



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

Nathália Saibt

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
ABELHA E PÓLEN APÍCOLA EMPREGANDO MÉTODO
QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS**

Santa Maria – RS, Brasil

2017

Nathália Saibt

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA
E PÓLEN APÍCOLA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS
MODIFICADO E LC-MS/MS**

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

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria – RS, Brasil

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Saibt, Nathália
Determinação multirresíduo de agrotóxicos em abelha e pólen apícola empregando método QuEChERS modificado e LC-MS/MS / Nathália Saibt.- 2017.
94 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella
Coorientadora: Martha Bohrer Adaime
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2017


1. Abelha 2. Pólen apícola 3. Agrotóxico 4. Cromatografia I. Zanella, Renato II. Bohrer Adaime, Martha III. Título.

Nathália Saibt

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA
E PÓLEN APÍCOLA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS
MODIFICADO E LC-MS/MS**

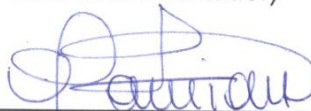
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovada em 21 de julho de 2017:



Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)

(Presidente/Orientador)



Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)



Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)

Santa Maria, RS

2017

Dedico este trabalho à minha família,
a base de tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Zanella pela orientação e pela oportunidade de fazer parte do grupo do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP). Foram anos de aprendizado e crescimento pessoal.

À banca de defesa da dissertação, professores Dr. Osmar Damian Prestes e Dr. Fábio Ferreira Gonçalves, pela disponibilidade de avaliar este trabalho e por suas contribuições.

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

À CAPES pelo auxílio financeiro fornecido.

Aos meus colegas, integrantes do LARP, em especial a Lucila, Nelson, Filipe e Pimperelli sem o apoio de vocês não teria conseguido. A Janice Facco, Magali, Gabriel e Luis pela convivência e amizade.

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

Aos meus amigos que tornaram esta caminhada mais fácil.

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

Muito obrigada!

RESUMO

DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ABELHA E PÓLEN APÍCOLA EMPREGANDO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO E LC-MS/MS

Autora: Nathália Saibt

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

A utilização de agrotóxicos contribui para o aumento na produção, porém há uma preocupação crescente com seus efeitos adversos no ambiente. O declínio da população de abelhas e a contaminação dos produtos apícolas por agrotóxicos estão sendo amplamente discutidos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo principal desenvolver e validar um método para determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de abelhas e pólen apícola, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS) para detecção de 81 compostos de diferentes classes, tais como, inseticidas e fungicidas. O método envolve uma etapa de homogeneização das amostras de abelhas e pólen apícola utilizando solução aquosa de tricloroacético, seguido de extração com acetonitrila, partição e limpeza do extrato com sulfato de magnésio, PSA, C18 e carvão grafitizado GCB. O método foi validado avaliando-se os parâmetros linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e efeito matriz. A determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de abelha e pólen apícola pelo método proposto é rápida e simples e o método mostrou ser efetivo para análise multirresíduo de agrotóxicos. Os resultados da validação, avaliados através de ensaios de recuperação em 4 níveis de fortificação, foram satisfatórios, com exatidão entre 70 e 120%, RSD <20%, linearidade entre 5 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, coeficiente de determinação (r^2) >0,99, LOD de 1,5 a 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e LOQ de 5 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método proposto foi aplicado em amostras de pólen apícola e de abelhas, obtidas de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo que todas apresentaram resíduos de agrotóxicos, porém todos abaixo do limite máximo permitido estabelecido pela legislação Europeia.

Palavras-chave: abelha, pólen apícola, agrotóxicos, cromatografia.

ABSTRACT**MULTIRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN BEES AND BEE POLLEN EMPLOYING MODIFIED QuEChERS METHOD AND LC-MS/MS**

Author: Nathália Saibt

Advisor: Prof. Dr. Renato Zanella

The use of pesticides contributes to increase the production, but there is a growing concern with its adverse effects in the environment. The decline of bee population and the contamination of apicultural products by pesticide residues has been widely discussed. Thus, this work had as main objective to develop and validate a method for determination of pesticide residues in bee and bee pollen samples, using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for detection of 81 compounds from different classes, such as insecticides and fungicides. The method involves a homogenization step of the bees and bee pollen samples using aqueous solution of trichloroacetic acid followed by acetonitrile extraction, partition and clean-up with magnesium sulfate, PSA, C18 and GCB. The method was validated evaluating the parameters linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and matrix effect. The determination of pesticide residues in bee and apicultural products samples by the proposed method is rapid and simple, and the method showed to be effective for pesticide multiresidue analysis. The validation results, evaluated by recovery assays at 4 spiked levels, were satisfactory, with accuracy from 70 to 120%, RSD <20%, linearity from 5 to 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, determination coefficient (r^2) >0.99, LOD of 1.5 to 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and LOQ of 5 to 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The proposed method was applied to bee pollen samples and bees samples, obtained from different regions of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, and all of them presented residues pesticides, however below the to the maximum residue limit established by the European legislation.

Keywords: bee, bee pollen, pesticides, chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção brasileira de mel entre os anos de 2000 - 2015.	17
Figura 2 - Esquema de um analisador de massas triplo quadrupolo.	29
Figura 3 - Representação das principais versões do método QuEChERS (A) original, (B) acetato e (C) citrato.	34
Figura 4 – Testes utilizando solução aquosa de tricloroacético (TCA).	45
Figura 5 – Cromatograma de alguns compostos obtido por LC-MS/MS a partir de soluções preparadas no extrato da matriz de pólen apícola na concentração de 50 µg L ⁻¹	55
Figura 6 – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70 e 120% e RSD ≤ 20%, obtidos para diferentes testes de extração.	56
Figura 7 – Extratos finais dos testes T ₅ , T ₆ e T ₇ prontos para serem analisados.....	57
Figura 8 – Comparação dos resultados dos testes T ₃ e T ₇ em relação ao número de compostos recuperados para matriz pólen apícola.	58
Figura 9 – Resíduos restantes após diferentes limpezas avaliadas por gravimetria.	59
Figura 10 – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70 e 120% e RSD ≤ 20%, obtidos para os testes de limpeza.....	60
Figura 11 – Comparação dos resultados dos testes T ₃ e T ₇ em relação ao número de compostos recuperados para matriz abelha.....	61
Figura 12 – Representação do método QuEChERS modificado proposto para a extração de agrotóxicos em abelhas e pólen apícola.	62
Figura 13 – Cromatograma do íon total obtido por LC-MS/MS para (A) amostra branco de pólen apícola, (B) branco reagente e (C) solução analítica no extrato da matriz, contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de 50 µg L ⁻¹	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classe, agrotóxico e suas respectivas toxicidades por contato e oral para as abelhas.....	20
Tabela 2 – Espécies de abelhas presentes no Brasil, nome popular e culturas agrícolas que polinizam.....	24
Tabela 3 – Diferentes preparos de amostras para determinação de agrotóxicos em abelhas e produtos apícolas.....	31
Tabela 4 - Principais sorventes e suas finalidades.....	35
Tabela 5 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos.	36
Tabela 6 – Informações dos agrotóxicos, contendo limites máximos de resíduos (LMR), log P, Ka, fórmula molecular, classe e o grupo químico.....	39
Tabela 7 – Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em abelhas e pólen apícola no sistema LC-MS/MS.....	43
Tabela 8 – Diferentes testes realizados para avaliação dos melhores condições de extração dos compostos em estudo.....	46
Tabela 9 - Relação dos testes realizados para análise de remoção dos coextrativos.	47
Tabela 10 – Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS. .	52
Tabela 11 – Agrotóxicos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), modo de ionização (ESI), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas por LC-MS/MS.....	53
Tabela 12 – Curvas analíticas no solvente e na matriz e coeficientes de determinação e valores de faixa linear.....	64
Tabela 13 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz pólen apícola determinados por LC-MS/MS.....	66
Tabela 14 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz abelha determinados por LC-MS/MS.....	67
Tabela 15 – Percentuais de recuperação e RSD dos agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado, para matriz pólen apícola e abelha.	69
Tabela 16 – Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, para matriz pólen apícola e abelha.	75
Tabela 17 - Valores de LOD e LOQ do método e do instrumento para cada agrotóxico estudado.	80
Tabela 18 - Resultados da análise de amostras reais (pólen apícola e abelha).	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEMEL – Associação Brasileira dos Exportadores de Mel

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

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

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

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

EU – União Europeia

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

HAc – Ácido acético

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA – Ingestão Diária Aceitável

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LARP – Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

LMR – Limite Máximo de Resíduo

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

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

m/z – Razão massa carga

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS/MS – Espectrometria de massas em série

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

pKa – constante de dissociação ácida

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

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

r^2 – Coeficiente de determinação

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

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

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

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

t_R – Tempo de retenção

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 APICULTURA	17
2.2 AGROTÓXICOS	18
2.3 EFEITOS NOCIVOS DOS AGROTÓXICOS	19
2.4 INDICADORES DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS	21
2.5 DECLÍNIO DA POPULAÇÃO DE ABELHAS.....	21
2.6 ABELHAS	22
2.6.1 Organização e alimentação das abelhas	23
2.7 IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS	23
2.7.1 Polinização	23
2.7.2 Produtos das abelhas	25
2.8 PÓLEN APÍCOLA	26
2.8.1 Beneficiamento do pólen apícola	26
2.9 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS E PÓLEN APÍCOLA	27
2.9.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos	27
2.9.2 Preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos	30
2.10 VALIDAÇÃO.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 INSTRUMENTAÇÃO	37
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS.....	38
3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS	39
3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE ...	42
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS	42
3.6 SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA E PÓLEN APÍCOLA	42
3.6.1 Escolha da fase móvel	42
3.6.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS	43

3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA E PÓLEN APÍCOLA	44
3.7.1 Teste gravimétrico	48
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA E PÓLEN APÍCOLA.....	48
3.8.1 Seletividade	48
3.8.2 Curva analítica e linearidade	48
3.8.3 Efeito matriz	49
3.8.4 Exatidão e precisão	49
3.8.5 LOD e LOQ do método	50
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS E PÓLEN APÍCOLA.....	52
4.2 CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR LC-MS/MS	52
4.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA	56
4.3.1 Pólen apícola	56
4.3.2 Abelhas	61
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO.....	62
4.4.1 Seletividade	62
4.4.2 Curva analítica e faixa linear	63
4.4.3 Efeito matriz	66
4.4.3.1 Pólen Apícola.....	66
4.4.3.2 Abelha.....	66
4.4.4 Exatidão (Ensaio de Recuperação) e Precisão (Repetitividade) . 68	
4.4.5 Precisão Intermediária	74
4.4.6 Determinação dos valores de LOD e LOQ do método e do instrumento	79
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO	82
5 CONCLUSÃO	83
6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS	84
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
8 REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

A apicultura é considerada uma atividade importante para o setor agropecuário em nível nacional. Além disso, é uma das atividades capazes de causar impactos positivos, tanto sociais quanto econômicos, e contribuir para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes (EMBRAPA, 2003).

O setor apícola une a capacidade geradora de riquezas relacionadas tanto ao aumento da produtividade agrícola quanto à manutenção e desenvolvimento das faunas e floras da biodiversidade nacional. Isto se deve a capacidade polinizadora das abelhas que permite o aumento da disponibilidade de frutos e sementes para a manutenção de ecossistemas. Contando ainda com os produtos derivados das abelhas, geradores de energia, saúde e aplicações das mais variadas no campo da saúde humana até a fixação do homem do campo e geração de emprego e renda (ABEMEL, 2015).

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

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos e amostras ambientais requer a utilização de métodos analíticos confiáveis, de forma a garantir a identificação e a quantificação destes resíduos. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos tem sido fundamental. Segundo VEKEY (2001), a cromatografia combinada com diferentes técnicas de detecção é um dos melhores e mais utilizados métodos analíticos, tendo em vista que combina as vantagens de alta seletividade e eficiência na separação cromatográfica, potencializada quando utilizada com a espectrometria de massas em série (MS/MS), sendo as técnicas analíticas mais importantes na determinação de resíduos de agrotóxicos.

O preparo das amostras tem sido objeto de constantes estudos, com conseqüente grande desenvolvimento. A presença de interferentes que são extraídos junto com os analitos de interesse torna a detecção, identificação e

quantificação de resíduos de agrotóxicos mais difícil, especialmente em matrizes com diferentes constituintes, como o pólen apícola e abelhas. Buscando atender aos organismos regulamentadores, que estabelecem os níveis de resíduos permitidos, muitos métodos e técnicas têm sido utilizados no aperfeiçoamento do preparo de amostras para determinação de agrotóxicos.

Neste contexto, a análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de abelha e pólen apícola é de extrema importância em termos de segurança e do equilíbrio ambiental. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a otimização e validação de um método multirresíduo de extração para 81 agrotóxicos, com posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). O método proposto foi aplicado para análise de amostras de abelha e de pólen apícola de diferentes regiões (Central, Sudoeste e Noroeste) do estado do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 APICULTURA

A apicultura brasileira se iniciou com enxames trazidos pelos imigrantes com a colonização. Contudo, somente com a introdução de abelhas africanas em meados de 1956 é que se deu a revolução da apicultura no Brasil com o cruzamento das duas populações, produzindo um híbrido conhecido hoje de abelhas africanizadas (SOARES, 2004).

O Brasil tem um grande potencial apícola, em função de sua diversidade de flora, extensão territorial e a variabilidade climática, possibilitando assim produzir mel o ano todo, o que o diferencia dos demais países (ANACLETO & MARCHINI, 2005). Na Figura 1, observamos a produção brasileira de mel em toneladas desde o ano 2000 (IBGE, 2016).

Figura 1 – Produção brasileira de mel entre os anos 2000-2015.



Fonte: IBGE, 2016

Além do mel, o Brasil também é reconhecido como referência em própolis. Ademais também oferece outros produtos como pólen apícola, geleia real e cera de abelha (ABEMEL, 2015).

O setor apícola vem desenvolvendo esforços de organização e aprimoramento técnico tendo por parceiros várias entidades públicas e privadas, bem como centros e empresas públicas de pesquisas, com vistas à compreensão das propriedades do mel nacional, da melhoria das técnicas de

manejo, do fortalecimento da cadeia produtiva como um todo e da comercialização nacional e internacional dos produtos derivados das abelhas (ABEMEL, 2015).

2.2 AGROTÓXICOS

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

Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; bem como, as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos podem ser classificados segundo a sua função (praga que controlam), segunda a estrutura química de suas substâncias ativas (grupo químico) e segundo os efeitos à saúde humana e ao meio ambiente (YAMASHITA, 2008).

De acordo com sua função os agrotóxicos podem ser classificados em:

- a) Inseticidas: controlam insetos;
- b) Fungicidas: destroem ou inibem fungos;
- c) Herbicidas: combatem plantas invasoras;
- d) Desfolhantes: eliminam folhas indesejadas;
- e) Fumigantes: combatem bactérias do solo;
- f) Raticidas: combatem ratos e outros roedores;
- g) Moluscocidas: combatem moluscos;

- h) Nematicidas: combatem nematoides;
- i) Acaricidas: utilizados no combate de ácaros.

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

2.3 EFEITOS NOCIVOS DOS AGROTÓXICOS

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

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

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

Além disso, a larga utilização de agrotóxicos no processo de produção agropecuária tem trazido uma série de transtornos e modificações para o

ambiente, pela sua acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas (biota, água, ar, solo, sedimentos etc.) (AMARO & GODINHO, 2012).

Um dos efeitos ambientais indesejáveis dos agrotóxicos é a contaminação de espécies que não interferem no processo de produção que se tenta controlar (espécies não-alvos), dentre as quais se inclui, as abelhas. 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).

Segundo MALASPINA *et al.* (2008), os inseticidas podem afetar as abelhas principalmente por três modos de intoxicação: a) contato; b) ingestão e c) fumigação e, seus efeitos variam de morte causada por toxicidade aguda e efeitos a longo prazo provocando danos no funcionamento da colônia e diminuição da longevidade dos indivíduos. Na Tabela 1 observamos a toxicidade de contato e a toxicidade oral de alguns agrotóxicos para as abelhas, medida pela dose letal mediana (LD₅₀, do inglês *Lethal Dose*) (BAYO & GOKA, 2016). LD₅₀ corresponde à dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população.

Tabela 1 – Classe, agrotóxico e suas respectivas toxicidades por contato e oral para as abelhas.

Classe	Agrotóxicos	LD₅₀ Contato (µg kg⁻¹)	LD₅₀ Oral (µg kg⁻¹)
Inseticidas	Carbofurano	0,16	
	Clorpirifós	0,072	0,24
	Clotianidina	0,039	0,004
	Diazinona	0,38	0,21
	Fipronil	0,007	0,001
	Fenpiroximato	11	
	Imidacloprido	0,061	0,013
	Tau-Fluvalinato	8,7	45
Fungicidas	Azoxistrobina	200	25
	Boscalida	200	166
	Carbendazim	50	
	Miclobutanil	40	34
	Propiconazol	50	77
	Tebuconazol	200	83

Fonte: BAYO & GOKA, 2016

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

2.4 INDICADORES DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

O uso indiscriminado dos agrotóxicos tem feito com que sejam detectados resíduos destes no meio ambiente, em todos os compartimentos ambientais (ar, água e solo) (BAIRD, 2002).

Nos últimos anos, cresceu o número de estudos que apontam as abelhas e os produtos apícolas como bioindicadores da contaminação ambiental, devido às abelhas operárias realizarem viagens exploratórias em áreas que cercam seu habitat, recolhendo o néctar, água e o pólen das flores. Durante este processo, diversos microrganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar ficam aderidos aos pelos superficiais de seu corpo, retidas em seu sistema respiratório ou armazenadas em sua vesícula melífera e no pólen que coletaram. Diante desse fato, as abelhas e os produtos apícolas podem ser usados como bioindicadores para monitoramento de impacto ambiental causado por fatores biológicos, químicos e físicos, tais como parasitas, contaminações industriais ou agrotóxicos.

2.5 DECLÍNIO DA POPULAÇÃO DE ABELHAS

Nos últimos anos, a preocupação com a conservação das abelhas tem crescido bastante devido ao declínio dos polinizadores (ALLEN-WARDELL

et al., 1998; KEVAN; VIANA, 2003;). Em outubro de 2006, apicultores da costa leste dos Estados Unidos, relataram uma perda alarmante de colônias de abelhas. Até o final daquele mesmo ano, os apicultores na costa oeste daquele país também começaram a relatar tal fenômeno que causou prejuízos sem precedentes (JOHNSON, 2010). No início de 2007, apicultores europeus observaram tal fenômeno na Bélgica, na França, na Holanda, na Grécia, na Itália, em Portugal e na Espanha, também na Suíça e Alemanha, embora em menor grau (DUPONT, 2007). Na Irlanda do Norte, foi relatada diminuição superior a 50% no número de colmeias. Em abril de 2007, novos relatos desse fenômeno foram feitos em Taiwan (MOLGA, 2007). Tais perdas continuaram ao longo dos anos de 2008 e 2009 (VANENGELSDORP *et al.*, 2009). Esse fenômeno passou a ser conhecido como Desordem do Colapso da Colônia (DCC) (RATNIEKS; CARRECK, 2010) e é caracterizado pela perda rápida e inexplicada da população adulta de uma colmeia (UNDERWOOD; VANENGELSDORP, 2007).

No Brasil, a situação não é diferente, apicultores tem registrado perdas de abelhas em suas colmeias nos últimos anos. Especialmente nos estados de São Paulo e Santa Catarina, houve casos de enfraquecimento, declínio e colapso das colônias (EMBRAPA, 2016). Ainda não se sabe quais as causas da DCC. Diversos fatores já foram apontados como responsáveis pelo novo fenômeno, desde uma nova doença até as ondas eletromagnéticas dos celulares. Segundo JOHNSON (2010), inicialmente, as maiores desconfianças incidiam sobre um novo parasita, envenenamento por agrotóxicos, desnutrição, estresse ambiental e um manejo apícola inadequado. Mas conforme o relatório emitido pelo USDA (2009), no qual foram apontados os progressos feitos nas pesquisas sobre o assunto nos últimos anos, é provável que as causas da DCC não possam ser atribuídas a uma única condição, e que provavelmente exista a interação de diferentes fatores.

2.6 ABELHAS

Desde a antiguidade as abelhas têm sido valorizadas pelos seus produtos e admiradas pelo seu comportamento (PEREIRA *et al.*, 2002). As abelhas são insetos da ordem *Hymenoptera*. Em todo o mundo são mais de 20.000 espécies,

sendo mais bem representadas nas regiões tropical e subtropical. No Brasil estima-se que existam mais de 2.500 espécies de abelhas distribuídas em cinco famílias. Dentro das famílias há muitos gêneros e espécies de abelhas das mais diversificadas formas, cores e tamanhos. Cada espécie apresenta uma característica própria e desempenha um papel particular na natureza (LIMA, 2005).

2.6.1 Organização e alimentação das abelhas

As abelhas apresentam níveis de organização social diferentes. Há espécies classificadas como sociais, em que ocorrem muitos indivíduos no mesmo ninho desempenhando diferentes atividades ao longo de suas vidas. Nesse sistema organizacional, as abelhas se dividem em machos e fêmeas, e estas em duas castas, as operárias e a rainha. Cada casta apresenta uma atividade, ou conjunto de atividades, como por exemplo, a função da rainha é manter a postura dos ovos no ninho. Além das espécies sociais, também existem as abelhas solitárias, as quais não apresentam divisão de castas e uma única fêmea constrói seu ninho sozinha, sem dividir essa tarefa com outra abelha (SILVA *et al.*, 2014).

As abelhas utilizam recursos retirados das flores para a sua alimentação, como por exemplo: os grãos de pólen, uma importante fonte de proteína e sais minerais; o néctar, que é a principal fonte de carboidratos; os óleos florais constituem a fonte mais importante de lipídeos para as abelhas coletoras de óleos (SILVA *et al.*, 2014).

2.7 IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS

2.7.1 Polinização

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

As abelhas são os principais agentes polinizadores, tanto dos remanescentes de áreas nativas quanto das principais plantas cultivadas. A polinização realizada pelas abelhas não é somente uma função crítica nos

ecossistemas, mas também essencial a uma gama de culturas ao redor do mundo.

Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) as abelhas seriam responsáveis pela polinização de 73% das plantas cultivadas, as quais são utilizadas de forma direta ou indireta na alimentação humana. Na Tabela 2 observamos as espécies de abelhas presentes no Brasil e as culturas agrícolas que polinizam.

Tabela 2 – Espécies de abelhas presentes no Brasil, nome popular e culturas agrícolas que polinizam.

Espécie	Nome Popular	Culturas agrícolas que polinizam
<i>Apis mellifera</i>	abelha-de-mel, abelha-africana, europa e africanizada	algodão, café, caju , canola, girassol, maçã, mamona, melão e soja
<i>Bombus (Fervidobombus) pauloensis</i>	mamangava-de-chão	berinjela e maracujá-amarelo
<i>Melipona (Melikerria) fasciculata</i>	uruçu-cinzenta, tiúba, tiúba-grande e jandaírapreta da Amazônia	açaí, berinjela, caju, tomate e urucum
<i>Melipona (Melipona) quadrifasciata</i>	mandaçaia, mandassaia, mandasái, manassaia e amanassaia	abóbora, pimentão, pimenta-malagueta e tomate
<i>Melipona (Melipona) subnitida</i>	jandaíra	caju, goiaba e pimentão
<i>Melipona (Michmelia) flavolineata</i>	uruçu-amarela e ira-açu	açaí, girassol e urucum
<i>Melipona (Michmelia) scutellaris</i>	uruçu, urussu, urussu-boi, irussu, eiruçu e iruçu	abacate, pimentão e pitanga
<i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>	uruçu	caju, guaraná e urucum
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	iraí	girassol, morango e pepino
<i>Tetragonisca angustula</i>	jataí, maria-seca e mosquito-amarelo	morango
<i>Trigona spinipes</i>	arapuá, abelha-de-cachorro, irapuá e xupé-pequeno	abóbora, caju, girassol, laranja, melancia, pitanga e tamarindo
<i>Epicharis (Epicharana) flava</i>	mamangava	acerola, castanha-do-pará e maracujá-doce
<i>Eulaema (Apeulaema) mocsaryi</i>	mamangava	castanha-do-Brasil

Fonte: Modificado de Silva *et al.*, 2014

2.7.2 Produtos das abelhas

Além do importante papel das abelhas na polinização, elas são responsáveis pela produção de mel, própolis, geleia real, cera e apitoxina (BACIC *et al.*, 2015). Além desses produtos apícolas, o pólen apícola vem se destacando tanto pelas suas propriedades terapêuticas, quanto pela possibilidade de aplicação na indústria alimentícia, na forma de alimentos funcionais (MARCHINI, 2006).

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, combinam com substâncias específicas próprias, e após armazenam até madurar nos favos da colmeia (MAPA, 2000).

O própolis é o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (BRASIL, 2001).

Geleia real é o produto da secreção do sistema glandular cefálica (glândulas hipofaringeanas e mandibulares) das abelhas operárias, coletado até 72 horas após a produção (BRASIL, 2001).

A cera é um produto de consistência plástica, de cor amarelada, muito fusível, secretado pelas abelhas para a formação dos favos nas colmeias (BRASIL, 2001). A cera é utilizada como ingrediente na indústria de fármacos e cosméticos, fabricação de velas, lustrador para pisos, tintas e materiais para impermeabilização.

A apitoxina (veneno das abelhas) é uma substância de origem glandular, produzida pelas operárias. Compõe-se de água e substâncias ativas como a apamina, melitina, fosfolipase, hialuronidase e aminoácidos (BRASIL, 2001). A apitoxina pode ser utilizada para minimizar casos de artrite, reumatismo e hipertensão, desde que o uso seja prescrito e acompanhado por um médico.

2.8 PÓLEN APÍCOLA

Pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia (BRASIL, 2001). A composição do pólen apícola varia com a origem floral, condições ambientais, climáticas, idade e estado nutricional da planta e estações do ano, fazendo com que o pólen tenha uma maior diversidade do que qualquer outro produto da colmeia (CARPES, 2008).

O pólen apícola contém nutrientes como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais, além de carotenoides, flavonoides e fitosteróis, sendo este o motivo da sua utilização como alimento alternativo e/ou suplemento alimentar (SOMERVILLE, 2005; SOMERVILLE, 2006). Além das propriedades nutricionais, o pólen apícola tem se destacado no cenário científico devido às suas propriedades bioativas, como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, imunomodulatória e anticariogênica, exercendo função antioxidante e inibindo a ação lesiva dos radicais livres (NEVES, 2009).

A produção de pólen apícola no Brasil representa uma atividade recente. Segundo vários autores o país tem potencial para ser um grande produtor de pólen apícola, devido principalmente à riqueza e a diversidade da flora aliada ao clima tropical e a eficiência das abelhas africanizadas (BARRETO *et al.*, 2006). A Legislação Brasileira possui parâmetros de controle de qualidade para que o pólen apícola possa ser comercializado. Este deve apresentar umidade máxima de 4% (pólen desidratado) ou 30% (pólen fresco), cinzas máximo de 4%, lipídeos mínimo de 1,8%, proteínas mínimo de 8%, açúcares totais entre 14,5 e 55%, fibra bruta mínimo de 2%, acidez livre máximo de 300 mEq.kg⁻¹ e pH entre 4 e 6 (BRASIL, 2001).

2.8.1 Beneficiamento do pólen apícola

O apicultor realiza a coleta do pólen apícola fixando, na colmeia, estruturas nas quais as cargas ficam retidas no momento em que as abelhas as atravessam. Estas estruturas são chamadas de “coletor de pólen”, “armadilhas

de pólen” ou “caça pólen”. De maneira geral, os coletores têm perfurações de, aproximadamente 45 mm de diâmetro para permitir a passagem das abelhas, mas não de todas as bolotas de pólen apícola, que caem em recipientes coletores e, posteriormente, são recolhidos pelos apicultores (ALVES, 2013b).

Nas unidades de processamento, o pólen apícola passa por etapas de pré-limpeza, congelamento, descongelamento, desidratação, envase e armazenamento. Durante a pré-limpeza são retiradas abelhas mortas, folhas ou qualquer outra sujidade visível. A etapa de congelamento é útil para destruir ácaros e, também, ovos e larvas de traça ou de outros insetos, além de controlar o crescimento de fungos e bactérias. Geralmente, o produto é mantido congelado por, pelo menos, dois dias (CAMARGO *et al.*, 2003). Uma vez descongelado, o produto é desidratado. Esta etapa, além de aumentar a vida de prateleira do produto, também permite que seja armazenado e comercializado à temperatura ambiente. As condições de desidratação variam entre as unidades de produção, mas é comum o uso de estufas com aquecimento. Por fim, faz-se o envase em embalagens fracionadas, armazenamento e comercialização (CAMARGO *et al.*, 2003).

2.9 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS E PÓLEN APÍCOLA

2.9.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos

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

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua interação entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida em uma coluna, sendo esta aplicada à análise de compostos voláteis ou volatizáveis que sejam

termicamente estáveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Como a maioria dos compostos não são suficientemente voláteis para ser analisados por Cromatografia Gasosa, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) tem tido grande destaque. Na HPLC o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel (líquida) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; HARRIS, 2012).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

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

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

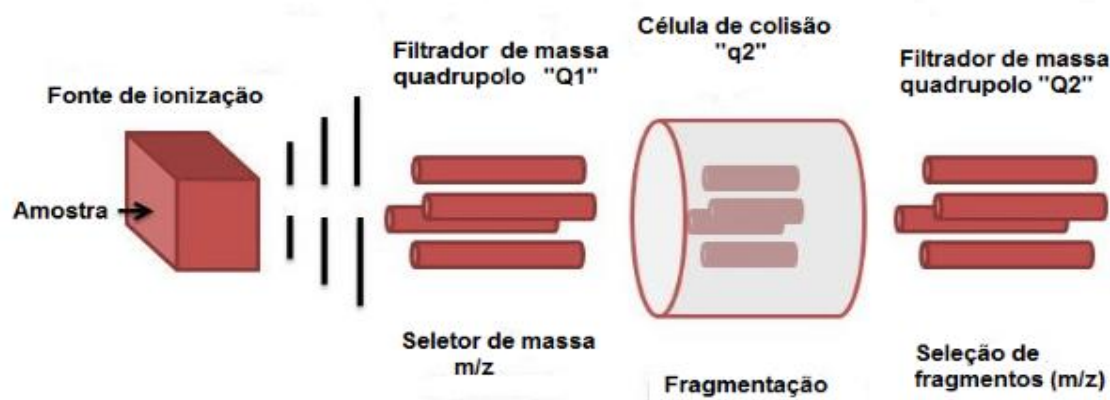
Mais comumente utiliza-se a ionização por eletronebulização (ESI), onde a amostra é dissolvida e pressurizada em tubo capilar de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. À medida que ocorre a dessolvatação,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

focalização. Neste processo, apenas a ionização ocorre à pressão atmosférica, o espectrômetro de massas se encontra sob “vácuo” (LANÇAS, 2009).

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

O analisador de massas tipo triplo quadrupolo (TQ) é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão m/z , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Na Figura 2 encontra-se esquematizado um analisador de massas triplo quadrupolo.

Figura 2 - Esquema de um analisador de massas triplo quadrupolo.



Fonte: Modificado Agilent (2016).

Dentre as técnicas de operação para obtenção do espectro de massas em MS/MS, estão varredura completa (do inglês, *Full scan*), Monitoramento do Íon Selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*), Varredura do Íon

Produto, Varredura do Íon Precursor e Monitoramento Seletivo de Reações (SRM, do inglês *Select Reaction Monitoring*).

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

2.9.2 Preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos

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

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

Na literatura tem sido relatado o uso de diferentes técnicas de preparo de amostra para a extração de resíduos de agrotóxicos em abelhas e pólen apícola. A Tabela 3, abaixo, apresenta alguns destes métodos.

Tabela 3 – Diferentes preparos de amostras para determinação de agrotóxicos em abelhas e produtos apícolas.

PSA: amina primária secundária; GCB: carvão grafítizado; MSPD: dispersão da matriz em fase sólida; d-SPE: extração em fase sólida dispersiva; FM: fase móvel.

Amostra	Análise	Analitos	Preparo de amostra	Referências
mel e pólen	LC-MS/MS	Fipronil e Metabólitos	1 g amostra + 3 mL H ₂ O/MeOH / 5 mL H ₂ O/MeOH lavar o tubo - SPE (florisil 1 g - 500 mg) - Eluição 5 mL metanol	CHAO <i>et al.</i> , 2010
abelhas	LC-MS/MS e GC-MS/MS	Multirresíduo	5 g amostra + 2 g pérolas de vidro + 10 mL H ₂ O + 10 mL ACN 1% HCOOH - Partição 1 g acetato + 4 g MgSO ₄ - 7 mL d-SPE 350 mg PSA/350 mg Z-SEP/1050 mg MgSO ₄ - Diluição 5x FM.	KILJANEK <i>et al.</i> , 2016
mel e abelhas	LC-MS/MS e GC-MS/MS	19 Agrotóxicos	1 g amostra + 10 mL H ₂ O + 10 mL ACN + 3 mL hexano - Partição 1 g NaCl/ 4 g MgSO ₄ - 2 mL d-SPE 150 mg MgSO ₄ / 25 mg PSA	BARGANSKA <i>et al.</i> , 2014
mel e pólen	LC-QTOF MS/MS	Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam	Mel - 5 g amostra - 10 mL H ₂ O - SPE (StrataX - 250 mg) - Eluição 2 mL ACN:H ₂ O (45:55 v/v) Pólen - 2 g amostra + 10 mL diclorometano - Filtração (papel filtro) - evaporado - reconstituído 1 mL ACN:H ₂ O (50:50 v/v)	HERNANDEZ <i>et al.</i> , 2016
Mel, pólen e abelha	LC-MS/MS	Clotianidina, Imidacloprido, Tiametoxam, Tiacloprido, Flonicamida, Acetamiprido e Nitempiram	5 g mel / 5 g abelha / 2 g pólen - 1-2 g NaSO ₄ - 10 mL H ₂ O - 10 mL ACN - Partição citrato - 8 mL d-SPE 900 mg MgSO ₄ /150 mg PSA - evaporação - reconstituído 0,2 mL ACN	CODLING <i>et al.</i> , 2016

Cera de abelha	LC-MS/MS	Multirresíduo	QuEChERS Citrato	LOPEZ <i>et al.</i> , 2016
Abelhas	GC-MS	Multirresíduo	2 g de amostra - 15 mL ACN-H ₂ O (2:1 v/v) - Ultra turrax 0.5 min - sais partição Citrato - Freezing out (2h) - 5 mL d-SPE 500 mg MgSO ₄ /450 mg C ₁₈ / 200 mg PSA/ 50 mg GCB - evaporação - reconstituir em tolueno	WALORCZYK <i>et al.</i> , 2009
Abelhas	GC-NPD	12 Agrotóxicos	0,5 g abelha - 1,5 g Florisil - MSPD - Coluna 2 g sílica ativada / 1,5 g MgSO ₄ - Eluição (diferentes solventes)	MORZYCKA, 2002
Abelhas	LC-MS	6 Agrotóxicos	1 g Abelha - 1 g C ₁₈ - MSPD - Eluição: 10 mL diclorometano:metanol (85:15, v/v) – evaporado e reconstituído 0,5 mL metanol	FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2006
Mel, pólen e abelha	LC-MS/MS e GC-ToF	Multirresíduo	5 g de mel 10 mL ACN - 10 mL H ₂ O 5 g de abelha 10 mL ACN - 3 mL H ₂ O - 3 mL hexano 2 g pólen 10 mL ACN - 8 mL H ₂ O - 3 mL hexano QuEChERS Citrato: 6 mL ACN - d-SPE com PSA e C ₁₈	WIEST <i>et al.</i> , 2011
Pólen e geleia real	LC-MS/MS	Sulforados	0,5 g pólen + 12 mL MeOH / 1,6 g geleia real + 5 mL MeOH - Centrifugação - Evaporação - Redissolver 1 mL MeOH	ARES <i>et al.</i> , 2016
Mel e geleia real	HPLC-MS/MS	Multirresíduo	2 g mel / 1 g geleia real - 100 mg EDTA + 100 mg ácido cítrico + 5 mL H ₂ O - 10 mL ACN 1% HAc - 4 g Na ₂ SO ₄ / 1 g NaCl - 4 mL Extrato d-SPE 50 mg PSA / 150 mg C ₁₈ / 900 mg Na ₂ SO ₄ - Filtração - 300 µL extrato + 700 µL FM	JIN <i>et al.</i> , 2017

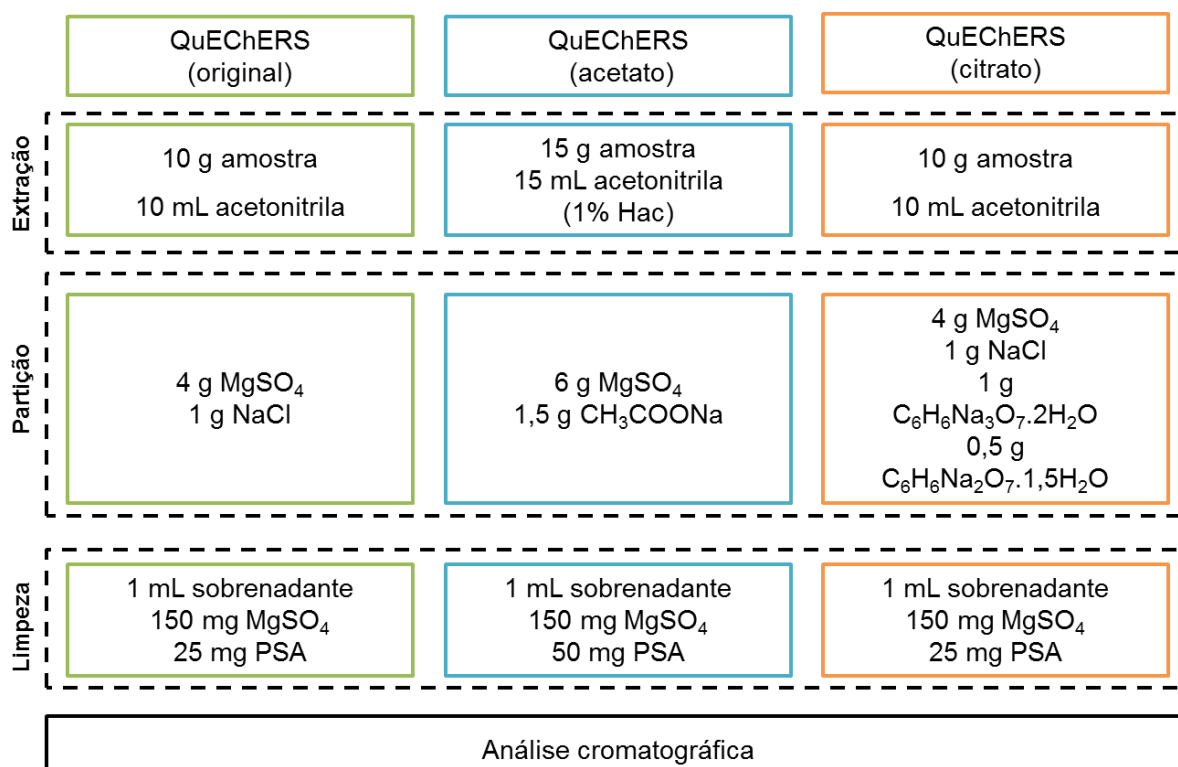
2.9.2.1 Método QuEChERS

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

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

Na otimização do método QuEChERS, percebeu-se que a utilização de tampões promovia recuperações satisfatórias para compostos dependentes do pH. Assim LEHOTAY e colaboradores (2005) desenvolveram o método QuEChERS-acetato, no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio e adição de ácido acético à acetonitrila. Em 2007, ANASTASSIADES e colaboradores propuseram o método QuEChERS-citrato, o qual utiliza uma mistura de citrato de sódio di e sesquiidratados como responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5). Na Figura 3 estão representadas as principais etapas do método QuEChERS e suas diferentes versões. Recentemente CURBELO e colaboradores (2014) utilizaram sais de amônio (formiato e acetato de amônio) para promover a partição e extração de 43 agrotóxicos de diferentes classes. Estes sais são mais voláteis o que facilita a ionização quando a análise é acoplada a espectrometria de massas em série.

Figura 3 - Representação das principais versões do método QuEChERS original, acetato e citrato.



Fonte: Adaptado PRESTES *et al.*, 2011

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

A etapa de partição, através da adição de sais, promove o efeito “*salting out*”, sendo utilizada em vários métodos multirresíduo. Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa (PRESTES *et al.*, 2009).

A limpeza dos extratos é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico. Um novo método de limpeza do extrato (*clean-up*) denominado extração em fase sólida dispersiva (do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*, d-SPE) foi proposto

juntamente com o método QuEChERS. A d-SPE permite que a limpeza do extrato e a redução de água residual sejam efetuadas de forma rápida e simultânea. O sorvente retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado no sistema cromatográfico (PRESTES *et al.*, 2011). Diferentes sorventes podem ser utilizados nesta etapa. Na Tabela 4 estão descritos os principais sorventes e suas finalidades.

Tabela 4 - Principais sorventes e suas finalidades.

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

2.10 VALIDAÇÃO

A demonstração da capacidade técnica de realizar ensaios pode ser evidenciada através da validação do método utilizado. De acordo com RIBANI e colaboradores (2004), validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência, visando diminuir os fatores que levam a imprecisão ou inexatidão de um dado gerado.

O processo de validação é a garantia experimental de que o método é adequado à finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados (ALBANO & RAYA-RODRIGUEZ, 2015).

No Brasil, há guias que auxiliam no processo de validação de um método analítico, tais como, o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” publicado em 2003 pela ANVISA. Além disso, em 2011 o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), publicou o documento “Orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2011). Além do Brasil, outros órgãos internacionais também dispõem de guias como, por exemplo, a SANTÉ (Saúde e Proteção do Consumidor, do francês *Santé et protection des consommateurs*) e o *Codex Alimentarius*.

Os parâmetros envolvidos no processo de validação de métodos analíticos avaliados usualmente são: curva analítica e faixa linear, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limite de detecção e de quantificação. Estes estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos.

Parâmetros	Definição	Aplicação	Referência
Seletividade	Avalia o grau de interferência	Extração de matriz "branco"	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015
Linearidade	Habilidade em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações dos analitos	Curva Analítica ($y = ax + b$)	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015
Faixa Linear de trabalho	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica ($y = ax + b$)	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015
Efeito Matriz	Influência dos componentes da matriz na resposta	Comparação entre curvas em solvente e em extrato branco	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015
Limite de detecção	Menor concentração da substância em análise que pode ser detectada	S/R = 3	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015
Limite de quantificação	Menor concentração da substância em exame que pode ser medida	S/R = 10	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015
Precisão	Avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes	Repetibilidade e Reprodutibilidade	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015
Exatidão	Grau de concordância entre os resultados individuais de um determinado ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro	Ensaio de fortificação	INMETRO, 2011; SANTÉ, 2015

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho proposto consistiu no desenvolvimento e validação do método QuEChERS modificado visando a extração e determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de abelha e pólen apícola empregando LC-MS/MS.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- ◇ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3 (Millipore, EUA);
- ◇ Centrífuga refrigerada NT 825 (Novatecnica, Brasil);
- ◇ Centrífuga refrigerada SL 703 (Solab, Brasil);
- ◇ Agitador Vortex – Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ◇ Balanças analíticas de precisão modelo UX-420H e APX-200 (Shimadzu, Japão);
- ◇ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ◇ Concentrador e evaporador TurboVap LV® (Biotage, EUA);
- ◇ Moinho IKA, modelo A 11 basic (IKA, Brasil);
- ◇ Sistema LC-MS/MS Varian (EUA) equipado com:
 - Cromatógrafo a líquido com bomba binária 212-LC, forno para coluna e sistema de desgaseificação;
 - Detector MS, 320-MS triplo quadrupolo (TQ) Mass Spectrometer, utilizando o modo de ionização por eletronebulização;
 - Amostrador automático ProStar 410;
 - Sistema de aquisição de dados através do software MS Workstation versão 6.9.2;

- Coluna analítica Pursuit UPS C₁₈ (100 x 2,0 mm d.i.) e 2,8 µm de tamanho de partícula (Varian, EUA);
- Sistema gerador de nitrogênio LC/MS 12/2 (Domnick Hunter, Inglaterra).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

Os reagentes, solventes e demais materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados abaixo:

- ◇ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ◇ Metanol, grau HPLC (Merck, Alemanha);
- ◇ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3R, resistividade de 18,2 MΩ cm (Millipore, França);
- ◇ Ácido acético glacial 100% (J. T. Baker, EUA);
- ◇ Ácido tricloroacético (Merck, Alemanha);
- ◇ Formiato de amônio (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Sulfato de magnésio anidro p.a (J.T. Baker, Japão);
- ◇ Cloreto de sódio p.a. (Sigma-Aldrich, Alemanha);
- ◇ Acetato de sódio anidro (J. T. Baker, EUA);
- ◇ Citrato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Hidrogenocitrato de sódio sesquiidratado (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Acetato de amônio (Merck, Alemanha);
- ◇ Acetona grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ◇ Hexano (95% n-hexano) (J. T. Baker, EUA);
- ◇ Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ◇ Sorvente Bondesil C18 com diâmetro de partícula (d.p.) 40 µm (Agilent, EUA);
- ◇ Sorvente Bondesil PSA com d.p. de 40 µm (Agilent, EUA);
- ◇ Bond Elut EMR-lipid (Agilent, EUA);
- ◇ Florisil® 60-120 mesh (J. T. Baker, EUA);
- ◇ Supel™ QuE Z-Sep+ (Sigma-Aldrich, EUA);

- ◇ Alumina neutra 100-125 mesh (Sigma-Aldrich, EUA);
- ◇ Quitosana (obtida e caracterizada no Laboratório de Operações Unitárias da Escola de Química e Alimentos da FURG, a partir de resíduos de camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis*) com d.p. de 62-76 µm (Rio Grande, Brasil);
- ◇ Carvão Supelclean™ ENVI-Carb d.p 105-125 µm (Supelco, EUA);
- ◇ Filtros de PTFE de 13 mm e porosidade de 0,22 µm (Analítica, Brasil);
- ◇ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ◇ Microtubo, tipo Eppendorf, capacidade 2 mL (Axygen Scientific, EUA);
- ◇ Frascos de vidro (vial) com capacidade de 2 mL (Agilent, EUA);
- ◇ Padrões sólidos dos compostos em estudo (Tabela 6);

3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

Os agrotóxicos para este estudo foram selecionados com base na União Europeia estabelecidos para mel e produtos apícolas (pólen apícola e geleia real). Estes compostos foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer e estão listados na Tabela 6, juntamente com a classe, grupo químico e propriedades físico-químicas.

Tabela 6 – Informações dos agrotóxicos, contendo limites máximos de resíduos (LMR), log P, Ka, fórmula molecular, classe e o grupo químico.

Agrotóxicos	LMR ^c (mgkg ⁻¹)	log P	ka	Fórmula Molecular	Grupo Químico
Acefato	0,02	-0,85	8,35	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	Organofosfato ^a
Acetamiprido	0,05	0,8	0,7	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	Neonicotinóide ^a
Aldicarbe	0,01	1,15	Não dissocia	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	Carbamato ^a
Atrazina-d5 (PC)	-	-	-	C ₈ H ₉ D ₅ ClN ₅	Triazina
Azoxistrobina	0,05	2,5	Não dissocia	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	Estrobilurina ^b
Boscalida	0,5	2,96	Não dissocia	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	Carboxamida ^b
Bupirimate	0,05	3,68	4,4	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	Pirimidinol ^b
Buprofeszina	0,05	4,93	Não dissocia	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	Tiadiazinona ^a
Carbaril	0,05	2,36	10,4	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	Carbamato ^a
Carbendazim	1	1,48	4,2	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	Benzimidazol ^b

Carbofurano	0,05	1,8	-	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	Carbamato ^a
Ciazofamida	0,05	3,2	Não dissocia	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S	Cianoimidazol ^b
Cimoxanil	0,05	0,67	9,3	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃	Acetamida ^b
Ciprodinil	0,05	4	4,44	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	Anilinoimidazina ^b
Clorfenvinfós	0,01	3,82	-	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	Organofosforado ^a
Clotianidina	0,01	0,905	11,1	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S	Neonicotinóide ^a
Cresoxim-metílico	0,05	3,4	Não dissocia	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	Estrobilurina ^b
Diazinona	0,01	3,69	2,6	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	Organofosforado ^a
Difenoconazol	0,05	4,36	1,07	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	Triazol ^b
Diflubenzurom	0,05	3,89	-	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂	Benzoiluréia ^a
Dimetomorfe	0,05	2,68	-1,3	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	Morfolina ^b
Dimoxistrobina	0,05	3,59	Não dissocia	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₃	Estrobilurina ^b
Emamectina	0,05	5	-	C ₄₉ H ₇₅ NO ₁₃	Avermectina ^a
Espinosade A	0,05	2,8	-	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₀	Espinosina ^a
Espirodiclofeno	0,05	5,83	-	C ₂₁ H ₂₄ Cl ₂ O ₄	Cetoenol ^a
Espiromesifeno	0,01	4,55	-	C ₂₃ H ₃₀ O ₄	Cetoenol ^a
Etiona	0,01	5,07	-	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	Organofosforado ^a
Etirimol	0,05	2,3	5	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O	Pirimidinol ^b
Fenamidona	0,05	2,8	Não dissocia	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	Imidazol ^b
Fenarimol	0,05	3,69	-	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	Pirimidina ^b
Fenazaquim	0,01	5,51	2,44	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	Quinazolina ^a
Fenbuconazol	0,05	3,79	Não dissocia	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄	Triazol ^b
Fenhexamida	0,05	3,51	7,3	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂	Hidroxianilida ^b
Fenoxicarbe	0,05	4,07	Não dissocia	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	Carbamato ^a
Fenpiroximato	0,05	5,01	Não dissocia	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	Pirazol ^a
Fentiona	0,01	4,84	-	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	Organofosforado ^a
Fipronil	0,005	3,75	Não dissocia	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	Fenil Pirazol ^a
Flusilazol	0,05	3,87	2,5	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si	Triazol ^b
Flutolanil	0,05	3,17	Não dissocia	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂	Carboxamida ^b
Flutriafol	0,05	2,3	2,3	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O	Triazol ^b
Fosmete	0,05	2,96	Não dissocia	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂	Organofosforado ^a
Imazalil	0,05	2,56	6,49	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	Imidazol ^b
Imidacloprido	0,05	0,57	Não dissocia	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	Neonicotinóide ^a
Indoxacarbe	0,05	4,65	Não dissocia	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇	Oxadiazina ^a
Iprovalicarbe	0,05	3,2	Não dissocia	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	Carbamato ^b
Lufenuron	0,02	5,12	10,2	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₈ N ₂ O ₃	Benzoiluréia ^a
Malationa	0,05	2,75	Não dissocia	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	Organofosforado ^a

Mecarbam	0,05	2,29	Não dissocia	C ₁₀ H ₂₀ NO ₅ PS ₂	Organofosforado ^a
Metalaxil	0,05	1,75	-	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	Fenilamida ^b
Metidationa	0,02	2,57	-	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	Organofosforado ^a
Metiocarbe	0,05	3,18	Não dissocia	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	Carbamato ^b
Metomil	0,02	0,09	Não dissocia	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	Carbamato ^a
Metoxifenzida	0,05	3,72	12,2	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃	Diacilhidrazina ^a
Miclobutanil	0,05	2,94	-	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	Triazol ^b
Oxadixil	0,01	0,65	-	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄	Fenilamida ^b
Picoxistrobina	0,05	3,6	Não dissocia	C ₁₈ H ₁₆ F ₃ NO ₄	Estrobilurina ^b
Piraclostrobina	0,05	3,99	Não dissocia	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	Estrobilurina ^b
Pirazofós	0,05	3,8	-	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	Fosforotiolato ^b
Piridabem	0,02	6,37	Não dissocia	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS	Piridazinona ^a
Pirimetanil	0,05	2,84	3,52	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	Anilino pirimidina ^b
Pirimicarbe	0,05	1,7	4,4	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	Carbamato ^a
Piriproxifem	0,05	5,37	6,87	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	Éter piridiloxipropílico ^a
Profenofós	0,05	1,7	Não dissocia	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	Organofosforado ^a
Propamocarbe	0,05	0,84	9,5	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	Carbamato ^b
Propiconazol	0,05	3,72	1,09	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	Triazol ^b
Quinalfos	0,05	4,44	-	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS	Organofosforado ^a
Quinoxifem	0,05	4,66	Não dissocia	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	Quinolina ^b
Tau-Fluvalinato	0,05	7,02	Não dissocia	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	Piretroide ^a
Tebufenozida	0,05	4,25	Não dissocia	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	Diacilhidrazina ^a
Teflubenzurom	0,05	4,3	9,2	C ₁₄ H ₆ Cl ₂ F ₄ N ₂ O ₂	Benzoiluréia ^a
Tetraconazol	0,02	3,56	0,65	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	Triazol ^b
Tiacloprido	0,05	1,26	Não dissocia	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	Neonicotinóide ^a
Tiametoxam	0,01	-0,13	Não dissocia	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	Neonicotinóide ^a
Tiodicarbe	0,05	1,62	Não dissocia	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃	Carbamato ^a
Tiofanato-metílico	1	1,45	7,28	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	Benzimidazol ^b
Tolifluanida	0,05	3,9	Não dissocia	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	Sulfamida ^b
Triadimefom	0,1	3,18	-	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	Triazol ^b
Triazofós	0,01	3,55	-	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	Organofosforado ^a
Triclorfom	0,01	0,43	-	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P	Organofosforado ^a
Trifenilfosfato (PI)	-	-	-	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	Organofosforado ^a
Trifloxistrobina	0,05	4,5	Não dissocia	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	Estrobilurina ^b
Triflumurom	0,01	4,9	-	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₃	Benzoiluréia ^a

^aInseticida; ^bFungicida; ^cLMR estabelecido pela União Europeia; PI: padrão interno; PC: padrão de controle.

3.4 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO E DO PADRÃO DE CONTROLE

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

Como padrão de controle utilizou-se atrazina deuterada para a avaliação do procedimento de extração, uma vez que é adicionado à amostra anteriormente à extração dos analitos, nas concentrações empregadas para avaliação dos ensaios de recuperação ($5, 10, 20, 50$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$).

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

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

A partir da mistura 5 mg L^{-1} , foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de $2,5; 5,0; 10; 25; 50; 75$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila e no extrato da matriz avaliada.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura abaixo de $-4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.6 SISTEMA LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA E PÓLEN APÍCOLA

3.6.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel baseou-se nas condições utilizadas frequentemente no LARP-UFSM (MARTINS *et al.* 2014; DONATO *et al.* 2015;). A fase móvel empregada neste trabalho foi a solução aquosa de formiato de

amônio 5 mmol L⁻¹ (solvente A) e metanol (solvente B), conforme gradiente descrito na Tabela 7. O tempo total de corrida foi de 20 min.

Tabela 7 – Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de agrotóxicos em abelhas e pólen apícola no sistema LC-MS/MS.

Tempo (min)	%A	%B
0	90	10
1	90	10
2	55	45
8	10	90
9,3	5	95
11,3	5	95
11,5	2	98
13,5	2	98
20	90	10

Vazão constante de 150 µL min⁻¹

3.6.2 Condições utilizadas no sistema LC-MS/MS

A seguir estão descritas as condições do sistema LC-MS/MS utilizadas para otimização do método e análise dos agrotóxicos em amostras de abelha e pólen apícola.

- ◇ Temperatura da coluna: 30 °C
- ◇ Temperatura da fonte: 50 °C
- ◇ Temperatura de dessolvatação: 250 °C
- ◇ Pressão gás de nebulização: 20 psi
- ◇ Pressão gás de dessolvatação (N₂): 40 psi
- ◇ Volume de injeção: 10 µL
- ◇ Pressão gás de colisão (argônio): 1,8 mTorr

A espectrometria de massas em série foi operada no modo de monitoramento SRM e ionização por eletronebulização no modo positivo e negativo.

Foram realizadas infusões, ou seja, injeções diretas no espectrômetro de massas, com solução analítica padrão 1,0 mg L⁻¹ de cada composto

individualmente. A partir das infusões foram definidos os íons característicos de cada composto, bem como, a voltagem do capilar, energias de colisão. Após a escolha destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para identificação e quantificação.

3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA E PÓLEN APÍCOLA

Os métodos de preparo de amostra propostos neste trabalho foram desenvolvidos com base em trabalhos da literatura para determinação multirresíduo de agrotóxicos em alimentos: QuEChERS original (ANASTASSIADES *et al.*, 2003), QuEChERS acetato (LEHOTAY *et al.*, 2005), QuEChERS citrato (ANASTASSIADES *et al.*, 2007) e QuEChERS acetato de amônio (CURBELO *et al.*; 2014). Para garantir a eficiência da extração algumas modificações destes métodos foram realizadas, devido às características das amostras em estudo. Visando uma melhor homogeneidade uma quantidade menor de amostra foi utilizada e adicionou-se água. Esta etapa é comumente utilizada para matrizes que apresentam baixo teor de água (MASTOVSKA *et al.*, 2010). Além disso, para assegurar a limpeza do extrato os sorventes utilizados na etapa de d-SPE foram baseados no trabalho desenvolvido por VÁZQUEZ e colaboradores (2015).

Desta forma, a Tabela 8 apresenta os testes preliminares que tiveram por objetivo encontrar as melhores condições de extração dos compostos em estudo. Os ensaios foram realizados em triplicata de fortificações, na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Destes, o teste com melhores resultados foi avaliado quanto à utilização da solução aquosa de tricloroacético em diferentes concentrações para a precipitação de proteínas (TORAÑO, 1999), conforme Figura 4. Os ensaios foram novamente realizados em triplicata de fortificações, na concentração de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

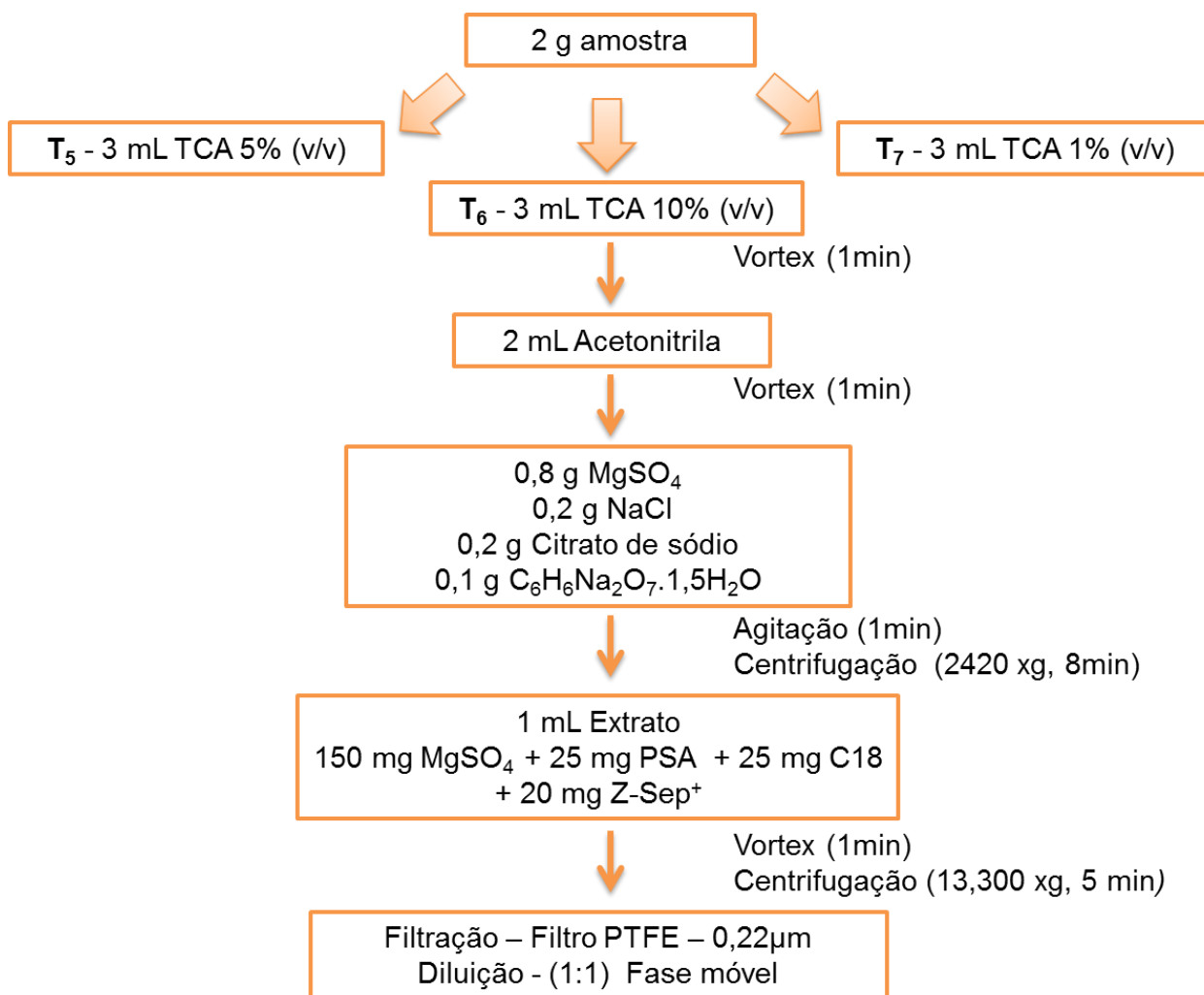
Figura 4 – Testes utilizando solução aquosa de tricloroacético (TCA).

Tabela 8 – Diferentes testes realizados para avaliação das melhores condições de extração dos compostos em estudo.

Etapa	QuEChERS original^a (T₁)	QuEChERS acetato^b (T₂)	QuEChERS citrato^c (T₃)	QuEChERS amônio^d (T₄)
Quantidade de amostra	2 g	2 g	2 g	2 g
Hidratação	3 mL água ultrapura	3 mL água ultrapura	3 mL água ultrapura	3 mL água ultrapura
Homogeneização	agitação 1 min (vortex)	agitação 1 min (vortex)	agitação 1 min (vortex)	agitação 1 min (vortex)
Extração	2 mL acetonitrila	2 mL acetonitrila 1% ácido acético (v/v)	2 mL acetonitrila	2 mL acetonitrila
Homogeneização	agitação 1 min (vortex)	agitação 1 min (vortex)	agitação 1 min (vortex)	agitação 1 min (vortex)
Partição	0,8 g MgSO ₄ + 0,2 g NaCl	0,8 g MgSO ₄ + 0,2 g CH ₃ COONa	0,8 g MgSO ₄ + 0,2 g NaCl + 0,2 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .H ₂ O + 0,1 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ .1,5H ₂ O	0,8 g MgSO ₄ + 1 g acetato de amônio
Separação I	agitação 1 min (vortex) + centrifugação 3500 rpm/8min	agitação 1 min (vortex) + centrifugação 3500 rpm/8min	agitação 1 min (vortex) + centrifugação 3500 rpm/8min	agitação 1 min (vortex) + centrifugação 3500 rpm/8min
Limpeza	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA + 25 mg C18 + 20 mg Z-Sep+	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA + 25 mg C18 + 20 mg Z-Sep+	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA + 25 mg C18 + 20 mg Z-Sep+	1 mL extrato + 150 mg MgSO ₄ + 25 mg PSA + 25 mg C18 + 20 mg Z-Sep+
Separação II	agitação 30 s (vortex) + centrifugação 10000 rpm/5min	agitação 30 s (vortex) + centrifugação 10000 rpm/5min	agitação 30 s (vortex) + centrifugação 10000 rpm/5min	agitação 30 s (vortex) + centrifugação 10000 rpm/5min
Filtração	filtração PTFE 0,22 µm	filtração PTFE 0,22 µm	filtração PTFE 0,22 µm	filtração PTFE 0,22 µm
Diluição	1:1 fase móvel	1:1 fase móvel	1:1 fase móvel	1:1 fase móvel
Análise	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS

^aANASTASSIADES *et al.*, 2003; ^bLEHOTAY *et al.*, 2005; ^cANASTASSIADES *et al.*, 2007; ^dCURBELO *et al.*; 2014.

Em um segundo momento, a etapa de limpeza do extrato foi avaliada. Após a extração utilizando o método QuEChERS modificado, os extratos foram submetidos a etapa de limpeza, avaliando-se diferentes sorventes, conforme Tabela 9. Esta etapa foi avaliada através dos testes gravimétricos, a fim de verificar a quantidade de resíduo sólido final.

Os testes E₁, E₂, E₅, E₈, E₁₀, E₁₁ e E₁₂ foram avaliados em termo de recuperação dos compostos em estudo. Os ensaios foram realizados em triplicata de fortificações, na concentração de 100 µg kg⁻¹.

Todos os testes foram realizados na matriz pólen apícola. Para a matriz abelha apenas os T₃, T₇ e o método otimizado foram avaliados.

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

Ensaio	MgSO ₄ (mg)	C18 (mg)	PSA (mg)	Z-Sep+ (mg)	Florisil (mg)	EMR- Lipid (mg)	Alumina (mg)	Quitosana (mg)	GCB (mg)
1	150	25	25	20	-	-	-	-	-
2	150	25	25	-	-	-	-	-	-
3	150	-	-	50	-	-	-	-	-
4	150	-	-	-	-	-	-	50	-
5	150	-	-	-	-	-	50	-	-
6	150	-	-	-	50	-	-	-	-
7	150	-	-	-	-	50	-	-	-
8	150	-	50	-	-	-	-	-	-
9	150	50	-	-	-	-	-	-	-
10	150	50	50	-	-	-	-	-	5
11	150	25	50	-	-	-	-	-	5
12	150	25	100	-	-	-	-	-	5

3.7.1 Teste gravimétrico

O procedimento consistiu na secagem de 2 mL de cada extrato limpo utilizando concentrador TurboVap LV[®], sob fluxo de nitrogênio, utilizando temperatura de 50 °C. Os tubos de vidro contendo os resíduos foram então pesados para avaliação da remoção de coextrativos, tendo como base a diferença das massas dos tubos antes e após a secagem dos extratos (SAPOZHNIKOVA & LEHOTAY, 2013).

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHA E PÓLEN APÍCOLA

Neste trabalho os parâmetros utilizados para a validação do método analítico foram: seletividade, curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz.

3.8.1 Seletividade

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

3.8.2 Curva analítica e linearidade

A linearidade das curvas analíticas foi realizada através da injeção das soluções analíticas preparadas de acordo com o item 3.5, nas concentrações de 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 75 e 100 µg L⁻¹ correspondente a 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 µg kg⁻¹. Estas foram preparadas em solvente (acetonitrila), e também foram preparadas no extrato da matriz (abelha e pólen apícola).

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

3.8.3 Efeito matriz

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

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

Onde:

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

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

3.8.4 Exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método proposto foram avaliadas através dos valores de recuperação e RSD, respectivamente. Os níveis de fortificação de 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram utilizados para avaliar a matriz pólen apícola com $n=7$. Para a matriz abelha os níveis de fortificação de 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram analisados com $n=6$.

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

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

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

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

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

Onde:

s= estimativa de desvio padrão absoluto;

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

x_i = valores individuais;

X= média das medidas em replicatas;

N= número de medidas.

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

3.8.5 LOD e LOQ do método

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

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

O LOQ_i foi definido como sendo o menor ponto da curva analítica preparada na matriz “branco”, com razão sinal ruído (S/R) maior que 10. Já o LOD_i foi calculado a partir do LOQ_i estabelecido dividido por 3,33.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos agrotóxicos em seis amostras de pólen apícola adquiridas em lojas

de produtos naturais da região de Santa Maria-RS no período de maio e junho de 2017. As quatro amostras de abelha analisadas foram coletadas por produtores de mel das regiões (Central, Noroeste e Sudoeste) e entregues no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES DO SISTEMA LC-MS/MS EMPREGADO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS E PÓLEN APÍCOLA

A Tabela 10 apresenta as condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para determinação dos agrotóxicos avaliados neste estudo.

Tabela 10 – Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS.

Parâmetros	LC-MS/MS
Coluna analítica	Pursuit XRs Ultra C18 100 x 2.0 mm (d.i.) e 2.8 µm de tamanho de partícula
Fase Móvel	(A) Solução aquosa de formiato de amônio 5 mmol L ⁻¹ (B) Metanol
Gradiente	10% B de 0 a 1 min; alterando até 90% B em 8 min; 95% B em 9,3 min; 98% B em 13,5 min; retornando até 10% B em 20 min.
Vazão	0,15 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Detector	Espectrômetro de massas, do tipo triplo quadrupolo, operando no modo de aquisição SRM

4.2 CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR LC-MS/MS

A Tabela 11 apresenta os agrotóxicos que foram analisados por LC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI positivo e negativo e modo de aquisição SRM. A tabela também mostra os tempos de retenção (t_R), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas.

Neste estudo foram selecionadas duas transições características para cada composto, sendo a transição mais intensa utilizada para quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para identificação, também dita de confirmação dos mesmos. Para os compostos metidationa, pirimicarbe e pirimetanil foi utilizada a mesma transição para quantificação e identificação por não apresentarem uma segunda transição com intensidade adequada.

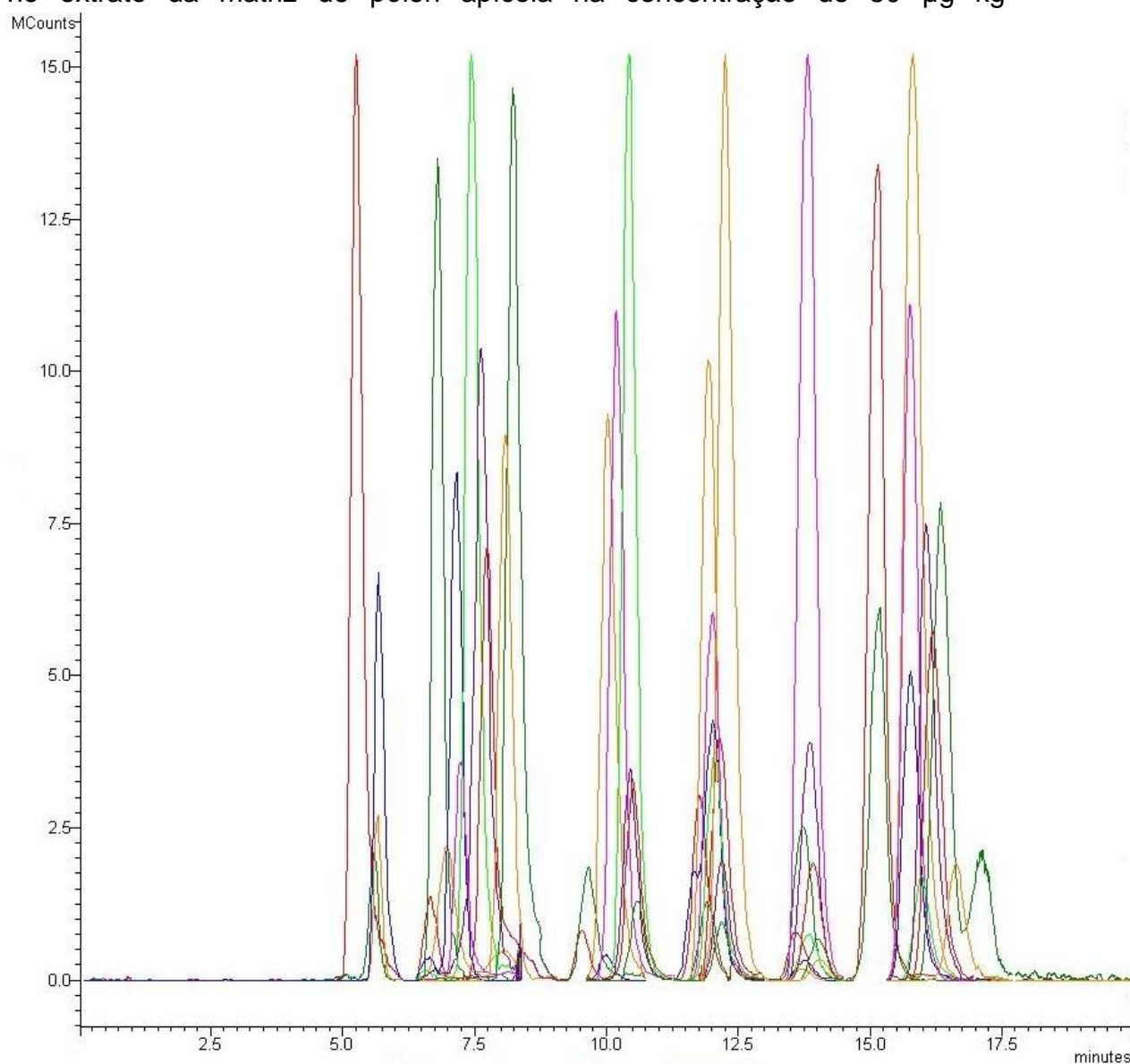
Tabela 11 – Agrotóxicos com seus respectivos tempos de retenção (t_R), modo de ionização (ESI), íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas por LC-MS/MS.

Compostos	t_R (min)	ESI	VC (V)	SRM transição m/z (CE, eV)	
				Quantificação	Identificação
Acefato	4,7	+	30	183,9>143,1 (8,5)	183,9>124,9 (18)
Acetamiprido	6,4	+	55	223>126,1 (20)	223>90,1 (24)
Aldicarbe	7,4	+	32	208>116 (5)	208>89 (15)
Atrazina d-5	8,7	+	55	221,1>179 (15)	221,1>79 (25)
Azoxistrobina	8,9	+	25	404>372 (14,5)	404>328,9 (30)
Boscalida	9,4	+	65	343>306,9 (17,5)	343>270,9 (30,5)
Bupirimate	10,4	+	45	317>166 (21,5)	317>271,9 (17,5)
Buprofezina	12,1	+	20	308>201 (9,5)	308>115,9 (14)
Carbaril	8,1	+	44.4	202>126,9 (26,5)	202>145 (8)
Carbendazim	7,1	+	45	192>160 (15)	192>131,9 (27)
Carbofurano	7,8	+	20	222>165 (7,5)	222>122,9 (16,5)
Clorfenvinfos	10,8	+	40	358,9>154,9 (9,5)	358,9>204,8 (10,5)
Clotianidina	6,2	+	50	250,1>169,2 (13)	250,1>131,9 (25)
Ciazofamida	10,1	+	50	325,1>108,1 (25)	325,1>261,3 (9,5)
Cimoxanil	6,9	+	50	199,1>128,1 (7,5)	199,1>111,2 (24,5)
Ciprodinil	11,0	+	105	226,1>108,4 (27)	226,1>93,1 (26)
Diazinona	10,9	+	60	305,1>169,1 (8,5)	305,1>276,6 (13)
Difenoconazol	11,3	+	54.6	406>250,9 (24)	406>336,9 (15,5)
Diflubenzurom	10,4	+	50	311,2>140,8 (28)	311,2>157,9 (14)
Dimetomorfe	9,5	+	85	388,1>301 (18)	388,1>165,2 (37,5)
Dimoxistrobina	10,5	+	45	327,1>205,2 (7)	327,1>115,9 (22)
Emamectina	11,3	+	80	886,6>157,9 (35)	886,6>302,3 (30)
Etiona	12,3	+	25	384,9>198,9 (7)	384,9>170,9 (13)
Etirimol	8,9	+	90	201,1>140,1 (19)	201,1>98 (22,5)
Fenamidona	9,3	+	57	312,1>236,2 (13)	312,1>91,8 (20,5)
Fenarimol	10,1	+	48.8	331>267,9 (22,5)	331>258,9 (24,5)
Fenazaquim	14,2	+	65	307,1>57,2 (23,5)	307,1>161,1 (16)
Fenbuconazol	10,2	+	50	337,1>70 (31,5)	337,1>125 (25)
Fenhexamide	10,0	+	95	302>97,2 (20,5)	302>55 (34,5)
Fenoxicarbe	10,4	+	20	302,1>87,9 (15)	302,1>115,9 (8)
Fempiroximato	13,1	+	25	422,2>366,1 (16,5)	422,2>214,9 (27)
Fentiona	10,9	+	43.6	279 >246,9 (11,5)	279>169 (14,5)
Fipronil	10,2	-	50	435>329,7 (15,5)	435>249,6 (26,5)
Fonicamida	5,6	-	55	227,7>80,8 (10)	227,7>145,8 (20,5)
Flusilazol	10,3	+	85	316,1>247,3 (16,5)	316,1>165,2 (27,5)
Flutolanil	9,5	+	40	324,2>261,9 (16,5)	324,2>241,9 (23)
Flutriafol	8,5	+	60	302,1>95,1 (45)	302,1>70,2 (28)
Imazalil	10,6	+	70	297>158,9 (17,5)	297>200,9 (15,5)
Imidacloprido	6,1	+	40	256,1>209 (14)	256,1>175 (17)

Indoxicarbe	11,1	+	45	528,1>218 (28)	528,1>203 (45)
Iprovalicarbe	9,9	+	20	321>203 (8)	321>118,9 (14)
Cresoxim-metil	10,6	+	25	314,4>222,3 (10)	314,4>267,2 (10)
Lufenurom	11,9	-	40	509>325,6 (18,5)	509>338,8 (10)
Malationa	9,6	+	45	331>284,9 (8)	331>126,9 (9)
Mercabam	10,1	+	20	330>226,9 (7)	330>198,9 (13)
Metalaxil	8,7	+	35	280>248 (9)	280>220 (12)
Metidationa	9,0	+	35	303>114,9 (6,5)	
Metiocarbe	9,5	+	45	226>121 (25)	226>169,1 (14)
Metomil	5,6	+	34	163>88 (15)	163>106 (15)
Metoxifenoziide	9,6	+	55	369>149,2 (19,5)	369>313,2 (9,5)
Miclobutanil	9,7	+	70	289,1>69,9 (11,5)	289,1>124,9 (25)
Oxadixil	7,2	+	50	279>131,9 (27,5)	279>219 (11,5)
Fosmete	9,1	+	60	317,9>133 (35)	317,9>160,1 (16,5)
Picoxistrobina	10,2	+	35	368>145 (18)	368>205 (6,0)
Pirimicarbe	8,5	+	34	239>182 (12,5)	
Profenofos	11,9	+	50	375>304,7 (19,5)	375>346,7 (12)
Propamocarbe	5,2	+	50	189,1>102 (21,5)	189,1>144,1 (10)
Propiconazol	10,9	+	60	342>158,9 (25,5)	342>69 (14)
Piraclostrobina	10,8	+	34	388>194 (9)	388>163 (22)
Pirazofos	11,2	+	70	374>222 (19)	374>194 (30)
Piridabem	13,7	+	36	365>309 (11,5)	365>147 (21)
Pirimetanil	9,7	+	80	200>106,9 (21)	
Piriproxifem	12,5	+	65	322,1>96 (21)	322,1>227,1 (12,5)
Quinalfos	10,7	+	34	299>242,9 (16)	299>270,9 (11,5)
Quinoxifem	12,9	+	75	308>196,9 (29)	308>271,9 (24,5)
Espinosad A	12,1	+	90	732,5>98 (45)	732,5>142,2 (26)
Espirodiclofem	13,1	+	60	411>313 (12,5)	411>71 (26,5)
Espiromesifem	12,6	+	88	371,1>273,1 (17)	371,1>255,1 (19)
Tau-Fluvalinato	13,6	+	38	503>181 (24)	503>208 (12)
Tebufenozide	10,3	+	35	353,2>297,4 (9,5)	353,2>133 (27,5)
Teflubenzurom	12,4	-	40	380,1>339,8 (10,5)	380,1>360,1 (6)
Tetraconazol	9,9	+	61	372>158,9 (24)	372>70 (13,5)
Tiacloprido	6,8	+	65	252,9>125,8 (18)	252,9>185,9 (12,5)
Tiametoxam	5,7	+	25	292>210,9 (11)	292>181 (19,5)
Tiodicarbe	8,0	+	25	355>87,9 (9)	355>107,9 (11,5)
Tiofanato-metil	7,7	+	23	343>150,9 (16,5)	343>310,9 (10)
Tolilfluanida	10,6	+	32	364>136,9 (25)	364>237,8 (14)
Triadimefom	9,7	+	46	294>197 (14,5)	294>224,9 (12)
Triazofos	9,8	+	64	314>118,9 (32)	314>162 (16)
Triclorfon	6,5	+	65	258,9>220,8 (11)	258,9>108,8 (21,5)
Trifloxistrobina	11,2	+	52	409>186 (14)	409>206 (11)
Triflumuro	10,9	+	62	359>156,1 (17,5)	359>139 (26,5)
Trifenilfosfato	10,7	+	65	327>152 (29)	327>214,9 (20,5)

A Figura 5 apresenta um cromatograma obtido por LC-MS/MS a partir dos íons selecionados dos compostos analisados no modo de aquisição SRM para a solução analítica preparada no extrato da matriz pólen apícola, com os analitos na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Figura 5 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS a partir de soluções preparadas no extrato da matriz de pólen apícola na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$

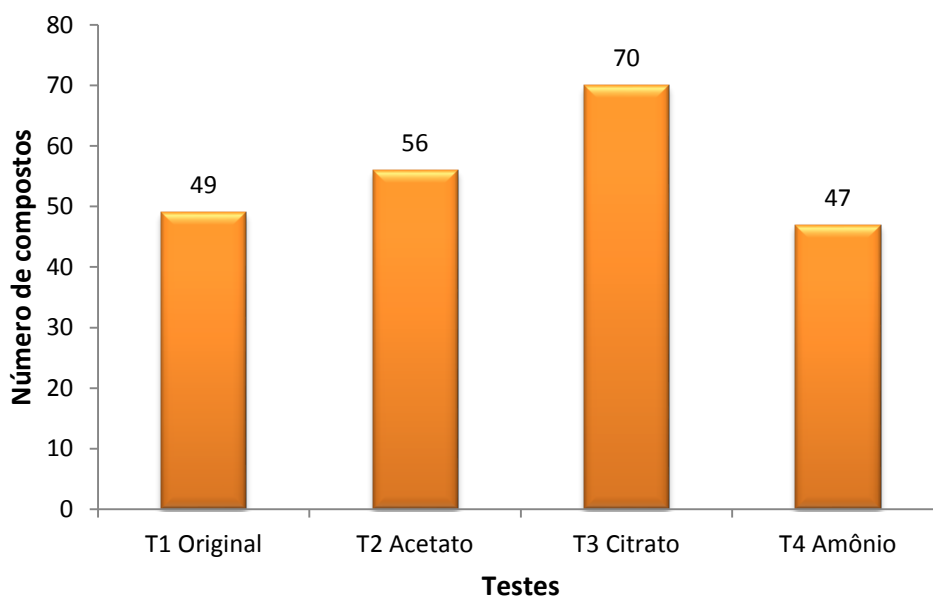


4.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS E PÓLEN APÍCOLA

4.3.1 Pólen apícola

A otimização do procedimento de extração foi realizada no sistema LC-MS/MS. Baseando-se na literatura foram inicialmente realizados quatro testes para otimização da extração de agrotóxicos em pólen apícola, conforme a Tabela 8. Desse modo, a Figura 6 apresenta os resultados dos quatro testes para avaliação da etapa de extração/partição, com o número de compostos com resultados adequados. A avaliação foi realizada através de ensaios de recuperação no nível $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, utilizando curva de calibração preparada na matriz “branco” a partir de cada uma das condições testadas.

Figura 6 – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70 e 120% e RSD $\leq 20\%$, obtidos para diferentes testes de extração.



Conforme estes resultados, o teste T₁ apresentou a recuperação de 60% dos compostos. Enquanto o teste T₂ 69%, o teste T₃ 86% e o teste T₄ 58% dos compostos, com resultados de recuperação e RSD na faixa aceitável.

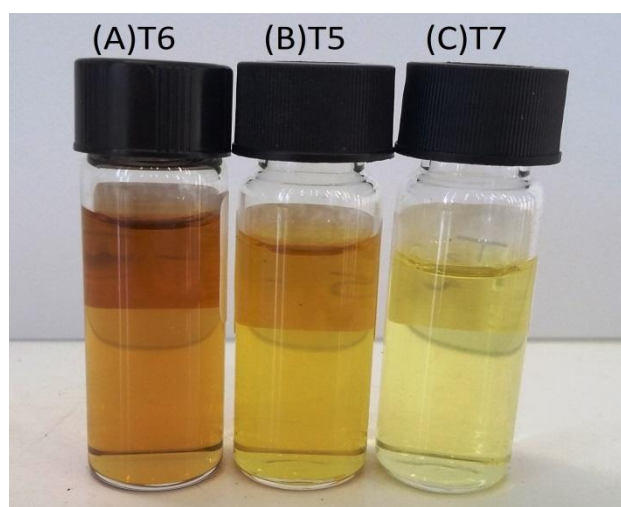
Ao comparar os testes de extração observou-se que o T₃ apresentou o melhor resultado, com o maior número de compostos extraídos. O método QuEChERS citrato modificado, em relação aos demais métodos, tem sido

utilizado para uma ampla faixa de agrotóxicos de diferentes classes em diversas matrizes apícolas (LOPEZ *et al.*, 2016; CODLING *et al.*, 2016).

O uso de acetonitrila como solvente é interessante visto que proporciona a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades, além disso, uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da matriz, tais como ceras, gorduras e pigmentos são extraídos (PRESTES *et al.*, 2009). A adição de água proporciona uma melhor interação entre a amostra e o solvente extrator. E neste caso, o uso da mistura de sais de partição citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado foi responsável pelo efeito tamponante (pH 5,0 a 5,5) (PRESTES *et al.*, 2011). Sendo assim, o T₃ - QuEChERS citrato modificado foi escolhido para os testes seguintes.

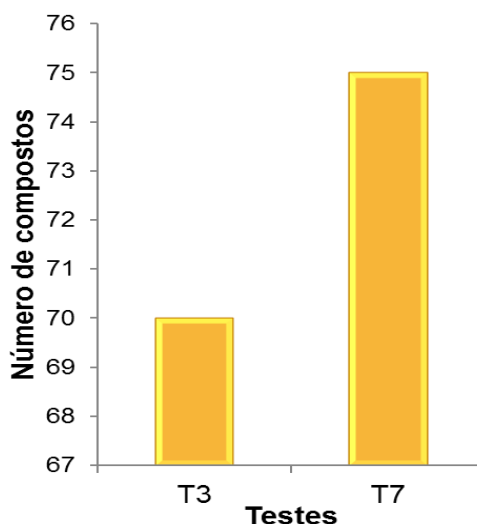
Como a matriz em estudo apresenta alto teor de proteínas, foi proposto a utilização da solução aquosa de ácido tricloroacético em diferentes concentrações, a fim de testar a precipitação das proteínas. Como observa-se na Figura 7 os extratos dos testes T₆ e T₅ apresentaram uma coloração intensa, isso se deve ao uso de concentrações elevadas do ácido tricloroacético o que ocasionou uma diminuição do pH do extrato resultando na extração de mais coextrativos. Os extratos obtidos nos testes T₅ e T₆ não foram considerados limpos o suficiente para a injeção no LC-MS/MS, uma vez que estavam muito pigmentados, e a presença de coextrativos pode afetar a resposta do sistema cromatográfico.

Figura 7 – Extratos finais dos testes T₅, T₆ e T₇ prontos para serem analisados.



Em comparação entre os testes T₃ e T₇ em termos de compostos recuperados, o T₇ apresentou a recuperação de cinco compostos a mais, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Comparação dos resultados dos testes T₃ e T₇ em relação ao número de compostos recuperados para matriz pólen apícola.



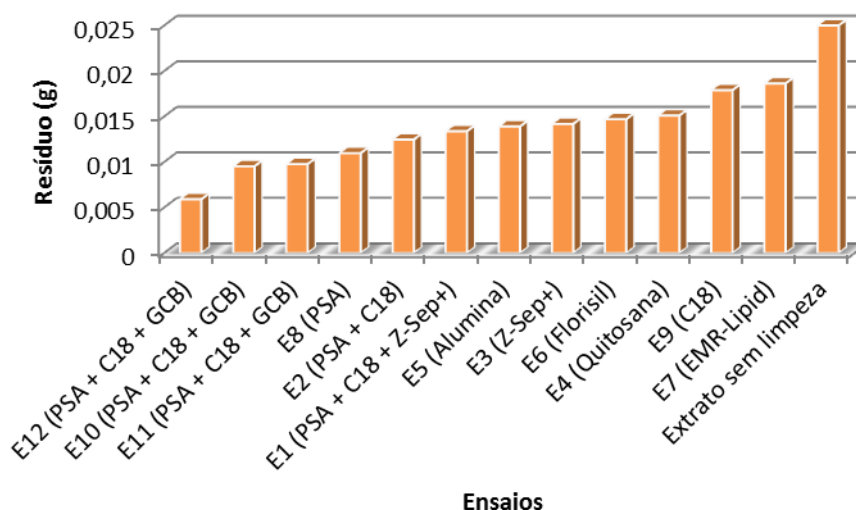
Em decorrência do uso do ácido tricloroacético visando à desnaturação das proteínas, ocorre a destruição da habilidade de ligação da proteína com o analito, resultando na maior extração de compostos (MARTINS, 2015).

Vários solventes, sais e ácidos podem ser utilizados com a finalidade de precipitar as proteínas presentes nas amostras. Os precipitantes exercem efeitos diferentes na proteína de modo a facilitar sua precipitação. Os precipitantes ácidos (ácido tricloroacético) formam sais insolúveis com grupamentos amino das moléculas de proteína (MARTINS, 2015). Em estudo conduzido por POLSON *et al.* (2003) diferentes técnicas para precipitar proteínas foram avaliadas em amostras de plasma. O uso de ácido tricloroacético apresentou como resultado 92% de remoção das proteínas. BOUSOVA *et al.* (2013) utilizaram uma solução de acetonitrila com 2% (v/v) de ácido tricloroacético para a extração de antibióticos em amostras de frango, devido a este precipitar as proteínas e facilitar a liberação dos analitos vinculados.

A etapa de limpeza é de grande importância, pois visa à remoção de interferentes no extrato da matriz obtido. Nessa etapa deve-se optar pelo procedimento que, ao mesmo tempo, remova as interferências do extrato, mas não interfira na recuperação dos compostos em análise. Para avaliação da etapa

de limpeza, diferentes combinações de sorventes foram testadas conforme pode se observar na Tabela 9. A Figura 9 apresenta os resultados dos testes gravimétricos realizados para os diferentes procedimentos de limpeza dos extratos.

Figura 9 – Resíduos restantes após diferentes tipos de limpezas, avaliados por gravimetria.

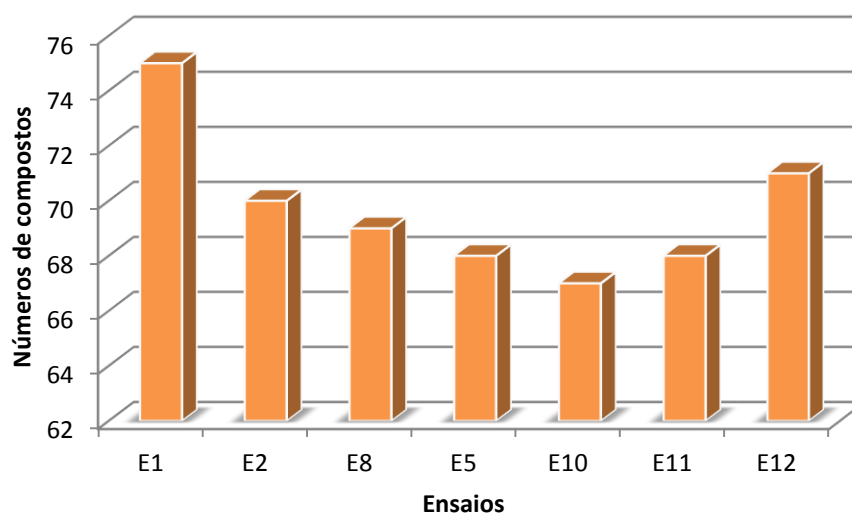


De acordo com a Figura 9, o teste E₁₂ mostrou-se o mais adequado para a limpeza do extrato, devido a menor quantidade de resíduos apresentados. Os testes E₁₀, E₁₁, E₈, E₂, E₁ e E₅ apresentaram extratos límpidos, possibilitando a injeção dos mesmos no sistema LC-MS/MS. Os sorventes utilizados nos ensaios E₃, E₄, E₆, E₉ e E₇ não foram eficientes para a remoção dos coextrativos, uma vez que os extratos finais ficaram turvos. O uso exclusivo de EMR, C18 ou Z-sep+, não foram eficientes para a remoção dos coextrativos, uma vez que a amostra em estudo apresenta diferentes constituintes. A literatura aponta o uso desses sorventes para remoção de lipídeos (BLANCO *et al.*, 2016; MATARRITA *et al.*, 2016). A quitosana é indicada para remoção de interferentes polares presentes na amostra. Porém ARIAS e colaboradores, (2014) relatam que a quitosana é mais eficiente em pH 3, devido à presença de íons H⁺, os grupos amino encontrados na quitosana são protonados e o processo de adsorção entre as interferências e a quitosana ocorre devido à atração eletrostática. O florisil foi utilizado nesta mesma quantidade por ORSO e colaboradores (2016) para remoção de carboidratos dos extratos de amostra de mel, resultando em bons resultados tanto em recuperação dos compostos quanto na limpeza do extrato.

A autora menciona que ativou o florisil por aquecimento antes das análises. PINHO e colaboradores (2010) também analisaram resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, utilizando florisil como sorvente de limpeza. Os autores descrevem que os componentes orgânicos restantes no extrato de mel, principalmente os açúcares, interagiram com a superfície polar do florisil.

Em seguida, procederam-se os testes para avaliar as recuperações dos agrotóxicos em estudo, utilizando as sete melhores etapas de limpeza (*clean-up*). A Figura 10 apresenta os resultados dos testes de recuperação para as sete diferentes limpezas do extrato.

Figura 10 – Número de compostos que apresentaram recuperações entre 70 e 120% e RSD \leq 20%, obtidos para os testes de limpeza.



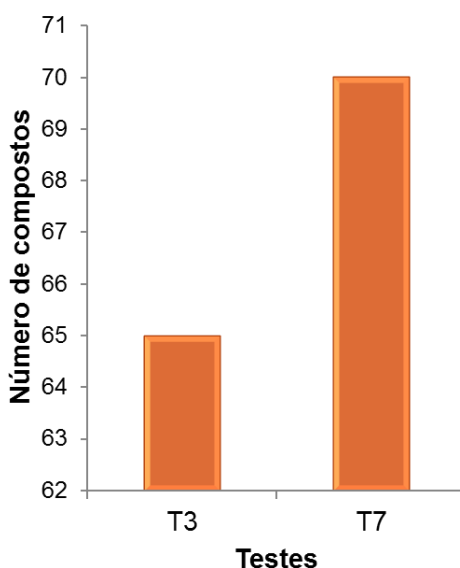
Observa-se que o teste E₁ extraiu 75 compostos e E₁₂ 71 compostos, essa diferença é explicada pelo uso do carvão no teste E₁₂. Mas comparando os testes gravimétricos o teste E₁₂ apresentou menor quantidade de coextrativos. O sorvente PSA é conhecido por exibir atividade de retenção de açúcares, ácidos graxos e outros ácidos orgânicos. Por outro lado, carvão para compostos planos tais como pigmentos naturais e esteróis, enquanto C18 para materiais lipofílicos, tais como gorduras e lipídios (LEHOTAY *et al.*, 2005). WALORCZYK e colaboradores (2009) utilizaram a mistura dos sorventes C18, PSA e GCB na etapa de limpeza do extrato de amostras de abelha. Os autores mencionam que agrotóxicos como ciprodinil, fenazaquim e quinoxifem podem ser adsorvidos pelo GCB e conseqüentemente apresentam baixas recuperações.

Portanto, a validação do método proposto utilizou a mistura dos sorventes PSA, C18, e GCB na etapa de limpeza do extrato, pois forneceu resultados satisfatórios tanto em relação à efetiva extração dos compostos, quanto em relação à quantidade de coextrativos restantes no extrato final.

4.3.2 Abelhas

Devido à dificuldade de obtenção de abelhas para executar todos os testes, optou-se por avaliar apenas os testes T₃ e T₇, a fim de verificar a extração dos compostos em estudo. Conforme Figura 11, observamos que novamente o T₇ mostrou-se mais eficiente, com a recuperação de 70 compostos. O T₃ foi capaz de extrair 65 compostos. A etapa de limpeza não foi otimizada para amostras de abelhas.

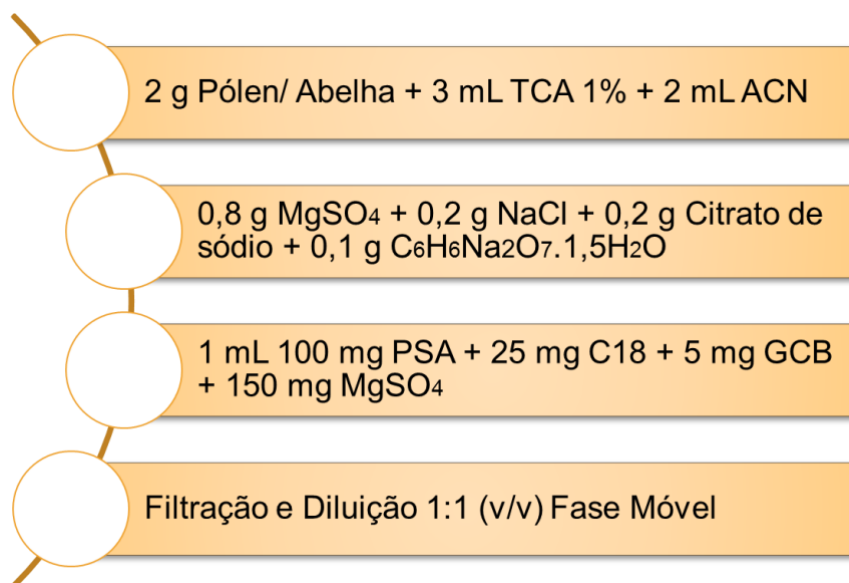
Figura 11 – Comparação dos testes de extração T₃ e T₇ em relação ao número de compostos recuperados para matriz abelha.



4.3.3 Método de extração otimizado

A Figura 12 apresenta o fluxograma do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos nas amostras de abelha e pólen apícola.

Figura 12 – Representação do método QuEChERS modificado proposto para a extração de agrotóxicos em abelha e pólen apícola.



4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS MODIFICADO

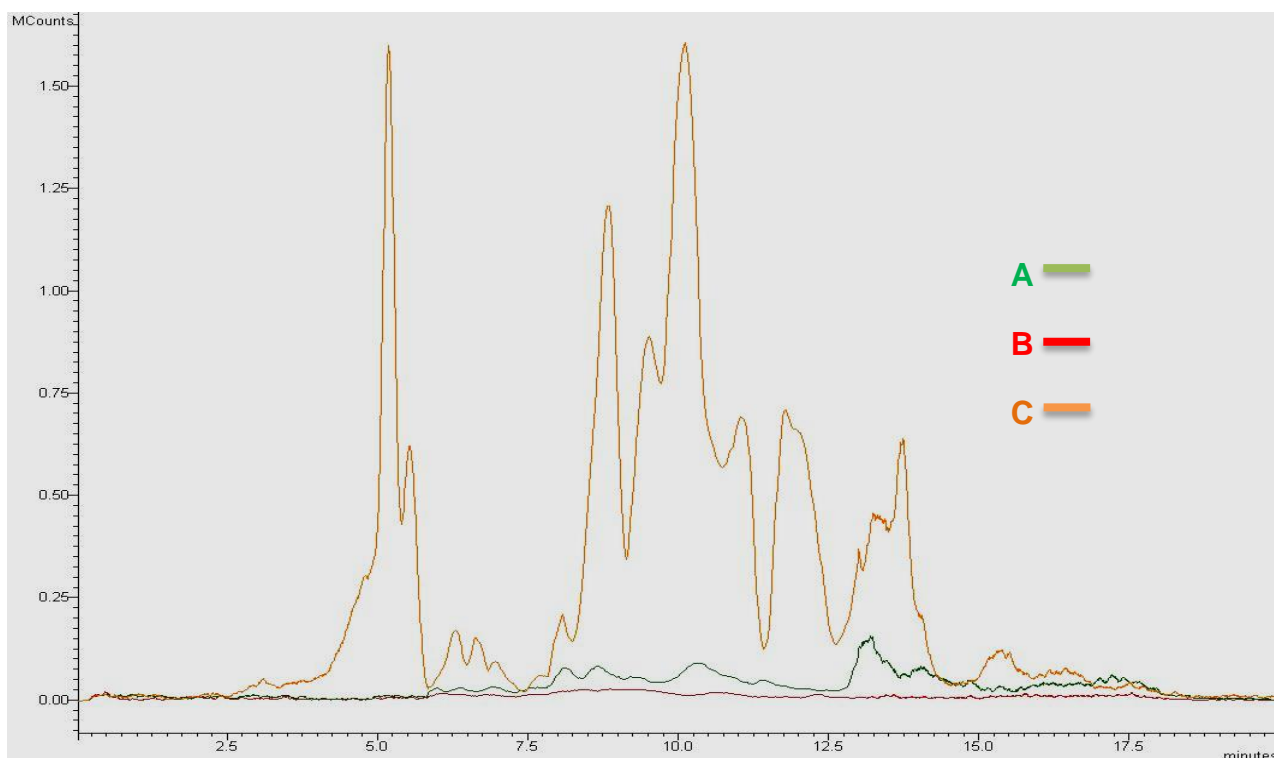
A validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos seguiu os seguintes parâmetros: seletividade, curva analítica e faixa linear, efeito matriz, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade), limite de detecção e limite de quantificação. Posteriormente, o método foi aplicado em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

4.4.1 Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos por injeção do extrato de amostra “branco” e extrato de amostra fortificada no sistema cromatográfico. Esta avaliação tem por objetivo verificar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo. No caso das matrizes em estudo, não foi possível encontrar amostras isentas de agrotóxicos, sendo necessário descontar a área dos analitos presentes na amostra “branco”. A amostra branco de pólen apícola utilizada para os testes e validação do método de extração apresentava resíduos dos compostos carbaril, diflubenzurom, iprovalicarbe, fenarimol e triclorfom. No caso da matriz branco de abelha os compostos triazofos e mercabam foram encontrados.

Na figura 13, observam-se os cromatogramas obtidos por LC-MS/MS, da amostra “branco” de pólen apícola, branco reagente e solução analítica no extrato da matriz na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Figura 13 – Cromatograma do íon total obtido por LC-MS/MS para (A) amostra branco de pólen apícola, (B) branco reagente e (C) solução analítica no extrato da matriz, contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.



4.4.2 Curva analítica e faixa linear

A faixa de trabalho de cada agrotóxico estudado foi determinada através das injeções em triplicata das soluções analíticas preparadas em acetonitrila e nos extratos das matrizes abelha e pólen apícola, nas concentrações 2,5; 5; 10; 25; 50; 75 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

A Tabela 12 apresenta os coeficientes de determinação (r^2), para as curvas analíticas em solvente e na matriz de abelha e pólen apícola, bem como a faixa linear para cada agrotóxico.

Tabela 12 – Curvas analíticas no solvente e na matriz e coeficientes de determinação e valores de faixa linear.

Compostos	Pólen apícola			Abelha		
	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Curvas Solvente	Matriz	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Curvas Solvente	Matriz
		r^2	r^2		r^2	r^2
Acefato	2,5 - 100	0,9964	0,9993	5 - 100	0,9945	0,9990
Acetamiprido	2,5 - 100	0,9986	0,9986	5 - 100	0,9937	0,9972
Aldicarbe	2,5 - 75	0,9979	0,9991	5 - 100	0,9996	0,9999
Azoxistrobina	2,5 - 100	0,9983	0,9997	5 - 100	0,9989	0,9997
Boscalida	2,5 - 100	0,9941	0,9986	5 - 100	0,9934	0,9959
Bupirimate	2,5 - 100	0,9971	0,9997	5 - 100	0,9993	0,9962
Buprofezina	2,5 - 100	0,9953	0,9994	5 - 100	0,9982	0,9973
Carbaril	2,5 - 75	0,9985	0,9972	5 - 100	0,9989	0,9976
Carbendazim	2,5 - 75	0,9991	0,9971	5 - 100	0,9994	0,9961
Carbofurano	2,5 - 75	0,9994	0,9953	5 - 100	0,9995	0,9958
Ciazofamida	2,5 - 100	0,9903	0,9923			
Cimoxanil	2,5 - 75	0,9990	0,9980	5 - 100	0,9999	0,9992
Ciprodinil	2,5 - 100	0,9970	0,9941			
Clorfenvinfos	2,5 - 100	0,9900	0,9989	5 - 100	0,9941	0,9990
Clotianidina	5 - 100	0,9911	0,9967			
Cresoxim-metil	2,5 - 100	0,9929	0,9982			
Diazinona	2,5 - 100	0,9943	0,9967	5 - 100	0,9998	0,9938
Difenoconazol	2,5 - 100	0,9986	0,9995	5 - 100	0,9992	0,9991
Diflubenzurom	2,5 - 100	0,9974	0,9989			
Dimetomorfe	2,5 - 100	0,9995	0,9989	5 - 100	0,9999	0,9983
Dimoxistrobina	2,5 - 100	0,9979	0,9991	5 - 100	0,9981	0,9957
Emamectina	2,5 - 100	0,9947	0,9998			
Espinosad A	2,5 - 75	0,9940	0,9905			
Espirodiclofem	2,5 - 100	0,9939	0,9973	5 - 100	0,9999	0,9988
Espiromesifem	2,5 - 100	0,9994	0,9963	5 - 100	0,9978	0,9958
Etiona	2,5 - 100	0,9977	0,9988	5 - 100	0,9994	0,9998
Etirimol	2,5 - 100	0,9985	0,9993	5 - 100	0,9949	0,9970
Fempiroximato	2,5 - 100	0,9993	0,9983	5 - 100	0,9997	0,9952
Fenamidona	2,5 - 100	0,9973	0,9992	5 - 100	0,9985	0,9986
Fenarimol	2,5 - 100	0,9962	0,9963			
Fenazaquim	2,5 - 100	0,9983	0,9941			
Fenbuconazol	2,5 - 100	0,9920	0,9991			
Fenhexamide	2,5 - 100	0,9948	0,9953			
Fenoxicarbe	2,5 - 100	0,9961	0,9994			
Fentiona	2,5 - 100	0,9937	0,9985	5 - 100	0,9935	0,9996
Fipronil	2,5 - 100	0,9992	0,9997			
Flonicamida	2,5 - 100	0,9993	0,9998			
Flusilazol	2,5 - 100	0,9956	0,9990	5 - 100	0,9977	0,9930
Flutolanil	2,5 - 100	0,9979	0,9997	5 - 100	0,9973	0,9978

Flutriafol	2,5 - 100	0,9959	0,9991	5 - 100	0,9989	0,9996
Fosmete	2,5 - 100	0,9963	0,9960	5 - 100	0,9963	0,9957
Imazalil	2,5 - 100	0,9981	0,9990			
Imidacloprido	2,5 - 100	0,9957	0,9989	5 - 100	0,9958	0,9913
Indoxicarbe	2,5 - 100	0,9968	0,9996	5 - 100	0,9976	0,9981
Iprovalicarbe	2,5 - 100	0,9993	0,9992	5 - 100	0,9934	0,9994
Lufenurom	2,5 - 100	0,9968	0,9996			
Malationa	2,5 - 100	0,9993	0,9996	5 - 100	0,9972	0,9981
Mercabam	2,5 - 100	0,9973	0,9994	5 - 100	0,9964	0,9987
Metalaxil	2,5 - 100	0,9982	0,9995	5 - 100	0,9950	0,9990
Metidationa	2,5 - 100	0,9953	0,9996	5 - 100	0,9968	0,9905
Metiocarbe	2,5 - 100	0,9973	0,9993	5 - 100	0,9941	0,9938
Metomil	2,5 - 100	0,9981	0,9996			
Metoxifenoziide	2,5 - 100	0,9992	0,9988			
Miclobutanil	2,5 - 100	0,9981	0,9983	5 - 100	0,9976	0,9990
Oxadixil	2,5 - 75	0,9988	0,9981	5 - 100	0,9997	0,9901
Picoxistrobina	2,5 - 100	0,9984	0,9993	5 - 100	0,9997	0,9993
Piraclostrobina	2,5 - 100	0,9994	0,9991	5 - 100	0,9998	0,9971
Pirazofos	2,5 - 100	0,9983	0,9991	5 - 100	0,9974	0,9991
Piridabem	2,5 - 100	0,9931	0,9954	5 - 100	0,9925	0,9985
Pirimetanil	2,5 - 100	0,9965	0,9965	5 - 100	0,9923	0,9916
Pirimicarbe	2,5 - 100	0,9971	0,9995	5 - 100	0,9949	0,9958
Piriproxifem	2,5 - 100	0,9995	0,9988			
Profenofos	2,5 - 100	0,9966	0,9998	5 - 100	0,9995	0,9975
Propamocarbe	2,5 - 100	0,9990	0,9996			
Propiconazol	2,5 - 100	0,9925	0,9984	5 - 100	0,9952	0,9902
Quinalfos	2,5 - 100	0,9975	0,9997	5 - 100	0,9982	0,9976
Quinoxifem	2,5 - 100	0,9996	0,9986			
Tau- Fluvalinato	2,5 - 100	0,9970	0,9931			
Tebufenozide	2,5 - 100	0,9971	0,9991	5 - 100	0,9999	0,9996
Teflubenzurom	2,5 - 100	0,9975	0,9991			
Tetraconazol	2,5 - 100	0,9947	0,9991	5 - 100	0,9988	0,9972
Tiacloprido	2,5 - 75	0,9974	0,9969	5 - 100	0,9984	0,9999
Tiametoxam	2,5 - 100	0,9993	0,9997	5 - 100	0,9999	0,9981
Tiodicarbe	2,5 - 75	0,9961	0,9955			
Tiofanato-metil	2,5 - 75	0,9983	0,9982	5 - 100	0,9998	0,9959
Tolilfluanaida	2,5 - 100	0,9981	0,9992			
Triadimefom	2,5 - 100	0,9930	0,9983	5 - 100	0,9987	0,9948
Triazofos	2,5 - 100	0,9975	0,9996	5 - 100	0,9954	0,9958
Triclorfon	2,5 - 75	0,9989	0,9982			
Trifloxistrobina	2,5 - 100	0,9973	0,9985	5 - 100	0,9993	0,9993
Triflumumurom	2,5 - 100	0,9982	0,9935	5 - 100	0,9990	0,9957

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os modelos são lineares e adequados, visto que todos os agrotóxicos apresentam coeficiente de determinação (r^2) maior ou igual que 0,99. Desta forma, este parâmetro está de acordo com as orientações da ANVISA e do INMETRO.

4.4.3 Efeito matriz

O efeito da matriz pode gerar supressão ou aumento do sinal analítico. Isto é causado pela interação entre os analitos e coextrativos da matriz na amostra preparada, que pode suprimir ou aumentar a ionização do analito na fonte de ionização, resultando em um menor ou maior sinal medido o que afeta a exatidão do resultado quantitativo (ZHANG *et al.*, 2011).

4.4.3.1 Pólen Apícola

Na Tabela 13 estão listados os resultados obtidos para o efeito matriz, avaliado para os agrotóxicos determinados por LC-MS/MS.

Tabela 13 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz pólen apícola determinados por LC-MS/MS.

Compostos	ME(%)	Compostos	ME(%)	Compostos	ME(%)
Acefato	-48,9	Fempiroximato	-63,3	Oxadixil	-51,7
Acetamiprido	-75,2	Fenamidona	-51,7	Picoxistrobina	-31,1
Aldicarbe	-49,7	Fenarimol	-37,3	Piraclostrobina	-29,6
Azoxistrobina	-34,7	Fenazaquim	-49,0	Pirazofos	-28,2
Boscalida	-66,6	Fenbuconazol	-32,1	Piridabem	-58,1
Bupirimate	-35,1	Fenhexamide	-38,6	Pirimetanil	-46,6
Buprofezina	-11,0	Fenoxicarbe	-25,6	Pirimicarbe	-33,2
Carbaril	-60,6	Fentiona	-41,2	Piriproxifem	-26,3
Carbendazim	-62,2	Fipronil	12,4	Profenofos	-14,9
Carbofurano	-47,1	Flonicamida	-9,8	Propamocarbe	-25,7
Ciazofamida	-30,6	Flusilazol	-35,5	Propiconazol	-32,5
Cimoxanil	-77,1	Flutolanil	-43,6	Quinalfos	-37,2
Ciprodinil	-54,9	Flutriafol	-48,1	Quinoxifem	-51,7
Clorfenvinfos	-25,7	Fosmete	-88,0	Tau-Fluvalinato	-83,9
Clotianidina	-80,5	Imazalil	-30,2	Tebufenozide	-27,4
Cresoxim-metil	-32,4	Imidacloprido	-85,0	Teflubenzurom	35,9
Diazinona	-50,8	Indoxicarbe	-21,3	Tetraconazol	-35,9
Difenoconazol	-25,8	Iprovalicarbe	-17,3	Tiacloprido	-81,0
Diflubenzurom	-35,2	Lufenurom	92,3	Tiametoxam	-70,0
Dimetomorfe	-59,2	Malationa	-33,5	Tiodicarbe	-39,3
Dimoxistrobina	-27,2	Mercabam	-33,3	Tiofanato-metil	-56,1

Emamectina	17,7	Metalaxil	-23,8	Tolilfluanida	-46,5
Espinosad A	-40,8	Metidationa	-42,1	Triadimefom	-39,0
Espirodiclofem	-61,5	Metiocarbe	-45,2	Triazofos	-33,1
Espiromesifem	-17,6	Metomil	-49,7	Triclorfon	-76,7
Etiona	-30,4	Metoxifenozone	-42,7	Trifloxistrobina	-40,0
Etirimol	-39,9	Miclobutanil	-38,4	Triflumurom	-45,4

Os resultados mostraram que todos os analitos estudados neste trabalho sofrem efeito matriz na determinação cromatográfica. A maioria dos compostos apresentaram supressão da resposta, com valores de efeito matriz entre -8,5 e -90%. Os agrotóxicos emamectina, fipronil, lufenurom e teflubenzurom apresentaram efeito matriz positivo caracterizado pelo aumento da resposta do sinal analítico. A fim de minimizar o efeito matriz as soluções analíticas foram preparadas na matriz “branco” de pólen apícola.

4.4.3.2 Abelhas

Na Tabela 14 estão listados os resultados obtidos para o efeito matriz, avaliado para os agrotóxicos determinados por LC-MS/MS.

Tabela 14 – Efeito matriz dos agrotóxicos estudados na matriz abelha determinados por LC-MS/MS.

Compostos	ME(%)	Compostos	ME(%)	Compostos	ME(%)
Acefato	-58,7	Etirimol	-70,4	Piraclostrobina	-61,7
Acetamiprido	-78,9	Femproximato	-71,2	Pirazofos	-62,9
Aldicarbe	-56,3	Fenamidona	-78,3	Piridabem	-78,3
Azoxistrobina	-63,2	Fentiona	-65,8	Pirimetanil	-76,8
Boscalida	-85,5	Flusilazol	-68,4	Pirimicarbe	-64,8
Bupirimate	-62,7	Flutolanil	-73,4	Profenofos	-64,2
Buprofezina	-63,9	Flutriafol	-72,2	Propiconazol	-61,9
Carbaril	-76,3	Fosmete	-83,6	Quinalfos	-70,6
Carbendazim	-75,3	Imidacloprido	-90,0	Tebufenozide	-65,9
Carbofurano	-71,5	Indoxicarbe	-55,1	Tetraconazol	-80,6
Cimoxanil	-80,7	Iprovalicarbe	-62,5	Tiacloprido	-78,3
Clorfenvinfos	-54,8	Malationa	-65,3	Tiametoxam	-91,3
Diazinona	-71,9	Mercabam	-66,4	Tiofanato-metil	-86,0
Difenoconazol	-60,7	Metalaxil	-58,0	Triadimefom	-69,3
Dimetomorfe	-81,7	Metidationa	-72,4	Triazofos	-72,3
Dimoxistrobina	-61,3	Metiocarbe	-77,6	Trifloxistrobina	-62,1
Espirodiclofem	-74,7	Miclobutanil	-69,1	Triflumurom	-75,0
Espiromesifem	-58,5	Oxadixil	-58,3		
Etiona	-73,8	Picoxistrobina	-62,1		

Para todos os compostos analisados foi observado uma supressão do sinal analítico. O efeito matriz ficou entre -56,3 e -91,3%. Dessa forma, as soluções analíticas foram preparadas no extrato “branco” da matriz abelha.

De acordo com PINHO e colaboradores (2010), o efeito da matriz sobre os analitos apresenta relação proporcional crescente ao aumento da complexidade da matriz em estudo. Estes resultados encontrados estão de acordo com a literatura, devido à complexidade das amostras em estudo. PARK e colaboradores (2017) relatam a dificuldade de analisar nitrofuranos em amostras de pólen apícola devido ao efeito matriz, consequência da composição química (proteínas, aminoácidos, vitaminas, carboidratos, entre outros constituintes) da matriz em estudo.

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

Os parâmetros de exatidão e recuperação dos analitos foram avaliados através da injeção de quatro níveis de concentração em sete repetições. A Tabela 15 apresenta os resultados das recuperações (n=7) percentuais e o RSD% para os 81 agrotóxicos que foram fortificados em pólen apícola, nos níveis de 5, 10, 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, extraídos pelo método QuEChERS modificado.

Para a matriz abelha os resultados também estão apresentados na Tabela 15, mas devido à baixa detectabilidade do equipamento apenas 55 agrotóxicos foram avaliados nos níveis de 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz. Neste trabalho seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, no qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120%, com $\text{RSD} \leq 20\%$ (SANTE, 2015)

Tabela 15 – Percentuais de recuperação e RSD dos agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado, para matriz pólen apícola e abelha.

Compostos	Pólen Apícola				Abelhas			
	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			
	5	10	20	50	10	20	50	100
	Recuperação (RSD%)				Recuperação (RSD%)			
Acefato	45,4 (8,1)	54,6 (8,4)	69,3 (5,8)	62,1 (4,2)	49,0 (9,0)	34,5 (14,3)	69,2 (16,7)	51,6 (14,8)
Acetamiprido	118,3 (15,5)	99,3 (11,8)	98,9 (15,2)	93,7 (10,1)	77,0 (7,2)	76,5 (11,9)	85,7 (12,7)	74,1 (18,0)
Aldicarbe	98,1 (12,4)	103,9 (9,0)	100,6 (6,8)	87,1 (2,2)		82,5 (11,5)	72,2 (8,0)	75,3 (10,7)
Azoxistrobina	116,7 (11,4)	112,5 (5,8)	108,1 (6,2)	101,4 (2,1)	87,8 (5,3)	71,0 (7,7)	107,6 (6,5)	75,9 (18,5)
Boscalida		95,7 (13,5)	90,2 (8,8)	85,0 (10,6)		88,8 (9,3)	83,2 (14,6)	71,2 (17,5)
Bupirimate	111,1 (17,4)	99,5 (10,9)	101,1 (8,7)	101,1 (6,4)	83,6 (14,9)	74,6 (17,0)	98,4 (9,0)	70,6 (6,2)
Buprofezina		119,8 (6,7)	109,6 (7,1)	90,8 (4,1)		73,8 (10,5)	95,8 (9,5)	74,3 (8,4)
Carbaril		117,6 (4,3)	108,1 (7,6)	97,1 (2,7)			105,8 (19,4)	76,9 (7,3)
Carbendazim	116,4 (12,8)	114,5 (14,5)	94,3 (7,1)	76,7 (7,3)		93,2 (10,7)	96,4 (7,3)	76,3 (4,7)
Carbofurano		107,0 (8,1)	107,8 (9,7)	102,5 (6,6)		74,1 (19,0)	78,8 (18,4)	76,2 (9,6)
Ciazofamida		101,4 (19,1)	112,0 (12,0)	91,4 (15,2)				
Cimoxanil	110,1 (9,3)	107,6 (5,1)	110,5 (4,8)	103,9 (2,9)			71,0 (8,8)	72,3 (5,3)
Ciprodinil	81,5 (15,1)	76,7 (18,4)	73,9 (4,1)	70,1 (7,1)				
Clorfenvinfos		94,3 (14,7)	97,7 (16,9)	94,3 (4,9)		70,6 (10,5)	119,4 (18,1)	70,7 (7,1)
Clotianidina		91,6 (9,3)	87,7 (15,5)	75,9 (17,4)				
Cresoxim-metil		91,5 (14,2)	113,0 (15,8)	98,0 (5,2)				
Diazinona		117,4 (15,2)	104,5 (7,2)	85,2 (11,5)		77,8 (13,5)	95,8 (18,2)	72,1 (20,0)
Difenoconazol	111,4 (12,7)	96,3 (7,6)	107,4 (13,9)	96,5 (4,7)		76,9 (12,4)	91,4 (10,5)	74,4 (13,9)
Diflubenzurom		55,9 (11,4)	49,5 (9,8)	65,8 (13,7)				

Dimetomorfe	105,4 (18,0)	109,4 (11,0)	101,1 (8,7)	94,4 (7,5)	74,0 (6,4)	75,1 (6,7)	90,8 (5,2)	74,2 (11,2)
Dimoxistrobina		108,5 (8,0)	109,6 (6,0)	100,3 (3,3)	114,0 (10,5)	86,3 (17,3)	117,7 (8,7)	92,4 (13,4)
Emamectina		63,1 (11,9)	51,2 (16,2)	44,7 (4,6)				
Espinosad A		118,7 (9,0)	113,2 (18,8)	102,5 (10,9)				
Espirodiclofem	117,5 (14,6)	84,1 (18,4)	84,1 (10,5)	77,0 (10,5)	117,5 (13,5)	100,7 (17,5)	104,2 (9,5)	76,8 (17,8)
Espiromesifem	92,7 (13,1)	109,9 (16,4)	94,7 (15,9)	88,2 (6,3)	73,3 (16,4)	95,9 (11,8)	98,2 (7,4)	77,3 (7,1)
Etiona	111,0 (11,1)	112,6 (9,1)	104,6 (10,9)	95,3 (5,1)			99,7 (10,2)	73,2 (12,0)
Etirimol	66,8 (9,7)	66,2 (12,6)	59,3 (9,0)	61,4 (7,0)	50,8 (15,6)	34,0 (11,6)	63,6 (14,1)	55,6 (14,7)
Fempiroximato	105,0 (15,6)	91,4 (14,7)	78,0 (12,7)	72,2 (14,0)			96,9 (11,7)	84,4 (12,9)
Fenamidona		95,1 (11,4)	117,9 (7,3)	101,0 (7,4)		71,5 (11,8)	110,7 (8,8)	76,2 (18,6)
Fenarimol		45,7 (8,3)	33,2 (7,5)	55,6 (4,7)				
Fenzaquim		45,7 (9,6)	51,3 (14,5)	61,2 (10,6)				
Fenbuconazol		100,4 (18,90)	119,1 (18,0)	95,3 (8,6)				
Fenhexamide		113,1 (13,5)	114,1 (19,6)	95,2 (7,6)				
Fenoxicarbe	78,5 (13,8)	103,5 (16,3)	103,2 (16,1)	90,0 (6,7)				
Fentiona	70,5 (14,6)	87,5 (12,3)	82,3 (9,2)	88,6 (13,0)		113,9 (13,9)	117,3 (10,0)	88,1 (14,8)
Fipronil	98,0 (14,5)	103,5 (6,8)	111,4 (8,2)	106,5 (2,9)				
Flonicamida	89,0 (13,8)	91,4 (6,4)	98,0 (8,7)	90,3 (3,6)				
Flusilazol	108,0 (15,4)	104,5 (11,3)	98,0 (5,3)	96,6 (3,3)	77,6 (18,4)	71,4 (14,3)	104,5 (9,3)	78,4 (11,8)
Flutolanil	96,0 (16,7)	101,0 (7,6)	100,8 (6,3)	99,0 (8,4)	90,5 (20,0)	73,1 (13,1)	102,5 (8,5)	91,4 (9,7)
Flutriafol		116,5 (6,3)	118,0 (9,6)	96,4 (5,3)		96,2 (17,2)	81,7 (10,2)	72,1 (4,0)
Fosmete		79,3 (10,6)	108,0 (15,1)	113,7 (14,6)		95,4 (16,7)	97,9 (12,0)	82,4 (15,9)
Imazalil		102,1 (12,6)	109,8 (11,7)	86,8 (11,4)				
Imidacloprido			102,2 (10,3)	99,0 (11,9)			85,7 (14,0)	87,7 (8,0)
Indoxicarbe	107,8 (16,7)	112,1 (7,4)	116,0 (9,8)	108,0 (2,3)	87,2 (15,0)	76,8 (7,9)	104,0 (9,1)	75,4 (16,0)
Iprovalicarbe			105,0 (5,4)	112,5 (7,3)		79,8 (17,3)	73,7 (13,0)	86,9 (10,2)

Lufenurom	120,0 (15,4)	115,4 (13,8)	103,9 (15,8)	93,3 (5,9)				
Malationa	108,4 (16,2)	109,3 (6,6)	109,2 (10,5)	100,2 (5,4)	107,8 (6,9)	72,2 (12,4)	103,0 (17,5)	87,4 (18,2)
Mercabam			112,0 (5,7)	119,2 (4,8)		80,1 (9,6)	117,0 (4,8)	82,5 (12,1)
Metalaxil	95,9 (9,8)	100,0 (8,2)	110,9 (8,6)	106,2 (2,5)	88,2 (13,0)	78,3 (8,2)	103,7 (4,3)	86,2 (12,9)
Metidationa	112,5 (18,5)	103,0 (8,4)	102,0 (6,3)	91,6 (4,1)		88,8 (13,1)	108,1 (12,6)	81,7 (9,3)
Metiocarbe	74,9 (9,2)	75,1 (6,9)	77,0 (10,0)	88,3 (6,9)	107,7 (18,4)	80,6 (15,8)	98,8 (20,0)	70,9 (13,0)
Metomil	85,6 (12,0)	97,1 (17,3)	97,8 (10,6)	94,3 (6,2)				
Metoxifenoziide		118,5 (2,0)	116,1 (4,7)	106,9 (2,8)				
Miclobutanil		110,7 (9,1)	117,2 (4,9)	105,1 (5,3)		86,9 (7,7)	72,1 (4,8)	87,9 (10,8)
Oxadixil		114,9 (16,7)	107,2 (3,5)	97,0 (8,3)		87,7 (17,0)	101,3 (17,4)	93,5 (14,9)
Picoxistrobina	106,9 (13,4)	114,3 (11,0)	109,3 (5,4)	104,3 (4,0)	97,9 (16,9)	82,0 (16,7)	89,2 (13,2)	74,6 (18,7)
Piraclostrobina	99,7 (13,8)	85,8 (7,8)	88,4 (6,8)	82,3 (6,8)	75,2 (17,5)	86,0 (20,0)	83,5 (7,7)	76,0 (16,9)
Pirazofos	96,0 (17,1)	106,1 (6,0)	106,8 (8,2)	108,0 (3,9)	88,3 (10,9)	73,9 (19,2)	101,8 (6,8)	76,7 (19,5)
Piridabem		112,5 (7,8)	91,4 (11,2)	81,6 (9,5)		85,2 (4,7)	96,5 (11,3)	77,2 (12,3)
Pirimetanil	98,1 (12,7)	73,2 (16,2)	83,1 (6,9)	77,8 (4,7)	111,3 (17,8)	90,2 (13,7)	81,8 (16,4)	78,3 (15,6)
Pirimicarbe		112,4 (10,7)	110,7 (9,7)	101,0 (4,1)		80,1 (11,2)	99,3 (15,5)	81,6 (10,5)
Piriproxifem		99,5 (7,9)	80,7 (9,0)	92,9 (4,1)				
Profenofos	100,8 (19,3)	95,8 (13,1)	89,1 (5,6)	85,8 (4,0)	75,8 (14,8)	72,7 (17,0)	95,0 (15,1)	74,5 (11,7)
Propamocarbe	49,7 (7,5)	30,9 (5,0)	23,5 (4,9)	37,4 (5,6)				
Propiconazol	116,6 (14,8)	112,4 (16,8)	110,9 (14,0)	89,5 (7,5)	99,0 (19,9)	71,9 (14,6)	100,5 (15,2)	86,3 (10,8)
Quinalfos	97,0 (15,3)	90,2 (10,1)	93,6 (14,2)	88,3 (10,1)	90,6 (14,8)	74,9 (10,4)	108,2 (7,1)	76,5 (12,7)
Quinoxifem	51,4 (15,0)	62,7 (17,2)	54,8 (21,6)	57,4 (8,1)				
Tau-Fluvalinato	77,9 (9,7)	89,9 (10,4)	71,6 (10,8)	82,3 (4,1)				
Tebufenozide	92,5 (16,7)	102,9 (11,7)	107,7 (8,0)	101,1 (4,5)	107,4 (10,5)	78,9 (19,2)	109,8 (6,2)	77,0 (18,6)
Teflubenzurom		106,3 (14,5)	102,7 (11,8)	89,9 (7,8)				
Tetraconazol			97,0 (8,6)	105,1 (13,2)		86,1 (19,7)	103 (17,2)	74,5 (18,1)

Tiacloprido		86,3 (15,6)	101,5 (6,6)		113,3 (7,2)	94,8 (12,5)	75,1 (13,7)	
Tiametoxam		107,8 (10,5)	95,9 (11,9)	87,5 (7,5)	85,9 (12,8)	108,4 (10,4)	87,8 (17,3)	
Tiodicarbe	96,7 (17,6)	96,9 (12,0)	92,6 (12,5)	79,0 (8,8)				
Tiofanato-metil		109,6 (3,5)	117,7 (8,0)	117,8 (3,5)	110,3 (13,4)	81,8 (13,0)	78,4 (16,4)	
Tolilfluanida		44,3 (15,9)	30,8 (12,4)	35,7 (13,7)				
Triadimefom			116,2 (13,6)	117,3 (5,6)	95,6 (16,6)	82,0 (13,2)	73,7 (15,8)	
Triazofos		92,5 (11,1)	112,6 (6,1)	113,7 (5,1)	73,8 (9,0)	85,3 (5,6)	73,2 (19,3)	
Triclorfon			72,8 (11,0)	89,6 (4,3)				
Trifloxistrobina		118,6 (7,2)	120 (6,0)	114,8 (4,3)	76,6 (20,0)	85,8 (15,3)	75,1 (12,2)	
Triflumurom	79,7(18,5)	77,6 (18,2)	78,5 (17,3)	71,9 (9,7)	117,6 (9,9)	107,1 (14,7)	104,4 (12,7)	90,6 (17,5)

A avaliação dos dados de exatidão para o pólen apícola, em relação à repetibilidade do método demonstra adequados resultados para a maioria dos compostos, com exceção de 35 compostos para o nível $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 7 no nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, os quais apresentaram recuperações inferiores a 70%. Os compostos acefato, diflubenzurom, emamectina, etirimol, fenazaquim, fenarimol, tolilfluanida, propamocarbe e quinoxifem apresentaram valores de recuperação inferiores a 70% em todos os níveis avaliados. Os resultados de desvio padrão, em termos de repetibilidade foram adequados, com exceção de quinoxifem no nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ que apresentou $\text{RSD} > 20\%$.

Os compostos emamectina, tolilfluanida e quinoxifem não apresentaram resultados satisfatórios, apresentando recuperações entre 30,2 e 66,9%. De acordo com a literatura para analisar estes compostos é necessário modificar o preparo de amostra. RÚBIAS e colaboradores (2015) desenvolveram um método simples para determinar avermectinas em carne, incluindo a emamectina, com base no método QuEChERS modificado. A extração neste estudo foi realizada com acetonitrila 0,5% amônia. INOUE e colaboradores (2009) também relataram resultados satisfatórios para a extração de avermectinas em condições básicas. Já no caso da tolilfluanida e quinoxifem foi relatado o uso do solvente acetato de etila para extração destes compostos. (VALLES *et al.* 2012; COSCOLLÀ *et al.* 2011).

Para determinação de acefato, a literatura reporta métodos para análise deste composto individualmente (GONZALO *et al.*, 1991; CHUANJIANG *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2015). Além do mais, este composto pode ter se transformado no seu produto de degradação metamidofós (KONG *et al.*, 2012). Os agrotóxicos diflubenzurom e propamocarbe também podem apresentar problemas de estabilidade. O composto propamocarbe apresentou recuperações inferiores a 55% em todos os níveis avaliados. Este comportamento pode ser explicado devido à tendência deste composto à fotodegradação (BURROWS *et al.*, 2002). O diflubenzuron também é rapidamente degradado principalmente por hidrólise e fotodegradação. (RODRÍGUEZ *et al.*, 1999).

Os compostos etirimol, fenazaquim e fenarimol apresentaram uma baixa recuperação, mas demonstraram bons valores de RSD. Resultados similares foram reportados por DIAS e colaboradores (2016) na determinação destes

compostos utilizando QuEChERS citrato em amostras de óleos comestíveis. O autor salienta que uma maneira de melhorar as recuperações desses compostos seria a utilização da calibração por curva extraída, para compensar as perdas da etapa de extração.

A avaliação dos dados para a abelha em termos de exatidão, em relação à repetibilidade do método demonstra adequados resultados para a maioria dos compostos, com exceção de 33 compostos para o nível $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, 7 no nível $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 2 nos níveis 50 e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ os quais apresentaram recuperações inferiores a 70%. Os resultados de desvio padrão, em termos de repetibilidade foram adequados, com RSD menor que 20%. Os compostos acefato e etirimol foram os únicos que não foram recuperados em nenhum nível de fortificação.

4.4.5 Precisão Intermediária

A precisão intermediária (RSD_{pi}) para os agrotóxicos estudados foi realizada empregando-se dias diferentes daqueles dos estudos de repetitividade. Na tabela 16 podem ser visualizados os valores de recuperação e a precisão intermediária avaliada, nas concentrações 5, 10, 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a matriz pólen apícola e nas concentrações de 10, 20 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a abelha.

Na avaliação da precisão intermediária os valores de recuperação para a maioria dos compostos variaram na faixa de 71,1 e 119,9% com RSD_{pi} menores que 20%, o que demonstra ter boa precisão.

Na matriz pólen apícola os compostos acefato, diflubenzurom, emamectina, etirimol, fenarimol, fenazaquim, propamocarbe, quinoxifem e tolilfluanida continuaram a apresentar valores de recuperação inferiores ao recomendado (entre 70 e 120%). Os valores de RSD ficaram acima de 20% para: quinoxifem no nível $5 \mu\text{g kg}^{-1}$; diflubenzurom e quinoxifem no nível $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabela 16 – Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, para matriz pólen apícola e abelha.

Compostos	Pólen Apícola				Abelhas		
	Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				Níveis de Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	5	10	20	50	10	20	50
	Recuperação (RSD%)				Recuperação (RSD%)		
Acefato	38,2 (17,7)	52,1 (11,1)	69,5 (4,1)	62,3 (5,8)	38,3 (5,7)	53,9 (12,4)	47,5 (8,4)
Acetamiprido	117,1 (17,9)	118,3 (16,2)	105,8 (7,0)	78,8 (17,7)	88,9 (14,3)	77,7 (12,3)	82,2 (12,0)
Aldicarbe	105,7 (11,6)	100,3 (2,0)	116,5 (7,3)	87,5 (15,3)		80,9 (7,1)	109,5 (6,5)
Azoxistrobina	118,7 (6,3)	119,5 (3,9)	116,8 (11,1)	102,3 (7,1)	117,2 (18,9)	112,9 (13,4)	107,4 (10,4)
Boscalida		100,1 (10,9)	102,9 (13,0)	81,8 (19,2)		81,3 (11,1)	76,1 (19,9)
Bupirimate	101,1 (18,4)	102,2 (15,5)	106,5 (12,7)	94,2 (6,7)	75,4 (16,8)	83,2 (17,7)	70,2 (19,0)
Buprofezina		101,3 (5,9)	109,1 (2,9)	94,1 (4,3)		85,2 (9,3)	89,0 (7,1)
Carbaril		118,6 (8,1)	113,5 (5,9)	94,4 (5,5)			80,6 (7,5)
Carbendazim	118,2 (9,1)	101,7 (12,1)	89,9 (11,5)	73,5 (16,8)		77,3 (17,2)	87,0 (13,6)
Carbofurano		97,9 (9,0)	93,2 (12,7)	100,6 (15,9)		81,7 (15,3)	82,7 (10,5)
Ciazofamida		108,4 (9,9)	110,3 (15,4)	96,7 (10,7)			
Cimoxanil	116,8 (10,5)	116,6 (3,1)	117,4 (7,4)	99,1 (4,3)			83,4 (5,1)
Ciprodinil	101,1 (15,2)	76,9 (17,5)	84,8 (13,5)	70,6 (16,0)			
Clorfenvinfos		96,7 (12,4)	98,9 (11,7)	88,2 (8,5)		100,1 (19,9)	72,4 (18,9)
Clotianidina		78,8 (7,7)	99,8 (16,1)	75,4 (13,9)			
Cresoxim-metil		112,9 (11,3)	116,1 (15,3)	104,8 (14,0)			
Diazinona		110,9 (13,5)	108,0 (14,5)	79,6 (10,6)		119,0 (13,5)	113,0 (13,3)
Difenoconazol	119,6 (9,3)	116,3 (10,5)	112,2 (6,4)	93,1 (8,5)		97,3 (17,6)	90,7 (14,9)

Diflubenzurom		48,3 (5,1)	69,1 (9,5)	55,7 (24,8)			
Dimetomorfe	113,8 (11,2)	119,5 (4,5)	112,6 (9,2)	92,4 (14,9)	104,4 (5,1)	111,6 (18,6)	119,1 (10,0)
Dimoxistrobina		112,3 (8,6)	112,1 (12,6)	99,0 (4,4)	77,3 (10,3)	72,5 (9,8)	103,0 (12,1)
Emamectina		49,9 (6,7)	66,9 (11,8)	41,3 (19,7)			
Espinosad A		86,0 (9,8)	92,4 (10,5)	71,2 (14,5)			
Espirodiclofem	77,8 (18,3)	94,9 (17,4)	102,0 (16,2)	77,9 (8,9)	108,2 (17,7)	79,9 (12,4)	86,3 (14,9)
Espiromesifem	108,7 (15,3)	104,2 (10,5)	98,8 (6,7)	83,5 (8,7)	71,1 (15,0)	89,6 (16,5)	70,1 (9,6)
Etiona	112,7 (11,3)	112,7 (8,5)	111,8 (15,1)	96,9 (3,0)			89,2 (15,8)
Etirimol	68,3 (7,3)	61,1 (7,1)	66,7 (6,1)	59,3 (9,1)	63,4 (12,8)	57,0 (15,9)	32,3 (8,8)
Fempiroximato	118,2 (8,3)	112,2 (8,8)	96,9 (17,5)	72,1 (13,7)			88,1 (11,2)
Fenamidona		88,5 (12,7)	96,1 (8,9)	98,4 (9,1)		89,1 (3,4)	70,2 (4,2)
Fenarimol		32,5 (6,8)	50,5 (7,4)	40,3 (6,5)			
Fenzaquim		51,4 (4,4)	34,8 (9,9)	52,7 (19,2)			
Fenbuconazol		90,0 (10,0)	109,8 (17,8)	95,2 (8,2)			
Fenhexamide		74,8 (9,1)	80,6 (19,7)	84,2 (13,4)			
Fenoxicarbe	118,7 (17,3)	107,8 (17,7)	108,4 (15,8)	95,6 (14,7)			
Fentiona	79,0 (11,3)	85,7 (12,1)	112,5 (12,6)	87,2 (16,1)		84,4 (14,2)	86,1 (9,3)
Fipronil	90,2 (7,2)	106,5 (5,6)	117,6 (10,2)	110,9 (8,6)			
Flonicamida	113,2 (5,1)	106,0 (7,2)	105,7 (7,4)	96,2 (5,6)			
Flusilazol	78,8 (14,8)	93,3 (11,7)	102,6 (9,9)	95,2 (4,4)	74,5 (12,8)	97,4 (16,5)	85,2 (14,2)
Flutolanil	118,5 (5,4)	118,8 (7,6)	119,7 (6,3)	101,0 (12,6)	108,6(12,8)	103,7 (10,9)	108,8 (11,8)
Flutriafol		107,4 (7,9)	110,1 (6,8)	94,9 (4,8)		116,8 (11,0)	89,3 (11,3)
Fosmete		89,2 (14,5)	110,2 (10,9)	114,6 (5,7)		70,4 (13,6)	114,4 (18,9)
Imazalil		71,6 (9,8)	83,2 (8,1)	84,0 (11,7)			
Imidacloprido			116,5 (10,6)	82,4 (20,0)			74,8 (9,4)
Indoxicarbe	110,8 (16,6)	118,6 (3,1)	116,8 (8,0)	104,9 (6,5)	79,2 (12,5)	83,9 (19,5)	70,7 (10,0)

Iprovalicarbe			108,1 (5,4)	117,3 (3,7)		84,5 (17,6)	75,0 (6,8)
Lufenurom	109,9 (11,4)	109,4 (18,6)	113,1 (8,7)	93,6 (14,9)			
Malationa	104,3 (11,5)	110,1 (9,8)	115,5 (11,6)	104,1 (3,9)	76,6 (6,0)	86,9 (16,5)	83,7 (14,5)
Mercabam			86,7 (7,7)	111,1 (15,3)		115,0 (10,3)	78,6 (8,4)
Metalaxil	98,7 (11,6)	109,0 (7,9)	113,3 (5,2)	103,0 (3,1)	74,9 (11,3)	79,3 (8,2)	95,2 (7,0)
Metidationa	100,3 (10,5)	109,6 (11,7)	116,3 (9,1)	95,3 (7,2)		73,7 (10,3)	82,6 (13,2)
Metiocarbe	99,2 (9,8)	109,2 (10,8)	108,5 (7,3)	88,6 (13,1)	80,1 (14,4)	74,3 (17,5)	96,9 (15,5)
Metomil	114,7 (11,2)	115,4 (12,7)	113,0 (11,4)	100,8 (11,1)			
Metoxifenoziide		116,4 (7,4)	118,4 (10,5)	105,6 (7,8)			
Miclobutanil		110,7 (3,8)	116,1 (5,3)	104,9 (5,4)		119,4 (10,1)	73,6 (9,3)
Oxadixil		115,5 (15,3)	102,3 (4,0)	101,9 (8,6)		84,2 (15,1)	77,3 (5,7)
Picoxistrobina	108,7 (15,0)	113,0 (8,3)	119,0 (10,0)	104,3 (4,4)	83,8 (10,9)	94,4 (13,6)	74,4 (8,4)
Piraclostrobina	119,0 (9,1)	113,7 (7,8)	104,4 (9,1)	81,4 (11,6)	77,9 (18,6)	89,3 (7,7)	73,6 (12,4)
Pirazofos	117,0 (13,4)	116,4 (8,9)	117,2 (6,3)	103,4 (5,5)	75,4 (13,8)	95,4 (12,9)	94,4 (12,8)
Piridabem		119,7 (9,4)	108,7 (8,8)	82,7 (18,8)		70,9 (16,7)	92,2 (12,7)
Pirimetanil	95,3 (15,6)	89,3 (10,9)	87,1 (11,7)	77,8 (12,0)	89,8 (17,2)	114,9 (18,3)	102,1 (16,3)
Pirimicarbe		107,4 (4,1)	108,8 (5,8)	98,8 (3,9)		80,7 (11,8)	91,7 (9,1)
Piriproxifem		104,1 (8,6)	98,3 (9,9)	70,2 (8,9)			
Profenofos	118,2 (10,4)	107,5 (7,8)	100,7 (8,6)	85,0 (3,4)	91,2 (18,2)	90,5 (11,1)	91,5 (14,3)
Propamocarbe	54,5 (14,3)	38,7 (9,4)	38,1 (3,8)	46,1 (14,8)			
Propiconazol	95,7 (15,1)	86,5 (11,7)	111,8 (4,9)	114,8 (3,5)	89,6 (13,1)	88,0 (15,4)	71,7 (16,5)
Quinalfos	89,3 (16,6)	108,2 (9,2)	99,4 (12,2)	92,4 (8,1)	87,7 (17,8)	73,1 (14,3)	89,7 (13,6)
Quinoxifem	65,0 (28,5)	55,7 (17,9)	61,4 (10,8)	57,0 (26,5)			
Tau-Fluvalinato	111,0 (6,6)	81,2 (3,8)	114,1 (10,4)	97,8 (5,9)			
Tebufenozide	80,2 (11,7)	97,1 (10,3)	113,2 (7,4)	103,2 (4,9)	88,6 (12,6)	83,3 (11,9)	87,1 (12,1)
Teflubenzurom		104,2 (12,9)	99,5 (10,8)	78,7 (10,2)			

Tetraconazol			93,6 (16,7)	109,7 (9,1)		72,3 (15,1)	81,8 (16,3)
Tiacloprido			116,9 (13,7)	94,3 (18,5)		100,1 (17,2)	89,4 (19,3)
Tiametoxam		117,8 (12,6)	111,3 (8,9)	86,0 (9,8)		88,8 (17,3)	74,6 (9,2)
Tiodicarbe	95,7 (15,1)	91,1 (14,4)	75,4 (16,5)	71,3 (14,1)			
Tiofanato-metil		118,9 (13,5)	111,2 (19,4)	102,0 (6,4)		109,0 (18,3)	89,3 (12,4)
Tolilfluanida		38,3 (17,1)	31,2 (12,7)	30,2 (34,1)			
Triadimefom			115,0 (14,7)	111,1 (7,5)		105,7 (16,3)	99,0 (12,8)
Triazofos		101,8 (7,7)	117,7 (8,5)	111,9 (6,2)		101,3 (13,1)	84,1 (6,4)
Triclorfon			71,7 (3,2)	77,3 (8,1)			
Trifloxistrobina		119,9 (7,3)	119,3 (6,5)	116,6 (3,5)		86,9 (16,6)	73,6 (10,0)
Triflumurom	73,2 (18,0)	104,3 (6,5)	112,5 (16,6)	71,1 (17,2)	96,4 (9,7)	70,4 (5,0)	97,6 (18,4)

4.4.6 Determinação dos valores de LOD e LOQ do método e do instrumento

A Tabela 17 apresenta os valores obtidos de LOD e LOQ do método para os agrotóxicos analisados nas matrizes abelha e pólen apícola

Neste estudo para a matriz pólen apícola a faixa de LOQm foi de 5 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto de LODm de 1,5 a 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de LOQi encontrados foram 2,5 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto os LODi foram 0,75 a 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores são considerados satisfatórios, pois com os limites de quantificação alcançados, consegue-se atingir aos valores máximos permitidos (LMR) para os agrotóxicos em pólen apícola, estabelecidos pela legislação. Exceto para o composto triclorfom que o LOQm do método (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) é superior ao limite estabelecido pela legislação (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) o que afetou sua análise. Porém, considerando os dados desse composto, possui recuperação e RSD adequados, tendo-se assim uma eficiente extração desse analito.

Para a matriz abelha a faixa de LOQm foi de 10 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto de LODm de 3 a 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O valor de LOQi encontrado foi de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto o LODi foi de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses valores são elevados comparados aos limites alcançados para o pólen apícola. Isso se deve a baixa detectabilidade do equipamento durante a validação do método para as abelhas.

Tabela 17 - Valores de LOD e LOQ do método para cada agrotóxico estudado.

Compostos	Pólen Apícola		Abelha	
	LOQm ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LODm ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQm ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LODm ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Acefato				
Acetamiprido	5	1,5	10	3
Aldicarbe	5	1,5	20	6
Azoxistrobina	5	1,5	10	3
Boscalida	10	3,0	20	6
Bupirimate	5	1,5	10	3
Buprofezina	10	3,0	20	6
Carbaril	10	3,0	50	15
Carbendazim	5	1,5	20	6
Carbofurano	10	3,0	20	6
Ciazofamida	10	3,0		
Cimoxanil	5	1,5	50	15
Ciprodinil	5	1,5		
Clorfenvinfos	10	3,0	20	6
Clotianidina	10	3,0		
Cresoxim-metil	10	3,0		
Diazinona	10	3,0	20	6
Difenoconazol	5	1,5	20	6
Diflubenzurom				
Dimetomorfe	5	1,5	10	3
Dimoxistrobina	10	3,0	10	3
Emamectina	10	3,0		
Espinosad A	10	3,0		
Espirodiclofem	5	1,5	10	3
Espiromesifem	5	1,5	10	3
Etiona	5	1,5	50	15
Etirimol				
Fempiroximato	5	1,5	50	15
Fenamidona	10	3,0	20	6
Fenarimol				
Fenazaquim				
Fenbuconazol	10	3,0		
Fenhexamide	10	3,0		
Fenoxicarbe	5	1,5		
Fentiona	5	1,5	20	6
Fipronil	5	1,5		
Fonicamida	5	1,5		
Flusilazol	5	1,5	10	3
Flutolanil	5	1,5	10	3
Flutriafol	10	3,0	20	6
Fosmete	10	3,0	20	6

Imazalil	10	3,0		
Imidacloprido	20	6,0	50	15
Indoxicarbe	5	1,5	10	3
Iprovalicarbe	20	6,0	20	6
Lufenurom	5	1,5		
Malationa	5	1,5	10	3
Mercabam	20	6,0	20	6
Metalaxil	5	1,5	10	3
Metidationa	5	1,5	20	6
Metiocarbe	5	1,5	10	3
Metomil	5	1,5		
Metoxifenoziide	10	3,0		
Miclobutanil	10	3,0	20	6
Oxadixil	10	3,0	20	6
Picoxistrobina	5	1,5	10	3
Piraclostrobina	5	1,5	10	3
Pirazofos	5	1,5	10	3
Piridabem	10	3,0	20	6
Pirimetanil	5	1,5	10	3
Pirimicarbe	10	3,0	20	6
Piriproxifem	10	3,0		
Profenofos	5	1,5	10	3
Propamocarbe				
Propiconazol	5	1,5	10	3
Quinalfos	5	1,5	10	3
Quinoxifem				
Tau-Fluvalinato	5	1,5		
Tebufenozide	5	1,5	10	3
Teflubenzurom	10	3,0		
Tetraconazol	20	6,0	20	6
Tiacloprido	20	6,0	20	6
Tiametoxam	10	3,0	20	6
Tiodicarbe	5	1,5		
Tiofanato-metil	5	1,5	20	6
Tolilfluanida				
Triadimefom	20	6,0	20	6
Triazofos	10	3,0	20	6
Triclorfon	20	6,0		
Trifloxistrobina	10	3,0	20	6
Triflummurom	5	1,5	10	3

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

A análise de todas as amostras foi realizada com adição de padrão de controle (atrazina deuterada) na concentração de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e todos os resultados de exatidão e precisão foram satisfatórios (recuperação entre 70 e 120%, com RSD < 20%). O método proposto foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em 6 amostras de pólen apícola e 4 amostras de abelha. Conforme a Tabela 18, todas as amostras analisadas apresentaram pelo menos algum resíduo de agrotóxicos.

Tabela 18 - Resultados da análise de amostras reais (pólen apícola e abelha).

Compostos	Amostras Pólen apícola						Amostras Abelha			
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
Acetamiprido	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Azoxistrobina	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d
Carbendazim	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d
Carbofurano	<LOQ	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d
Clorfenvinfos	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Clotianidina	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	-	-	-	-
Diazinona	n.d	n.d	<LOQ	<LOQ	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d
Difenoconazol	n.d	<LOQ	<LOQ	16,2	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d
Espirodiclofem	n.d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Imidacloprido	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	<LOQ
Triazofos	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d
Triclorfon	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Trifloxistrobina	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ

Todas as amostras apresentaram algum resíduo de agrotóxicos. A amostra A₄ de pólen apícola apresentou difenoconazol na concentração de 16,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$, valor abaixo do LMR. O restante das amostras apresentou resíduo abaixo do nível de quantificação.

5 CONCLUSÃO

O método QuEChERS modificado otimizado neste estudo mostrou-se eficaz para a determinação de 72 agrotóxicos em pólen apícola e 53 agrotóxicos em abelhas.

A detecção dos compostos utilizando o equipamento LC-MS/MS com fonte de ionização por eletronebulização nos modos positivo e negativo, operando no modo SRM, proporcionou satisfatória detectabilidade, seletividade e precisão na etapa de validação do pólen apícola. Na etapa de validação da abelha ocorreu uma diminuição da detectabilidade.

O método foi avaliado em termos de linearidade e faixa de trabalho, através da fortificação das curvas analíticas preparadas na matriz pólen apícola e abelha, nos níveis 2,5; 5; 10; 25; 50; 75 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O efeito matriz avaliado pela comparação das curvas preparadas na matriz pólen apícola e abelha e no solvente acetonitrila mostrou a necessidade de validar e quantificar os dados na presença da matriz.

A exatidão do método, avaliada através da fortificação dos quatro níveis, apresentou recuperação na faixa de 70 a 120%. A precisão do método foi adequada em termos de repetitividade sendo que o RSD ficou menor que 20%.

Os valores de LOD e LOQ do método foram de 1,5 a 6 e 5 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente para o pólen apícola. Para as abelhas os valores foram de 3 a 15 e de 10 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

O método proposto foi aplicado em 6 amostras de pólen apícola e 4 amostras de abelhas para avaliar a eficiência na determinação de resíduos de agrotóxicos. Os resultados das análises demonstram que o método foi eficaz e que todas as amostras apresentaram resíduos de agrotóxicos.

Dessa forma, conclui-se que o método proposto, empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS é adequado para a determinação de agrotóxicos em abelhas e pólen apícola, podendo ser aplicado em análises de rotina.

6 ENCAMINHAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Nas atividades de pesquisa gera-se uma quantidade significativa de resíduos líquidos e sólidos, os quais devem ser adequadamente tratados ou descartados.

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

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Ampliar o escopo de agrotóxicos a serem analisados em abelhas e pólen apícola por LC-MS/MS;
- ✓ Desenvolver um método de análise cromatográfica por GC-MS/MS para expandir o escopo para analitos não passíveis de análise por cromatografia líquida;
- ✓ Ampliar o estudo de sorventes para a etapa de limpeza dos extratos de abelhas;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do método de extração QuEChERS modificado para outros produtos apícolas;
- ✓ Aplicar o método proposto em monitoramentos amplos para avaliar a ocorrência de agrotóxicos nessas matrizes em diferentes épocas do ano e regiões.

8 REFERÊNCIAS

ABEMEL (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL), 2015 Disponível em <<http://brazillletsbee.com.br/o-setor.aspx>>. Acesso em: 5 jan 2017.

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

AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e Abelhas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, p53-62, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

ANVISA (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA), 2011a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Monitoramento+e+Pesquisa/2408e3804fddb924be6fffacfa6b37f1>>. Acesso em: 11 jun. 2016.

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

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília: **Diário Oficial da União**. DF, 12 de julho de 1989.

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

BRASIL, Instrução Normativa n.3 de 2001 de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade, de apitoxina, de cera de abelha, de geleia real, de geleia real liofilizada, de pólen apícola, de própolis, de extrato de própolis. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa>. Acesso em: 12/08/2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAMARGO, R. C. R.; RÊGO, J. G. S.; LOPES, M. T. R.; PEREIRA, F. M. Boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado, 2003. Disponível em: <www.infoteca.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: dez. 2016.

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

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

CURBELO, G. A. M.; LEHOTAY, J. S.; BORGES, H. J.; DELGADO, R. A. M. Use of ammonium formate in QuEChERS for high-throughput analysis of pesticides in food

by fast, low-pressure gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 75–84, 2014.

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

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

DUPONT, G. Les abeilles malades de l'homme, **Le Monde**, 29 August 2007. Disponível em: <http://www.lemonde.fr/cgibin/ACHATS/acheter.cgi?offre=ARCHIVES&type_item=ART_ARCH_30J&objet_id=1002393&clef=ARCTRK-NC_01>. Acesso em: 31 out. 2016.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16665113/pesquisadores-avaliam-mortalidade-de-abelhas-no-brasil>>. Acesso 15 marc. 2017.

EMBRAPA. Histórico sobre mel. 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>>. Acesso em: 10 set 2016.

EU (EUROPEAN UNION) pesticides database, disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eupesticidesdatabase/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>. Acesso em: 20 jun. 2016.

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.

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

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

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

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

HOLLER, J. F.; SKOOG, D. A.; CROUCH R. S. P Princípios de Análise Instrumental. 6 ed. São Paulo: **Bookman**, 2009.

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

IBGE, Produção da pecuária municipal, BRASIL, 2016. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

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

JIN, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, W.; ZHANG, W.; WANG, L.; ZHOU, J.; LI, Y. Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1298–1307, 2017.

JOHNSON, R. Honey Bee Colony Collapse Disorder, 2010. Disponível em: <<http://www.fas.org/sgp/crs/misc/RL33938.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

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

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

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

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

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

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K., LIGHTFIELD, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for

Residue Analysis of Fruits and Vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 615, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MOLGA, P. La mort des abeilles met la planète en danger, Les Echos, 20 August 2007. Disponível em: <<http://archives.lesechos.fr/archives/2007/LesEchos/19985-63-ECH.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2016..

MATARRITA, J.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide

residues and environmental contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1449, p. 17–29, 2016.

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

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) 2010. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2010/05/controlese-residuos-publicada-norma-de-2010-para-produtos-de-origem-animal>>. Acesso em 11 jun. 2016.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO) – Instrução normativa nº 11 de 20 de outubro, de 2000 – **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1690>. Acesso em: 15 nov. 2016.

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

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

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

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. **Quim. Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

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

PARKA, S. M.; KIMA, K. T.; KANG, J. S. Development of an analytical method for detecting nitrofurans in bee pollen by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1046, p. 172–176, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TORANO, S. J.; VERBON, A.; GUCHELAAR, J. H. Quantitative determination of thalidomide in human serum with high-performance liquid chromatography using protein precipitation with trichloroacetic acid and ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 734, p. 203–210, 1999.

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

UNDERWOOD R. B.; VANENGELSDORP, D. Colony Collapse Disorder: Have We Seen This Before?. 2007. Disponível em: <www.beeculture.com/content/ColonyCollapseDisorder.cfm>. Acesso em: 30 out. 2016.

USDA. Colony Collapse Disorder Progress Report, CCD Steering Committee. 2009. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/is/br/ccd/ccd_progressreport.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2017.

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

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

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227-236, 2001.

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

VIANA, B.F.; SILVA, F.O. Polinização por abelhas em agroecossistemas, 2010. Disponível em: <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/16%C2%BA20Cong_Bras_Apic/Anais_1/POLINIZA%C3%87%C3%83O%20POR%20ABELHAS%20EM%20AGROECOSSISTEMAS.pdf>. Acesso em: 14 jun 2017.

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

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

WIEST, L. BULETÉ, A.; GIROUD, B.; CÉDRIC FRATTA, C.; SOPHIE AMIC, S.; LAMBERT, O.; POULIQUEN, H.; ARNAUDGUILHEM, C. Multi-residue analysis of 80

environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5743–5756, 2011.

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

YAMASHITA, M. G. N. Análise de rótulos e bulas de agrotóxicos segundo dados exigidos pela legislação federal de agrotóxicos e afins e de acordo com parâmetros de legibilidade tipográfica. 2008 Dissertação (Mestrado em Desenho Industrial) - Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2008.