). Para os antibióticos, além dos parâmetros citados acima, deve-se avaliar o limite de decisão e a capacidade de detecção do método, segundo a Decisão 2002/657/EC (European Commission Decision, 2002).

2.9.1 Seletividade/especificidade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

O mesmo termo tem sido empregado para especificidade, porém pode-se utilizar somente o termo seletividade, sugerido pela IUPAC, sendo mais apropriado, porque há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância (RIBANI *et al.*, 2004).

2.9.2 Linearidade

É a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo de concentração especificado (MAPA, 2011).

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

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

Sendo: y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico); a = inclinação da curva analítica = sensibilidade; x = concentração; b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$;

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (b). Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2011). São três os tipos possíveis de curva de calibração que podem ser elaboradas (MAPA, 2011):

- Curva de calibração do analito em solução: construída a partir dos padrões de calibração do analito puro em solvente. Este tipo de curva de calibração somente poderá ser utilizado se comprovada a inexistência do efeito de matriz.
- Curva de calibração da matriz branca fortificada: construída a partir da matriz branca fortificada com os padrões de calibração do analito puro.
- Curva de calibração do extrato da matriz branca fortificado: construída a partir do extrato da matriz branca fortificado com os padrões de calibração do analito puro.

2.9.3 Faixa linear e faixa de trabalho

A faixa linear de trabalho deve compreender os valores de LMR ou LMDR por meio da equivalência funcional estabelecida pela curva de calibração (MAPA, 2011). Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2011).

O teste para avaliar a normalidade dos dados analíticos pode ser determinado pelo teste de Anderson-Darling e o teste de Durbin-Watson avalia a independência dos resíduos. Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função que modela a concentração do analito na amostra (INMETRO, 2011).

2.9.4 Avaliação da normalidade

O teste Anderson-darling foi proposto para melhorar a discriminação das extremidades de distribuição, mediante o peso de ambas as extremidades. Eles introduziram também equações de testes estatísticos para medir a discrepância entre duas funções de distribuição (HEO *et al.*, 2013).

A estatística que expressa a distribuição dos dados é a seguinte:

$$A = -n - 1 \div n \varepsilon \sum_{i=1}^n 2i - 1 \ln p_{(i)} + \ln 1 - p_{(n-i+1)}$$

Onde,

$$pi = \phi X_{(i)} - x \div s$$

(2)

Sendo que: ϕ é função distribuição acumulada da distribuição normal padrão; x: média e s: desvio padrão dos valores.

Se os dados apresentarem distribuição normal seu formato será linear, caso contrário apresentará formato de uma curvatura. O método dos mínimos quadrados ponderados, um caso particular dos mínimos quadrados generalizados, normalmente é recomendado para dados heteroscedásticos (SOUZA &

JUNQUEIRA, 2005). Além de Anderson-Darling, outros testes estatísticos podem ser feitos para avaliar a normalidade em uma distribuição de dados, tais como: Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov.

2.9.5 Avaliação da independência

O teste estatístico de Durbin-Watson testa a hipótese nula de que os resíduos de uma regressão dos mínimos quadrados ordinários não são autocorrelacionados. Essa estatística varia de 0 a 4, o valor para aleatoriedade é em torno de dois, quando forem menores é indicativo de autocorrelação positiva e quando for maior que dois é indicativo de autocorrelação negativa (WINDIG, 2005; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Esse teste é utilizado para detectar a presença de autocorrelação (dependência) nos resíduos de uma análise de regressão. Este teste é baseado na suposição de que os erros no modelo de regressão são gerados por um processo autoregressivo de primeira ordem, de acordo com a seguinte equação:

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (3)$$

Assumindo que os resíduos e_i são variáveis independentes, a autocorrelação entre os resíduos $\rho_s = 0$. Para cada conjunto de dados, existem dois limites críticos, d_L (limite inferior) e d_U (limite superior). Se o valor calculado d estiver entre esses limites, o teste é inconclusivo. Valor de $d < d_L$ indicam autocorrelação e valores de $d > d_U$ indica independência dos resíduos (WINDIG, 2005).

2.9.6 Efeito matriz

O efeito matriz tem por objetivo averiguar possíveis interferências da matriz, causadas por substâncias que a constituem e provocam efeitos na análise cromatográfica, relacionados a resposta instrumental (MAPA, 2011).

Esse efeito é observado pelo aumento de sinal (efeito positivo) ou decréscimo do sinal analítico (efeito negativo), para um determinado composto presente no extrato da matriz, comparado com o sinal analítico obtido para o mesmo composto

em solvente orgânico. Esse efeito começa a exercer influência nas análises quando o resultado for superior a 20% (FERRER *et al.*, 2011).

Diferentes espécies podem resultar na supressão de íons, tais como, espécies endógenas, presentes em componentes de amostras mesmo após as etapas de extração e limpeza. Substâncias coextraídas podem também afetar a intensidade do íon do analito quando formam adutos ou reagem com o analito na interface do sistema cromatográfico. Na detecção por espectrometria de massas, pode-se afirmar que quando as espécies são ionizadas no modo negativo, esse está sob influência de uma menor supressão dos íons, por ser mais seletivo e por ter relativamente um menor número de compostos passando por esse modo (GOSETTI *et al.*, 2010).

2.9.7 Precisão

A precisão caracteriza o grau de concordância entre valores medidos obtidos pela reprodução de medidas de mesmos objetos ou semelhantes, sob condições específicas. Em termos de avaliação da precisão do método, dois tipos de precisão são amplamente utilizados: a repetibilidade (precisão intra-ensaio) e a precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial, precisão entre corridas) (KRUIVE *et al.*, 2015).

É possível determinar a repetibilidade e a precisão intermediária simultaneamente. Subamostras de amostras de interesse podem ser analisadas em replicatas sob condições de repetibilidade através de um número diferente de corridas, enquanto variam-se as condições entre as corridas (dias, analistas e equipamentos) (KRUIVE *et al.*, 2015).

2.9.7.1 Repetibilidade

Nos estudos de repetibilidade espera-se que a variação dos resultados seja menor, através da análise da amostra várias vezes, de forma independente, por um operador, utilizando um procedimento experimental e um conjunto de reagentes, em um dia (KRUIVE *et al.*, 2015). Refere-se aos resultados de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos (RIBANI *et al.*, 2004).

2.9.7.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária, diferentemente da repetibilidade, é a precisão obtida em um longo período de tempo, levando em conta algumas mudanças, tais como: diferentes analistas, equipamentos e lotes de reagentes (KRUIVE *et al.*, 2015; INMETRO, 2011). A precisão é geralmente expressa em termos de desvio padrão (s), desvio padrão relativo (RSD), variância (s^2) ou coeficiente de variação (CV).

A precisão intermediária é conhecida como a mais representativa variabilidade realizada em um mesmo laboratório, pois confirma que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

2.9.8 Exatidão – recuperação/veracidade

A exatidão relata o erro sistemático em um sistema de medição e, se definido rigorosamente, refere-se à concordância entre a média de um número infinito de valores medidos de replicatas e o valor verdadeiro de uma grandeza medida. Na prática a exatidão é determinada em um número finito de medidas, porém razoavelmente grandes, bem como valores de referência são utilizados, em vez de valores verdadeiros (KRUIVE *et al.*, 2015).

A exatidão de um método é geralmente expressa de forma quantitativa como tendência ou tendência relativa. Na prática essa tendência é definida como a estimativa do erro sistemático e determinada como a diferença entre a média obtida em um grande número de replicatas e um valor de referência (KRUIVE *et al.*, 2015).

A maior razão pela qual os dados podem ser tendenciosos em análise por cromatografia líquida, pode ser denominada como:

- Tendência causada pela perda do analito durante o preparo da amostra, expresso quantitativamente pelo valor de recuperação;
- Tendência devido à estabilidade do analito ser limitada na solução da amostra;
- Tendência devido aos efeitos de supressão ou enriquecimento do analito durante a ionização;
- Tendência devido a outros efeitos (pureza do padrão sólido, tendência da calibração da vidraria utilizada, etc.)

Já, o termo veracidade é definido como o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. A sua determinação deve ser feita por intermédio de ensaios de recuperação, utilizando-se material de referência certificado (MRC) ou através da matriz branca fortificada (MAPA, 2011).

2.9.9 Limite de detecção

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) representa a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LOD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

- Método visual

Utiliza a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, a fim de distinguir entre sinal e ruído analítico para visualização da menor concentração visível, ou seja, detectável.

- Método da relação sinal-ruído

Para determinar a relação sinal-ruído faz-se a comparação das medidas dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas de um composto de uma matriz e um branco dessa amostra. A relação sinal-ruído usualmente utilizada é 3:1. Este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base.

- Método baseado em parâmetros da curva analítica

Para calcular esses dados, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção. O limite de detecção é avaliado através da equação 4:

$$LOD = 3,33 \times s \div S \quad (4)$$

Sendo: estimativa do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (S).

2.9.10 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável (MAPA, 2011).

O LOQ pode ser calculado utilizando a relação 10:1, ou seja, utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica, em níveis próximos ao LOQ (RIBANI *et al.*, 2004), segundo a equação 5:

$$LOQ = 10 \times s \div S \quad (5)$$

2.9.11 Limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β)

A regulamentação European commission 657/2002/EC, relativa ao desenvolvimento de métodos analíticos e a interpretação de resultados, recomenda calcular dois limites estatísticos, CC α e CC β . Esses permitem avaliar as concentrações com segurança, distinguir e quantificar as substâncias, levando em consideração a variabilidade do método e o risco estatístico de tomar uma decisão errada.

Segundo a 657/2002/EC, o CC α é definido como o limite de decisão, ou concentração crítica no risco alfa e CC β como a capacidade de detecção, também chamado de concentração crítica no risco beta. O cálculo derivou da norma ISO n° 11843 e é aplicado em rotinas para avaliar a capacidade de detecção de um método, particularmente quando ocorre a implementação da metodologia para calibração linear (GARCIA-CHAO *et al.*, 2010).

O CC α é definido pela 657/2002/EC como sendo o menor nível de concentração, no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de 1- α que o analito em questão está presente. Para as substâncias que apresentam LMR, o valor de α é considerado 5% e para substâncias que não apresentam limite máximo estabelecido o valor de α é 1%.

O CC β representa a menor quantidade da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro aceitável β (5% para substâncias com ou sem limite máximo de resíduo permitido estabelecido) (CD, 2002).

Existem diferentes maneiras para calcular o $CC\alpha$ e $CC\beta$, de acordo com a norma estabelecida pela ISO (2000). O cálculo é baseado em uma calibração diária do método no instrumento para análise de amostras de interesse, incluindo amostras desconhecidas a serem controladas. Os dados para realização dos cálculos são obtidos através da análise de um conjunto de amostras branco, fortificadas em no mínimo três níveis de concentração equidistantes. Deve-se realizar a análise de cada nível em duplicata. Após é confeccionada uma curva analítica e são calculados os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ (VERDON, HURTAUD-PESSEL & SANDERS, 2006).

2.10 Planejamento experimental

Para simplificar os resultados e diminuir o tempo gasto com a realização de ensaios utilizam-se os sistemas de planejamento experimental. Através deles, pode-se avaliar simultaneamente uma grande quantidade de variáveis através de um número reduzido de ensaios. O planejamento experimental é o mais indicado quando se quer estudar os efeitos de duas ou mais variáveis (CUNICO *et al.*, 2008).

Primeiramente é necessário especificar os níveis que cada fator será estudado, definidos nos experimentos, em geral, n_1 níveis do fator 1, n_2 níveis do fator 2 e assim por diante. Para estudar o efeito do fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação, assim, havendo k fatores, ou seja, k variáveis, o planejamento de dois níveis será $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo chamado planejamento fatorial 2^k (SARAMAGO *et al.*, 2008).

O planejamento de experimentos mais simples é o planejamento fatorial 2^2 , ou seja, dois fatores (expoente) e dois níveis para cada fator (base da potência). Assim, para a efetivação desse planejamento, é necessária a realização de no mínimo quatro experimentos ($2^2 = 4$) (BORGES, FIGUEIREDO & QUEIROZ, cap. 4, 2015). Um planejamento é incluído no centro do planejamento, em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado, conhecido como experimento no ponto central. Desse modo, é possível avaliar a significância dos efeitos e é possível verificar se há falta de ajuste do modelo proposto (TEÓFILO & FERREIRA, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na otimização e validação de método para a extração simultânea de agrotóxicos e antibióticos em mel. A quantificação destes compostos foi realizada por UHPLC-MS/MS e foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$) e efeito matriz.

O objetivo geral deste trabalho foi definir um método de preparo de amostra capaz de extrair diferentes classes de agrotóxicos e antibióticos simultaneamente em mel. Posteriormente, aplicou-se esse método em amostras de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul.

3.1 Instrumentação

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

- Agitador vortex - Biomixer modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Balança analítica modelo UX-420H (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica modelo APX-200 (Denver Instruments Ltda. Brazil);
- Banho termostaticado 398 (De Leo, Brazil);
- Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- Centrífuga 12 x 15 mL (Centribio, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3 (Millipore, Bedford, MA, France);
- Sistema UHPLC-MS/MS, modelo Xevo TQ (Waters, EUA), contendo: analisador triplo quadrupolo, amostrador automático sample manager (Acquity); coluna analítica ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μm - 2,1 x 50 mm; sistema de aquisição de dados *MassLynx V4.1*; sistema gerador de nitrogênio PEAK, modelo NM30L-MS (PEAK, Escócia) e gás argônio 6.0 usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS.

3.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Ácido etilenodiaminotetracético sódico (Na_2EDTA) (Synth, Brasil);
- Ácido cítrico anidro (Synth, Brasil);
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3® (resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$);
- Cartuchos para SPE Oasis 60 mg/3 mL (Waters, EUA);
- Cloreto de sódio p.a. (Merck, Brasil);
- Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Filtros nylon de 13 mm (0,2 μm);
- Florisil® 60-100 mesh (Mallinckrodt, Irlanda);
- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Fosfato de sódio dibásico p.a. heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Vetec, Brasil);
- Frascos de vidro (*via*) com capacidade de 2 mL;
- Hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado (Sigma Aldrich, EUA);
- Metanol grau HPLC (Mallinckrodt, NJ, USA);
- Padrões sólidos dos agrotóxicos e antibióticos, adquiridos da empresa Dr. Ehrenstofer, Alemanha, conforme Tabela 6;
- PSA com tamanho de partículas de 40 μm (Varian, EUA);
- Sulfato de magnésio anidro (J. T. Baker, Japão);
- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, 50 mL (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório analítico.

3.3 Padrões analíticos dos compostos analisados

Os compostos analisados neste trabalho foram selecionados com base no PNCRC e União Europeia, de acordo com os LMRs estabelecidos para mel. Os padrões foram preparados individualmente através das soluções analíticas estoque

1000 mg L⁻¹ de cada composto, considerando a pureza dos padrões sólidos. A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila e/ou metanol, grau HPLC, de acordo com a solubilidade de cada composto e as soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura de -18 °C. A partir destas soluções, preparou-se uma mistura na concentração 10 mg L⁻¹ contendo todos os agrotóxicos, e uma solução mistura contendo todos os antibióticos, ambas em acetonitrila. Por fim, preparou-se uma mistura na concentração 1 mg L⁻¹ a partir da solução 10 mg L⁻¹ para os agrotóxicos e outra para os antibióticos, na mesma concentração. A Tabela 6 apresenta as informações de pureza, classe, grupo químico, fórmula molecular, pKa e log K_{ow} de cada um dos compostos avaliados neste trabalho.

Tabela 6 – Informações de todos os compostos, contendo a pureza, classe, grupo químico, fórmula molecular, pKa e log k_{ow} de cada um deles.

Analitos	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular	pKa	log K_{ow}
Acefato	99,0	I	Organofosforado	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	8,35	-0,85
Acetamiprido	99,0	I	Neonicotinóide	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	0,7	0,8
Atrazina	99,5	H	Triazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	1,7	2,7
Azinfós etílico	97,7	I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	-	3,18
Azinfós metílico	99,0	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	5	2,96
Azoxistrobina	99,5	F	Estrobilurina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	-	2,5
Boscalida	99,5	F	Anilida	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	-	2,96
Bromofós etílico	99,5	I	Organotiofosfato	C ₁₀ H ₁₂ BrCl ₂ O ₃ PS	-	5,21
Carbaril	98,5	I	Carbamato de naftila	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	10,4	2,36
Carbendazim	99,0	F	Benzimidazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	4,2	1,48
Carbofuram	98,5	Ac/I/N	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	-	1,8
Carbofuram 3-OH	97,0	I	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	-	-
Carboxim	99,9	F	Carboxanilida	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	0,5	2,3
Ciproconazol	99,0	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O	-	3,09
Cloranfenicol	98,5	An	Aminopropanodiol	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	-	-
Clorpirifós etílico	99,5	I	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	-	4,7
Clorpirifós metílico	97,0	I	Organofosforado	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	-	4
Clotianidina	99,5	I	Neonicotinóide	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	11,1	0,905
Diclorvós	97,0	I	Organofosforado	C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P	-	1,9
Dietofencarbe	97,5	F	N-fenil carbamato	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄	-	2,89
Difenoconazol	99,0	F	Triazol	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	1,07	4,36
Dimetoato	98,5	Ac/I	Organofosforado	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	-	0,704

Dimoxistrobina	99,0	F	Estrobilurina	$C_{19}H_{22}N_2O_3$	-	3,59
Diniconazol	99,0	F	Triazol	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O$	-	4,3
Diuron	97,5	H	Uréia	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	-	2,87
Emamectina benzoato	90,0	I	Avermectina	$C_{49}H_{75}NO_{13}$	-	5
Epoxiconazol	99,0	F	Triazol	$C_{17}H_{13}ClFN_3O$	-	3,3
Eritromicina ABC	93,5	An	Macrolídeo	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	-	3,06
Etofenprox	98,5	I	Piretróide	$C_{25}H_{28}O_3$	-	6,9
Etrimfós	60,0	I	Organotiofosfato	$C_{10}H_{17}N_2O_4PS$	-	2,94
Fempropatrina	99,0	Ac/I	Piretróide	$C_{22}H_{23}NO_3$	-	6,04
Fempropimorfe	94,5	F	Morfolina	$C_{20}H_{33}NO$	6,98	4,5
Fenarimol	97,5	F	Pirimidina	$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$	-	3,69
Fipronil	97,5	I	Pirazol	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$	-	3,75
Flutolanil	99,0	F	Carboxamida	$C_{17}H_{16}F_3NO_2$	-	3,17
Flusilazol	98,0	F	Organosiliconado	$C_{16}H_{15}F_2N_3Si$	2,5	3,87
Fluvalinato	94,0	I	Piretróide	$C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$	-	3,85
Fosmet	98,5	Ac/I	Organotiofosfato	$C_{11}H_{12}NO_4PS_2$	-	-
Furazolidona	99,0	An	Nitrofurano	$C_8H_7N_3O_5$	-	-
Hexaconazol	97,0	F	Triazol	$C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$	2,3	3,9
Imazalil	97,5	F	Imidazol	$C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$	6,49	2,56
Imidacloprido	98,5	I	Neonicotinoide	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	-	0,57
Iprovalicarbe	97,5	F	Carbamato	$C_{18}H_{28}N_2O_3$	-	3,2
Isoxaflutol	98,0	H	Isoxazol	$C_{15}H_{12}F_3NO_4S$	-	2,32
Lincomicina cloridrato	99,0	An	Macrolídeo	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$	-	0,29
Linurom	99,4	H	Ureia	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	-	3
Malationa	99,0	I	Organofosforado	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	-	2,75
Mepanipirim	99,4	F	Anilinopirimidina	$C_{14}H_{13}N_3$	2,7	3,28
Mepronil	99,0	F	Benzanilida	$C_{17}H_{19}NO_2$	-	3,66

Metacrifós	98,0	Ac/I	Organotiofosfato	$C_7H_{13}O_5PS$	-	1,53
Metalaxil	99,5	F	Acilalaninato	$C_{15}H_{21}NO_4$	-	1,65
Metidation	99,0	I	Organofosforado	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	-	2,57
Metolaclor	99,0	H	Cloro acetanilida	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	-	3,4
Metsulfurom metílico	99,0	H	Sulfonilurea	$C_{14}H_{15}N_5O_6S$	3,75	-1,87
Mevinfós	92,0	Ac/I	Organofosforado	$C_7H_{13}O_6P$	-	0,127
Monolinurom	99,0	H	Fenil Uréia	$C_9H_{11}ClN_2O_2$	-	2,2
Ometoato	99,0	Ac/I	Organofosforado	$C_5H_{12}NO_4PS$	-	-0,74
Oxadixil	99,0	F	Fenilamidas e ditiocarbamatos	$C_{14}H_{18}N_2O_4$	-	0,65
Paraoxon etílico	99,0	I	Organofosforado	$C_{10}H_{14}NO_6P$	-	-
Penconazol	99,2	F	Triazol	$C_{13}H_{15}Cl_2N_3$	1,51	3,72
Picoxistrobina	98,5	F	Estrobilurina	$C_{18}H_{16}F_3NO_4$	-	3,6
Piraclostrobina	97,5	F	Metoxicarbamato	$C_{19}H_{18}ClN_3O_4$	-	3,99
Pirazofós	97,0	I	Organofosforado	$C_{14}H_{20}N_3O_5PS$	-	3,8
Piridato	96,5	I	Piridazina	$C_{19}H_{23}ClN_2O_2S$	-	4,01
Pirimetanil	98,3	I	Anilinopirimidina	$C_{12}H_{13}N_3$	3,52	2,84
Pirimicarbe	97,0	F	Carbamato	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	4,4	1,7
Pirimifós etílico	98,5	I	Organofosforado	$C_{13}H_{24}N_3O_3PS$	-	4,85
Pirimifós metílico	99,0	Ac/I	Organofosforado	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	4,3	3,9
Profenofós	98,0	Ac	Organofosforado	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	-	1,7
Profoxidim	98,5	H	Cicloexadiona oxima	$C_{24}H_{32}ClNO_4S$	5,91	3,9
Propargito	91,5	H	Éster sulfito	$C_{19}H_{26}O_4S$	-	5,7
Propoxur	99,0	F	Carbamato	$C_{11}H_{15}NO_3$	-	0,14
Salinomicina	80,0	Ac	Ionóforo	$C_{42}H_{70}O_{11}$	-	-
Simazina	98,0	H	Triazina	$C_7H_{12}ClN_5$	1,62	2,3
Sulfaclopiridazina	99,0	An	Sulfonamida	$C_{10}H_9ClN_4O_2S$	-	0,31

Sulfadiazina	99,0	An	Sulfonamida	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	-	-0,09
Sulfadimetoxina	97,5	An	Sulfonamida	$C_{12}H_{14}N_4O_4S$	-	0,63
Sulfametazina	99,0	An	Sulfonamida	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	-	-
Sulfametoxazol	99,0	An	Sulfonamida	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	-	0,9
Sulfaquinoxalina	97,0	An	Sulfonamida	$C_{14}H_{12}N_4O_2S$	-	-
Sulfatiazol	99,5	An	Sulfonamida	$C_9H_9N_3O_2S_2$	-	-
Tebuconazol	98,0	F	Triazol	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	-	3,7
Terbutilazina	99,0	H	Triazina	$C_9H_{16}ClN_5$	1,9	3,4
Tiacloprido	98,0	I	Neonicotinoide	$C_{10}H_9ClN_4S$	-	1,26
Tiametoxan	99,7	I	Neonicotinoide	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	-	-0,13
Tilosina	98,0	An	Macrolídeo	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	-	3,41
Tolclofós metílico	98,5	F	Hidrocarboneto aromático	$C_9H_{11}Cl_2O_3PS$	-	4,56
Triadimefon	99,0	F	Triazol	$C_{14}H_{16}ClN_3O_2$	-	3,18
Triazofós	78,0	F	Organofosforado	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS$	-	3,55
Triclorfom	97,0	F	Organofosforado	$C_4H_8Cl_3O_4P$	-	0,43
Trifloxistrobina	99,0	F	Estrobilurina	$C_{20}H_{19}F_3N_2O_4$	-	4,5
Triflumizol	98,0	F	Imidazol	$C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$	3,7	4,77

Sendo: I = Inseticida; F = Fungicida; H = Herbicida; Ac = Acaricida; An: Antimicrobiano; B: Bactericida; N: Nematicida; PE = Ponto de Ebulição.

Fonte: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>

3.3.1 Padrão interno e de substituição

Estes compostos são adicionados em diferentes estágios do procedimento analítico, anterior a extração (padrão de substituição, PS) e no extrato final (padrão interno, PI) e possuem o objetivo de assegurar a execução correta do procedimento de extração e de análise no sistema cromatográfico, respectivamente.

Neste trabalho, utilizou-se como padrão interno o composto trifenilfosfato na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. O padrão de substituição, atrazina deuterada, foi adicionado no mesmo nível de concentração para cada ponto da curva fortificada. Os resultados não foram empregados para efeito de cálculo de nenhum dos analito, apenas para a avaliação do procedimento de extração.

3.3.2 Amostras de mel

A amostra “branco” de mel, utilizada no processo de validação do método, deve ser isenta dos compostos avaliados neste trabalho, a fim de evitar uma quantificação errônea dos analitos em estudo. Essa amostra, adquirida em uma propriedade rural da região norte do estado do Rio Grande do Sul, foi submetida à análise físico-química a fim de avaliar os parâmetros de acidez (36 mEq kg^{-1}), umidade (20%) e açúcares redutores (64,8%).

As amostras utilizadas na etapa de aplicabilidade do método foram obtidas de diferentes cidades do estado e coletadas durante todo o ano de 2013 e o início de 2014. A identificação dessas amostras foi feita de acordo com o código apresentado na Tabela 7. No momento da coleta das amostras aplicou-se um questionário para que o apicultor/produtor pudesse relatar algumas informações sobre culturas existentes próximas às colmeias, possíveis aplicações de produtos químicos (agrotóxicos ou antibióticos) nas proximidades, dentre outras. Esse questionário foi utilizado para auxiliar nas discussões dos resultados das 43 amostras avaliadas, em virtude dos resultados encontrados, após análise cromatográfica. O questionário encontra-se no Anexo I desse trabalho.

Tabela 7 – Relação de amostras de mel obtidas para a etapa de aplicação do método.

Cidade – Região do estado do RS	Código das amostras	Cidade – Região do estado do RS	Código das amostras
São Borja – sudoeste	1	Serafina Correa – norte	22
São Borja – sudoeste	2	Candelária – centro	23
São Borja – sudoeste	3	Erechim – norte	24
São Borja – sudoeste	4	Santo Antônio da Patrulha – metropolitana	25
Santa Maria – centro	5	Planalto – norte	26
Santa Maria – centro	6	Itaqui – sudoeste	27
Santa Maria – centro	7	Itaqui – sudoeste	28
Santa Maria – centro	8	Santiago – centro	29
Erechim – norte	9	Santiago – centro	30
Erechim – norte	10	Sertão – norte	31
Ibirubá – noroeste	11	Casca – noroeste	32
Nova Esperança do Sul – centro	12	Ibirubá – noroeste	33
São Vicente do Sul – centro	13	Passo Fundo – norte	34
Pouso Novo – centro	14	Soledade – noroeste	35
Ernestina – noroeste	15	Itaara – centro	36
Itaqui – sudoeste	16	Santa Maria – centro	37
Itaqui – sudoeste	17	Erechim – norte	38
Santiago – centro	18	Erechim – norte	39
Nova Palma – centro	19	Santa Maria – centro	40
Nova Bassano – nordeste	20	Santa Maria – centro	41
São Martinho da Serra – centro	21	Santa Maria – centro	42
		Santa Maria – centro	43

Essas amostras foram coletadas diretamente das colmeias, as quais foram armazenadas em frascos plásticos contendo aproximadamente 20 g de mel por amostra. Posteriormente essas amostras foram transportadas até o Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP), mantidas a temperatura ambiente (± 20 °C), em caixa de poliestireno.

3.4 Condições otimizadas no sistema UHPLC-MS/MS

Inicialmente foram realizados alguns testes para otimizar as condições cromatográficas no sistema UHPLC-MS/MS. As condições testadas foram:

diferentes colunas cromatográficas, diferentes condições da fonte de ionização, fase móvel e gradiente de fase móvel.

O sistema cromatográfico operou no modo SRM, sendo que os íons característicos de cada composto selecionado foram monitorados no primeiro quadrupolo. No terceiro quadrupolo realizou-se a varredura do íon produto, variando as energias de colisão de cada composto, a fim de obter as melhores condições de detecção. Após, foram avaliadas as transições a serem utilizadas para a quantificação (transição de maior intensidade) e confirmação (segunda transição de maior intensidade) dos compostos estudados. Além disso, programou-se para que os primeiros e últimos minutos da corrida cromatográfica tivessem o eluato da coluna direcionado para o descarte, evitando uma maior transferência de coextrativos para o espectrômetro de massas, que demandaria manutenção e limpeza mais frequentes do equipamento.

3.4.1 Coluna cromatográfica

As colunas cromatográficas utilizadas em UHPLC-MS/MS seguem os mesmos princípios de separação da HPLC (5 a 25 cm de comprimento e 3,2 a 4,6 mm de diâmetro interno), entretanto empregam dimensões reduzidas, com 5 a 10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1 a 2,1 mm. Essas colunas são recheadas com partículas de fase estacionária $\leq 2 \mu\text{m}$, podendo ser utilizadas altas velocidades lineares de fase móvel para obter melhores resultados.

Nesse trabalho testaram-se duas colunas cromatográficas: ACQUITY UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm x 1,7 μm) e ACQUITY UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm x 1,7 μm), com diferença apenas no comprimento da coluna cromatográfica, a fim de avaliar a eluição dos compostos, através de injeção com todos os analitos, preparada no solvente (acetonitrila).

3.4.2 Gradiente de fase móvel

Com relação aos gradientes de fase móvel, as variações ocorreram devido ao formato dos picos não apresentarem boa resolução e também pelo fato de os compostos eluírem em tempos muito próximos em uma corrida de 10 min (AVULA *et*

al., 2012). Foram testados alguns gradientes de fase móvel com tempo de corrida cromatográfica de 10 e 15 min e vazão de 0,200 e 0,225 mL min⁻¹.

3.4.3 Fonte de ionização

Os parâmetros relacionados às condições de ionização de cada composto, os quais foram testados para os analitos avaliados neste trabalho, são utilizados na rotina do laboratório, no sistema UHPLC-MS/MS. A seguir estão descritas algumas condições da *MS tune file* testada:

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Voltagem do capilar: 2,0 kV;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação: 600 L h⁻¹;
- Vazão do *spray*: 80 L h⁻¹;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min⁻¹;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Volume de injeção: 10 µL.

Abaixo algumas condições com a segunda *MS Tune File* testada, na qual as diferenças se resumem na voltagem do capilar, temperatura, vazão do gás de dessolvatação e do *spray*:

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Voltagem do capilar: 2,50 kV;
- Temperatura de dessolvatação: 450 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação: 900 L h⁻¹;
- Vazão do *spray*: 150 L h⁻¹;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min⁻¹;
- Temperatura da fonte: 150 °C;
- Volume de injeção: 10 µL.

O parâmetro tempo de residência (*dwell time*) foi ajustado para cada analito, pois no método têm-se diferentes características físico-químicas entre os analitos, as quais necessitam ser avaliadas individualmente.

3.5 Condições otimizadas no método de preparo de amostra de mel

Diferentes métodos de extração, tais como o método QuEChERS e a extração com solvente, bem como diferentes testes para a etapa de limpeza da amostra foram realizados através de testes prévios. O objetivo desses testes foi avaliar a melhor condição no procedimento de preparo de amostra que, em uma única análise cromatográfica fosse capaz de extrair os agrotóxicos e antibióticos das amostras de mel.

A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de agrotóxicos com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e limpeza, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, além de observar a legislação ambiental (PRESTES *et al.*, 2009).

Nesse trabalho avaliou-se o método QuEChERS citrato (JOVANOVA *et al.*, 2014), porém com modificações durante a sua execução. Testou-se também uma solução tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹, pH 4, de acordo com SOLLIEC *et al.* (2015), para efetuar a homogeneização do mel, seguida de acetonitrila, na extração, e na etapa de limpeza diferentes solventes foram utilizados a fim de obter um extrato limpo para análise cromatográfica. As principais etapas envolvidas na etapa de extração das amostras de mel estão representadas na Figura 5.

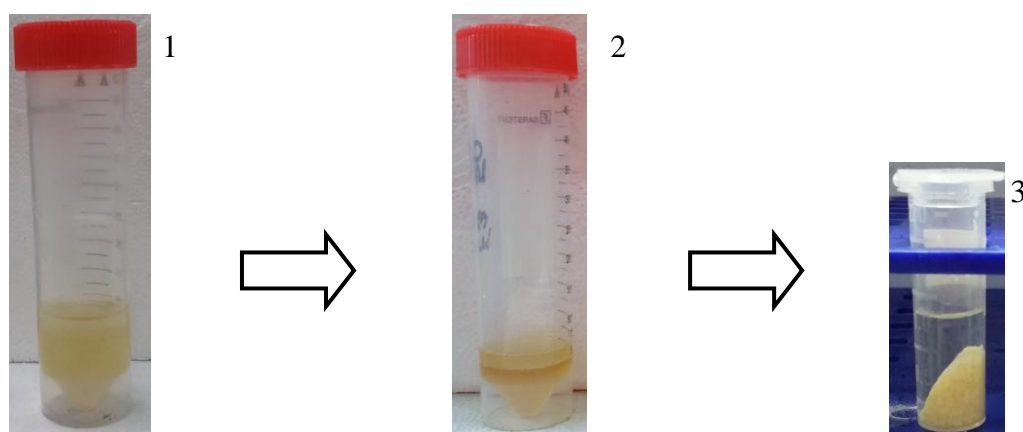


Figura 5 – Representação das etapas: 1- homogeneização e extração do mel; 2 – centrifugação para separação das fases orgânica e aquosa e 3 – limpeza das amostras.

Optou-se pelo método QuEChERS citrato modificado, Figura 6. Avaliou-se a quantidade de 5 g de amostra, diretamente em tubo de polipropileno tipo Falcon, de 50 mL de capacidade com tampa rosqueada. Em seguida, fez-se o aquecimento dessa amostra em banho-maria, com temperatura controlada de 40 °C para diminuir a viscosidade da amostra e facilitar o processo de extração. Realizaram-se testes de fortificação contendo todos os compostos em estudo. Após agitação de 2 min, adicionou-se 5 mL da solução tampão *Mcllvaine* 0,1 mol L⁻¹, pH 4, em solução aquosa, através da adição de ácido cítrico anidro, fosfato de sódio dibásico p.a. e ácido etilenodiaminotetracético, a fim de garantir a homogeneização completa das amostras e posterior adição de 5 mL de acetonitrila, para a etapa de extração do método, ambas com agitação de 2 min entre cada etapa. Em seguida, acrescentaram-se os sais, etapa de partição do método, com agitação de 2 min e centrifugação a 3400 rpm por 6min.

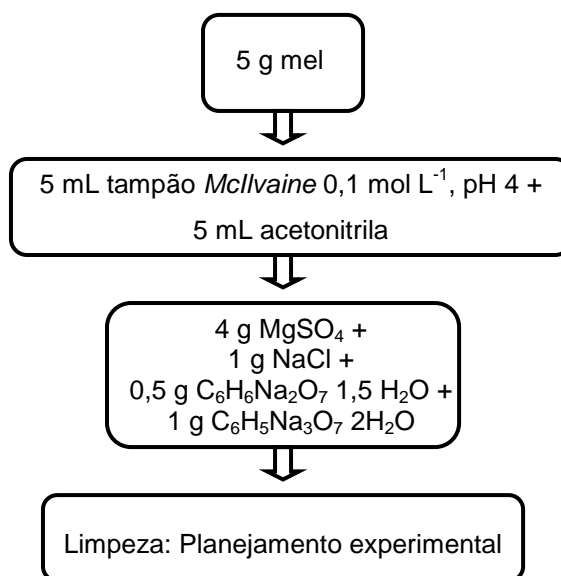


Figura 6 – Ilustração do procedimento de preparo de amostra utilizando o método QuEChERS citrato e o planejamento experimental na etapa de limpeza.

Aplicou-se um planejamento experimental 2² com repetição do ponto central + α e - α para avaliação da etapa de limpeza das amostras. O planejamento foi caracterizado pela variação das quantidades dos sorventes PSA e C18, inicialmente testados para as amostras de mel. A quantidade de sulfato de magnésio não sofreu variações e por isso não está incluída no planejamento, sendo que para a proporção de 1 mL de extrato utilizou-se 150 mg de MgSO₄. Além de PSA e C18, diferentes sorventes foram utilizados nas proporções obtidas através do planejamento

experimental, para aumentar as possibilidades de obtenção de extratos mais limpos e com bons resultados de recuperação dos compostos. Assim, foram testados florisil[®] e o OASIS HLB 60 mg (sorvente polimérico utilizado para compostos anfóteros), Figura 7. Os testes foram realizados com quantidades de amostra, solução tampão e de acetonitrila proporcionalmente menores, com o intuito de miniaturizar o método proposto e reduzir a quantidade de resíduos gerados no final do procedimento.

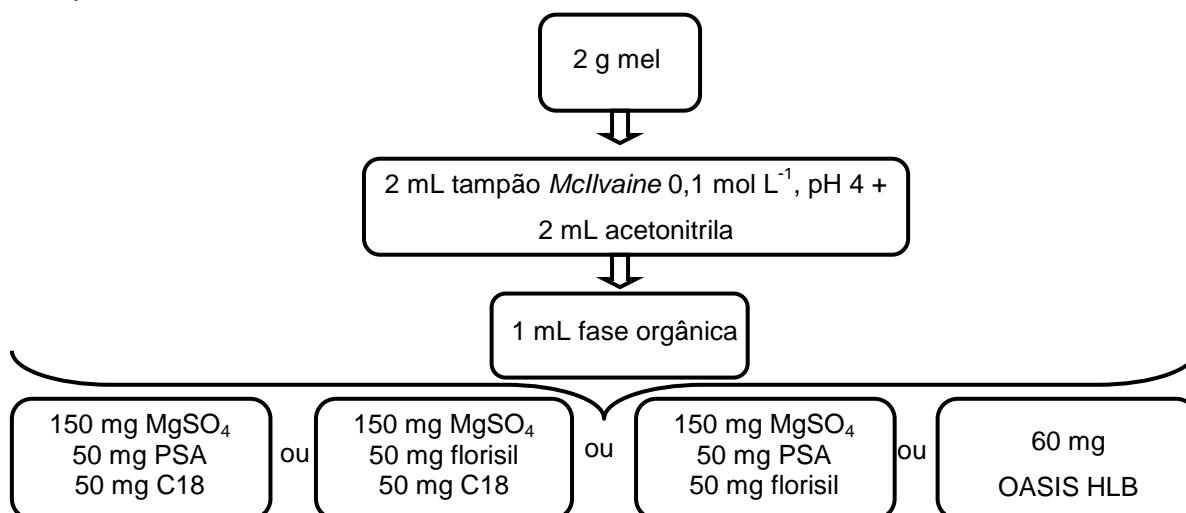


Figura 7 – Preparo de amostra utilizando extração com acetonitrila e variação dos sorventes testados na etapa de limpeza do método.

Levando-se em consideração que para alguns compostos a extração não ocorreu de forma efetiva, foram realizados outros testes de limpeza utilizando combinações de PSA e florisil[®] separadamente, Figura 8.

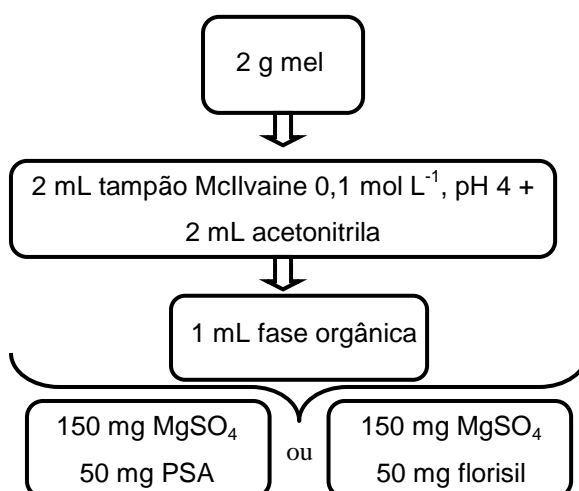


Figura 8 – Preparo de amostra utilizando acetonitrila na etapa de extração, seguido por duas condições de limpeza da amostra.

Todos os testes citados apresentam similaridade durante a etapa de extração, caracterizando-se por uma homogeneização da amostra com o auxílio da solução tampão McIlvaine, pH 4, seguida por extração com acetonitrila. Já, na etapa de limpeza, caracterizada pela extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), as variações são maiores em virtude de se tratar de uma matriz complexa, com composição química diversificada e grande quantidade de açúcar presente no extrato da matriz mel.

3.6 Validação do método para análise de agrotóxicos e antibióticos em mel

Os seguintes parâmetros foram avaliados na etapa de validação do método analítico:

- Curva analítica, considerando as premissas de normalidade e independência dos dados obtidos;
- Faixa linear e independência dos resíduos;
- Efeito matriz;
- Exatidão;
- Precisão (repetibilidade e precisão intermediária);
- Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método;
- Limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).

3.6.1 Seletividade

Para avaliar e comprovar a seletividade do método realizou-se injeção no sistema cromatográfico de uma amostra de mel sem a presença dos compostos. A seletividade do método foi assegurada pela ausência dos íons de quantificação e qualificação no tempo de retenção dos analitos da amostra “branco”.

3.6.2 Curva analítica e faixa linear

As curvas analíticas foram preparadas no solvente e no extrato da matriz mel, em 10 níveis de concentrações 0,1; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 150 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, para

abranger os LMRs dos agrotóxicos e antibióticos avaliados nesse trabalho. As curvas analíticas foram injetadas em triplicata para posteriormente realizar os cálculos das médias das áreas, do efeito matriz e do RSD. Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do sistema de aquisição de dados *MassLynx V4.1*.

Através do teste de Anderson-Darling foi possível avaliar a normalidade dos resíduos frente à curva analítica. Esse teste compara os ajustes de uma dada função de distribuição observada com os dados de distribuição esperados.

A avaliação da independência dos dados foi realizada pelo teste de Durbin-Watson, o qual avaliou a autocorrelação que afeta a variância dos dados obtidos. A aplicação desse teste utilizou a faixa linear com os dez níveis, porém com a exclusão de 22,2% dos níveis que não atenderam aos critérios de aceitação para os mesmos (HORWITZ, 1995).

3.6.3 Efeito matriz

Para a avaliação da existência de efeito matriz nos extratos do mel nas análises cromatográficas foi realizada a comparação entre as inclinações das curvas obtidas empregando-se soluções analíticas em acetonitrila e aquelas obtidas com soluções analíticas preparadas em extrato de mel “branco”. O cálculo será efetuado através da equação 6:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (6)$$

Onde: X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada composto, preparadas na matriz (mel); X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada composto, preparadas em solvente (acetonitrila).

3.6.4 Ensaios para avaliar a recuperação/veracidade

Para avaliar a exatidão, em termos de recuperação do método proposto, na etapa de preparo da amostra de mel utilizaram-se as condições previamente definidas nas etapas de homogeneização, extração e limpeza da amostra. Primeiramente, aqueceu-se o mel em banho-maria a temperatura de 40 °C, por 5 min, para posteriormente realizar a pesagem das amostras. A quantidade de

amostra de mel pesada foi de $2 \pm 0,1$ g, em tubos de polipropileno, capacidade de 50 mL, após efetuou-se a fortificação das amostras, contendo todos os compostos em estudo, além da adição do padrão de controle, nos dez níveis de concentração da curva analítica. Os tubos contendo o mel fortificado foram agitados por 2 min, após adicionou-se 2 mL da solução tampão *Mcllvaine* $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4, em solução aquosa, com posterior agitação por 2 min, essa etapa garantiu a homogeneidade das amostras de mel. A extração ocorreu com a adição de 2 mL de acetonitrila, com posterior agitação de 2 min e centrifugação a 3400 rpm, por 6 min. Retirou-se 1 mL da fase orgânica de cada extrato para realizar a etapa de limpeza com 150 mg de MgSO_4 e 50 mg de florisil[®]. Os extratos foram agitados por 1 min e centrifugados a 10000 rpm, por 5 min, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e posteriormente filtrados, em filtros de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro e diluídos na proporção 1:4, v/v, matriz:água ultrapura. Adicionou-se o volume de $20 \text{ }\mu\text{L}$ do padrão interno, na concentração 1 mg L^{-1} anteriormente a análise cromatográfica.

O procedimento de extração das amostras de mel fortificadas foi realizado em seis repetições de cada um dos níveis (0,1; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 150 e $200 \text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$), sendo cada um dos níveis injetado uma vez no sistema cromatográfico. Esses ensaios foram realizados na matriz “branco” de mel, a fim de avaliar a exatidão desse método, para avaliação dos ensaios de recuperação dos compostos em estudo. O cálculo para avaliar a recuperação dos compostos foi realizado através da equação 7:

$$R(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (7)$$

Onde: C_1 = concentração determinada na amostra fortificada; C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada; C_3 = concentração usada para fortificação.

A determinação da veracidade desse método foi realizada utilizando os valores de concentração determinados através da curva analítica, nos ensaios de fortificação dos três níveis intermediários (10; 20 e $50 \text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$), expressos em percentual, para todos os compostos avaliados, de acordo com a equação 8.

$$\text{Veracidade}(\%) = \frac{\text{média das concentrações de cada nível} \times 100}{\text{valor teórico}} \quad (8)$$

3.6.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão do método, avaliada em termos de repetibilidade (RSD_r), foi realizada através de seis extrações de cada nível da curva analítica (0,1; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 150 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$), sendo que cada extrato foi injetado uma vez ($n=6$).

A precisão pode ser calculada através da fórmula do desvio padrão relativo conforme a equação 9:

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad (9)$$

Onde: s = estimativa de desvio padrão absoluto, em que $s = \{\sum(x_i - x_m)^2/n-1\}^{1/2}$; x_i = valores individuais; \bar{X} = média das medidas em replicatas; n = número de medidas.

A avaliação da precisão intermediária (RSD_{pi}) foi realizada através da injeção dos três níveis intermediários de fortificação, nas concentrações 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em dias diferentes em relação à repetibilidade do método. Os resultados foram avaliados utilizando-se o teste t pareado, a fim de comparar os dados. Foram considerados resultados significativamente iguais os valores que não apresentaram diferença estatística no nível de 5%.

3.6.6 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Neste trabalho, os valores de LOD e LOQ do método foram determinados experimentalmente a partir da relação de três e dez vezes a razão sinal/ruído, respectivamente, sendo determinado para cada composto, em todos os níveis da curva analítica fortificada.

A determinação dos valores de LOQ foi estabelecida de acordo com o menor nível fortificado que obteve relação sinal/ruído > 10 , com resultados de exatidão entre 70 e 120% e precisão $\leq 20\%$. Já, os valores de LOD foram obtidos a partir do LOQ dividido por 3,33 vezes a relação sinal/ruído.

3.6.7 Limite de decisão ($CC\alpha$) e Capacidade de detecção ($CC\beta$)

Os limites de decisão e as capacidades de detecção do método proposto foram calculados de acordo com a Decisão 2002/657/EC, para os 12 antibióticos avaliados nesse trabalho.

O limite de decisão foi determinado considerando o menor nível da curva analítica fortificada, com relação sinal/ruído maior que 10 e com dados de exatidão (entre 70 e 120%) e precisão ($\leq 20\%$), de acordo com a equação 10:

$$CC\alpha = \downarrow \text{nível fortificado} \quad (10)$$

A capacidade de detecção foi calculada somando-se o valor de $CC\alpha$ obtido mais 1,64 vezes o desvio padrão (SD, do inglês *standard deviation*) referente à precisão intermediária do limite de decisão correspondente, de acordo com a equação 11:

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 SD \quad (11)$$

3.7 Aplicação do método

O método validado foi aplicado para 43 amostras reais de mel de diferentes espécies botânicas e diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul, com o objetivo de avaliar quais são os principais resíduos de agrotóxicos e antibióticos presentes, seja por contaminação direta ou indireta pelas abelhas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Condições cromatográficas

Foi empregada a coluna cromatográfica Acquity UPLC BEH C18, com dimensões de 100 x 2,1 mm x 1,7 μm , e temperatura de 40 $^{\circ}\text{C}$, que apresentou melhor separação cromatográfica para os compostos avaliados, em relação à coluna com dimensões de 50 x 2,1 mm x 1,7 μm . Como fase móvel utilizou-se uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L^{-1} (solvente A) e solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) e formiato de amônio 5 mmol L^{-1} em metanol (solvente B), a uma vazão de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Tabela 8). O tempo de corrida cromatográfica de 15 min garantiu uma separação adequada dos compostos em estudo.

Tabela 8 – Gradiente da fase móvel utilizado nesse trabalho.

Tempo (min)	Vazão (mL min^{-1})	%B
Inicial	0,200	5
0,25	0,200	5
7,75	0,200	100
14	0,200	100
14,01	0,200	5
15	0,200	5

A voltagem do capilar foi de 2 kV, temperatura de dessolvatação de 500 $^{\circ}\text{C}$, vazão do gás de dessolvatação (nitrogênio) de 600 L h^{-1} , vazão do spray de 80 L h^{-1} , vazão do gás de colisão (argônio) de 0,15 mL min^{-1} , temperatura da fonte de 150 $^{\circ}\text{C}$, volume de injeção de 10 μL e tempo de residência (dwell time) de 0,001 s para a maioria dos compostos.

A Figura 9 apresenta o cromatograma da amostra branco fortificada na concentração 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A utilização do UHPLC-MS/MS proporcionou alta seletividade e eficiência de separação, bem como informação estrutural e seletividade, sendo assim foi possível a identificação e quantificação de todos os compostos em estudo.

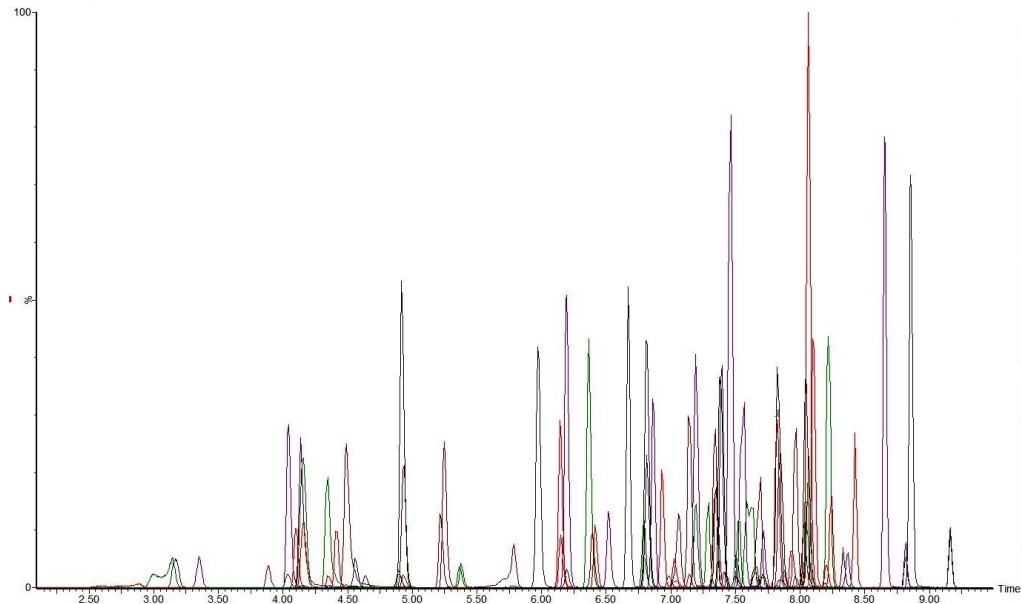


Figura 9 – Cromatograma de um nível de fortificação na concentração de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ na amostra de mel obtida pelo UHPLC-MS/MS.

A fim de apresentar os íons de quantificação e qualificação para alguns dos compostos considerados nocivos às abelhas e conseqüentemente encontrados em análises de amostras de mel, a Figura 10 apresenta quatro compostos, preparados através de uma fortificação no extrato da matriz mel, na concentração $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

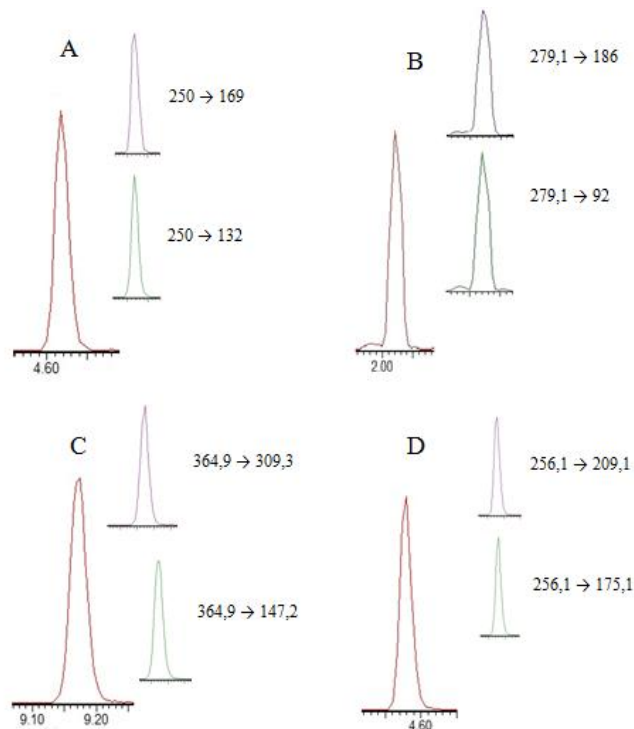


Figura 10 – Cromatogramas dos compostos (A) clotianidina, (B) sulfametazina, (C) bromofós metílico e (D) imidacloprido, com suas respectivas transições de quantificação e qualificação.

A Tabela 9 apresenta os compostos determinados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+) e aquisição SEM, sendo que o fipronil foi o único composto que apresentou ionização no modo negativo, com seus respectivos tempos de retenção (t_R), íons precursores, íons produtos de cada composto em estudo e a energia de colisão (EC) das transições monitoradas. A transição mais intensa foi utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação dos mesmos.

Tabela 9 – Compostos analisados com seus respectivos tempos de retenção, íons precursores e produtos otimizados.

Compostos	t_R (min)	ESI (+/-)	Transições SRM, m/z (EC, eV)	
			Quantificação	Confirmação
Acefato	2,88	+	184> 143 (8)	184>125 (8)
Acetamiprido	4,91	+	223>126 (20)	223>56 (15)
Atrazina	6,82	+	216>174 (18)	216>96 (23)
Azinfós etílico	7,67	+	346>77 (36)	346>132 (16)
Azinfós metílico	7,08	+	318>160 (8)	318>261 (8)
Azoxistrobina	7,12	+	404>329 (30)	404>372 (15)
Boscalida	7,36	+	343>307 (20)	343>140 (20)
Bromofós metílico	9,17	+	365>147 (26)	365>309 (12)
Carbaril	6,41	+	202>145 (22)	202>117 (28)
Carbendazim	4,16	+	192>160 (18)	192>132 (28)
Carbofuram	6,2	+	222>165 (16)	222>123 (16)
Carbofuram 3-OH	4,89	+	238>163 (16)	238>181 (10)
Carboxim	6,38	+	236>87 (22)	236>143 (16)
Ciproconazol	7,50/7,68	+	292>125 (27)	292>70 (24)
Cloranfenicol	5,29	+	321>152 (18)	321>257 (12)
Clorpirifós etílico	8,82	+	350>97 (32)	350>198 (20)
Clorpirifós metílico	8,38	+	322>125 (20)	322>290 (16)
Clotianidina	4,63	+	250>132 (18)	250>169 (12)
Diclorvós	6,15	+	221>79 (34)	221>109 (22)
Dietofencarbe	7,20	+	268>226 (10)	268>124 (40)
Difenoconazol	8,31	+	406>251 (25)	406>111 (60)
Dimetoato	4,93	+	230>125 (20)	230>199 (10)
Dimoxistrobina	7,94	+	327>116 (21)	327>205 (10)
Diniconazol	8,34	+	326>70 (25)	326>159 (34)
Diuron	6,93	+	233>72 (18)	233>46 (14)
Emamectina benzoato	8,79	+	887>126 (38)	887>158 (37)
Epoconazol	7,75	+	330>101 (50)	330>121 (22)
Eritromicina ABC	6,84	+	734>158 (30)	734>576 (20)
Etofenprox	9,48	+	394>107 (43)	394>177 (15)

Etrimfós	8,08	+	293>125 (26)	293>265 (16)
Fempropatrina	8,82	+	350>125 (14)	350>97 (34)
Fempropimorfe	7,41	+	304>147 (28)	304>57 (30)
Fenarimol	7,33	+	331>81 (34)	331>268 (22)
Fipronil	7,8	-	435>250 (26)	435>330 (16)
Flusilazol	7,84	+	316>165 (28)	316>247 (18)
Flutolanil	7,40	+	324>65 (40)	324>262 (18)
Fluvalinato	9,21	+	503>181 (30)	503>208 (12)
Fosmet	7,08	+	318>77 (46)	318>160 (22)
Furazolidona	3,88	+	226>95 (14)	226>139 (15)
Hexaconazol	8,21	+	314>70 (22)	314>159 (28)
Imazalil	6,87	+	297>159 (22)	297>69 (22)
Imidacloprido	4,55	+	256>175 (20)	256>209 (15)
Iprovalicarbe	7,62	+	321>119,06 (16)	321>203 (10)
Isoxaflutol	6,81	+	360>220 (40)	360>251 (14)
Lincomicina cloridrato	8,31	+	407>252 (24)	407>338 (16)
Linurom	7,29	+	249>160 (18)	249>181 (17)
Malationa	7,43	+	331>99 (24)	331>127 (12)
Mepanipirim	7,69	+	224>106 (25)	224>77 (40)
Mepronil	7,47	+	270>91 (44)	270>119 (28)
Metacrifós	7,03	+	241>125 (20)	241>209 (8)
Metalaxil	5,79	+	280>192 (17)	280>220 (13)
Metidationa	7,0	+	303>85 (20)	303>145 (10)
Metolaclor	7,87	+	284>176 (25)	284>252 (15)
Metsulfurom metílico	6,06	+	382>167 (16)	382>199 (22)
Mevinfós	4,89/5,36	+	225>127 (15)	225>193 (8)
Monolinurom	6,52	+	215>99 (34)	215>126 (22)
Ometoato	3,13	+	214>125 (22)	214>183 (11)
Oxadixil	5,79	+	279>132 (34)	279>219 (10)
Paraoxon etílico	6,68	+	276>220 (17)	276>248 (16)
Penconazol	8,06	+	284>159 (34)	284>70 (16)
Picoxistrobina	7,85	+	368>145 (22)	368>201 (10)
Piraclostrobina	8,13	+	388>163 (25)	388>194 (12)
Pirazofós	8,22	+	374>194 (32)	374>222 (22)
Piridato	9,35	+	379>207 (18)	379>351 (10)
Pirimetanil	7,18	+	200>107 (24)	200>82 (24)
Pirimicarbe	5,92	+	239>182 (16)	239>72 (21)
Pirimifós etílico	8,66	+	334>198 (23)	334>182 (25)
Pirimifós metílico	8,23	+	306>108 (32)	306>164 (22)
Profenofós	8,57	+	373>128 (40)	373>303 (20)
Profoxidim	9,07	+	466>280 (16)	466>238 (19)
Propargito	8,88	+	368>175 (15)	368>231 (15)
Propoxur	6,16	+	210>111 (16)	210>168 (10)
Salinomicina	9,57	+	774>403 (61)	774>431 (50)
Simazina	6,2	+	202>96 (22)	202>124 (16)
Sulfacoloropiridazina	4,34	+	285>92 (28)	285>156 (15)

Sulfadiazina	3,16	+	251>108 (30)	251>156 (15)
Sulfadimetoxina	5,21	+	311>92 (32)	311>156 (20)
Sulfametazina	4,1	+	279>92 (28)	279>186 (16)
Sulfametoxazol	4,4	+	254>108 (27)	254>156 (16)
Sulfaquinoxalina	5,38	+	301>92 (30)	301>156 (16)
Sulfatiazol	3,34	+	256>92 (25)	256>156 (15)
Tebuconazol	8,05	+	308>70 (22)	308>125 (40)
Terbutilazina	7,39	+	230>174 (16)	230>96 (28)
Tiacloprido	5,24	+	253>126 (20)	253>90 (40)
Tiametoxam	4,02	+	292>132 (22)	292>211 (12)
Tilosina	6,65	+	916>101 (45)	916>174 (40)
Tolclofós metílico	8,25	+	301>125 (17)	301>175 (29)
Triadimefom	7,5	+	294>69 (20)	294>197 (15)
Triazofós	7,57	+	314>162 (35)	314>119 (18)
Triclorfom	8,69	+	257>127 (15)	257>257 (7)
Trifloxistrobina	8,32	+	409>145 (40)	409>186 (16)
Triflumizol	8,44	+	346>278 (10)	346>60 (10)

Os compostos ciproconazol e mevinfós apresentam isômeros e, por isso, a quantificação dos seus íons ocorreu através da integração dos dois tempos de retenção referentes aos dois picos cromatográficos apresentados para esses compostos.

4.2 Avaliação dos ensaios de extração realizados para análise de resíduos de agrotóxicos e antibióticos em mel

A partir de ensaios preliminares de procedimentos de preparo de amostra, concluiu-se que o uso da solução tampão *Mcllvaine*, pH 4, forneceu uma boa homogeneidade das amostras, e a acetonitrila promoveu uma eficiente extração dos compostos.

Por outro lado, a aplicação do método QuEChERS citrato modificado não foi eficiente para a extração dos antibióticos, pois na etapa de partição (caracterizada pela presença dos sais sulfato de magnésio, cloreto de sódio, citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquiidratado) foi constatada a perda de alguns analitos, através dos baixos percentuais de recuperação obtidos (40-60%).

Dessa forma, a procedência aos testes ocorreu utilizando a etapa inicial de homogeneização com a solução tampão, seguida de acetonitrila na etapa de extração do método, com posterior agitação e centrifugação do extrato, o qual

resultou na separação das fases aquosa e orgânica, sendo assim não foi necessária a etapa de partição. Em relação à etapa de limpeza da amostra foi imprescindível a aplicação do planejamento experimental, a fim de torná-lo mais adequado para posterior injeção no sistema cromatográfico. Foram obtidas 10 diferentes combinações dos sorventes PSA e C18, com posterior análise dos extratos pela aplicação de testes gravimétricos, Tabela 10.

Tabela 10 – Planejamento experimental obtido em relação às quantidades de sorventes PSA e C18 para a etapa de limpeza do método.

Testes	PSA (mg)	C18 (mg)
1	50	50
2	50	100
3	150	50
4	150	100
5	30	75
6	170	75
7	100	40
8	100	110
9	100	75
10	100	75

De acordo com os resultados do teste gravimétrico, realizados através da pesagem dos vials de cada um dos 10 testes, por três vezes, obtiveram-se as médias, apresentadas na Tabela 11. Pode-se inferir que o comportamento em relação à quantidade de PSA e a quantidade de coextrativos foram inversamente proporcionais, pois quanto menor a quantidade de PSA utilizada, maior foi a presença de coextrativos presentes, ressaltados nos testes 2 e 5. Da mesma forma, o teste 8 mostrou que quanto maior a presença de C18 em relação ao PSA, maior a quantidade de coextrativos presentes no extrato final.

Tabela 11 – Resultados referentes aos testes gravimétricos.

Teste QuEChERS citrato	Resposta teste gravimétrico (g)
1	0,00030
2	0,00195
3	0,00066
4	0,00088
5	0,00257
6	0,00114
7	0,00037
8	0,00191
9	0,00168
10	0,00173

O teste 1, na presença de 50 mg de PSA e 50 mg de C18, foi aquele apresentou menor quantidade de coextrativos em relação aos demais, sendo assim, esse teste foi escolhido e o seu extrato foi injetado no sistema UHPLC-MS/MS para avaliar os resultados em termos de recuperação dos compostos. Assim, a continuidade dos testes ocorreu com as mesmas proporções de sais do teste 1, na presença dos sorventes florisil® e OASIS HLB. A Figura 11 mostra os resultados preliminares obtidos com os diferentes sorventes e as três faixas de recuperação para cada teste, realizados no nível de fortificação $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

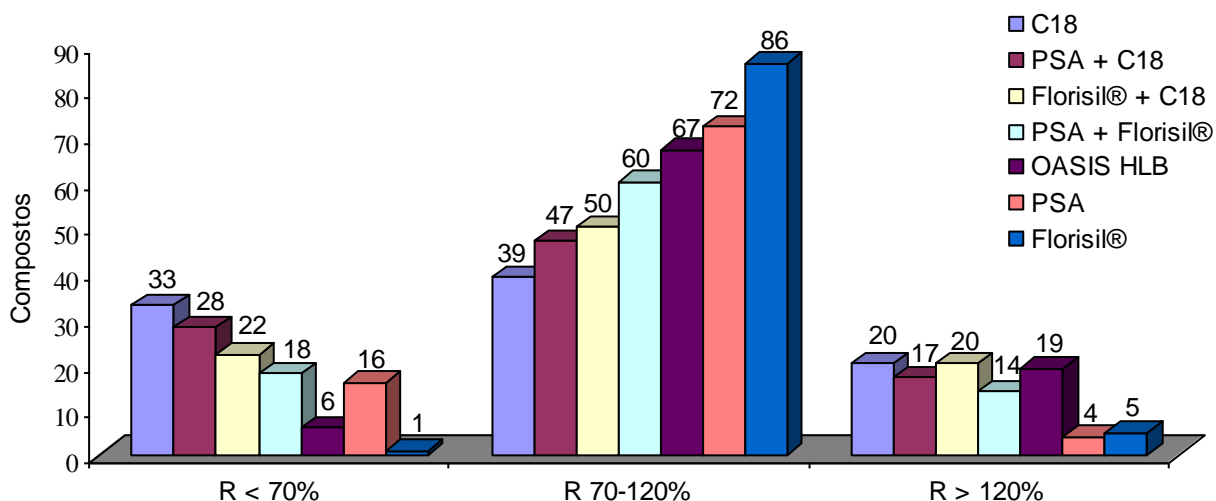


Figura 11 – Resultados referentes aos testes utilizando diferentes sorventes com a quantidade de compostos obtida para cada uma das três faixas de recuperação avaliadas.

Os testes empregando PSA e florisil® foram os que resultaram em um maior número de compostos (60) com resultados satisfatórios de recuperação (entre 70 e 120%), seguido pelo teste utilizando o sorvente OASIS HLB (67 compostos). Os

demais testes contendo C18, PSA + C18 e florisil[®] + C18 não foram satisfatórios, devido às menores quantidades de compostos com recuperações na faixa de 70-120%. Posteriormente, os sorventes PSA e florisil[®] foram testados separadamente. Observa-se que a extração dos compostos foi mais eficiente, sendo que na presença de PSA, 72 compostos apresentaram recuperações entre 70-120%, já o teste com florisil[®] apresentou 86 compostos com recuperações entre 70-120%.

Abaixo está representada a Tabela 12 com os resultados dos testes gravimétricos realizados na etapa de limpeza do método, utilizando os sorventes florisil[®] e PSA. Pesaram-se três vezes os vials contendo os extratos dos dois testes e posteriormente realizou-se a média, em cinco repetições.

Tabela 12 – Resultados dos testes gravimétricos realizados com os sorventes florisil[®] e PSA.

Extrações	Teste com sorvente florisil[®] (g)	Teste com sorvente PSA (g)
1	0,00030	0,00158
2	0,00027	0,00179
3	0,00025	0,00105
4	0,00027	0,00107
5	0,00011	0,00112

4.3 Validação do procedimento de preparo da amostra de mel

A validação do método proposto utilizou somente florisil[®] na etapa de limpeza, Figura 12, pois forneceu resultados satisfatórios tanto em relação à efetiva extração dos compostos, quanto em relação à remoção dos coextrativos no extrato final.

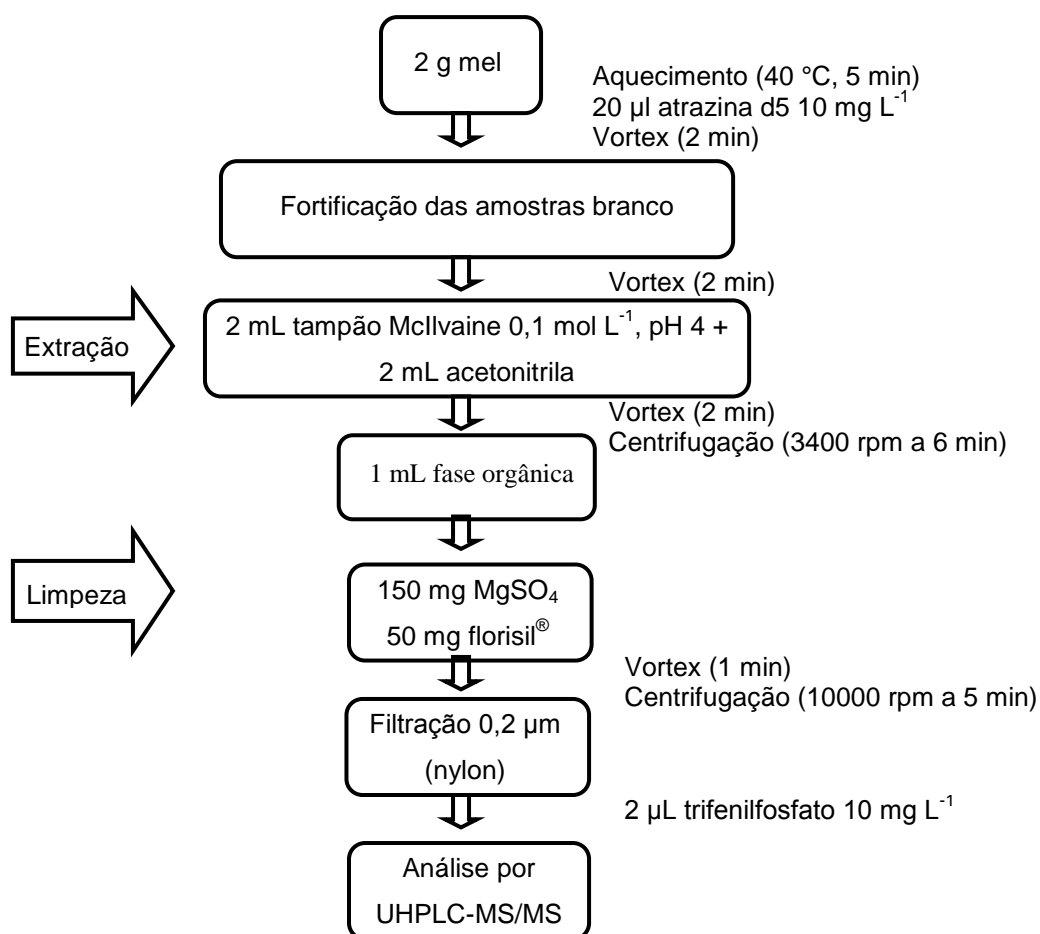


Figura 12 – Representação do método de preparo de amostra validado.

O florisil[®] utilizado na etapa de limpeza da amostra foi previamente ativado por aquecimento em mufla a 550 °C *overnight*, após foi mantido em estufa a 130 °C por 5 h e imediatamente desativado através da adição de 8% (m/v) de água Milli-Q, de acordo com RAMOS e colaboradores (1997). O uso do florisil[®] auxiliou na limpeza dos coextrativos presentes no mel sem a ocorrência de perdas nessa etapa. PINHO e colaboradores (2010) analisaram resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, também apontou a eficiência do florisil[®] na etapa de limpeza, comparado ao congelamento. Os resultados mostraram que o açúcar interagiu efetivamente com a superfície polar do florisil[®].

A utilização da solução tampão McIlvaine, pH 4, auxiliou na dissolução das amostras de mel, além de poder ser aplicado para compostos de diferentes polaridades e solubilidades. Da mesma forma, o Na₂EDTA foi necessário para evitar a complexação dos macrolídeos com metais presentes na amostra de mel (FRENICH *et al.*, 2010). O trabalho descrito por LI e colaboradores (2008) constata

a importância em utilizar essa solução tampão como solvente na etapa de extração de antibióticos em mel, pois fornece maiores valores de recuperação. Em contrapartida, segundo o autor, o emprego de água resulta em valores de recuperação menores, pois os compostos ficam retidos e complexam com os resíduos de metal da amostra.

Já a acetonitrila, utilizada como solvente de extração neste trabalho é um solvente de média polaridade, o qual é capaz de extrair uma grande variedade de compostos com diferentes características físico-químicas (HO *et al.*, 2012). Segundo trabalho proposto por PRESTES e colaboradores (2011), a acetonitrila permite a extração de pequenas quantidades de compostos lipofílicos provenientes da matriz. A acetonitrila é também classificada como um solvente ambientalmente correto e não persistente (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

4.3.1 Seletividade/especificidade

Para os métodos analíticos é importante a capacidade de discriminação entre a substância a analisar e substâncias que são provenientes da matriz, tais como açúcares, componentes fenólicos e minerais (EUROPEAN UNION, 2002).

Neste trabalho, a avaliação da seletividade foi feita através da injeção de amostras “branco” de mel, Figura 13, com o objetivo de verificar a presença de interferentes provenientes da matriz nos mesmos tempos de retenção dos analitos.

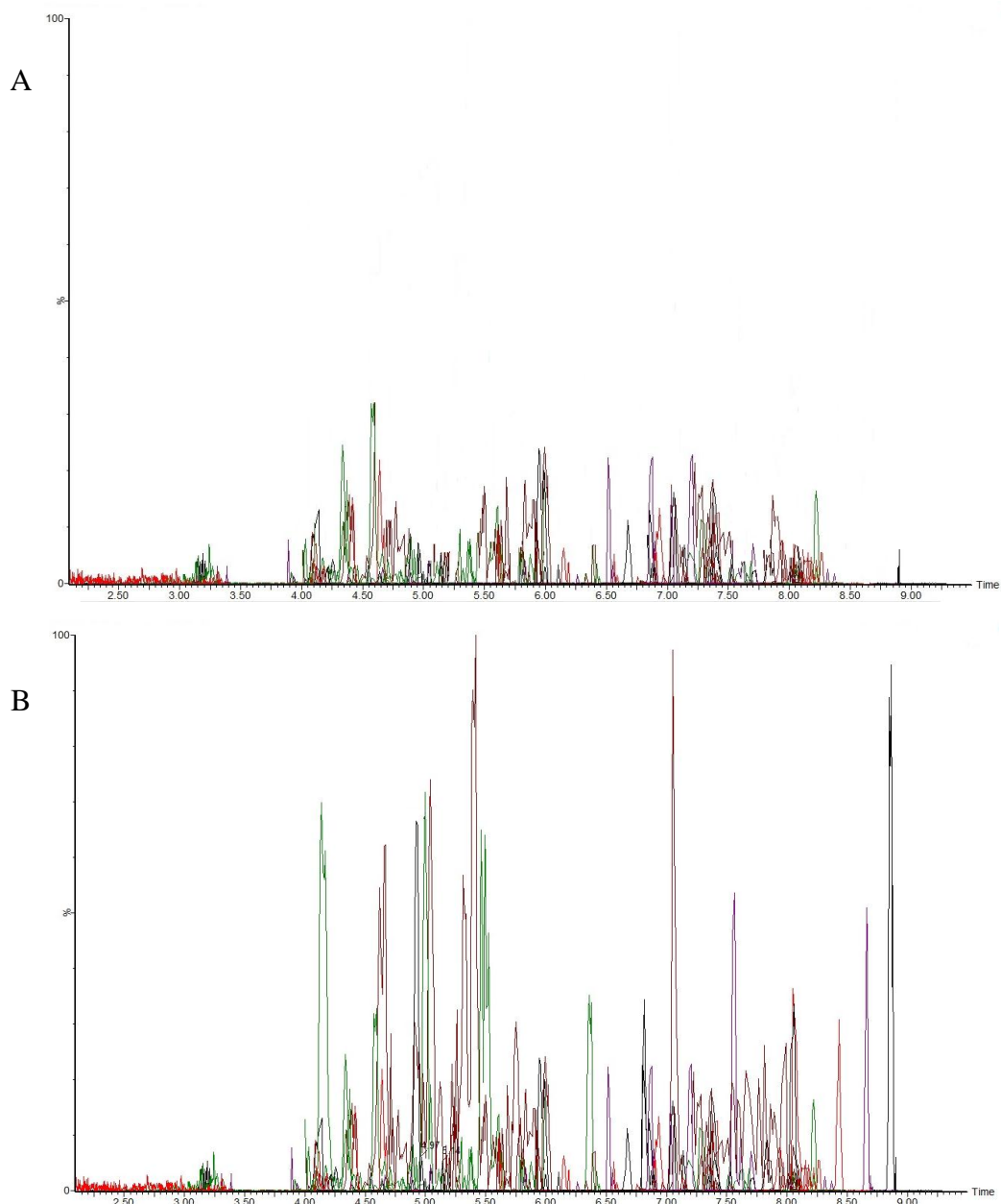


Figura 13 – Representação de um cromatograma de íons totais (TIC) da amostra “branco” de mel (A) e da amostra fortificada no menor nível da curva analítica $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (B), ambos os extratos injetados no sistema UHPLC-MS/MS.

4.3.2 Curva analítica – testes de normalidade e independência dos resíduos

A faixa de trabalho de cada composto determinado nesse trabalho foi preparada em solvente (acetonitrila) e na matriz mel, e injetada em triplicata nas concentrações $0,1; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 150$ e $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Anderson-Darling, no nível de significância de 5%. O teste rejeita a hipótese de normalidade quando se obtém valores $p < 0,05$. A Tabela 13 apresenta os resultados dos testes de Anderson-

Darling, Durbin-Watson, os valores da faixa linear e do coeficiente de determinação para cada composto.

Os níveis citados abaixo não apresentaram normalidade dos dados, ou seja, apresentaram heteroscedasticidade ($p < 0,05$): níveis 0,1 e 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$: azoxistrobina, carbofuram, dicofol, mepronil, mevinfós e triadimefon; níveis 150 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$: acetamiprido, cloranfenicol, fenarimol, fipronil, flusilazol, fluvalinato, fosmet, lincomicina cloridrato, linurom, mepanipirim, metidationa, oxadixil, penconazol, piridato e triazofós; níveis 0,1 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$: azinfós etílico, carbofuram 3-OH, clorpirifós etílico, diclorvós, dimetoato, dimoxistrobina, epoxiconazol, eritromicina ABC, etrimfós, todas as sulfonamidas (menos sulfatiazol), piraclostrobina, pirimifós metílico, profenofós, profoxidim, propargito, salinomicina, triclorfom e trifloxistrobina; nível 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$: carboxim e difenoconazol.

Portanto, os níveis citados acima foram excluídos para fins de cálculos para os respectivos compostos, respeitando o limite de 22,2% de pontos passíveis de exclusão, referentes à curva analítica.

Através do teste de Durbin-Watson, verificou-se a independência dos resíduos, segundo o critério ($p > 0,05$). Dessa forma, pode-se confirmar a premissa de que os dados seguem uma distribuição normal e independente, garantindo a linearidade da curva analítica aplicada para os analitos estudados.

Tabela 13 – Resultados dos testes de normalidade, independência, faixa linear e coeficiente de determinação, avaliados para cada composto.

Analitos	Teste de normalidade	Teste de independência	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coeficiente de determinação (r^2)
Acefato	0,1883	0,6132	0,1 a 200	0,9988
Acetamiprido	0,2450	0,4034	0,1 a 100	0,9971
Atrazina	0,1684	0,0502	0,1 a 200	0,9934
Azinfós etílico	0,7784	0,3198	1 a 150	0,9993
Azinfós metílico	0,0641	0,4884	0,1 a 200	0,9983
Azoxistrobina	0,4365	0,0729	2 a 200	0,9937
Boscalida	0,1171	0,9795	0,1 a 200	0,9986
Bromofós metílico	0,1586	0,1453	0,1 a 200	0,9986
Carbaril	0,1608	0,2294	0,1 a 200	0,9950
Carbendazim	0,6589	0,2844	0,1 a 200	0,9999
Carbofuram	0,0677	0,6292	2 a 200	0,9919
Carbofuram 3-OH	0,9164	0,1834	1 a 150	0,9991
Carboxim	0,3335	0,0870	0,1 a 150	0,9909

Ciproconazol	0,5022	0,7376	0,1 a 200	0,9954
Cloranfenicol	0,4949	0,0982	0,1 a 100	0,9981
Clorpirifós etílico	0,2782	0,4035	1 a 150	0,9986
Clorpirifós metílico	0,2203	0,4581	0,1 a 200	0,9957
Clotianidina	0,7999	0,2047	0,1 a 200	0,9984
Diclorvós	0,1355	0,1324	1 a 150	0,9963
Dietofencarbe	0,1613	0,5405	0,1 a 200	0,9953
Difenoconazol	0,0528	0,0761	0,1 a 150	0,9908
Dimetoato	0,2761	0,1179	1 a 150	0,9959
Dimoxistrobina	0,2084	0,8906	1 a 150	0,9933
Diniconazol	0,1447	0,0875	0,1 a 200	0,9969
Diuron	0,0528	0,0679	0,1 a 200	0,9925
Emamectina benzoato	0,0963	0,5952	0,1 a 200	0,9993
Epoxiconazol	0,9316	0,4291	1 a 150	0,9909
Eritromicina ABC	0,255	0,1851	1 a 150	0,9971
Etofenprox	0,1567	0,0817	0,1 a 200	0,9971
Etrimfós	0,8782	0,2382	1 a 150	0,9973
Fempropatrina	0,1801	0,1480	1 a 150	0,9982
Fempropimorfe	0,5147	0,3757	0,1 a 200	0,9926
Fenarimol	0,2247	0,5090	0,1 a 100	0,9979
Fipronil	0,7999	0,0818	0,1 a 100	0,9923
Flusilazol	0,2137	0,7355	0,1 a 200	0,9910
Flutolanil	0,2221	0,1286	0,1 a 100	0,9988
Fluvalinato	0,3288	0,4694	0,1 a 100	0,9979
Fosmet	0,1387	0,1827	0,1 a 100	0,9977
Furazolidona	0,0565	0,4009	0,1 a 200	0,9988
Hexaconazol	0,7653	0,1961	0,1 a 200	0,9963
Imazalil	0,06961	0,0561	0,1 a 200	0,9911
Imidacloprido	0,1688	0,0518	0,1 a 200	0,9983
Iprovalicarbe	0,5358	0,2795	0,1 a 200	0,9971
Isoxaflutol	0,6224	0,0552	0,1 a 200	0,9987
Lincomicina cloridrato	0,2417	0,6415	0,1 a 100	0,9968
Linurom	0,0500	0,4280	0,1 a 100	0,9977
Malationa	0,0518	0,3547	0,1 a 200	0,9971
Mepanipirim	0,0520	0,9417	0,1 a 100	0,9901
Mepronil	0,3106	0,9873	2 a 200	0,9931
Metacrifós	0,3118	0,2119	0,1 a 200	0,9971
Metalaxil	0,2138	0,0712	0,1 a 200	0,9962
Metidationa	0,0981	0,8201	0,1 a 100	0,9972
Metolaclor	0,0844	0,1168	0,1 a 200	0,9915
Metsulfurom metílico	0,1071	0,0526	0,1 a 200	0,9957
Mevinfós	0,0703	0,0605	2 a 200	0,9975
Monolinurom	0,0651	0,2369	0,1 a 200	0,9986
Ometoato	0,3407	0,9229	0,1 a 200	0,9995

Oxadixil	0,1132	0,9874	0,1 a 100	0,9993
Paraoxon etílico	0,8197	0,2683	0,1 a 200	0,9968
Penconazol	0,1405	0,0577	0,1 a 100	0,9904
Picoxistrobina	0,3298	0,8851	0,1 a 200	0,9918
Piraclostrobina	0,3719	0,9759	1 a 150	0,999
Pirazofós	0,8396	0,1805	0,1 a 200	0,9975
Piridato	0,0816	0,7867	0,1 a 100	0,9914
Pirimetanil	0,0825	0,8402	0,1 a 200	0,9946
Pirimicarbe	0,1916	0,0522	0,1 a 200	0,9949
Pirimifos etílico	0,3906	0,0945	0,1 a 200	0,9944
Pirimifos metílico	0,3915	0,286	1 a 150	0,9966
Profenofós	0,1161	0,1187	1 a 150	0,9992
Profoxidim	0,2435	0,6821	1 a 150	0,9969
Propargito	0,2455	0,2325	1 a 150	0,9980
Propoxur	0,1845	0,1930	0,1 a 200	0,9987
Salinomicina	0,0721	0,0894	1 a 150	0,9945
Simazina	0,2777	0,7311	0,1 a 200	0,9987
Sulfacloropiridazina	0,5738	0,2562	1 a 150	0,9980
Sulfadiazina	0,3541	0,1071	1 a 150	0,9948
Sulfadimetoxina	0,1830	0,1583	1 a 150	0,9973
Sulfametazina	0,5139	0,1347	1 a 150	0,9987
Sulfametoxazol	0,4108	0,0620	1 a 150	0,9920
Sulfaquinoxalina	0,5320	0,0526	1 a 150	0,9928
Sulfatiazol	0,0600	0,1678	0,1 a 200	0,9991
Tebuconazol	0,2707	0,6289	0,1 a 200	0,9984
Terbutilazina	0,1425	0,1106	2 a 200	0,9919
Tiacloprido	0,2367	0,0952	0,1 a 200	0,9989
Tiametoxam	0,0956	0,052	0,1 a 200	0,9962
Tilosina	0,1776	0,2689	0,1 a 200	0,9971
Tolclofós metílico	0,1635	0,3222	0,1 a 200	0,9982
Triadimefom	0,0823	0,7260	2 a 200	0,9961
Triazofós	0,0531	0,4744	0,1 a 100	0,9955
Triclorfom	0,3188	0,0818	1 a 150	0,9965
Trifloxistrobina	0,1344	0,1860	1 a 150	0,9958
Triflumizol	0,2564	0,1526	0,1 a 200	0,9975

4.3.3 Efeito matriz

De acordo com PINHO e colaboradores (2010), o efeito da matriz sobre os analitos apresenta relação proporcionalmente crescente ao aumento da complexidade da matriz em estudo. Esse efeito pode suprimir ou aumentar a

ionização do analito na fonte de ionização e conseqüentemente afeta os resultados de exatidão e precisão do método (FERRER *et al.*, 2011).

Os efeitos sobre a matriz são classificados de acordo com os seguintes critérios: nenhum efeito matriz é observado quando se obtém valores de -20 a 20%; entre -50 e -20% ou de 20 a 50%, observa-se um médio efeito matriz; e para valores superiores a 50% o efeito matriz é forte (FERRER *et al.*, 2011).

Na Tabela 14 está listado o efeito matriz que cada analito apresentou em virtude da comparação entre as injeções das soluções das curvas analíticas preparadas em solvente (acetonitrila) e das curvas analíticas preparadas por fortificação na matriz “branco” de mel.

Tabela 14 – Resultados do efeito matriz calculados para cada analito avaliado.

Compostos	Efeito matriz (%)	Compostos	Efeito matriz (%)
Acefato	-11,1	Malationa	80,4
Acetamiprido	9,4	Mepanipirim	37,3
Atrazina	58,5	Mepronil	54,1
Azinfós etílico	27,5	Metacrifós	74,7
Azinfós metílico	65,2	Metalaxil	65,9
Azoxistrobina	32,5	Metidationa	19,5
Boscalida	19,6	Metolaclor	59,2
Bromofós metílico	221,2	Metsulfurom metílico	56,5
Carbaril	98,1	Mevinfós	56,3
Carbendazim	16,0	Monolinurom	80,3
Carbofuram	87,4	Omatoato	-23,2
Carbofuram 3-OH	162	Oxadixil	73,6
Carboxim	43,2	Paraoxon etílico	85,6
Ciproconazol	15,0	Penconazol	36,4
Cloranfenicol	202,2	Picoxistrobina	52,9
Clorpirifós etílico	9,7	Piraclostrobina	13,7
Clorpirifós metílico	22,6	Pirazofós	43,9
Clotianidina	12,6	Piridato	624,8
Diclorvós	8,7	Pirimetanil	76,4
Dietofencarbe	74,8	Pirimicarbe	123,0
Difenoconazol	10,7	Pirimifós etílico	25,4
Dimetoato	82,3	Pirimifós metílico	26,0
Dimoxistrobina	413,2	Profenofós	19,2
Diniconazol	32,6	Profoxidim	27,2
Diuron	70,1	Propargito	63,1
Emamectina benzoato	-73,1	Propoxur	121,1
Epoxiconazol	30,5	Salinomicina	-12,0
Eritromicina ABC	-92,5	Simazina	101,8

Etofenprox	442,9	Sulfacloropiridazina	68,7
Etrimfós	24,4	Sulfadiazina	8,2
Fempropatrina	8,9	Sulfadimetoxina	83,8
Fempropimorfe	46,4	Sulfametazina	29,2
Fenarimol	33,3	Sulfametoxazol	81,0
Fipronil	76,8	Sulfaquinoxalina	81,0
Flusilazol	19,6	Sulfatiazol	0,4
Flutolanil	67,0	Tebuconazol	46
Fluvalinato	351,3	Terbutilazina	36,7
Fosmet	34,3	Tiacloprido	62,2
Furazolidona	48,3	Tiametoxam	26,1
Hexaconazol	49,2	Tilosina	-76,6
Imazalil	11,3	Tolclofós metílico	9,0
Imidacloprido	92,3	Triadimefon	34,3
Iprovalicarbe	71,7	Triazofós	67,0
Isoxaflutol	56,6	Triclorfom	158,9
Lincomicina cloridrato	-94,4	Trifloxistrobina	8,5
Linurom	121,6	Triflumizol	60,6

Os resultados mostraram que a maioria dos compostos apresentou efeito matriz positivo, sendo que 73% apresentaram efeito superior a 20% e 8% dos compostos apresentou efeito matriz negativo, caracterizado pela supressão do efeito matriz. Por outro lado, 19% dos compostos apresentaram efeito matriz inferior a 20%. Os componentes presentes na matriz mel, como os polissacarídeos são responsáveis por promoverem um aumento da resposta do sinal analítico, durante a ionização dos analitos (Orso *et al.*, 2014). A fim de compensar o efeito matriz, as curvas analíticas foram preparadas no extrato branco da matriz.

GALARINI e colaboradores (2015) avaliaram o efeito matriz de amostras de mel na determinação de 27 antibióticos pertencentes às classes das sulfonamidas, nitroimidazóis e quinolonas, por LC-MS/MS. Os autores relataram altos resultados de efeito matriz. Em seu trabalho, GOMEZ-PEREZ e colaboradores (2012) avaliaram o efeito matriz de agrotóxicos e antibióticos em amostras de mel, sendo que a maioria dos compostos apresentou efeito matriz entre 50 e 120%, resultados semelhantes a esse trabalho, que apresentou 44 compostos com efeito matriz acima de 50%.

4.3.4 Exatidão – recuperação/veracidade

Os parâmetros de exatidão do método proposto foram avaliados através da extração dos dez níveis de fortificação da curva preparada no extrato “branco” de mel, com seis injeções de cada nível. A Tabela 15 apresenta os percentuais de recuperação e precisão, em termos de repetibilidade e precisão intermediária do método para os dez níveis da curva analítica fortificada para todos os agrotóxicos avaliados nesse trabalho.

A avaliação dos dados de exatidão em relação à repetibilidade do método demonstra bons resultados para a maioria dos compostos, com exceção de 23 compostos para o nível $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, 2 do nível $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, 3 do nível $2 \mu\text{g kg}^{-1}$, 10 do nível $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, 6 do nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, 2 do nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 1 do nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Apenas azinfós etílico apresentou valor acima de 120% para o nível $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os compostos metsulfurom metílico, piridato e salinomicina apresentaram recuperação abaixo de 70% no nível $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, clotianidina e simazina no nível $2 \mu\text{g kg}^{-1}$, isoxaflutol e trifloxistrobina no nível $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, iprovalicarbe no nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e picoxistrobina no nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. O método mostrou boa precisão, em termos de repetibilidade, no entanto, alguns compostos apresentaram $\text{RSD} > 20\%$: clorpirifós metílico, clotianidina, diniconazol, furazolidona, simazina, tebuconazol, tolclofós metílico a $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$; mevinfós, picoxistrobina, propoxur e tebuconazol em $1 \mu\text{g kg}^{-1}$; diclorvós, mevinfós e profenofós no nível $2 \mu\text{g kg}^{-1}$; carboxim no nível $5 \mu\text{g kg}^{-1}$; diclorvós e piraclostrobina no nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$; malationa no nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$; clorimuró etílico, dimoxistrobina, linurom e malationa no nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$; dietofencarbe e fempropimorfe no nível $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; fenarimol, fipronil, flusilazol, linurom, miclobutanil, piraclostrobina, salinomicina e triadimefon no nível $150 \mu\text{g kg}^{-1}$; epoxiconazol, fempropimorfe, flusilazol, metolaclor e triazofós no nível $200 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 15 – Percentuais dos ensaios de recuperação (R), expressos em termos de repetibilidade e precisão intermediária e resultados de precisão, em termos de desvio padrão relativo (RSD), avaliados para os agrotóxicos em estudo.

Agrotóxicos	Níveis de repetibilidade ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n= 6										Precisão intermediária ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n=4		
	0,1	1	2	5	10	20	50	100	150	200	10	20	50
	Recuperação \pm RSD												
Acefato	121 \pm 6	108 \pm 9	96 \pm 1	96 \pm 5	97 \pm 6	91 \pm 5	89 \pm 9	88 \pm 3	97 \pm 6	101 \pm 2	118 \pm 16	72 \pm 5	71 \pm 7
Acetamiprido	115 \pm 5	98 \pm 8	95 \pm 13	113 \pm 13	115 \pm 5	124 \pm 7	116 \pm 2	104 \pm 1	93 \pm 1	91 \pm 9	119 \pm 4	114 \pm 8	109 \pm 9
Atrazina	109 \pm 10	107 \pm 15	101 \pm 18	115 \pm 14	96 \pm 3	98 \pm 6	104 \pm 3	104 \pm 3	98 \pm 5	92 \pm 2	114 \pm 2	92 \pm 8	97 \pm 11
Azinfós etílico	115 \pm 14	115 \pm 14	109 \pm 10	135 \pm 13	115 \pm 6	117 \pm 6	118 \pm 8	122 \pm 18	103 \pm 10	74 \pm 14	117 \pm 8	115 \pm 15	156 \pm 2
Azinfós metílico	101 \pm 11	102 \pm 11	81 \pm 14	85 \pm 12	96 \pm 14	97 \pm 8	105 \pm 20	105 \pm 3	101 \pm 9	91 \pm 8	117 \pm 13	91 \pm 16	83 \pm 5
Azoxistrobina	118 \pm 10	88 \pm 5	87 \pm 12	105 \pm 1	93 \pm 4	93 \pm 14	97 \pm 19	103 \pm 11	94 \pm 6	97 \pm 6	100 \pm 15	87 \pm 6	93 \pm 19
Boscalida	110 \pm 10	88 \pm 7	115 \pm 5	105 \pm 9	97 \pm 16	92 \pm 11	97 \pm 17	95 \pm 19	94 \pm 10	99 \pm 5	119 \pm 2	82 \pm 30	86 \pm 25
Bromofós metílico	105 \pm 5	81 \pm 10	105 \pm 10	106 \pm 8	99 \pm 5	108 \pm 9	96 \pm 7	97 \pm 6	99 \pm 4	86 \pm 4	115 \pm 14	115 \pm 11	120 \pm 9
Carbaril	114 \pm 14	93 \pm 17	100 \pm 5	117 \pm 20	99 \pm 7	106 \pm 5	105 \pm 3	100 \pm 3	101 \pm 14	93 \pm 8	118 \pm 14	94 \pm 12	101 \pm 13
Carbendazim	77 \pm 14	112 \pm 7	105 \pm 10	109 \pm 19	109 \pm 5	101 \pm 9	98 \pm 3	98 \pm 1	99 \pm 8	100 \pm 8	110 \pm 11	83 \pm 9	87 \pm 5
Carbofuram	124 \pm 18	90 \pm 12	90 \pm 6	105 \pm 3	100 \pm 2	96 \pm 6	98 \pm 5	98 \pm 3	103 \pm 11	99 \pm 10	118 \pm 9	87 \pm 9	87 \pm 8
Carbofuram 3-OH	112 \pm 10	145 \pm 13	90 \pm 18	107 \pm 13	115 \pm 4	102 \pm 3	104 \pm 7	99 \pm 4	100 \pm 12	92 \pm 10	125 \pm 9	96 \pm 13	106 \pm 10
Carboxim	75 \pm 10	91 \pm 17	118 \pm 12	129 \pm 22	113 \pm 11	118 \pm 3	114 \pm 6	105 \pm 3	97 \pm 6	88 \pm 5	112 \pm 5	115 \pm 10	111 \pm 7
Clorpirifós etílico	102 \pm 7	98 \pm 18	86 \pm 11	98 \pm 11	103 \pm 6	104 \pm 6	104 \pm 5	107 \pm 4	101 \pm 13	96 \pm 11	113 \pm 6	104 \pm 10	75 \pm 2
Clorpirifós metílico	128 \pm 26	98 \pm 7	115 \pm 17	106 \pm 4	107 \pm 17	93 \pm 11	99 \pm 13	105 \pm 11	119 \pm 8	106 \pm 7	117 \pm 3	93 \pm 6	133 \pm 21
Clotianidina	122 \pm 36	103 \pm 14	67 \pm 11	86 \pm 13	118 \pm 17	110 \pm 18	97 \pm 6	107 \pm 2	101 \pm 4	98 \pm 6	117 \pm 9	97 \pm 10	103 \pm 18
Ciproconazol	125 \pm 14	70 \pm 11	123 \pm 7	106 \pm 17	84 \pm 20	100 \pm 10	99 \pm 19	105 \pm 7	95 \pm 20	103 \pm 10	115 \pm 3	83 \pm 18	90 \pm 19
Diclorvós	112 \pm 10	120 \pm 18	120 \pm 24	122 \pm 13	130 \pm 21	113 \pm 7	113 \pm 8	103 \pm 4	99 \pm 5	91 \pm 4	117 \pm 9	113 \pm 1	110 \pm 12
Dietofencarbe	128 \pm 20	95 \pm 8	73 \pm 19	91 \pm 1	82 \pm 13	94 \pm 14	90 \pm 17	105 \pm 21	103 \pm 19	100 \pm 16	127 \pm 14	76 \pm 18	73 \pm 6
Difenoconazol	103 \pm 10	97 \pm 6	95 \pm 6	128 \pm 5	139 \pm 2	119 \pm 10	117 \pm 4	110 \pm 4	99 \pm 5	86 \pm 6	131 \pm 5	120 \pm 8	118 \pm 2

Dimetoato	112±12	110±19	125±18	123±8	113±20	115±4	108±3	99±2	98±8	91±8	117±6	119±4	117±12
Dimoxistrobina	107±18	91±10	75±13	77±4	80±6	75±18	79±21	80±19	93±9	118±9	92±7	84±25	64±11
Diniconazol	117±26	101±18	76±19	89±11	92±8	103±7	98±8	104±3	103±5	96±5	119±17	98±9	90±5
Diuron	118±16	95±8	70±16	84±5	87±6	89±4	100±6	103±3	103±8	93±8	107±4	88±19	100±11
Emamectina benzoato	121±19	80±17	93±3	86±5	91±12	93±8	84±3	91±7	98±12	101±5	128±16	110±6	109±11
Epoxiconazol	120±8	112±14	118±15	112±6	128±13	113±13	112±13	118±1	104±4	85±22	113±6	99±15	113±12
Etofenprox	76±14	82±15	113±16	80±11	79±12	81±9	71±10	85±8	104±13	86±5	114±6	101±20	98±10
Etrinfós	126±17	95±13	105±16	122±11	120±16	117±7	107±14	114±3	102±4	87±4	128±17	120±2	103±16
Fenarimol	125±14	75±12	110±12	73±16	126±18	100±15	95±13	116±5	118±23	89±7	117±25	77±21	75±19
Fempropatrina	123±19	82±16	80±21	106±18	107±5	106±6	103±4	108±2	101±15	94±12	109±7	69±3	96±6
Fempropimorfe	115±14	83±20	77±15	73±13	78±5	79±17	87±18	108±21	96±8	110±27	123±4	117±24	107±18
Fipronil	91±10	75±19	90±8	115±9	125±18	118±5	100±20	116±16	98±22	77±15	119±8	110±34	107±17
Flusilazol	122±17	77±3	77±18	78±15	76±17	80±15	70±18	86±18	87±26	102±21	113±5	66±12	80±20
Flutolanil	77±15	85±12	83±20	84±10	75±13	77±11	79±19	90±18	95±12	109±8	110±20	72±19	51±11
Fluvalinato	103±8	74±19	108±8	105±5	98±11	107±9	99±7	101±3	99±2	95±1	122±16	106±4	104±10
Fosmet	117±10	100±7	115±10	118±4	114±15	117±7	109±9	111±1	95±3	87±12	123±16	106±17	106±17
Hexaconazol	121±15	77±11	83±10	89±17	83±20	80±17	70±10	92±20	109±6	103±11	101±22	75±17	75±11
Imazalil	108±10	105±5	83±18	109±1	108±14	116±6	113±9	109±3	101±7	91±7	117±9	120±10	117±11
Imidacloprido	117±14	110±17	130±8	104±16	116±9	106±5	105±2	99±3	99±12	96±6	106±5	105±16	94±15
Iprovalicarbe	77±19	75±5	71±18	76±16	68±10	81±5	86±8	100±7	107±15	101±6	112±8	71±15	81±19
Isoxaflutol	114±2	120±5	75±15	67±14	84±15	80±14	86±7	93±1	101±11	105±8	112±1	70±3	71±14
Linurom	119±12	75±9	88±14	101±3	95±13	101±13	81±23	105±14	110±25	89±12	121±16	81±18	83±19
Malationa	90±14	110±6	80±17	78±11	99±17	103±23	99±29	107±18	97±18	99±12	125±3	92±3	109±13
Mepanipirim	76±7	70±13	78±4	88±12	80±15	102±16	90±20	101±16	110±19	93±18	125±5	77±8	113±19
Mepronil	123±20	110±9	88±9	94±14	95±15	93±15	96±18	106±12	91±18	103±16	122±5	76±16	87±19
Metalaxil	116±5	85±12	78±4	97±3	83±1	93±4	99±8	97±5	103±4	96±6	118±13	85±16	98±13

Metacrifós	87±19	90±20	73±11	85±12	76±7	75±11	87±5	102±3	102±9	103±7	122±13	73±11	77±12
Metidationa	118±11	78±19	98±11	127±4	119±14	106±17	103±7	97±10	99±12	91±9	119±13	113±37	99±23
Metolaclor	96±20	70±18	100±5	90±2	90±16	91±13	87±12	96±11	105±12	93±21	118±6	98±17	89±11
Metsulfurom metílico	67±18	100±16	110±5	116±2	103±10	102±4	106±5	100±2	100±5	94±3	121±12	96±7	102±13
Mevinfós	118±7	135±22	111±32	118±7	109±4	104±10	104±3	102±2	98±14	96±10	107±4	93±14	94±11
Monolinurom	126±15	116±20	102±9	114±14	96±12	89±3	95±4	99±5	103±11	97±11	115±17	91±3	86±6
Ometoato	116±8	102±12	79±18	96±4	92±10	89±5	95±9	90±3	103±9	101±9	79±5	89±12	81±4
Oxadixil	121±18	95±14	118±7	108±10	118±7	105±8	112±5	101±6	97±5	93±3	116±17	104±7	105±13
Paraoxom etílico	96±18	95±6	74±13	84±10	78±3	83±5	85±7	94±10	106±9	98±5	118±6	71±8	79±10
Penconazol	72±15	103±6	114±12	124±18	121±11	115±11	122±12	99±14	85±12	82±1	118±11	128±6	114±16
Picoxistrobina	118±14	89±22	91±11	89±16	76±5	68±12	82±19	90±17	96±6	105±9	79±3	73±17	84±20
Pirimicarbe	98±14	105±7	115±5	128±15	115±2	111±8	106±5	117±16	110±28	93±8	120±12	105±3	72±6
Pirimifós etílico	71±16	85±5	84±19	81±15	83±3	93±7	89±5	114±10	105±7	95±13	109±13	102±21	103±1
Pirimifós metílico	105±9	76±15	73±4	93±8	89±5	101±17	98±8	86±12	102±12	91±9	118±5	98±15	85±15
Profenofós	122±13	70±7	85±26	89±9	95±8	98±5	91±5	91±11	106±8	98±12	113±7	99±11	93±6
Profoxidim	128±15	75±16	95±12	76±13	97±14	92±18	89±16	99±3	101±10	88±14	113±27	109±16	80±13
Propargito	111±14	80±16	100±18	78±11	85±4	96±9	93±4	108±8	104±17	94±8	114±12	117±12	86±9
Propoxur	75±11	105±27	110±15	106±18	113±8	101±7	99±4	112±4	104±9	96±14	120±8	96±13	120±10
Piraclostrobina	105±17	85±5	88±7	73±15	89±21	105±18	99±16	102±3	105±12	90±13	116±7	87±17	93±8
Pirazofós	125±19	103±15	89±8	73±15	74±12	93±8	87±10	100±11	107±16	99±20	118±5	82±16	100±19
Piridato	62±16	84±8	91±3	86±5	83±10	90±18	85±13	102±8	102±13	83±9	125±4	115±16	83±16
Pirimetanil	94±13	75±7	70±8	81±9	89±15	91±16	83±10	95±3	102±16	97±8	119±7	80±19	98±20
Salinomicina	124±12	65±14	78±4	90±7	84±2	125±17	87±2	108±15	96±22	78±11	129±18	119±6	119±23
Simazina	80±29	74±8	69±14	95±20	90±8	82±10	90±4	94±2	99±11	104±10	119±14	78±7	78±13
Tebuconazol	130±22	70±26	75±17	92±5	80±17	94±15	94±4	91±12	96±3	101±7	118±11	76±17	81±26
Terbutilazina	88±10	98±15	103±13	97±10	108±6	103±13	109±13	104±12	104±10	89±7	119±16	102±26	99±24
Tiacloprido	106±19	90±13	100±5	102±9	105±9	102±4	102±9	99±1	101±8	97±9	112±10	91±6	91±11

Tiametoxam	117±16	92±12	86±4	124±11	119±14	100±11	101±9	103±3	97±6	95±5	126±9	84±15	92±8
Tolclofós metílico	76±21	75±19	103±8	91±20	109±2	100±6	107±11	98±16	99±2	104±11	118±10	90±11	89±10
Triadimefom	75±20	75±7	80±17	71±11	79±20	98±11	97±20	100±9	82±23	109±13	122±13	86±20	83±32
Triazofós	130±19	110±7	75±19	97±20	80±14	104±19	105±16	103±8	113±18	96±27	125±27	85±10	117±18
Triclorfom	74±17	120±20	117±10	120±8	117±11	108±15	106±9	99±5	97±16	91±8	110±7	101±18	102±14
Trifloxistrobina	125±14	80±8	70±19	69±8	99±12	117±10	108±3	113±4	100±12	94±12	115±7	106±23	104±9
Triflumizol	107±12	70±14	73±14	79±12	83±4	90±11	83±5	102±5	104±17	98±14	126±10	112±19	104±16

Em termos de precisão intermediária, as recuperações ficaram acima de 120% para os compostos carbofuran 3-OH, dietofencarbe, emamectina benzoato, etrimfós, fempropimorfe, fluvalinato, fosmet, linurom, malationa, mepronil, metacrifós, metsulfurom metílico, salinomicina, tiametoxam, triadimefon, triazofós e triflumizol para o nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os compostos azinfós etílico e clorpirifós etílico para o nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Além de dimoxistrobina e flusilazol, os quais apresentaram valores de recuperação abaixo de 70% para os níveis 50 e $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Os valores de RSD ficaram acima de 20% para: fenarimol, hexaconazol e triazofós no nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$; boscalida, dimoxistrobina, fempropimorfe, fipronil, metidationa, pirimifós etílico, terbutilazina e trifloxistrobina no nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ e boscalida, clorpirifós etílico, salinomicina, tebuconazol e terbutilazina no nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de coeficiente de variação para níveis de concentração abaixo de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ devem ser os menores possíveis, segundo a Decisão 2002/657/EC (European Commission Decision, 2002). Os resultados obtidos neste trabalho foram similares aos apresentados por GÓMEZ-PÉREZ e colaboradores (2012) na análise de agrotóxicos e drogas veterinárias, em que alguns compostos não apresentaram resultados de recuperação e RSD adequados para o nível de concentração mais baixo ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Os resultados de veracidade avaliados para os três níveis intermediários de fortificação (10 ; 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) ficaram entre 65 e 148% para o nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, entre 67 e 125% para o nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 68 e 156% para o nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. No entanto, deve-se ressaltar que para a maioria dos compostos a veracidade apresentou valores entre 80 e 110%, faixa recomendada para concentrações acima de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, segundo o MAPA (2011). Os compostos que apresentaram valores de veracidade fora da faixa estipulada pelo MAPA, possuem valores de recuperação entre 70 e 120%, com exceção dos compostos acetamiprido e salinomicina para o nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, os quais apresentam recuperações acima de 120%.

As recuperações dos 12 antibióticos foram realizadas de acordo com a Decisão 2002/657/EC, nas concentrações de 0,5, 1 e 1,5 vezes o LMR de cada composto. A Tabela 16 apresenta os resultados de recuperação e RSD em relação a repetibilidade e precisão intermediária do método para os antibióticos avaliados nesse estudo.

Tabela 16 – Resultados de recuperação (R) e RSD para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária para os antibióticos em estudo.

Antibióticos	Níveis de fortificação \pm RSD ($\mu\text{g kg}^{-1}$), n= 6					
	Repetibilidade			Precisão intermediária		
	0,5 LMR R \pm RSD (%)	1 LMR R \pm RSD (%)	1,5 LMR R \pm RSD (%)	0,5 LMR R \pm RSD (%)	1 LMR R \pm RSD (%)	1,5 LMR R \pm RSD (%)
Cloranfenicol	108 \pm 10	116 \pm 16	114 \pm 13	85 \pm 8	92 \pm 10	107 \pm 7
Eritromicina ABC	73 \pm 19	87 \pm 16	93 \pm 3	81 \pm 11	73 \pm 6	79 \pm 19
Furazolidona	113 \pm 32	90 \pm 21	88 \pm 12	79 \pm 16	85 \pm 17	71 \pm 4
Lincomicina cloridrato	120 \pm 10	74 \pm 18	73 \pm 14	64 \pm 15	76 \pm 13	71 \pm 9
Sulfacloropiridazina	65 \pm 4	85 \pm 17	138 \pm 18	67 \pm 7	78 \pm 14	80 \pm 4
Sulfadiazina	76 \pm 14	73 \pm 13	103 \pm 3	86 \pm 12	81 \pm 7	75 \pm 4
Sulfadimetoxina	123 \pm 9	105 \pm 25	75 \pm 16	90 \pm 10	84 \pm 4	92 \pm 3
Sulfametazina	65 \pm 14	95 \pm 5	98 \pm 11	85 \pm 10	87 \pm 16	96 \pm 5
Sulfametoxazol	110 \pm 14	90 \pm 17	88 \pm 3	73 \pm 5	78 \pm 2	85 \pm 7
Sulfaquinoxalina	95 \pm 17	85 \pm 23	83 \pm 13	85 \pm 7	106 \pm 9	89 \pm 12
Sulfatiazol	127 \pm 10	82 \pm 6	90 \pm 6	76 \pm 9	94 \pm 16	75 \pm 4
Tilosina	92 \pm 12	76 \pm 32	76 \pm 16	121 \pm 1	89 \pm 2	69 \pm 2

Os resultados de recuperação para os antibióticos ficaram acima de 120% para sulfadimetoxina e sulfatiazol (0,5 LMR) e sulfacloropiridazina (1,5 LMR) no ensaio de repetibilidade e para tilosina (0,5 LMR) no ensaio de precisão intermediária. Por outro lado, a sulfacloropiridazina e sulfametazina (0,5 LMR) para a repetibilidade; lincomicina cloridrato e sulfacloropiridazina (0,5 LMR) e tilosina (1,5 LMR), para a precisão intermediária, apresentaram valores abaixo de 70%. Para a maioria dos antibióticos, os resultados mostraram boa precisão do método nos ensaios de repetibilidade, exceto para furazolidona (0,5 LMR e 1 LMR), sulfaquinoxalina e tilosina para (1 LMR), apresentaram RSD > 20%. Os resultados para a precisão intermediária ficaram abaixo de 20% para todos os antibióticos.

O estudo relatado por GALARINI e colaboradores (2015) para a determinação de 27 resíduos de antibióticos em mel com detecção por LC-MS/MS, relataram resultados de recuperação inferiores a 70% para alguns antibióticos, tais como, sulfadiazina e sulfaquinoxalina, com RSD > 20% para alguns compostos.

4.3.5 Precisão

A avaliação da precisão do método, em termos de repetibilidade foi realizada através da injeção dos dez níveis da curva fortificada na matriz mel, em quatro repetições de cada nível. A precisão intermediária foi feita em dois dias diferentes e

os dados foram avaliados utilizando o teste t, em quatro repetições dos níveis intermediários 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, Tabela 17. O teste t forneceu informações sobre a distribuição dos dados, ou seja, se os dados podem ser classificados como significativamente iguais ou diferentes. O valor crítico para aceitar a hipótese nula de que os resultados obtidos são significativamente diferentes é de 2,353 para 5% de significância.

Tabela 17 – Resultados da precisão intermediária avaliada, utilizando o teste t nos três níveis intermediários de fortificação da curva analítica.

Compostos	Precisão intermediária - Teste t		
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Acefato	0,2254	-3,8660	-2,2645
Acetamiprido	0,6303	-0,4848	-1,6275
Atrazina	0,2254	-1,1466	-1,1290
Azinfós etílico	0,5546	-0,8167	0,9967
Azinfós metílico	0,2966	-0,6473	-1,1436
Azoxistrobina	0,3995	-0,0824	1,8707
Boscalida	0,0058	-0,8166	-0,9013
Bromofós metílico	0,2711	0,4544	2,2908
Carbaril	0,2181	-2,7402	-0,8365
Carbendazim	0,9758	-1,8370	-1,5390
Carbofuram	0,0822	-1,1623	-0,4039
Carbofuram 3-OH	0,5997	-0,7345	0,0628
Carboxim	0,8809	-0,8224	-1,0580
Ciproconazol	0,2885	-2,0887	-0,9095
Cloranfenicol	0,0066	0,6490	-0,9595
Clorpirifós etílico	0,1248	-0,1170	-3,5306
Clorpirifós metílico	0,1047	1,2127	-0,5254
Clotianidina	0,8943	-0,8219	1,1831
Diclorvós	-1,9776	-0,4013	-0,9144
Dietofencarbe	0,6002	-1,3640	-1,0274
Difenoconazol	-1,9952	-0,2802	0,1453
Dimetoato	0,6728	0,2598	0,7662
Dimoxistrobina	0,0218	0,9025	-0,2568
Diniconazol	1,9824	-1,4163	-0,6171
Diuron	2,2477	-1,0825	0,8176
Emamectina benzoato	0,6767	0,6957	1,4076
Epoxiconazol	-0,7572	-0,9374	1,4659
Eritromicina ABC	1,9773	0,7417	-1,4173
Etofenprox	0,1940	1,3462	0,2083
Etrimfós	1,3392	0,7616	-1,0753

Fempropimorfe	0,8618	0,9945	1,4820
Fenarimol	0,3328	-2,1002	0,6142
Fipronil	0,7232	-0,2748	1,0315
Flusilazol	0,4235	-0,8269	0,3884
Flutolanil	0,1553	0,5361	0,4179
Fluvalinato	0,2269	-0,3594	1,2305
Fosmet	0,7667	-2,4482	0,1687
Furazolidona	2,6513	-0,1815	0,2772
Hexaconazol	2,8867	-0,3207	1,2214
Imazalil	0,7006	0,2680	0,9932
Imidacloprido	-1,7995	0,1321	-1,1962
Iprovalicarbe	0,3476	0,8169	-0,4484
Isoxaflutol	0,6939	1,6059	-3,1117
Lincomicina cloridrato	1,2810	2,6207	-2,5451
Linurom	3,1637	0,7535	2,0533
Malationa	1,8081	-0,2250	1,0763
Mepanipirim	0,6229	-3,5025	0,8956
Mepronil	0,2675	-2,2957	-1,5397
Metacrifós	0,3039	0,2852	-1,2165
Metalaxil	0,4448	-1,1141	0,9952
Metidationa	-0,3779	0,4607	-0,5357
Metolaclor	0,4997	0,3324	2,2692
Metsulfurom metílico	1,7835	-1,3666	-0,1547
Mevinfós	-1,2990	-0,6153	-1,9927
Monolinurom	1,6764	-2,1435	-3,1505
Ometoato	0,1101	0,3982	-1,9150
Oxadixil	-0,3016	-0,7212	-0,1556
Paraoxon etílico	0,2186	-2,6835	-0,9884
Penconazol	-3,6953	0,5844	-1,1414
Picoxistrobina	1,866	0,5250	1,3620
Piraclostrobina	2,3026	-2,2386	-0,5821
Pirazofós	0,4074	-1,1276	-0,7207
Piridato	0,1105	0,1126	-3,5784
Pirimetanil	0,8912	-0,6734	2,2963
Pirimicarbe	-1,5595	-1,0188	-2,0794
Pirimifós etílico	0,3683	0,4908	-0,2850
Pirimifós metílico	0,3142	-0,3839	-0,4036
Profenofós	0,1311	0,1335	-4,3101
Profoxidim	1,1605	1,5819	1,2970
Propargito	0,5357	1,9827	2,2171
Propoxur	0,6129	-0,5847	-0,8421
Salinomicina	3,0308	-1,2295	0,9039
Simazina	1,8235	-0,5356	-2,6300
Sulfaclopiridazina	0,6187	-1,6060	0,6738

Sulfadiazina	1,7741	-3,3382	-11,25
Sulfadimetoxina	0,6291	-2,3515	-10,91
Sulfametazina	0,6592	-2,6592	-0,1389
Sulfametoxazol	0,5474	-1,1056	-3,0454
Sulfaquinoxalina	1,1338	-1,9973	-1,5961
Sulfatiazol	0,5547	-1,8944	-1,3188
Tebuconazol	3,0517	-1,2634	-1,1190
Terbutilazina	1,753	0,4085	-1,8690
Tiacloprido	0,3442	-2,0210	-0,4942
Tiametoxam	2,6544	1,7492	0,9811
Tilosina	0,2578	0,7888	0,3527
Tolclofós metílico	0,7559	-1,7604	-1,1205
Triadimefon	1,8136	-3,1696	-0,4908
Triazofós	1,5649	-2,4892	-1,4697
Triclorfom	0,8219	-1,3640	1,4367
Trifloxistrobina	2,1974	-1,3374	-1,3535
Triflumizol	0,3192	2,6101	1,8221

Os resultados mostraram boa precisão intermediária do método, considerando que somente os compostos furazolidona, hexaconazol, linurom, salinomicina, tebuconazol e tiametoxam no nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ e lincomicina cloridrato e triflumizol no nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ apresentaram diferença significativa das médias dos desvios padrões da precisão intermediária. Dentre os compostos que apresentaram esse comportamento, o hexaconazol, o linurom, a salinomicina e o triflumizol não são monitorados na matriz mel e por isso não possuem LMR.

Já o composto tiametoxam com LMR $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, segundo a EU, não apresenta precisão intermediária nesse nível, o que afetou a sua análise. O composto tebuconazol também não apresentou precisão intermediária no nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, entretanto não teve sua análise prejudicada, pois seu LMR é $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, segundo EU. Apesar disso, todos esses compostos apresentaram resultados adequados, segundo a legislação, em termos de exatidão e precisão do método para os respectivos níveis de fortificação e, por isso, foram validados nesse estudo.

4.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método foram calculados de acordo com a relação sinal/ruído, conforme o item 3.6.6. O LOQ variou de $0,1$ a $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e o LOD, sendo 3,33 vezes menor, variou de $0,03$ a $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, conforme

apresentados na Tabela 18. Esses valores de LOQ e LOD do método são considerados satisfatórios levando-se em consideração os LMRs dos compostos em estudo e a complexidade da matriz trabalhada.

Tabela 18 – Resultados dos limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) do método proposto.

Compostos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Compostos	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Acefato	5	1,5	Malationa	1	0,03
Acetamiprido	0,1	0,03	Mepanipirim	0,1	0,03
Atrazina	0,1	0,03	Mepronil	0,1	0,03
Azinfós etílico	1	0,3	Metacrifós	0,1	0,03
Azinfós metílico	0,1	0,03	Metalaxil	0,1	0,03
Azoxistrobina	0,1	0,03	Metidationa	1	0,3
Boscalida	0,1	0,03	Metolaclor	0,1	0,03
Bromofós etílico	0,1	0,03	Metsulfuron metílico	0,1	0,03
Carbaril	1	0,3	Mevinfós	5	1,5
Carbendazim	0,1	0,03	Monolinurom	0,1	0,03
Carbofuram	0,1	0,03	Ometoato	2	0,6
Carbofuram 3-OH	0,1	0,03	Oxadixil	0,1	0,03
Carboxim	0,1	0,03	Paraoxon etílico	1	0,03
Ciproconazol	1	0,3	Penconazol	0,1	0,03
Cloranfenicol	0,1	0,03	Picoxistrobina	0,1	0,03
Clorpirifós etílico	0,1	0,03	Piraclostrobina	1	0,3
Clorpirifós metílico	1	0,3	Pirazofós	0,1	0,03
Clotianidina	1	0,3	Piridato	0,1	0,03
Diclorvós	0,1	0,03	Pirimetanil	0,1	0,03
Dietofencarbe	0,1	0,03	Pirimicarbe	1	0,3
Difenoconazol	0,1	0,03	Pirimifós etílico	0,1	0,03
Dimetoato	0,1	0,03	Pirimifós metílico	0,1	0,03
Dimoxistrobina	0,1	0,03	Profenofós	1	0,3
Diniconazol	1	0,3	Profoxidim	0,1	0,03
Diuron	0,1	0,03	Propargito	1	0,3
Emamectina benzoato	0,1	0,03	Propoxur	0,1	0,03
Epoconazol	0,1	0,03	Salinomicina	0,1	0,03
Eritromicina ABC	1	0,3	Simazina	1	0,3
Etofenprox	0,1	0,03	Sulfaclorpiridazina	2	0,6
Etrimfós	0,1	0,03	Sulfadiazina	0,1	0,03
Fempropatrina	0,1	0,03	Sulfadimetoxina	0,1	0,03
Fempropimorfe	0,1	0,03	Sulfametazina	0,1	0,03
Fenarimol	1	0,3	Sulfametoxazol	0,1	0,03
Fipronil	2	0,6	Sulfaquinoxalina	0,1	0,03
Flusilazol	0,1	0,03	Sulfatiazol	0,1	0,03
Flutolanil	0,1	0,03	Tebuconazol	1	0,03

Fluvalinato	0,1	0,03	Terbutilazina	1	0,3
Fosmet	0,1	0,03	Tiacloprido	0,1	0,03
Furazolidona	1	0,3	Tiametoxam	2	0,6
Hexaconazol	2	0,6	Tilosina	2	0,6
Imazalil	0,1	0,03	Tolclofós metílico	1	0,3
Imidacloprido	1	0,3	Triadimefom	1	0,3
Iprovalicarbe	0,1	0,03	Triazofós	0,1	0,03
Isoxaflutol	1	0,3	Triclorfom	0,1	0,03
Lincomicina cloridrato	1	0,3	Trifloxistrobina	0,1	0,03
Linurom	0,1	0,03	Triflumizol	1	0,03

Através dos resultados de LOD e LOQ apresentados acima, percebe-se que o método mostra-se adequado para a determinação qualitativa e quantitativa de agrotóxicos a baixos níveis de concentração. De acordo com o trabalho de WIEST e colaboradores (2011), o qual avaliou 80 resíduos de agrotóxicos em mel, abelha e pólen, os resultados de LOD variaram de 0,01 a 23,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ de 4,1 a 57 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

4.3.7 Limite de decisão e capacidade de detecção

O limite de decisão ($CC\alpha$) e a capacidade de detecção ($CC\beta$) do método foram calculados de acordo com o item 3.6.7, utilizando o procedimento da curva de calibração para obter os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para todos os antibióticos avaliados. Os resultados obtidos estão listados na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para os antibióticos avaliados.

Analitos	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cloranfenicol	0,10	0,12
Eritromicina ABC	1,00	1,44
Furazolidona	1,00	1,72
Lincomicina cloridrato	1,00	1,17
Sulfacloropiridazina	2,00	2,81
Sulfadiazina	0,10	0,13
Sulfadimetoxina	0,10	0,12
Sulfametazina	0,10	0,12
Sulfametoxazol	0,10	0,13
Sulfaquinoxalina	0,10	0,27
Sulfatiazol	0,10	0,12
Tilosina	2,00	2,66

Observa-se que os valores de $CC\alpha$ variaram de 0,1 a 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo ao LOQ do método, e os valores de $CC\beta$ variaram de 0,12 a 2,81 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Pode-se concluir que o método, além de oferecer uma capacidade de detecção, identificação e quantificação a baixos níveis de concentração do analito, fornece dados que auxiliam a decidir se a amostra é não conforme em relação aos limites obtidos.

Assim, o método proporciona baixos níveis de $CC\alpha$ e $CC\beta$, esses valores podem ajudar a decidir se as amostras não são conformes em relação aos limites permitidos. Pode-se afirmar também que os menores limites foram atingidos, ou seja, o método é adequado para a determinação de todos os compostos monitorados no mel na Europa (CE 2377/90) e no Brasil (MAPA, 2013).

KASIOTIS e colaboradores (2014) obtiveram limites na faixa de 0,1-77 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os compostos avaliados, utilizando o método QuEChERS modificado e LC-MS/MS. DUBREIL-CHENEAU e colaboradores (2014) apresentaram valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ para sulfonamidas em mel, na faixa de 2,8-17,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$. JUAN-BORRÁS e colaboradores (2015) apresentaram valores de 0,7-4,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para antibióticos em mel. Os limites obtidos para os compostos os quais não possuem LMR estabelecido são suficientemente baixos para determinar esses resíduos. De acordo com o guia SANCO/10232/2006, os limites para os compostos os quais não possuem LMR variam na faixa de 0,1-50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou L^{-1} , coincidindo com os valores obtidos nesse método.

4.4 Aplicação do método

O método foi aplicado para 43 amostras de mel coletadas em diferentes regiões e de diferentes origens botânicas, do estado do Rio Grande do Sul. Essas amostras foram obtidas diretamente dos apicultores, e as informações relevantes como origem do mel, presença de lavouras nas proximidades e/ou aplicação de antibióticos nas colmeias foram registradas no questionário.

Dentre as amostras, predominam méis multiflorais, obtidos de árvores frutíferas, como laranjeiras, macieiras, parreirais de uva, flor de girassol, canola e

eucalipto, além de algumas amostras estarem localizadas as proximidades de lavouras de milho, soja e trigo.

Do total de amostras analisadas, 53% delas apresentaram resíduos de um ou mais analitos, na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$ em cada amostra analisada, sendo encontrado um total de 37 compostos nessas amostras, 36 resíduos de agrotóxicos e um antibiótico.

O limite máximo de resíduos não foi ultrapassado em nenhuma amostra, de acordo com os resultados da Tabela 20. Resíduos de inseticidas e acaricidas (acefato, azinfós etílico, carbofuram, clorpirifós etílico, diclorvós, dimetoato, paraoxon etílico, pirazofós, pirimifós etílico, pirimifós metílico, profenofós e salinomicina), fungicidas (boscalida, difenoconazol, dimoxistrobina, flusilazol, imazalil, metalaxil, picoxistrobina, propoxur e tebuconazol), antibiótico (eritromicina ABC) e herbicida (linurom) foram obtidos em concentrações abaixo do LMR, de acordo com os limites estabelecidos pela EU e pelo PNCRC para mel, no Brasil. Os compostos azoxistrobina, diurom, emamectina benzoato, etrimfós, imidacloprido, oxadixil, propoxur e terbutilazina apresentaram resíduos abaixo do LOQ do método avaliado.

Tabela 20 – Resultados para 23 amostras positivas obtidas da aplicação do método validado para amostras reais de diferentes origens botânicas.

Compostos	Amostras positivas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	18	19	20	22	23	24	25
Acefato	-	-	-	-	0,12	0,52	0,23	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azinfós etílico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	-	-	0,32	0,7	-	-	-	-	-	-	-
Azoxistrobina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boscalida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,86	-	-	-
Carbofuram	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorpirifós etílico	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,37	-	-	-
Diclorvós	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,07	-	4,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Difenoconazol	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dimetoato	-	-	-	-	-	-	-	-	10	< LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dimoxistrobina	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diuron	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Emamectina benzoato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etrimfós	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< LOQ	-	-	-
Eritromicina ABC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9	-	-	-	-	-	-
Fention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,3	-	-	-
Flusilazol	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flutolanil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-
Imazalil	-	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Imidacloprido	<LOQ	-	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linurom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Paraoxon etílico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,77	-	-	-
Metalaxil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< LOQ	-	-	-	-	-	1,75	-	-	-
Oxadixil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Picoxistrobina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pirazofós	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pirimifós etílico	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-
Pirimifós metílico	0,13	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Profenofós	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propoxur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-	-	1,17	2,07	-

Os resíduos encontrados nas amostras devem-se devido à proximidade que algumas colmeias encontravam-se de lavouras de soja, milho ou trigo, levando em consideração o processo de polinização que a abelha realiza para coletar néctar, pólen e água das flores, atingindo grandes distâncias (aproximadamente 7 km²) em curto período de tempo (RISSATTO *et al.*, 2006).

Acefato e tebuconazol são utilizados em cítricos, soja, milho e trigo (AGROFIT, 2015) e foram encontrados resíduos em duas e quatro amostras, respectivamente. Os inseticidas pirimifós etílico, azinfós etílico e clorpirifós etílico foram encontrados em 23, 16 e 10% das amostras, respectivamente. Os fungicidas foram encontrados em menor quantidade. Deve-se ressaltar que a presença desses resíduos nas amostras ocorreu em função das proximidades das colmeias com lavouras de diferentes culturas, como soja, milho e trigo e, anteriormente a coleta do mel, foram realizadas aplicações de agrotóxicos nessas culturas, segundo informações obtidas dos apicultores e relatadas nos questionários. Assim, a contaminação das abelhas e conseqüentemente do mel ocorreram de forma indireta por agrotóxicos, exceto para a amostra 18, que apresentou resíduo do antibiótico eritromicina ABC, contaminada de forma direta, pois, segundo informações obtidas através do questionário utilizado durante a coleta das amostras, a aplicação ocorreu para tratamento de doença bacteriana da colmeia.

Alguns trabalhos relataram a presença de resíduos de agrotóxicos e antibióticos em amostras de mel. BARGANSKA e colaboradores (2013) analisaram 45 amostras obtidas diretamente de apicultores, de apiários locais de diferentes regiões da Polônia, obtiveram 29% das amostras com resíduos de agrotóxicos. Entre os analitos, dimoxistrobina, indoxacarbe pirimicarbe e estavam presentes em 53% das amostras; estando abaixo do LOQ do seu método, bem como o composto azinfós etílico estava presente em 11% das amostras. GALARINI e colaboradores (2015) analisaram 74 amostras de mel de diferentes origens botânicas, obtidas de diferentes supermercados da Itália, sendo que 12% apresentaram resíduos de sulfonamidas abaixo dos LMR. LÓPEZ e colaboradores (2014) analisaram 61 amostras de mel obtidas de quatro regiões da Colômbia e, apenas cinco apresentaram resíduos de um ou mais analitos, entre eles, clorpirifós etílico, profenofós e fenitrotona. Além de 28 amostras que apresentaram resíduos no mesmo nível ou abaixo do LMR estabelecido pela UE e três amostras apresentaram resíduos acima do LMR.

5 Conclusão

Este trabalho apresentou diferentes métodos de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos e antibióticos em mel por UHPLC-MS/MS. As maiores modificações realizadas foram na etapa de limpeza, na qual se aplicou um planejamento experimental a fim de avaliar as quantidades e os tipos de sorventes adequados e a eliminação da etapa de partição do método. Os resultados demonstraram que a utilização de C18 nessa etapa acarretava em diminuição das porcentagens de recuperação de alguns analitos e o PSA, apesar de resultar em bons resultados de recuperação, apresentava maiores quantidades de coextrativos quando comparado ao florisil[®] no teste gravimétrico. Portanto, o método validado apresentou uma etapa de homogeneização, seguida de extração com acetonitrila e uma etapa de limpeza empregando florisil[®] e sulfato de magnésio. Sendo assim, a característica principal deste método é a simplicidade na execução do preparo da amostra, aliado ao baixo consumo de solvente e baixo custo.

A detecção dos compostos utilizando o equipamento UHPLC-MS/MS com fonte de ionização por eletrospray nos modos positivo e negativo, operando no modo SRM, ofereceu boa detectabilidade, seletividade e precisão dos analitos em estudo, estando apto para aplicações em análises de rotina laboratorial.

O método foi avaliado em termos de linearidade e faixa de trabalho, através da fortificação das curvas analíticas preparadas na matriz mel, nos níveis 0,1; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 150 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Também foram confirmadas as premissas de normalidade e independência dos resíduos, através da aplicação dos testes de Anderson-Darling e Durbin-Watson, respectivamente. O efeito matriz avaliado pela comparação das curvas preparadas na matriz mel e no solvente acetonitrila mostrou a necessidade de validar e quantificar os dados na presença da matriz mel.

A exatidão do método, avaliada através da fortificação dos dez níveis da curva analítica, apresentou recuperações na faixa de 67 a 138%, porém para a maioria dos compostos as recuperações variaram de 70 a 120%. A precisão do método foi adequada em termos de repetitividade sendo que o RSD ficou na faixa de 2 a 31%, porém a maioria dos resultados de RSD foi menor de 20; os resultados de precisão intermediária também foram adequados, após aplicação do teste t. Os valores de LOD e LOQ do método foram de 0,03 a 1,5 e 0,1 a 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$,

respectivamente, e os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram de 0,1 a 5,0 e 0,12 a 2,81 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Esse método foi aplicado em 43 amostras de mel de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, para a determinação de resíduos de agrotóxicos e antibióticos. Os resultados das análises cromatográficas demonstraram que 53% das amostras apresentaram resíduos de 37 analitos nas amostras.

Os resultados da validação mostraram que o método é adequado para estudar e avaliar e determinar quantitativamente a presença de resíduos de agrotóxicos e antibióticos em amostras de mel.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEMEL (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL), 2014. Disponível em: <http://www.beebrazil.com/inteligencia_comercial_abemel_dezembro.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2015.

ABU-JDAYIL, B.; GHZAWI, A. A. M.; AL-MALAH, K. I. M.; ZAITOUN, S. Heat effect on rheology of light – and dark- colored honey. **Journal of Food Engineering**, v. 51, p. 33-38, 2002.

AGANIN, A. F. Electrical conductivity of several unifloral honeys. **Trudy Saratovskogo Zootekhnicheskogo Inatituta**, v. 21, p.137-144, 1971.

AGROFIT (AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS), 2015. Disponível <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 jul. 2015.

AMBIENTE BRASIL. 2013 Disponível em <<http://noticias.ambientebrasil.com.br/clipping/2013/09/09/97932-sumico-das-abelhas-derruba-exportacoes-de-mel-do-brasil.html>> Acesso em: 13 jan. 2015.

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 multiresíduo method employing acetonitrila extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 83, p.412-431, 2003.

ANVISA (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA) 2010. 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. 2015.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2011a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/relatorio+da+anvisa+indica+residuo+de+agrotxico+a+cima+do+permitido>. Acesso em: 06 jun. 2015.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2011b. Resolução RDC, Nº 20, DE 5 DE MAIO DE 2011.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) – Guia para qualidade em Química Analítica – uma assistência à habilitação. Séries Temáticas, Brasília, 2005.

AUBERT, S; GONNET, M. Measure de la couleur dès miels. **Apidologie**, v.14, p.105-118, 1983.

AVULA, B; WANG, Y; WANG, M; SMILLIE, T. J; KHAN, I. A. Simultaneous determination of sesquiterpenes and pyrrolizidine alkaloids from the rhizomes of *Petasites hybridus* (L.) G.M. et Sch. and dietary supplements using UPLC-UV and HPLC-TOF-MS methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 53-63, 2012.

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

BANKOVA, V; POPOVA, M; BOGDANOV, S; SABATINI, A. Chemical Composition of European Própolis: Expected and Unexpected Results. **Chemical Composition of European Propolis**, v. 57, p. 530-533, 2002.

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

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa : UFV, 2004, 215p.

BARCELÓ, D; HENNION, M. C. **Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water**. 2ª ed., Elsevier: Amsterdam, 2003.

BARGANSKA, Z; SLEBIODA, M; NAMIESNIK, J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. **Food Control**, v. 31, p. 196-201, 2013.

BARLAVENTO. 2013. Disponível em: <<http://www.Barlavento.pt/index.php/noticia?id=56520>> Acesso em: 9 jun. 2014.

BATH, P. K.; SINGH, N. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. **Food Chemistry**, v.67, p. 389-397,1999.

BEDENDO, G. C; JARDIM, I. C. S. F; CARASEK, E. A simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6449-6454, 2010.

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

BENETTI, C; DAINESE, N; BIANCOTTO, G; PIRO, R; MUTINELLI, F. Unauthorised antibiotic treatments in beekeeping Development and validation of a method to

quantify and confirm tylosin residues in honey using liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 87-92, 2004.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 49-52, 2007.

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

BORGES, K. B; FIGUEIREDO, E. C; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015, cap. 4, 263 p.

BORGES, K. B; FIGUEIREDO, E. C; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015, cap. 24, 263 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da União**. Brasília, seção 1, p. 16-17, 2000.

CALDAS, S. S; ZANELLA, R; PRIMEL, E. G. **Risk Estimate of Water Contamination and Occurrence of Pesticides in the South of Brazil**. Rijeka: InTech, p. 471-492, 2011.

CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M. O. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. Série meliponicultura, 1ª ed., Bahia: Nova Civilização Ltda, 2005, 40 p.

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

CODEX ALIMENTARIUS. **Method Validation, joint FAO/WHO food standards programme**. Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.

CODEX STAN 12-1981 - **CODEX STANDARD FOR HONEY**. Adaptado em 1981. Revisões 1987 e 2001.

COUNCIL DIRECTIVE 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. Official Journal of the European Communities.

CRANE, E. **Livro do mel**. Trad. de Astrid Kleinert Giovannini. São Paulo: Nobel. 1983, 226 p.

CUNICO, M. W. M; CUNICO, M. M; MIGUEL, O. G; ZAWADZKI, S. F; PERALTA-ZAMORA, P; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão acadêmica**, v. 9, p. 23-32, 2008.

DIÁRIO DIGITAL. 2013. Disponível em <http://diariodigital.sapo.pt/news.asp?id_news=635417>. Acesso em: 13 out. 2014.

DUBREIL-CHÉNEAU E; PIROTAIS Y; VERDON E; HURTAUD-PESSEL D. Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans: validation according to European Union Decision 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1339, p. 128-136, 2014.

EMBRAPA. **Histórico sobre mel**. 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 10 set. 2014.

EVANS, J. D; SPIVAK, M. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. **Journal of Invertebrate**, v. 103, p. 62-72, 2010.

EU (EUROPEAN UNION) pesticides database, disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN. Acesso em: 20 jun. 2015.

European Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Com.* 2002, L221/8.

FACCHINI, L. A. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Parte 2, Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012, 140 p.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 2005. Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?hasbulk=0&subset=FoodQuality&&language=EN>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

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.

FERNÁNDEZ-TORRES R; PÉREZ-BERNAL, J. L; BELLO-LÓPEZ, M. A; CALLEJÓN-MOCHÓN, M; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, J. C; GUIRAÚM-PÉREZ, A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. **Talanta**, v. 65, p. 686-691, 2005.

FERRER, C; LOZANO, A; AGUERA, A; GIRÓN, A. J; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634-7639, 2011.

FINCO F. D. B. A; MOURA, L. L; SILVA, I. G. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 706-712, 2010.

FONTANA, A. R; CAMARGO, A. B; ALTAMIRANO, J. C. Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6334-6341, 2010.

FORSGREN, E. European foulbrood in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. S5–S9, 2010.

FRENICH, A. G; AGUILERA-LUIZ, M. M; VIDAL, J. L. M; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Comparison of several extraction techniques for multiclasse analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, p. 150-160, 2010.

GALARINI, R; SALUTI, G; GIUSEPPONI, D; ROSSI, R; MORETTI, S. Multiclass determination of 27 antibiotics in honey. **Food Control**, v. 48, p. 12-24, 2015.

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

GIANNETTI, L; LONGO, F; BUIARELLI, M. Tetracycline residues in Royal jelly and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry: validation study according to Commission Decision 2002/657/EC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1017–1023, 2010.

GBYLIK-SIKORSKA, M; SNIEGOCKI, T; POSYNIAK, A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 990, p. 132-140, 2015.

GIMENES, M. Ecologia da polinização. **ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS: Apostila do Curso de Ecologia da Polinização**. Feira de Santana, 2000.

GÓMEZ-PEREZ, M. L; PLAZA-BOLAÑOS, P; ROMERO-GONZÁLEZ, R; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L; GARRIDO-FRENICH, A. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography – Orbitrap high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1248, p. 130-138, 2012.

GONZÁLES, A. P; BURIN, L; BUERA, M. P. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. **Food Research International**, v.32, p.185-191, 1999.

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

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

HO, Y. B; ZAKARIA, M. P; LATIF, P. A; SAARI, N. Simultaneous determination of veterinary antibiotics and hormone in broiler manure, soil and manure compost by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 160-168, 2012.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 331-343, 1995.

HEO, J; SHIN, H; NAM, W; OM, J; JEONG, C. Approximation of modified Anderson-Darling test statistics for extreme value distributions with unknown shape parameter. **Journal of Hydrology**, v. 499, p. 41-49, 2013.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA), 2012. Disponível em: <http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2013-10-10/ibge-seca-faz-producao-nacional-de-mel-cair-19-em-2012>. Acesso em: 10 nov. 2014.

IBGE, **Produção da pecuária municipal**, BRASIL, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2014.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA), **DOQ-CGCRE-008**. Orientação sobre validação de métodos analíticos, revisão 4, 2011, 20 p.

JOVANOVIĆ, P; GUZSVÁNY, V; FRANKO, M; LAZIC, S; MARIJANA, S; SARIC, B; BANJAC, V. Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 111, p. 125-133, 2013.

JOVANOVIĆ, P; GUZSVÁNY, V; FRANKO, M; LAZIC, S; MARIJANA, S; MILOVANOVIĆ, I; NEDELJKOVIĆ, N. Development of multiresidue DLLME and QuEChERS based LC-MS/MS method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey liqueur. **Food Research International**, v. 55, p. 11-19, 2014.

JOVANOV P; GUZSVÁNY V; LAZIC S; FRANKO M; SAKAC M; SARIC L; KOS J. Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. **Journal food composition analysis**, v. 40, p. 106-113, 2015.

JUAN-BORRÁS M; PERICHE A; DOMENECH E; ESCRICHE I. Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS-MS. **Food Control**, v. 50, p. 243-249, 2015.

KASIOTIS K. M; ANAGNOSTOPOULOS C; ANASTASIADOU P; MACHERA K. Pesticides residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: reported death incidents in honeybees. **Science of the Total Environment**, v. 485-486 p. 633-642, 2014.

KENDE, A; CSIZMAZIA, Z; RIKKER, T; ANGYAL, V; TORKOS, K. Combination of stir bar sorptive extraction–retention time locked gas chromatography–mass spectrometry and automated mass spectral deconvolution for pesticide identification in fruits and vegetables. **Microchemical Journal**, v. 84, p. 63-69, 2006.

KRUBE, A; REBANE, R; KIPPER, K; OLDEKOP, M; EVARD, H; HERODES, K; RAVIO, P; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8-28, 2015.

KUJAWSKI, M. W., NAMIESNIK, J. Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS. **Food Control**, v. 22, p. 914-919, 2011.

KUJAWSKI, M. W.; NAMIESNIK, J. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 785-793, 2008.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LAYCOCK, I; COTTERELL, K. C; O’SHEA-WHELLER, T. A; CRESSWELL, J. E. Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at Field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 153-158, 2014.

LEÃO, Éder Lira de Souza; MOUTINHO, Lúcia Maria Góes; XAVIER, Maria Gilca Pinto. Condicionantes de Crescimento Arranjo Produtivo Local de Apicultura na Região do Araripe, Pernambuco. **Revista de Administração, Contabilidade e Economia**. UNOESC. Edição Especial Agronegócios, v. 11, n.1, p. 75-102, janeiro-julho 2012.

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

LI, J; CHEN, L; WANG, X; JIN, H; DING, L; ZHANG, K; ZHANG, H. Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 75, p. 1245–1252, 2008.

LIMA, M. C.; ROCHA, S. A. **Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Brasília: IBAMA, 2012.

LÓPEZ, D. R; AHUMADA, D. A; DÍAZ, A. C; GUERRERO, J. A. Evaluation of pesticide residues in honey from different geographic region of Colombia. **Food Control**, v. 37, p. 33-40, 2014.

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.

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: 9 jun. 2015.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2010/05/controle-de-residuos-publicada-norma-de-2010-para-produtos-de-origem-animal>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) – **Manual de garantia da qualidade analítica – resíduos e contaminantes em alimentos**. 1ª ed. Brasília, 2011.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2013. Instrução normativa nº 17, de 29 de maio de 2013.

MARTEL, A. C; ZEGGANE, S; DRAJNUDEL, P; FAUCON, J. P; AUBERT, M. Tetracycline residues in honey after hive treatment. **Food Additives & Contaminants**, v. 23, p. 265-273, 2006.

MARTINS-RAMOS, D; BORTOLUZZI, R. L. C; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remascente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 380-397, 2010.

MENDES, C. V.; SILVA, J. B. A.; MESQUITA, L. X.; MARACAJÁ, P. B. AS ANÁLISES DE MEL: REVISÃO. **Caatinga**, v. 22, p. 07-14, 2009.

MILUM, V.G. Some factores affecting the color of honey. **Journal of Economic Entomology**, v.41, p. 495-505. 1948.

MOONSUN, J., PAENG, I. R. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 180-185, 2008.

MOREIRA, R. F. A.; DE MARIA, C. A. B. GLICÍDIOS NO MEL, **Química Nova**, v. 24, p. 516-525, 2001.

MUNROE, J. A. The viscosity and thixotropy f honey. **Journal of Entomology**, v. 36, p. 79-777. 1943.

NOVÁKOVÁ, L; VLCKOVÁ, H; PETR, S. Evaluation of new mixed-mode UHPLC stationary phases and the importance of stationary phasechoise when using low ionic-strength mobile phase additives. **Talanta**, v. 93, p. 99-105, 2012.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, v. 1, p. 140-151, 2010.

ORMEÑO, E; GOLDSTEIN, A; NIINEMETS, U. Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 978-989, 2011.

ORSO, D; MARTINS, M. L; DONATO, F. F; RIZZETTI, T. M; KEMMERICH, M; ADAIME, M. B; ZANELLA, R. Multiresidue Determination of Pesticide Residues in Honey by Modified QuEChERS Method and Gas Chromatography with Electron Capture Detection. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, p. 1355-1364, 2014.

PANSERI, S; CATALANO, A; GIORGI, A; ARIOLI, F; PROCOPIO, A; BRITTI, D; CHIESA, L. M. Occurence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. **Food Control**, v. 38, p. 150-156, 2014.

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.

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

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

QUEIROZ, S. C. N; FERRACINI, V. L; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, p. 185-192, 2012.

RAMOS, L; HERNANDEZ, L. M; GONZALEZ, M. J. Elution pattern of planar chlorinated biphenyls 2,3,7,8-polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans on chromatographic adsorbents and factors affecting the mechanism of retention. Possibilities of selective separation of both families. **Journal of Chromatography A**, v. 759, p. 127-137, 1997.

REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL – **Identidade e Qualidade do mel**. MERCOSUL/GMC/RES. N° 56/99.

REGULAMENTO (CE) N.º 546/2004 DA COMISSÃO de 24 de Março de 2004. Jornal Oficial da União Europeia.

REYBROECK W; DAESELEIRE, E; BRABANDER, H. F; HERMAN, L. Antimicrobials in beekeeping. **Veterinary Microbiology**, v. 158, p. 1-11, 2012.

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

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

RIDGWAY, k; LALLJIE, S. P. D; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36–53, 2007.

RISSATO, S. R; LIBÂNIO, M; GIAFFERIS, G. P; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Química Nova**, v. 27, p. 739-743, 2004.

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

RISSATO, S. R; GALHIANE, M. S; ALMEIDA, M. V; GERENUTTI, M; APON, B, M. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–

mass spectrometry and application in environmental contamination. **Food Chemistry**, v. 4, p. 1719-1726, 2007.

RODRIGUEZ-ALLER, M; GURNY, R; VEUTHEY, J; GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 2–18, 2013.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION) QUALITY CONTROL PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS, Documento N° SANCO 10232/2006, 24/March/2006.

SARAMAGO, S. P; JUNIOR, V. S; SILVA, J. D; SARAMAGO, S. F. P. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS MISTOS. **FAMAT**, v. 11, p. 231-246, 2008.

SCHADE, J. W; MARSH, G; LECKERT, J. E. Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their influence in detecting heat alteration. **Food Research**, v. 23, p. 446-463. 1958.

SEBRAE, **Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia**. Sumário executivo, 2010.

SEBRAE, **Exportação brasileira de mel**, 2011.

SEBRAE, **Oportunidade para o Mercado de mel**, 2014, disponível em: http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Estudos%20e%20Pesquisas/2014_06_06_RT_Agroneg%C3%B3cio_Oportunidades_para_o_mercado_de_mel.pdf. Acesso em: 05 jun. 2015.

SEELEY, T. D.; VISSCHER, P. K.; PASSINO, K. M. Group decision making in honey bee swarms. **American Scientist**, v. 94, p. 220-229, 2006.

SEEMANN, P.; NEIRA, M. **Tecnología de la producción apícola**. Valdivia: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias Empaste, 1988, 202p.

SHERIDAN, R; POLICASTRO, B; THOMAS, S; RICE, D. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 3509-3516, 2008.

SILVA, G. R; PEREIRA, F. L; SOUZA, B. A; LOPES, M. T. R; CAMPELO, J. E. G; DINIZ, F. M. Aspectos biológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini) e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Agricultural Entomology**, v. 81, p. 299-308, 2014.

SMITH, F. G. Deterioration of the colour of honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 6, p. 95-98, 1967.

SINDIVEG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal). Disponível em: <www.revistaplantar.com.br/tag/sindiveg/>. Acesso em: 22 jun. 2015.

SOLLIEC M; ROY-LACHAPELLE A; SAUVÉ S. Quantitative performance of liquid chromatography coupled to Q-Exactive high resolution mass spectrometry (HRMS) for the analysis of tetracyclines in a complex matrix. **Analytica Chimica Acta**, v. 853 p. 415-424, 2015.

SOUZA, S. V. Z; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

TANNER, G; CZERWENKA, C. LC-MS/MS Analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12271-12277, 2011.

TEÓFILO, R. F; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 1678-7064, 2006.

THOMPSON, T. S; WAITE, R. J; WILKINS, S; BROWN, M. A; BIGWOOD, T; SHEW, M; RIDGWAY, C; SHARMAN, M. Effects of shook swarm and supplementary feeding on oxytetracycline levels in honey extracted from treated colonies. **Apidologie**, v. 37, p. 51- 57, 2006.

THOMPSON, T.S; NOOT, D.K. "Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry". **Analytica Chimica Acta**, v. 551, p. 168-176, 2005.

USDA (United States Department of Agricultural). Nutrient data for 11333, **Peppers, sweet, green, raw**. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3136>>. Acesso em: 26 ago. 2014.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características do Mel**. Boletim Técnico - PIE-UFES: 01107, 2007, 8 p.

VERDON, E; HURTAUD-PESSEL, D; PESSEL, P. Evaluation of the limit of performance of an analytical method based on a statistical calculation of its critical concentrations according to ISO standard 11843: Application to routine control of banned veterinary drug residues in food according to European Decision 657/2002/EC. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, p. 58–62, 2006.

VILLAS-BÔAS, J. **Mel de abelhas sem ferrão – manual tecnológico**, 1ª ed., Brasília, DF: ISPN, 2012.

VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Análises físico-químicas de méis de São Paulo. **Mensagem Doce**, v. 53, p. 17-19, 1999.

WHITE, J. W. Jr. Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural and proline in honey; Collaborative study. **Journal of the Association of the Official Analytical Chemistry**, v.62, p.515-526, 1979.

WHITE, J. W. Jr. Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. Part II. **American Bee Journal**, v.132, p.792-794. 1992.

WHITE, J. W. Jr. The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. **Bee World**, v. 75, p. 104-107. 1994.

WIESE, H. **Apicultura: Novos tempos**. 2. ed. Guaíba: Agrolivros, 2005, 173-287 p.

WIEST, L; BULETÉ, A; GIROUD, B; FRATTA, C; 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.

WINDIG, W. The use of the Durbin-Watson criterion for noise and background reduction of complex liquid chromatography/mass spectrometry data and a new algorithm to determine sample differences. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 77, p. 206-214, 2005.

WOOTTON, M; EDWARDS, R. A; FARAJI-HAREMI, R. Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honey 2. Changes in sugar and free amino acid contents. **Journal of Apicultural Research**, v.15, p.29-34, 1976.

WU, J. Y; SMART, M. D; ANELLI, C. M; SHEPPARD, W. S. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 326-329, 2012.

ZACHARIS, C. K; ROTSIAS, I; ZACHARIADIS, P. G; ZOTOS, A. Dispersive liquid – liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1665-1672, 2012.

ZHOU, N; WANG, J; ZHANG J; LI, C; TIAN, Y; WANG, J. Selection and identification of streptomycin-specific single-stranded DNA aptamers and the application in the detection of streptomycin in honey. **Talanta**, v. 108, p. 109–116, 2013.

7 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

A geração de resíduos nas atividades laboratoriais torna-se uma consequência após o término das atividades, obtendo-se uma quantidade significativa de resíduos líquidos e sólidos. Esses devem ser tratados ou descartados de forma adequada para que os mesmos não contaminem o ambiente.

Neste sentido, os resíduos gerados durante o desenvolvimento desse trabalho foram armazenados em recipientes adequados e encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química (DQ) da UFSM. O DQ é responsável pela destinação dos resíduos gerados que serão posteriormente tratados por uma empresa terceirizada capacitada nessa área.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a aplicabilidade desse método para a análise de abelhas e produtos derivados das colmeias, como própolis, geléia real e pólen, considerando que são alimentos bastante consumidos pela população, além de avaliar o impacto ambiental através dessas análises;

Aumentar o escopo de agrotóxicos e antibióticos para as futuras análises, levando-se em consideração a importância em analisar os compostos de interesse para a matriz em questão;

Testar outras condições para o método de preparo de amostra, a fim de buscar melhores resultados para os compostos que não obtiveram exatidão e precisão adequadas nesse trabalho.

9 ANEXOS

Anexo I – Questionário aplicado aos apicultores:

Este questionário tem dois objetivos:

- O primeiro consiste em buscar informações sobre a procedência dos méis coletados em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul;
- O segundo refere-se à utilização destas amostras para posteriormente aplicá-las no trabalho de doutorado, que tem por objetivo a análise para verificar a presença de resíduos de agrotóxicos e antibióticos em mel.

Nome:..... Idade:.....

Profissão:..... Cidade:.....

1- Qual o tamanho da sua propriedade rural, em hectares?

- até 20
- de 20 a 50
- de 50 a 100
- mais de 100
- não possui terras.

2- Qual o número aproximado de colmeias que possui?

- até 10
- de 10 a 20
- de 20 a 50
- mais de 50

3- Qual a média, em quilos, de produtividade anual de mel por colmeia?

- até 15
- de 15 a 20
- de 20 a 25
- de 25 a 30
- mais de 30

4- Qual é a principal atividade desenvolvida na sua propriedade?

- apicultura
- trigo
- milho
- soja

- fruticultura
 - fumicultura
 - outra, qual?
-

5- Você faz uso de agrotóxicos em local próximo as colmeias?
Costuma aplicar antibióticos na colmeia a fim de tratar/evitar algumas doenças?

sim.

Quais?.....

não

6- Tem conhecimento sobre o uso de agrotóxicos utilizados nas proximidades?

sim

Quais?.....

não

7- Há alguma espécie frutífera ou lavoura nas proximidades da colmeia ou região próxima (até 7 km de distância)?

sim

apicultura

fumicultura

milho

soja

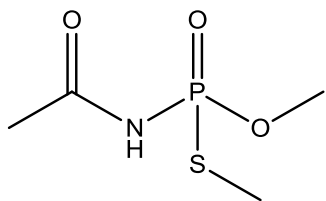
trigo

fruticultura

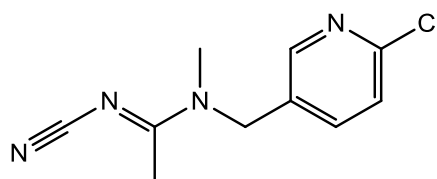
outra

não

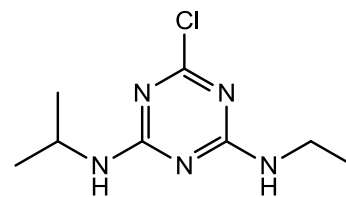
Anexo II – Fórmulas estruturais dos compostos avaliados nesse trabalho.



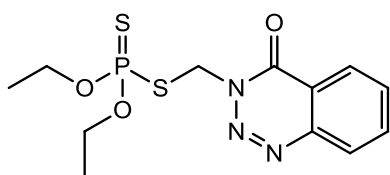
Acefato



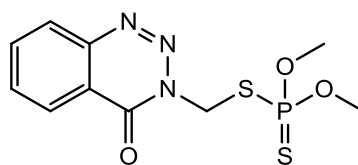
Acetamiprido



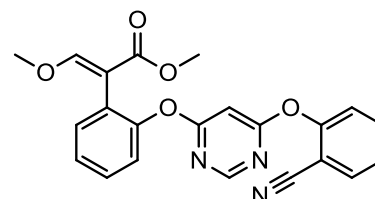
Atrazina



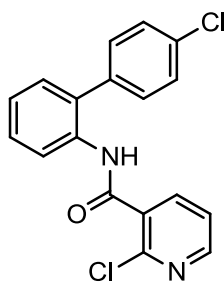
Azinfós etílico



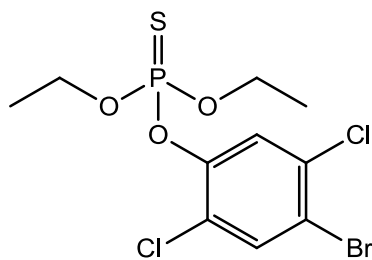
Azinfós metílico



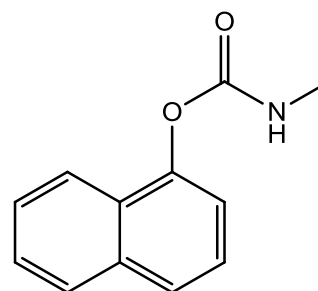
Azoxistrobina



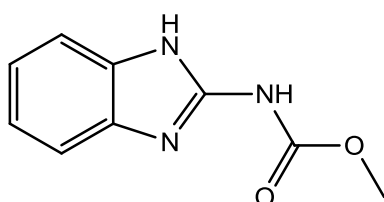
Boscalida



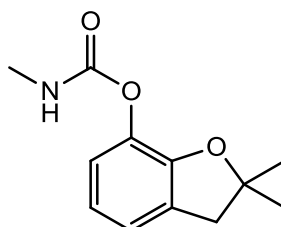
Bromofós etílico



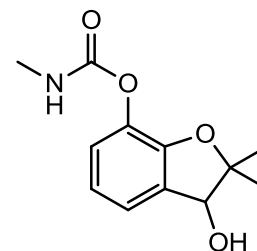
Carbaril



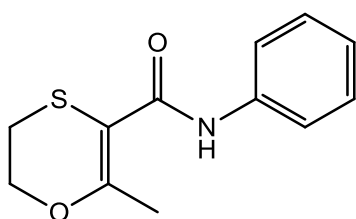
Carbendazim



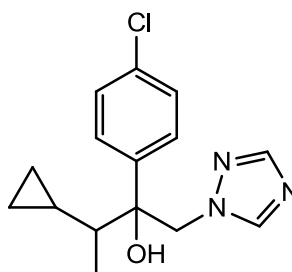
Carbofuram



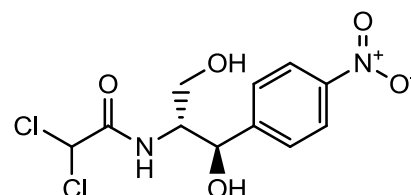
Carbofuram 3-OH



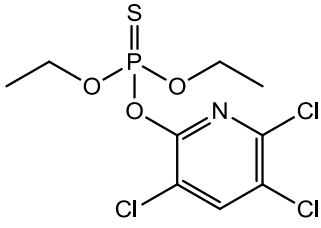
Carboxim



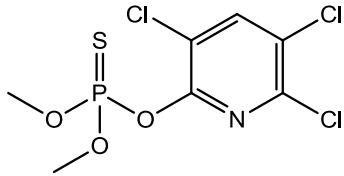
Ciproconazol



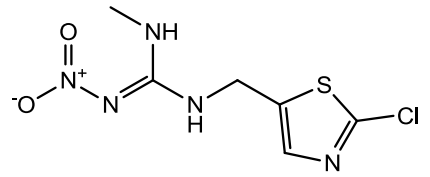
Cloranfenicol



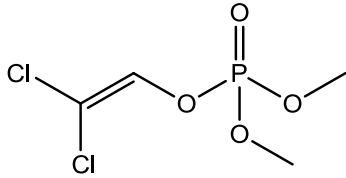
Clorpirifós etílico



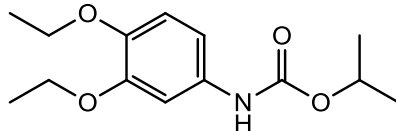
Clorpirifós metílico



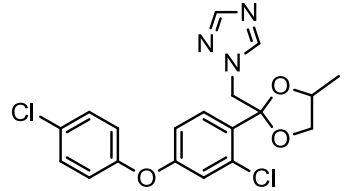
Clotianidina



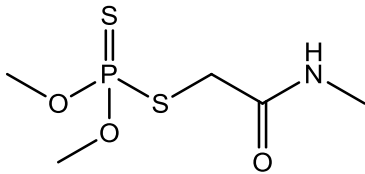
Diclorvós



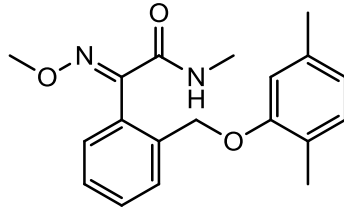
Dietofencarbe



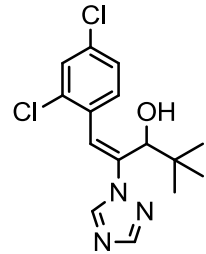
Difenoconazol



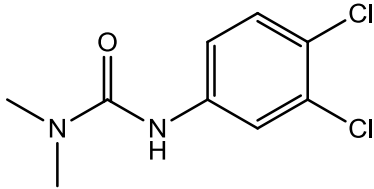
Dimetoato



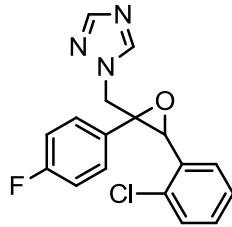
Dimoxistrobina



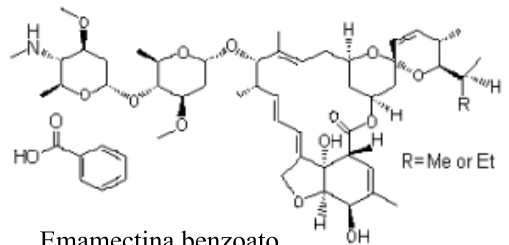
Diniconazol



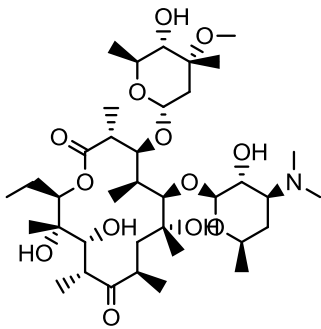
Diuron



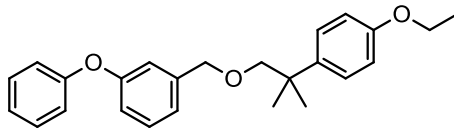
Epoxiconazol



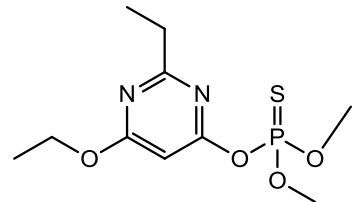
Emamectina benzoato



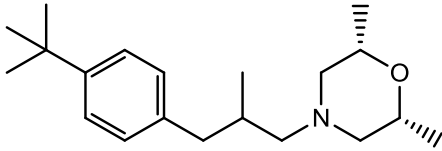
Eritromicina ABC



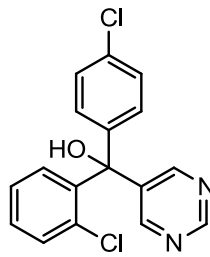
Etofenprox



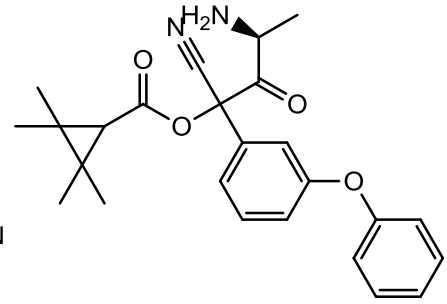
Etrimfós



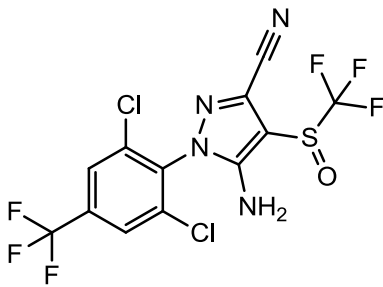
Fempropimorfe



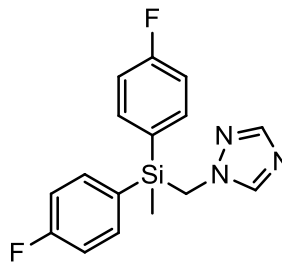
Fenarimol



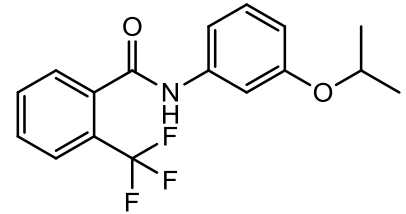
Fempropatrina



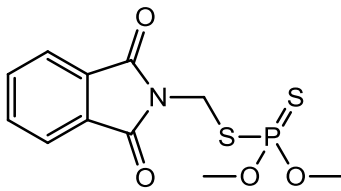
Fipronil



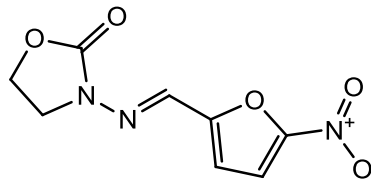
Flusilazol



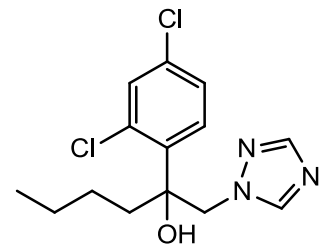
Flutolanil



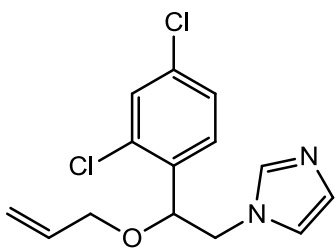
Fosmet



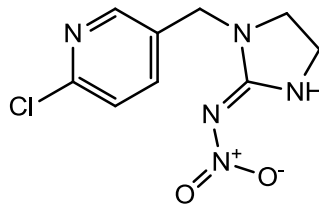
Furazolidona



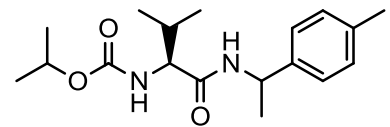
Hexaconazol



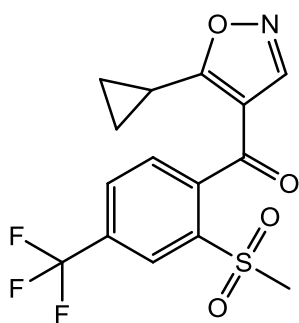
Imazalil



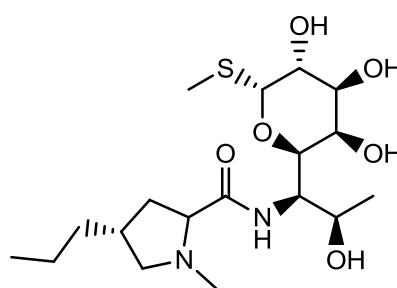
Imidaclicprido



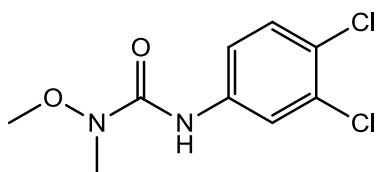
Iprovalicarbe



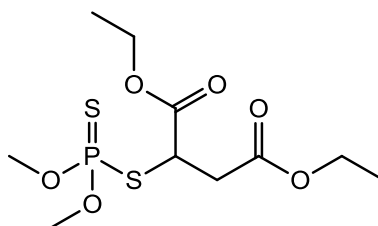
Isoxaflutol



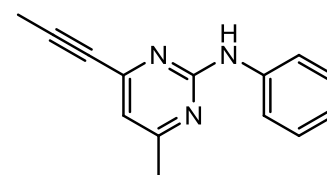
Lincomicina cloridrato



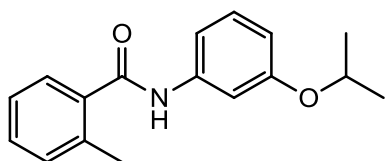
Linurom



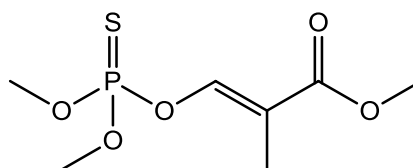
Malationa



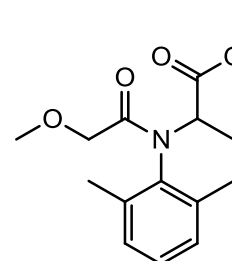
Mepanipirim



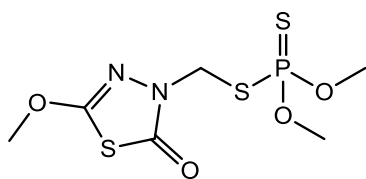
Mepronil



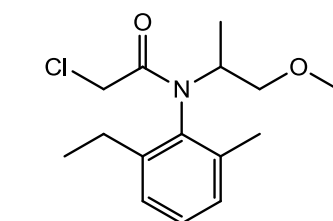
Metacrifós



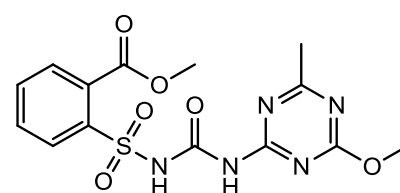
Metalaxil



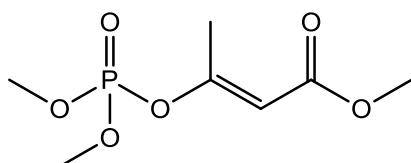
Metidation



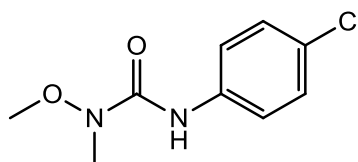
Metolaclor



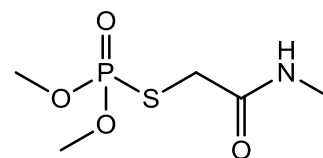
Metsulfurom metílico



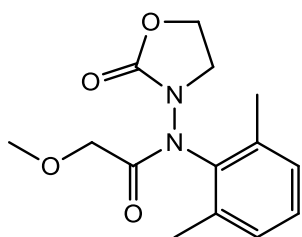
Mevinfós



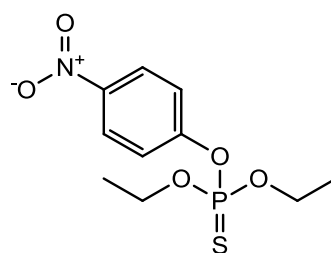
Monolinurom



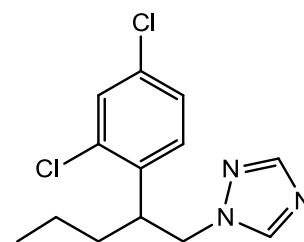
Ometoato



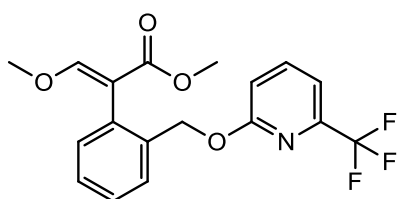
Oxadixil



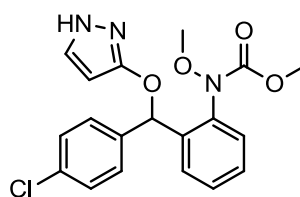
Paraoxon etílico



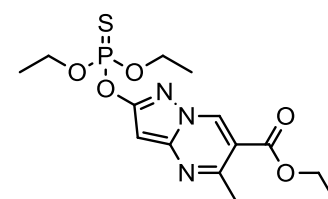
Penconazol



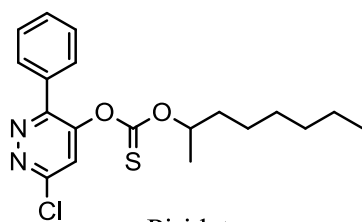
Picoxistrobina



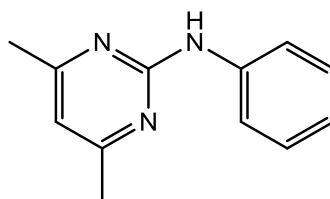
Piraclostrobrina



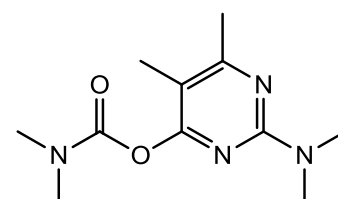
Pirazofós



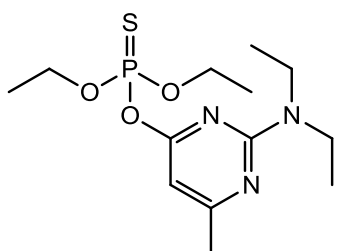
Piridato



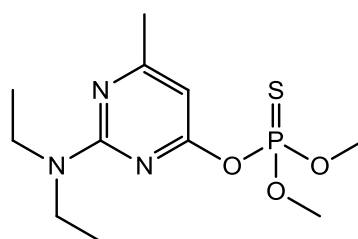
Pirimetanil



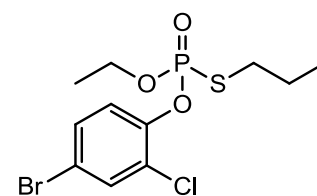
Pirimicarbe



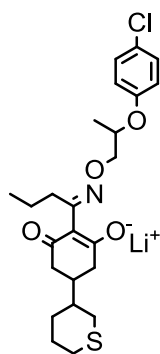
Pirimifós etílico



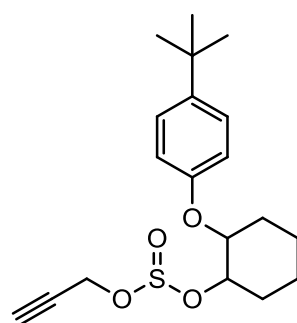
Pirimifós metílico



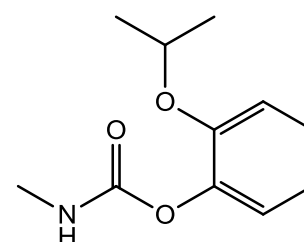
Profenofós



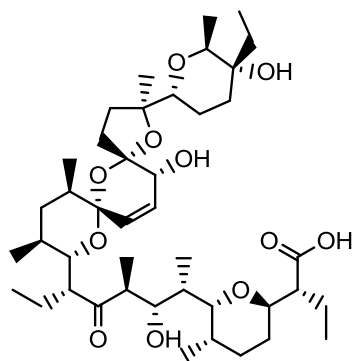
Profoxidim



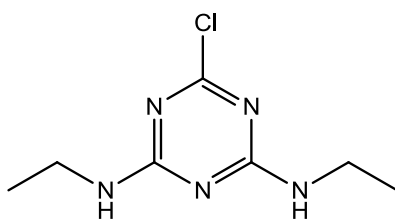
Propargito



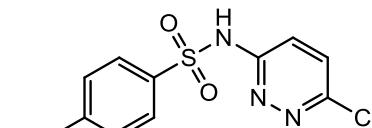
Propoxur



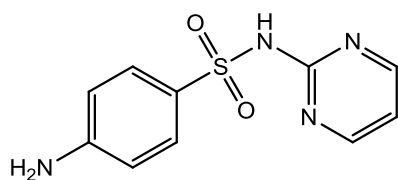
Salinomicina



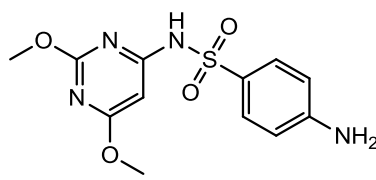
Simazina



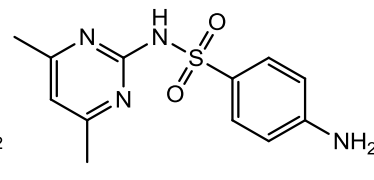
Sulfacloropiridazina



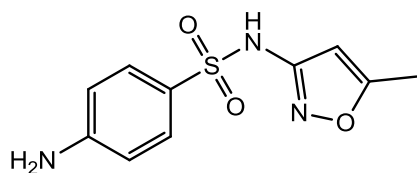
Sulfadiazina



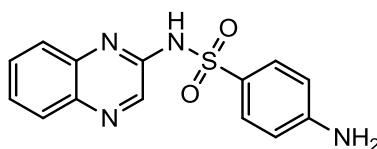
Sulfadimetoxina



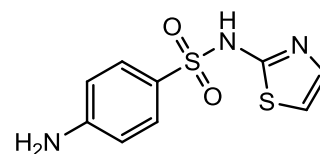
Sulfametazina



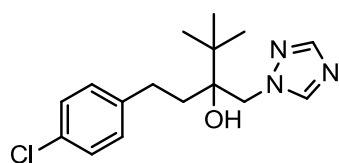
Sulfametoxazol



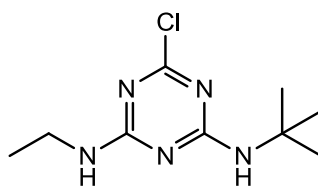
Sulfaquinoxalina



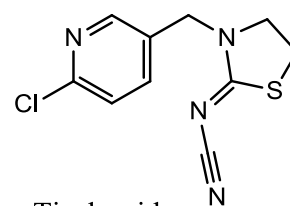
Sulfatiazol



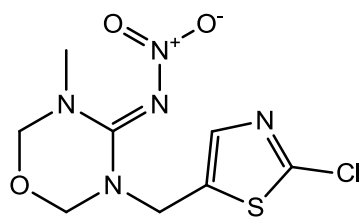
Tebuconazol



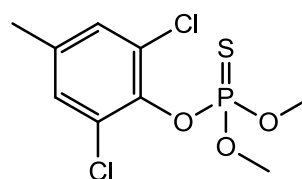
Terbutilazina



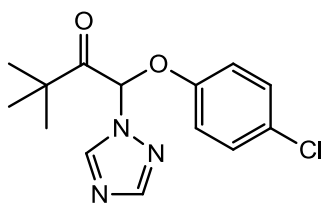
Tiacloprido



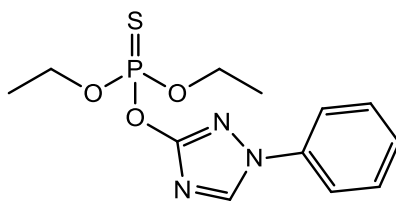
Tiametoxam



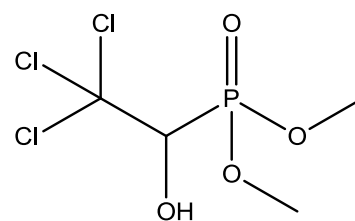
Tolclofós metílico



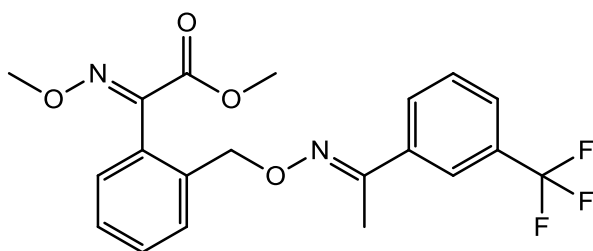
Triadimefon



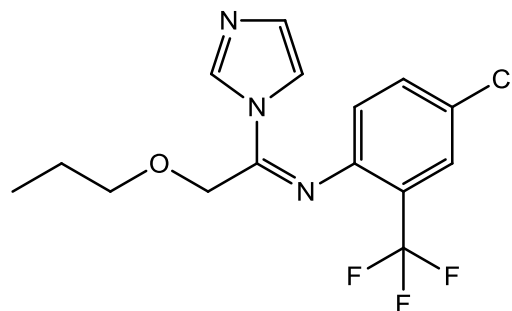
Triazofós



Triclorfom



Trifloxistrobina



Triflumizol