

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA  
NÚCLEO DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MEL DE  
*ABELHAS Apis Mellifera*

DÉBORA SANTOS SILVA BEZERRA

SÃO CRISTÓVÃO – SE  
2009

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM  
MEL DE ABELHAS *Apis Mellifera*

DÉBORA SANTOS SILVA BEZERRA

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Núcleo de Pós Graduação em  
Química da Universidade Federal de  
Sergipe como requisito para obtenção  
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

SÃO CRISTÓVÃO – SE  
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

B574d Bezerra, Débora Santos Silva  
Desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas *Apis Mellifera* / Débora Santos Silva Bezerra. – São Cristóvão, 2009.  
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

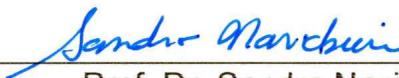
1. Pesticidas – Aspectos ambientais. 2. Mel de abelha - Contaminação. 3. Abelhas - Produtos. 4. *Apis Mellifera*. I. Título.

CDU543.393

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

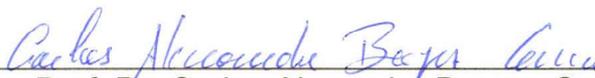
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação  
de Mestrado de Débora Santos Silva Bezerra  
apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Sergipe, em  
27/05/2009.



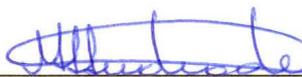
---

Prof. Dr. Sandro Navickiene  
DQI, UFS



---

Prof. Dr. Carlos Alexandre Borges Garcia  
DQI, UFS



---

Profa. Dra. Marta Valéria Almeida Santana de Andrade  
Depto. de Ciências Exatas e da Terra, UNEB

*Às quatro pessoas mais importantes da minha vida:  
minha mãe Clese,  
meu pai Carlos,  
meu irmão Rafael  
e ao meu noivo Adysson.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e força para chegar até aqui.

Aos meus pais Clese e Carlos pelo amor sem limites, meu irmão e amigo Rafael aos quais devoto o meu mais intenso amor.

Ao meu amor Adysson, que sempre acreditou em mim mesmo nos momentos que nem eu acreditava.

As minhas avós Maria e Joelina e meus avôs Luiz (*in memorian*) e Clovis (*in memorian*).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sandro Navickiene pela oportunidade de conhecer a cromatografia e paciência ilimitada para transmitir seus vastos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea pela confiança e sugestões valiosas ao trabalho.

Aos colegas de mestrado Adilson, Cintia, Ângelo, Wendel e também companheiros de laboratório Pedro, Clovis, Márcia, Cláudia, Rogério e Elissandro.

Aos amigos de graduação Danielle Barros, Juliana, Charlene, Ana, Ricardo, Alberto, e aos que se tornaram também de mestrado Fabiano e Wesley.

Aos colegas do LCP, Vanessa, Daniela, Adriano, Michel, Ricardo e especialmente a dupla Tamires e Marcell pelo apoio incondicional e amizade verdadeira.

Aos professores do DQI/UFS principalmente Carlos, Patrocínio, Nivan e Luís Eduardo pelos quais tenho a maior admiração e guardo um carinho imenso.

Aos técnicos que sempre me estenderam a mão, Dona Elisa, Dona Edinalva, Jane, Ismael e Rivair.

A Capes pelo apoio financeiro.

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.  
É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e  
toda arte." Albert Einstein

## CURRICULUM VITAE

### 1 - Formação Acadêmica:

Mestrado em Química pela Universidade Federal de Sergipe.

Desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas *Apis mellifera*, 2009, sob orientação do Prof. Dr. Sandro Navickiene.

Graduação em Química Licenciatura pela Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE, 2006.

Contextualização no ensino de Química: As propriedades específicas da matéria através do tema água, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Msc. Elizabete Lustosa Costa.

### 2 – Atividades desenvolvidas no mestrado:

Trabalho apresentado na forma de pôster no 12<sup>o</sup> Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO com o título *Pesticide analysis in honey by matrix solid phase dispersion and high-performance liquid chromatography witch photodiode array detector*, no período de 28 a 30 de Outubro de 2008 em Florianópolis/SC.

Trabalho apresentado na forma de pôster na 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química com o título *Método analítico para determinação de pesticidas residuais em mel de abelhas Apis mellifera usando MSPD e GC/MS*, no período de 31/05 a 02/06 em Fortaleza/CE.

### 3 - Resumos Apresentados em Congressos Internacionais: 1

### 4 - Resumos Apresentados em Congressos Nacionais: 15

## 5 - Experiência Profissional:

Universidade Federal de Sergipe.

Função: Professor Substituto

Disciplinas: Química I (2008/1), Química Experimental I (2008/1 – 2009/1),  
Química Experimental II (2009/1), Química Analítica Agrícola II (2008/1 –  
2008/2).

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vi
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 – Atividade Apícola .....	4
2.2 – Contaminação de produtos apícolas .....	9
2.3 – Classes químicas dos pesticidas em análise .....	12
2.4 – Métodos de análise .....	19
2.4.1 – Dispersão da matriz em fase sólida .....	22
2.4.2 – Técnicas cromatográficas de análise .....	25
3. OBJETIVOS .....	27
4. EXPERIMENTAL .....	28
4.1 – Materiais utilizados .....	28
4.2 – Reagentes e adsorventes .....	28
4.3 – Equipamentos utilizados .....	28
4.4 – Padrões e soluções .....	28
4.5 – Obtenção da amostra de mel .....	29
4.6 – Condições cromatográficas de análise .....	29
4.6.1 – Cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas .....	29
4.6.2 – Cromatógrafo à líquido com detector espectrofométrico com arranjo de diodos .....	29
4.7 – Método de extração por MSPD .....	30
4.7.1 – Extração dos pesticidas para análise no GC-MS .....	30
4.7.2 – Extração dos pesticidas para análise no HPLC-UV .....	30
4.8 – Limpeza do material .....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1 – Desenvolvimento do método analítico .....	33

5.1.1 – Obtenção das condições cromatográficas de análise .....	34
5.1.2 – Ensaio para desenvolvimento do método MSPD de extração dos pesticidas em análise por GC-MS.....	38
5.1.2.1 – Escolha do adsorvente e proporção matriz:adsorvente.....	38
5.1.2.2 – Ensaio para seleção do solvente de eluição.....	41
5.1.2.3 – Ensaio para seleção do volume de solvente .....	44
5.1.2.4 – Ensaio para seleção de solvente auxiliar ( <i>clean up</i> ) .....	45
5.1.3 – Ensaio para desenvolvimento do método MSPD de extração dos pesticidas em análise por HPLC-UV/DAD.....	47
5.2 – Validação de métodos analíticos .....	52
5.2.1 – Seletividade .....	53
5.2.2 – Exatidão e precisão .....	53
5.2.3 – Linearidade e curva analítica.....	58
5.2.4 – Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) .....	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	63
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
8. REFERÊNCIAS .....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Receita gerada pela exportação em dólar (a) e produção de mel em quilogramas (b) pelo Brasil entre 2007 - 2009. Fonte Sebrae, 2009.

Figura 02: Fontes de contaminação na colônia de abelhas.

Figura 03: Estrutura química dos pesticidas selecionados para estudo no GC-MS.

Figura 04: Estrutura química dos pesticidas selecionados para estudo no HPLC-UV.

Figura 05: Esquema representativo do processo de extração MSPD.

Figura 06: Fluxograma geral do processo de extração e coluna MSPD.

Figura 07: Cromatograma da mistura padrão analítica dos pesticidas em estudo (modo SIM)  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em acetonitrila obtido por GC-MS.

Figura 08: Cromatograma da amostra de mel eluída com 10 mL de acetonitrila, obtido no GC-MS modo SCAN.

Figura 09: Cromatograma da mistura padrão analítica dos pesticidas em estudo  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em acetonitrila obtido por HPLC-UV.

Figura 10: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando sílica como suporte sólido e eluição com 20 mL dos solventes hexano e diclorometano.

Figura 11: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando Florisil como suporte sólido e eluição com 20 mL dos solventes hexano e diclorometano.

Figura 12: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando sílica como suporte sólido e eluição com 20 mL dos solventes acetona, acetonitrila e mistura de solventes hexano:acetato de etila (1:4, v/v).

Figura 13: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando Florisil como suporte sólido e eluição com 20 mL dos solventes acetona, acetonitrila e mistura de solventes hexano:acetato de etila (1:4, v/v).

Figura 14: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando sílica como suporte sólido e diferentes volumes do solvente de eluição acetonitrila.

Figura 15: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando sílica como suporte sólido, eluição com 10 mL de acetonitrila e diferentes co-solventes.

Figura 16: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando sílica e Florisil como suporte sólido e eluição com 20 mL de acetato de etila.

Figura 17: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando sílica como suporte sólido, e eluição com 20 mL de diversos solventes de eluição.

Figura 18: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando Florisil como suporte sólido, e eluição com 20 mL de diversos solventes de eluição

Figura 19: Eficiência na recuperação ( $n = 2$ ) dos pesticidas em mel utilizando Florisil como suporte sólido, e diversos solventes auxiliares.

Figura 20: Cromatogramas obtidos do branco dos reagentes (a), do extrato fortificado da matriz (b) e da solução padrão de comparação (c) no nível de fortificação  $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Figura 21. Curvas analíticas obtidas em solvente (a) e no extrato da matriz (b) para a bifentrina.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Nutrientes do mel.

Tabela 02: Comparativo de produtividade de mel em escala mundial

Tabela 03: Características gerais dos pesticidas selecionados para estudo no GC-MS.

Tabela 04: Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo no GC-MS.

Tabela 05: Características gerais dos pesticidas selecionados para estudo no HPLC-UV.

Tabela 06: Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo no HPLC-UV.

Tabela 07: Métodos descritos na literatura para extração de pesticidas em produtos apícolas.

Tabela 08: Aplicações da MSPD para análise de resíduos de pesticidas em diversas matrizes.

Tabela 09: Pesticidas em estudo com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ) no GC-MS e fragmentos utilizados para a sua identificação nos extratos das amostras.

Tabela 10: Pesticidas em estudo no HPLC-UV com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ) e comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{máximo}}$ ).

Tabela 11. Resultados de recuperação média ( $n = 7$ ) com intervalos de confiança (95%) e coeficiente de variação (CV%) do procedimento para

extração dos pesticidas avaliados em amostra de mel de abelhas *Apis mellifera*.

Tabela 12: Intervalos de faixa linear de trabalho, equações da reta e coeficientes de correlação para os pesticidas em análise preparadas no extrato da matriz.

Tabela 13: Intervalos de concentração, equações da reta e coeficientes de correlação da curva analítica para os pesticidas em análise preparados no extrato da matriz.

Tabela 14: Valores obtidos de LOD e LOQ instrumental ( $LOD_i$  e  $LOQ_i$ ) e do procedimento ( $LOD_p$  e  $LOQ_p$ ) para cada extrato de matriz analisado.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE – acetilcolineesterase

ACN – acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CL<sub>50</sub> – Concentração letal para 50% da população

CV – Coeficiente de variação

DCM - diclorometano

DCT – Detector por condutividade térmica

DIC – Detector por ionização em chama

DLLME – micro extração dispersiva líquido-líquido (do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*)

ECD – Detector por captura de elétrons (do inglês *electron capture detector*)

EMRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPA – Agência de Proteção Ambiental (do inglês *Environmental Protection Agency*)

ER – Estabelecimento Relacionado

EUA – Estados Unidos da América

FPD – Detector fotometria de chama (do inglês *flame photometry detector*)

FVO – *Food and Veterinary Office*

GC – Cromatografia a gás (do inglês *gas chromatography*)

GC-ECD – Cromatógrafo a gás acoplado a detector de captura de elétrons

GC-ECD/NPD – Cromatógrafo a gás com dois sistemas de detecção em série: captura de elétrons e nitrogênio fósforo

GC-EI/MS – Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas com ionização por impacto de elétrons

GC-MS – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

HACCP/APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*)

HPLC-MS – Cromatógrafo a líquido acoplado a espectrometria de massas

HPLC-UV/DAD – Cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos

IDA – Ingestão diária aceitável

IDR – Índice de ingestão diária

INMETRO – Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

LC - Cromatografia líquida (do inglês *liquid chromatography*)

LC-APCI-MS – Cromatógrafo líquido

LC-MS/MS – Cromatógrafo líquido acoplado a dois detectores em série de espectrometria de massas

LC-UV/DAD – Cromatógrafo a líquido com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos

LD<sub>50</sub> – dose letal para 50% da população

LLE – Extração líquido-líquido (do inglês *liquid-liquid extraction*)

LMR – Limite máximo de resíduos

LOD – Limite de detecção (do inglês *limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (do inglês *limit of quantification*)

MeOH – metanol

MS – Detector de espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry*)

MSPD – Dispersão da matriz em fase sólida (do inglês *matrix solid phase dispersion*)

NPD – Detector de nitrogênio e fósforo (do inglês *nitrogen-phosphorus detection*).

OCs – Organoclorados

PCBs – Bifenilas policloradas

PNCRC – Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes

r – Coeficiente de correlação

RSD – Desvio padrão relativo

SCAN – modo de varredura linear

SEAGRI – Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária

SEAGRI – Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SIM – monitoramento de íons seletivos (do inglês *single ion monitoring*)

SPE – Extração em fase sólida (do inglês *solid phase dispersion*)

SPME – Micro extração em fase sólida (do inglês *solid phase microextraction*)

t<sub>R</sub> – tempo de retenção

UE – extração por ultrassom (do inglês *ultrasonic extraction*)

## RESUMO

O mel, principal produto da atividade apícola, utilizado como alimento, adoçante e para fins terapêuticos (apiterapia), tem a imagem de ser natural, saudável e limpo. Entretanto, esse produto é produzido atualmente em ambientes poluídos por diversas fontes de contaminação, tais como pesticidas que se difundem pelo planeta e podem atingir a população pela ingestão de alimentos contaminados, como o mel. A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) combinada às técnicas cromatográficas modernas como cromatografia a gás (GC) e cromatografia a líquido (HPLC) é uma alternativa para evitar os diversos inconvenientes encontrados nos métodos clássicos de extração. Este trabalho desenvolve um método para extração de resíduos dos pesticidas pirimicarbe, malationa, bifentrina e procimidona em mel de abelha *Apis mellifera* por MSPD e análise por GC com detecção por espectrometria de massas (MS) bem como dos pesticidas coumafós, flumetralina, fluvalinato e piraclostrobina por HPLC-UV/DAD. Ensaios com Florisil, sílica gel, alumina e C<sub>18</sub> foram realizados em duplicata para escolha do adsorvente apropriado bem como quantidades e tipos diversos de solventes para eluição tais como diclorometano, acetonitrila, acetato, hexano e mistura deles. A eficiência do método foi determinada em termos de recuperação percentual dos analitos de ensaios com sílica como sorvente e eluição com 10 mL de acetonitrila em três níveis de fortificação diferentes. Os resultados obtidos levam a valores de recuperação entre 45-56%, 46-64%, 49-64%, 34-43% para os pesticidas pirimicarbe, malationa, procimidona e bifentrina respectivamente, com desvios padrão relativos menores que 8,5%. Os limites de detecção e quantificação para os analitos em investigação foram entre 0,02-0,088 µg mL<sup>-1</sup> e 0,07-0,282 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Palavras - Chave: Pesticidas; mel; MSPD; GC-MS.

## ABSTRACT

Honey, main beekeeping product, used as food, sweetener and to therapeutic purpose, has the image of being natural, healthy and clean. However, today this product is produced in a polluted environment by different sources of contamination such as pesticides that diffuse around the world and can reach the population by the consumption of contaminated food, as honey. The matrix solid phase dispersion (MSPD) combined to the modern chromatographic techniques such as gas chromatography (GC) is an alternative to avoid the different inconveniences found in the classical methods of extraction. The present study develops a procedure for extraction of pirimicarb, malathion, bifenthrin and procymidone residue pesticides in honey *Apis mellifera* bee by MSPD and GC analysis with mass spectrometry detector (MS). In order to obtain a more adequate method for extraction of these pesticides, assays with Florisil, silica, alumina and C<sub>18</sub> were carried out twice to determine the appropriate solvent choice as such as amounts and kinds of solvents by elution such as dichloromethane, acetonitrile, ethyl acetate and n-hexane. The efficiency of the method was determined in terms of mean percentual recoveries of the pesticides by assays with sorbent silica and elution with 10 mL of acetonitrile in three fortification levels. Recovery results for the pesticides were between 45-56%, 46-64%, 49-64%, 34-43% for pirimicarb, malathion, procymidone and bifenthrin, respectively, with relative standard deviations lower than 8.5%. Limits of detection and quantification for the analytes investigated ranged from 0.02 – 0.088 µg mL<sup>-1</sup> and 0.07 – 0.282 µg mL<sup>-1</sup>, respectively.

Keywords: Pesticide, honey, MSPD, GC-MS.

## 1 - INTRODUÇÃO

A apicultura (criação racional de abelhas) é uma atividade sustentável por natureza, uma vez que viabiliza a melhoria na qualidade de vida do homem do campo gerando renda sem comprometer o meio ambiente, ocupa mão-de-obra familiar e contribui para o aumento da biodiversidade do ecossistema, pois muitas das plantas cultivadas, sobretudo as frutíferas dependem desses insetos para sua polinização. A atividade polinizadora das abelhas é essencial para a produção de frutas e sementes de alto valor comercial. Suas características morfológicas e etimológicas como a intensa atividade polinizadora e sua habilidade em reter e bioacumular em seus corpos substâncias que estão em contato direto durante a polinização fazem desses insetos excelentes bioindicadores ambientais (TOTTI, 2006). No Brasil, a atividade apícola se iniciou com enxames trazidos pelos imigrantes durante a colonização, embora, somente com o cruzamento entre duas populações, produzindo um híbrido conhecido atualmente como “abelha africanizada”, é que se deu a revolução da apicultura no país que chegou a exportar 80% da produção nacional (SEBRAE, 2006).

De maneira geral, aplica-se ao mel, principal produto da atividade, inúmeros efeitos benéficos em várias condições patológicas, além de ser um alimento de alto potencial energético que contém diversos elementos complementares, importantes nutricionalmente. Por muitos anos, a aparente pureza e ausência de resíduos caracterizaram o mercado do mel, entretanto, hoje os produtos da abelha podem ser produzidos em ambientes poluídos por diferentes fontes de contaminação tal como pesticidas que muitas vezes permanecem nas plantas em que foram aplicados, afetando outros organismos para os quais não foram desenvolvidos (PIRO et al., 2003). Desta forma, o consumo do mel se torna uma rota importante para exposição humana aos resíduos de pesticidas, os quais podem acarretar problemas de saúde ao consumidor. Além disso, a própria atividade apícola também pode ser fonte de contaminação desse produto, em ocorrência da aplicação direta de acaricidas e

antibióticos para o controle de doenças que atingem abelhas adultas e suas crias. Muitos desses contaminantes não causam alta mortalidade, mas podem provocar vários efeitos comportamentais adversos para esses insetos mesmo em pequenas doses (PORRINI et al., 2003).

Diante do risco potencial de resíduos de pesticidas em mel, há necessidade de monitoramento constante dos níveis de concentração dessas substâncias. Esses compostos são determinados comumente por cromatografia a gás (GC, do inglês *Gas Chromatography*) ou cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) dependendo da sua polaridade, volatilidade e estabilidade térmica, após a etapa preliminar de preparação da amostra para eliminar interferentes em matrizes muito complexas (PICÓ, 2007). A maioria dos métodos de preparo de amostra desenvolvidos envolve a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid - liquid extraction*), extração por ultrassom (UE, do inglês *ultrasonic extraction*) ou extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) que em sua maioria envolve grandes quantidades de solvente e tempo requerido para extração. A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) é uma técnica de extração e limpeza que surge para suprir tais inconvenientes de forma a ser aplicável para amostras complexas sólidas ou semi-sólidas como o mel, entretanto sua aplicação ainda é incipiente nessa matriz. A técnica combina diretamente a amostra com um adsorvente (dispersante), permitindo a realização simultânea de várias etapas no preparo da amostra, transferência do material para coluna e eluição com solvente apropriado (BARKER, 2007; DÓREA, 2004). Além disso, a MSPD fornece resultados equivalentes ou superiores quando comparados a outras técnicas de extração e purificação.

Determinar resíduo de substâncias contaminantes em qualquer tipo de matriz requer uma concentração máxima estabelecida de referência que limita a presença do composto na matriz de interesse, conhecida como limite máximo de resíduos (LMR). Contudo, não existe legislação oficial e nem um padrão internacional definido para mel ou qualquer outro produto apícola em relação ao controle de qualidade. Na União Européia um nível de concentração de

0,01mg/kg é freqüentemente considerado para acaricidas, mas com LMR não fixado. No Brasil, a Instrução Normativa 11, de 20 de Outubro/2000, regulamenta a padronização físico-química do mel para fins comerciais, baseada em legislações européias, porém não cita nenhum aspecto referente a resíduos de contaminantes. De fato, a ausência de LMRs estabelecidos para pesticidas em mel, obriga a comparação com outros gêneros alimentícios (PIRO et al., 2003).

A proposta desse trabalho foi desenvolver e aplicar um método analítico simples, seletivo e confiável para extração de resíduos dos pesticidas pirimicarbe, malationa, bifentrina e procimidone utilizados em culturas nas quais abelhas são importantes polinizadores, bem como aqueles pesticidas empregados diretamente na colméia para o tratamento de doenças que podem afetar esses insetos, tais como flumetralina, fluvalinato, piraclostrobina e coumafós, utilizando as técnicas de dispersão da matriz em fase sólida, cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos.

## 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 – Atividade apícola

As abelhas são insetos que surgiram há milhares de anos a partir de vespas que alteraram sua dieta alimentar de insetos e ácaros para utilizar o néctar e pólen como fonte de nutrientes. Como consequência, esses insetos criaram uma estreita relação com plantas que produzem flores e frutos, onde sua função principal é fecundar as flores, fazendo assim a polinização das colheitas agrícolas e espécies nativas perpetuando o mundo vegetal em troca do néctar como alimento (SEBRAE, 2007). A vantagem da polinização através das abelhas já foi demonstrada para as culturas de abacate, manga, pêra, maracujá, pêssego, maçã, melão, citros, ameixa, coco, girassol entre outras (SEGEREN, 2004).

Durante o processo evolutivo, surgiram várias espécies de abelhas e atualmente conhece-se mais de 20 mil espécies das quais apenas 2% são sociais e fornecem produtos tais como o mel, rica fonte de alimento para o homem. Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas. A espécie *Apis mellifera* é generalista e destaca-se por ser de fácil manejo, alocação, eficiência e produção de produtos com alto valor agregado (SEBRAE, 2007; CARVALHO, 2006).

O mel, principal produto apícola, é uma substância viscosa e aromática produzida pelas abelhas a partir do néctar recolhido de flores e processado pelas enzimas digestivas desses insetos, sendo armazenado em favos de suas colméias para servir-lhes de alimento durante o inverno. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais estão diretamente relacionados com a fonte floral que o originou e com a espécie que o produziu (RISSATO et al., 2006; HERRERA et al., 2005; SEBRAE, 2007).

De maneira geral, aplica-se ao mel inúmeros efeitos benéficos em várias condições patológicas, além de ser um alimento de alto potencial energético que contém diversos elementos complementares, importantes nutricionalmente.

Apesar de ser basicamente uma solução saturada de açúcares e água, outros componentes tais como ácidos orgânicos (ácidos glucômico, oxálico, cítrico, maléico, fórmico, láctico entre outros), minerais (cálcio, ferro, manganês, magnésio, fósforo, potássio, sódio entre outros) e vitaminas conferem ao mel um alto grau de complexidade, como mostra a Tabela 01 (TILHE, 2003; IOANNIDOU et al.,2005).

Tabela 01: Nutrientes do mel.

Nutriente	Unidade	Quantidade em 100g de mel	IDR* (mgKg <sup>-1</sup> )
Energia	caloria	339	2800
Niacina	mg	0,11 - 0,36	20
Riboflavina	mg	0,02 - 0,06	1,7
Vitamina B1	mg	0,004 – 0,006	1,5
Vitamina B6	mg	0,008 – 0,32	2,0
Vitamina B12	mg	-	6,0
Vitamina C	mg	2,2 – 2,4	60

\* Índice de ingestão diária

Fonte: Embrapa, 2009.

O mel pode ser utilizado como alimento, adoçante e para fins terapêuticos (apiterapia). Estimula a resistência física, é levemente sedativo (combate a insônias), digestivo e laxativo, anti-séptico e antianêmico. Em aplicação tópica, minimiza a formação de cicatrizes em feridas e queimaduras devido a alterações na produção de colágeno (propriedades antimicrobianas) além de ser excelente hidratante para a pele. Seu uso também é feito com sucesso em afecções do trato respiratório (como expectorante) e vários outros tipos de doenças, como por exemplo, na alimentação de doentes tuberculosos. No Brasil, de maneira geral, seu consumo como alimento ainda é incipiente (aproximadamente 300g/habitante/ano), principalmente comparado a países

como os Estados Unidos e os da Comunidade Européia e África, que podem chegar a mais de 1000g/habitante/ano (SEBRAE, 2005; McKEE, 2003).

Com o surgimento da apicultura racional no século XIX, os produtos da colméia puderam ser explorados sem prejuízos maiores para as abelhas. No Brasil, a atividade apícola se iniciou com enxames trazidos pelos imigrantes durante a colonização. Contudo, somente com o cruzamento entre duas populações, produzindo um híbrido conhecido atualmente como “abelha africanizada”, em meados de 1956, é que se deu a revolução da apicultura no país. O que era uma tradição quase que exclusiva das regiões Sul e Suldeste passou a ser praticada também nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste embora a consolidação da boa fase do negócio apícola ocorreu somente em 2001 com a abertura do mercado internacional para o mel brasileiro por ocasião da suspensão das importações do mel da China por países da Comunidade Européia devido a presença de altos índices de resíduos de antibióticos (SILVA, 2007b; SEBRAE, 2007).

Apesar da extraordinária diversidade de flores e clima favorável, que aliados à presença da abelha africanizada, poderia lhe conferir um grande potencial para a atividade apícola, o Brasil se mantém no quinto lugar no ranking mundial da produção do mel (Tabela 02) apesar da enorme vantagem em trabalhar com abelhas africanizadas, muito mais produtivas e tolerantes a inimigos naturais e doenças tal como a Varroatose causada pelo ácaro *Varroa jacobsoni* ou *Varroa destructor*, que suga o sangue das abelhas desde a fase de larva até a adulta prejudicando a produtividade da colônia (SEBRAE, 2007; SEBRAE, 2005; NASCIMENTO et al., 2005).

Tabela 02: Comparativo de produtividade de mel em escala mundial

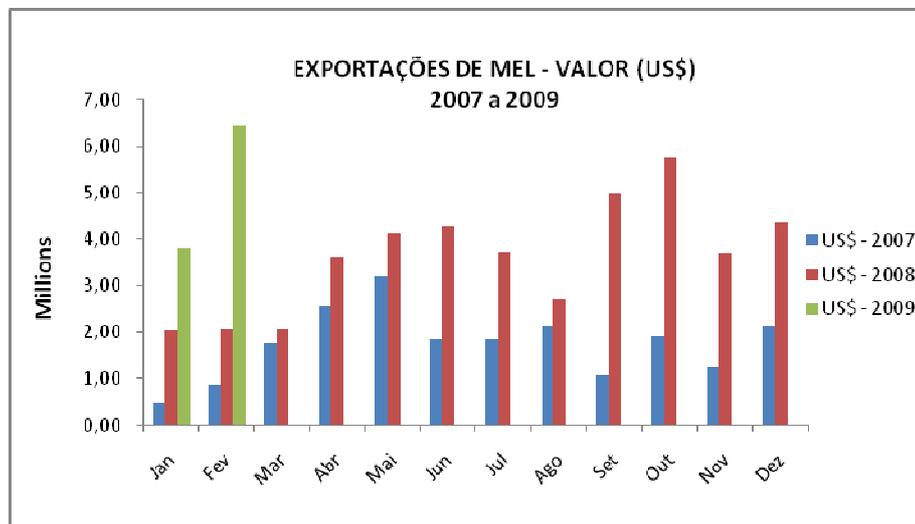
Produtividade média anual	Brasil	EUA	México	Argentina	China
	Kg/colméia/ano	15	32	31	30 - 35

Fonte: Sebrae – Relatório completo sobre mercado do mel, 2007.

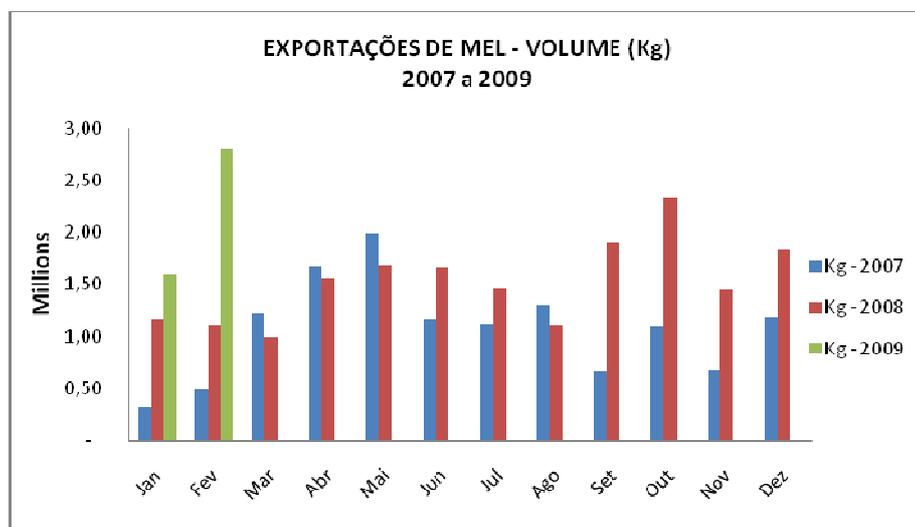
Com a entrada do mel brasileiro no mercado internacional, a apicultura viveu um grande momento de mobilização e crescimento. Desde sua introdução no país, é bastante significativo o avanço da apicultura brasileira, o que se constata tanto do ponto de vista do agronegócio, como do social e tecnológico. De acordo com a Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária (SEAGRI), 80% dessa produção nacional é exportada, sendo que os maiores compradores são países da Europa. Entretanto, no ano de 2006 uma missão sanitária do serviço de alimentação e veterinária (FVO, do inglês *Food Veterinary Office*) da União Européia (UE) verificou que o sistema brasileiro de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal não era equivalente aos requisitos sanitários da UE, o que culminou com a publicação do embargo ao mel brasileiro, que antes do bloqueio gerava uma receita de US\$ 15 milhões para o setor apícola nacional. Apesar do embargo, as exportações de mel em 2006 superaram os resultados do ano anterior, aumentando 23,3% em valor e 1,1% em peso graças aos EUA que absorveram 75% das exportações. Entretanto, em dezembro do mesmo ano, as exportações caíram quase 52% em valor e mais de 60% em peso em relação ao mesmo período de 2005 (SILVA, 2007b).

Após dois anos de embargo (março/2006 – março/2008) a UE aprovou o Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Brasil embora antes de retomar as exportações para países do bloco, o setor apícola nacional terá ainda que se adequar às novas exigências, como implantação de boas práticas, do Sistema HACCP/ APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), Unidades de Extração (Casa do Mel) bem como o registro, junto ao Ministério da Agricultura, com Estabelecimento Relacionado (ER) das Unidades de Extração (SEBRAE, 2007; SEBRAE, 2005).

Segundo dados recentes do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) mostrados na Figura 01, no período de Fevereiro/2007-Fevereiro/2009 a produção nacional cresceu cerca de 575%. Nos dois primeiros meses deste ano já foram exportadas 4,40 mil toneladas de mel, gerando uma receita de US\$ 10,28 milhões, representando aumentos de



(a)



(b)

Figura 01: Receita gerada pela exportação em dólar (a) e produção de mel em quilogramas (b) pelo Brasil entre 2007 - 2009. Fonte Sebrae, 2009.

147,5% em valor e de 93,5% em peso, em relação ao ano anterior. O principal destino das exportações brasileiras de mel neste período foram os Estados Unidos (59,7%), entretanto, já foram comercializadas com a União Européia US\$ 3,59 milhões, representando 35% do total das exportações de mel. Apesar do grande desafio de atendimento das exigências da União Européia, o SEBRAE acredita que o cenário continuará sendo favorável ao mercado de mel, em função de prováveis reduções na oferta decorrentes, principalmente, de problemas climáticos e mortandade de enxames por uso de inseticidas pelos grandes exportadores.

## 2.2 – Contaminação de produtos apícolas

O mel e demais produtos da colméia (cera, pólen, própolis, geléia real, apitoxina) tem a imagem de ser natural, saudável e limpo. Entretanto, esses produtos são produzidos atualmente em ambientes poluídos por diversas fontes de contaminação. Para produzir o mel, as abelhas operárias, a cada dia, voam aproximadamente 7 km<sup>2</sup> nas áreas que a cercam recolhendo o néctar, a água e o pólen das flores. Durante esse processo, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados por estes insetos e ficam retidos nos pêlos superficiais de seu corpo ou são inalados e unidos em seu aparelho respiratório (BOGDANOV, 2005; RISSATO et al., 2006; PIRO, 2003).

Dessa forma, a abelha e seus produtos podem caracterizar o nível da poluição de quase todos os setores ambientais (solo, água, plantas e ar) em uma área de alguns quilômetros quadrados funcionando como indicador biológico de contaminação ambiental pelo aparecimento de alta mortalidade, quando o produto é potencialmente tóxico para abelhas (LD<sub>50</sub> baixa) e/ou presença de resíduos em seus corpos ou em produtos da colméia, no caso dessas substâncias não serem particularmente perigosos para esses insetos (RISSATO et al., 2006; PORRINI et al., 2003). Em geral, o mel pode ser

contaminado de forma involuntária pelo próprio ambiente ou ainda através da própria prática apícola, como mostra a Figura 02.

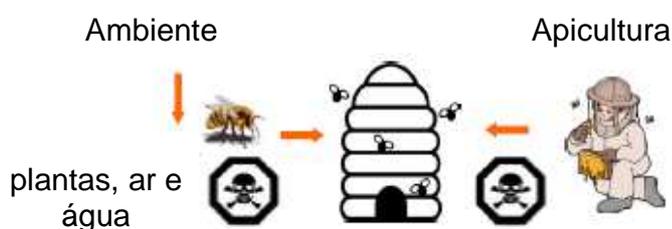


Figura 02: Fontes de contaminação na colônia de abelhas. Adaptado de Bogdanov, 2005.

As abelhas, como qualquer ser vivo, são alvo de diversos organismos que podem lhe causar problemas tanto na fase larval quanto na adulta. Algumas bactérias, fungos e vírus causam doenças que afetam principalmente as larvas. Por outro lado, as abelhas adultas são frequentemente atacadas por protozoários, ácaros e insetos. No Brasil, de modo geral, a ocorrência e os danos provocados por doenças e certas pragas são menores, principalmente em razão da maior resistência das abelhas africanizadas e das condições climáticas, que parecem ser menos favoráveis a disseminação das doenças.

A ocorrência de doenças nas colméias acarretam prejuízos diretos pela diminuição da produtividade, uma vez que o aumento da mortalidade, tanto de crias como de abelhas adultas, leva a uma redução da população da colmeia e uma conseqüente redução na produção. O controle dessas pragas é realizado pelo uso de acaricidas sintéticos tais como coumafós, flumetralina, fluvalinato e piraclostrobina, o que implica num risco de contaminação direta do mel e outros produtos apícolas. Os programas de determinação de resíduos de pesticidas para monitoramento de mel são muitas vezes, concentrados em resíduos de acaricidas usados para controlar o *Varroa jacobsoni*, um ectoparasita que suga o sangue das abelhas (hemolinfa) adultas e das crias, enfraquece o sistema imunológico e transmite vírus que afetam as abelhas (KORTA, 2001; SABATINI,

2003; ADAMCZYCK, 2007; RIAL-OTERO, 2007a; KAMEL, 2007; SHAMSIPUR, 2008; KARAZAFIRIS, 2008; DEBAYLE, 2008).

A contaminação indireta ocorre na maioria das vezes porque a produção do mel obtido de floradas silvestres está cada vez mais escassa no mundo e por esse motivo, atualmente, a exploração da apicultura torna-se dependente das culturas agrícolas que, muitas vezes, utilizam compostos tais como pesticidas (inseticidas, fungicidas, herbicidas) de maneira inadequada, o que prejudica a qualidade do mel e demais produtos apícolas, pois ocasiona a contaminação da produção com resíduos que podem ser tóxicos para o homem ou ainda afetar outros organismos diferentes daqueles para os quais foram desenvolvidos, como as abelhas, os insetos polinizadores mais importantes do mundo.

Além da alta mortalidade de abelhas nas colméias, também se evidenciam a presença de efeitos subletais como perda de sentido, hipotermia, alteração da atividade da enzima ATPase e outras perturbações fisiológicas e comportamentais como o distúrbio do colapso das colônias (CCD, do inglês *colony collapse disorder*), também conhecida como síndrome do desaparecimento de abelhas. Esses e outros contaminantes tais como metais tóxicos, isótopos radioativos, organismos geneticamente modificados e bactérias patogênicas podem alcançar os produtos da colméia pelo ar, água e plantas e serem introduzidos na dieta humana pelo consumo do mel e demais produtos apícolas (SEBRAE 2007; BOGDANOV, 2006; RIAL-OTERO et al., 2007; CARVALHO, 2006).

Em seu trabalho, Carvalho (2006) avaliou a toxicidade de pesticidas utilizados na cultura de citros para a abelha polinizadora *Apis mellifera* e constatou que a maioria deles é altamente ou medianamente tóxicos para a abelha. Antes disso, Nica et al. (2004), já haviam demonstrado que a causa da elevada mortalidade de abelhas situadas na zona melífera da Romênia foi a exposição desses insetos à deltametrina, um inseticida da classe química dos piretróides usado para culturas agrícolas e programas de saúde pública.

### 2.3 – Classes químicas dos pesticidas em estudo

Segundo Queiroz (2001), pesticidas, praguicidas, agrotóxicos ou defensivos agrícolas são denominações genéricas de substâncias utilizadas para o controle de animais ou vegetais que possam trazer problemas à agricultura ou à saúde pública, ou seja, é um importante meio de controle de pragas e doenças causadoras de baixa produtividade e, conseqüentemente, de danos econômicos à prática agrícola, entretanto seu uso deve ser moderado para evitar resíduos dessas substâncias. Isso pode ser conseguido quando o produtor respeita o prazo de carência de cada princípio ativo, colhendo o produto depois desse prazo.

As maiores preocupações estão em torno do perigo potencial da exposição aguda (toxicidade a curto prazo) e crônica (toxicidade a médio e longo prazo) a pesticidas, pois, em sistemas biológicos, vários desses compostos são potencialmente carcinogênicos e podem causar alterações nos sistemas endócrinos, reprodutor e nervoso. Além disso, o pesticida aplicado pode ser metabolizado por enzimas do próprio mel e ser transformado em um metabólito ainda mais tóxico que o composto original. Em um estudo realizado com 289 pesticidas, a Agência de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency - EUA*) encontrou 53 ingredientes ativos que são oncogênicos ou potencialmente oncogênicos dos quais 18% são utilizados na produção de alimentos (TILHE, 2005; ERDOGRUL, 2007).

Devido a complexidade dessas substâncias, sua classificação é realizada sob diversos aspectos, tais como modo de ação (herbicida, inseticida, fungicida, dentre outros), forma de atuação (sistêmico ou não sistêmico), origem (inorgânico ou orgânico), estrutura química e toxicologia (BARBOSA, 2004).

Os pesticidas não sistêmicos têm ação de contato (via dérmica), penetração, ingestão (via oral) e fumigante (via respiratória), enquanto que os sistêmicos são seletivos a praga, com a intenção de não matar os insetos não-alvo. É transportado pela seiva do vegetal em quantidade letal para o inseto, sem prejudicar a planta (LARINI, 1997).

A classificação toxicológica refere-se à toxicidade aguda de um pesticida, como produtos técnicos ou formulados, a qual é expressa pela sigla  $DL_{50}$  (dose letal para óbito de 50% dos animais teste), nos estudos pela via oral ou dérmica e  $CL_{50}$  (concentração letal para óbito de 50% dos animais teste) nos estudos de absorção por via respiratória (GRISOLIA, 2005). Em função dos valores de  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$ , os pesticidas são classificados toxicologicamente em quatro classes distintas, que varia de I a IV, de extremamente tóxicos (classe I) a produtos pouco tóxicos (classe IV), conforme Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Em função do potencial tóxico dos pesticidas, a Legislação Brasileira, através da ANVISA, define como limite máximo de resíduos (LMR) a quantidade máxima de resíduos legalmente aceita nos alimentos, decorrente da aplicação adequada de um produto numa fase específica da cultura, desde sua produção até o consumo. O objetivo principal do estabelecimento de LMR é a garantia, com certa margem de segurança, que a população, ao consumir diariamente produtos cujos níveis de resíduos de pesticidas estejam dentro dos limites estabelecidos, não deverá, segundo os conhecimentos científicos atuais, ter algum problema de saúde. Assim, são estabelecidos valores de ingestão diária aceitáveis (IDA), através de uma revisão completa das informações disponíveis provindas de estudos com animais de laboratório e observações em humanos (dados de propriedades bioquímicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas do pesticida) (TILHE, 2005).

Os pesticidas em estudo (Figura 03) incluem inseticidas organossintéticos e fungicidas de diferentes grupos químicos, tais como organofosforados (malationa e coumafós), piretróides (bifentrina e fluvalinato), carbamatos (pirimicarbe), dicarboximidas (procimidona), dinitroanilinas (flumetralina) e estrobilurina (piraclostrobina). As Tabelas 03, 04, 05 e 06 sintetizam as principais características gerais e físico-químicas dos pesticidas.

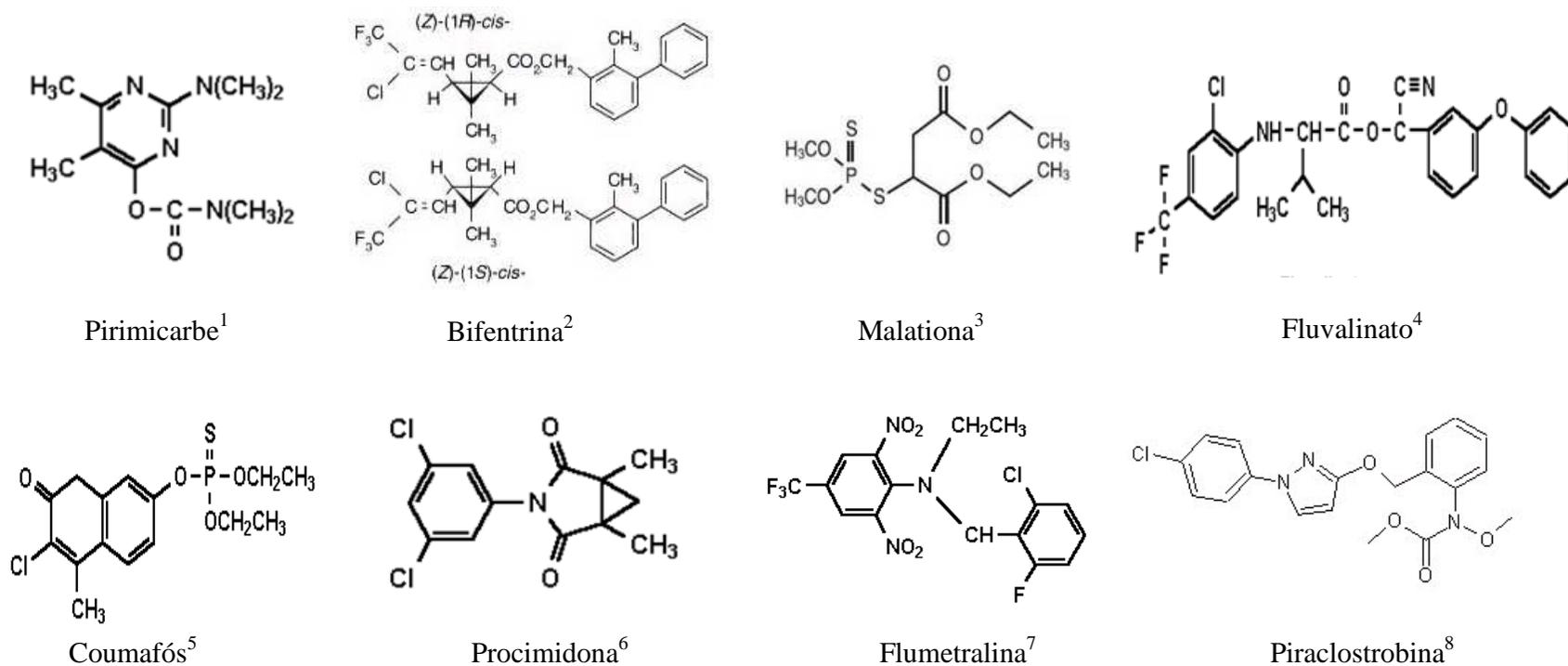


Figura 03: Estrutura química dos pesticidas selecionados para estudo. ANVISA, 2009.

<sup>1</sup>2-dimethylamino-5,6-dimethylpyrimidin-4-yl dimethylcarbamate

<sup>2</sup>2-methylbiphenyl-3-ylmethyl(Z)-(1R,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

<sup>3</sup>diethyl (dimethoxythiophosphorylthio)succinate

<sup>4</sup>(RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl N-(2-chloro-alpha,alpha,alpha-trifluoro-p-tolyl)-DL-valinate

<sup>5</sup>[3-chloro-7-diethoxyphosphinothioyloxy-4-methylcoumarin

<sup>6</sup>N-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide

<sup>7</sup>N-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-N-ethyl-alpha,alpha,alpha-trifluoro-2,6-dinitro-p-toluidine

<sup>8</sup>methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yloxymethyl]phenyl}(N-methoxy)carbamate

Tabela 03: Características gerais dos pesticidas selecionados para estudo no GC-MS.

Pesticida	Modo de ação	Forma de atuação	Grupo Químico	Fórmula bruta	Classe Toxicológica*	DL <sub>50</sub> ** (µg/abelha)
Pirimicarbe	inseticida	sistêmico	carbamato	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	II	não tóxico
Malationa	inseticida acaricida	não sistêmico	organofosforado	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	III	0,71 (tópico)
Bifentrina	inseticida acaricida	sistêmico	piretróide	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	II	0,1 (oral); 0,015 (contato)
Procimidona	fungicida	sistêmico	dicarboximida	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	II	não tóxico

\*I (extremamente tóxico); II (altamente tóxico); III (medianamente tóxico); IV (pouco tóxico).

\*\*estabelecido para abelhas por Tomlin, 2000.

Fonte: ANVISA, 2009; Tomlin, 2000.

Tabela 04: Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo no GC-MS.

Pesticida	Ponto de ebulição (°C)	Pressão de vapor (Pa), 20-25°C	log K <sub>ow</sub> *	Solubilidade** (gL <sup>-1</sup> )
Pirimicarbe	164,7-167,7	9,7 x 10 <sup>-4</sup>	1,7	3,0
Malationa	156-157	5,3 x 10 <sup>-3</sup>	2,7	1,4 x 10 <sup>-2</sup>
Bifentrina	150	2,4 x 10 <sup>-5</sup>	>6,0	0,1 x 10 <sup>-3</sup>
Procimidona	100	1,8 x 10 <sup>-2</sup>	3,1	4,5 x 10 <sup>-3</sup>

\*coeficiente de partição octanol:água

\*\*em água, 20-25°C

Fonte: Barceló, 1997; Tomlin, 2000.

Tabela 05: Características gerais dos pesticidas selecionados para estudo no HPLC-UV.

Pesticida	Modo de ação	Forma de atuação	Grupo Químico	Fórmula bruta	Classe Toxicológica*	DL <sub>50</sub> ** (µg/abelha)
Coumafós	inseticida acaricida	não sistêmico	organofosforado	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClO <sub>5</sub> PS	II	não estabelecido
Piraclostrobina	fungicida	-	estrobilurina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	II	-
Flumetralina	inseticida acaricida	sistêmico	dinitroanilina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClF <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	I	não tóxico
Fluvalinato	inseticida acaricida	não sistêmico	piretróide	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	II	18,4 (tópico)

\*I (extremamente tóxico); II (altamente tóxico); III (medianamente tóxico); IV (pouco tóxico).

\*\*estabelecido para abelhas por Tomlin, 2000.

Fonte: ANVISA, 2009; Tomlin, 2000.

Tabela 06: Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo no HPLC-UV.

Pesticida	Ponto de ebulição (°C)	Pressão de vapor (Pa), 20-25°C	log K <sub>ow</sub> *	Solubilidade** (gL <sup>-1</sup> )
Coumafós	-	1,3 x 10 <sup>-2</sup>	4,1	0,0015
Piraclostrobina	-	-	-	-
Flumetralina	-	3,2 x 10 <sup>-5</sup>	5,4	0,7 x 10 <sup>-4</sup>
Fluvalinato	90	□ 1,3 x 10 <sup>-2</sup>	4,3	1,03 x 10 <sup>-6</sup>

\*coeficiente de partição octanol:água

\*\*em água, 20-25°C

Fonte: Barceló, 1997; Tomlin, 2000.

Pirimicarbe é bastante utilizado nas plantações de alface, tomate, berinjela, batata entre outros e seu limite máximo de resíduos refere-se à soma de outros metabólitos, o pirimicarbe dietílico e a metilamina. Malationa é utilizado nas culturas de arroz, cacau, citros, pêssego e tomate; decompõe-se facilmente em meio alcalino ou ácido produzindo compostos isoméricos e similares que apresentam ação direta no sistema nervoso central (LARINI, 1999). A bifentrina tem aplicação em cultura de citros, feijão, frutas e em grãos. O fungicida procimidona da classe dicarboximida tem aplicação foliar nas culturas de alface, batata, cebola, citros, feijão e frutas em geral (ANVISA, 2009).

Coumafós, flumetralina e fluvalinato são acaricidas sintéticos permitidos pela UE, largamente utilizados para o controle do ácaro *Varroa jacobsoni*, entretanto podem ser utilizados também em culturas agrícolas. São instáveis em pH alcalino e por esse motivo podem permanecer no mel por aproximadamente 9 meses (KORTA, 2001). Não existe LMRs estabelecidos para tais compostos, todavia diversos países da UE estabeleceram seus próprios limites.

Flumetralina é um regulador de crescimento e tem aplicação foliar como antibrotante na cultura de fumo; esta substância pode induzir a perdas cromossômicas no tecido ósseo. Fluvalinato tem aplicação foliar nas culturas de algodão e café. A piraclostrobina, fungicida da classe estrobilurina, tem seu LMR definido como a soma do princípio ativo e seu metabólito carbamato. A atividade fungicida dessa substância consiste na inibição da respiração mitocondrial pela ligação do chamado sítio Q<sub>o</sub> do citocromo b, localizado na membrana mitocondrial do fungo (ANVISA, 2009; ABREU, 2006; KARAZAFIRIS, 2008).

Os carbamatos degradam-se relativamente rápido, são pouco absorvidos pelo organismo humano (não se acumulam em tecidos gordurosos), menos tóxicos que os fosforados e mais tóxicos que os clorados, além de inibidores reversíveis da acetilcolinesterase, AchE, responsável pela transmissão de impulsos nervosos no organismo (BARBOSA, 2004; BADIOU et al., 2008).

Os organofosforados são hidrossolúveis embora exista a probabilidade de restarem resíduos e subprodutos em níveis relativamente nocivos ao consumo humano, bem como a possível contaminação aguda e pontual (SILVA, 2005), atuam inibindo a AchE e são mais tóxicos que os organoclorados.

Os fungicidas são substâncias químicas ou biológicas que causam debilidade imunológica, lesões renais e, assim como os carbamatos e organofosforados, inibem a ação da AchE (LARINI, 1999).

Os piretróides agem no canal de sódio da membrana do nervo causando desordem neuromuscular, tais como perda da coordenação dos movimentos musculares voluntários, convulsões e morte (MENEZES FILHO, 2005). São pouco persistentes no meio ambiente, em meio alcalino são decompostos por hidrólise. São degradados no ambiente através de reações de hidrólise e oxidação. No homem as principais vias de absorção são a oral e intra-gástrica, dérmica e inalatória. Não apresentam atividade anticolinesterásica e determinam um pequeno efeito na sensibilidade muscular da acetilcolina (LARINI, 1999).

Os níveis de concentração dessas substâncias podem ser determinados por técnicas cromatográficas aliadas a métodos de extração convenientes. De fato, determinar resíduo de substâncias contaminantes em qualquer tipo de matriz requer um padrão de referência estabelecido que limita a concentração máxima permitida da substância na matriz de interesse, contudo não existe legislação oficial e nem um padrão internacional definido para mel ou qualquer outro produto apícola em relação ao controle de qualidade, o que dificulta a verificação se o nível de concentração do produto presente no alimento é seguro para o consumidor. O *Codex Alimentarius* não se refere a resíduos de pesticidas em mel, por considerar este um assunto de baixa prioridade (TILHE, 2003; FIDENTE et al., 2005). Por outro lado, a União Européia estabeleceu um nível de concentração para acaricidas em mel, mas não o estende para pesticidas usados na agricultura (PIRO et al., 2003). A legislação brasileira, por sua vez, adota a mesma posição do Codex, o que obriga a comparação com outros gêneros alimentícios devido a ausência de limites máximos de resíduos

(LMRs) estabelecidos para pesticidas em mel. Neste trabalho, a comparação é feita com os valores estabelecidos pela ANVISA para cultura de citros, uma vez que as abelhas apesar de generalistas visitam preferencialmente essas culturas para coletar o néctar (CARVALHO, 2006).

#### 2.4 – Métodos de análise

A determinação qualitativa e quantitativa de pesticidas em produtos da colméia é necessária para monitorar a contaminação desses produtos e garantir a saúde do consumidor. Em geral, esses compostos são determinados por técnicas cromatográficas capazes de determinar resíduos de pesticidas nesse tipo de matriz. O processo de análise de pesticidas envolve várias fases, sendo a etapa da pré-concentração/preparação da amostra uma das mais importantes, uma vez que retira as impurezas das amostras que serão levadas para a análise instrumental, pois os métodos instrumentais não oferecem as essenciais seletividade, sensibilidade ou independência das interferências de matriz (LUNA, 2003).

Embora os métodos de análise multirresíduo representem formas efetivas de quantificar uma larga escala de pesticidas em matrizes complexas tais como alimentos, é comum as porcentagens de recuperação dos analitos com valores acima ou abaixo do que seria considerado ideal (entre 70-120%), ou seja, como um aumento ou redução da resposta do detector e, ainda, desvios elevados nas análises (HAJSLOVÁ, 2003). Essas interferências da matriz são conhecidas como efeito matriz e derivam de vários processos físicos e químicos, bem como da natureza química da matriz, como demonstrado por Krueve et al., 2008.

Em suma, o efeito matriz é causado por constituintes da matriz que co-eluem com princípios ativos de interesse, resultando em alargamento da banda cromatográfica e acentuação ou inibição da concentração do analito, devido à mesma afinidade e competição pelos sítios ativos do liner, coluna ou detector. A presença ou ausência de tais efeitos podem ser demonstradas pela

comparação da resposta produzida pelo analito em solução com solvente orgânico com aquela obtida pela mesma quantidade do analito no extrato da matriz através de uma calibração mais confiável que pode ser obtida com a construção da curva analítica no extrato da matriz. Esse artifício minimiza o efeito matriz bem como a inserção de etapas de limpeza (clean-up) dos extratos através de sorventes auxiliares embora em alguns casos aumentem o tempo de análise e causem valores de recuperação menores. Além disso, a intensidade do efeito pode variar de uma amostra para outra, ou de acordo com a concentração do analito na matriz, como demonstrado por Hajslová et al. (2003), bem como o próprio sistema de detecção segundo Krue et al., 2008.

Durante as últimas décadas, vários métodos têm sido descritos na literatura para a determinação e quantificação de resíduos de pesticidas em mel, os quais envolvem LLE, SPE com detecção por cromatografia a gás (GC, do inglês *gas chromatography*) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*). Alguns desses métodos de extração consomem mais tempo e solvente devido as etapas envolvidas no preparo da amostra antes da análise cromatográfica muito embora, na atual conjuntura, os sistemas de separação cromatográfica, as técnicas de detecção e o preparo da amostra estejam caminhando em direção à simplificação e miniaturização (ZHU, 2007). O estudo de resíduos de diversas classes de pesticidas em mel já foi realizado em países como Espanha (CORTA et al., 2000; HERRERA et al., 2005; JIMÉNEZ et al., 2004), Grécia (TSIGOURI, 2003; BALAYIANNIS et al., 2008), Itália (TOTTI et al., 2006; FIDENTE et al., 2005; ROSSI et al., 2005), Suécia (JANSSON, 2000), Reino Unido (CALDOW et al., 2004; CHARLTON et al., 2007), Polônia (WILCZYNSKA et al., 2007), Índia (CHOUDHARY et al., 2008), Turquia (ERDOGRUL, 2007) dentre outros, como mostra a Tabela 07.

Tabela 07: Métodos descritos na literatura para extração de pesticidas de produtos apícolas.

Referência	Matriz	Método de extração	Analito	Solvente de extração	Análise
Chen et al., 2009	Mel	DLLME	Antibiótico	tetracloroetano em acetonitrila	HPLC-UV
Zhu et al., 2008	Mel	-	3 pesticidas	acetato de etila	HPLC-MS
Karazafiris et al., 2008	Geléia real	SPE	9 pesticidas	2mL acetato e 2 mL hexano	GC-ECD
Debayle et al., 2008	Mel	SPE	pesticidas e antibióticos	ACN:MeOH:DCM (50:25:25, v/v/v)	LC-MS/MS
Adamczyk et al., 2007	Cera de abelha	SPE	acaricidas	hexano:éter etílico (1:1)	LC-UV/DAD
Charlton et al., 2007	Abelhas	SPE	fungicidas	éter dietílico	GC-MS
Caldow et al., 2007	Frutas Mel	-	acaricida	-	GC-MS
Erdogrul, 2007	Mel	Extração em coluna	pesticidas	-	GC-MS GC-ECD
Totti et al., 2006	Abelhas	MSPD	pesticidas	10 mL DCM:MeOH (85:15, v/v)	LC-APCI-MS
Rissato et al., 2006	Mel	LLE	48 pesticidas	50 mL acetato de etila	GC-MS
Zhen et al., 2006	Mel	Extração por ultrassom	23 pesticidas	Hexano:acetato (7:3 v/v)	GC-EI/MS
Herrera et al., 2005	Mel	SPE	15 pesticidas 6 PCBs	40 mL MeOH:H <sub>2</sub> O (3:1, v/v)	GC-ECD/NPD

DCM – diclorometano; MeOH – metanol; ACN – acetonitrila

#### 2.4.1 – Dispersão da matriz em fase sólida

A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) é uma técnica de extração e limpeza introduzida por Barker e colaboradores em 1989, como aperfeiçoamento da SPE para evitar os diversos inconvenientes encontrados no manuseio dessa técnica, que tem encontrado aplicação particular como um processo analítico para preparação, extração e fracionamento de amostras sólidas e semi-sólidas, como mostra a Tabela 08. Diferentemente da SPE, a MSPD envolve a homogeneização, quebra celular, fracionamento e purificação da amostra em um processo único e eluição dos analitos com uma quantidade relativamente pequena de solvente. A extração e a purificação combinadas numa mesma etapa é uma notável vantagem da técnica MSPD, além do uso de quantidades pequenas de amostra e do menor tempo requerido para preparação da mesma fornecendo resultados similares. Os extratos obtidos são geralmente prontos para análise, mas se necessário, podem ser facilmente sujeitos a purificação direta do extrato para remoção de substâncias interferentes da matriz pelo uso de sorvente auxiliar ou uma segunda coluna no próprio processo MSPD (BARKER, 2007; BEYER, 2008; MORZYCKA, 2002; PICÓ, 2007).

Para amostras complexas como mel, a extração de pesticidas é complicada devido a grande quantidade de matéria orgânica na amostra, que afeta o resultado da análise. Uma substancial quantidade de cera, pigmentos e carboidratos nos extratos causa problema com a detecção cromatográfica devido ao bloqueio dos sítios ativos do liner e coluna, por essa razão a limpeza dos extratos é requerida antes da análise cromatográfica (MORZYCKA, 2002).

A dispersão da matriz em fase sólida combina aspectos de várias técnicas analíticas, realizando a ruptura da amostra enquanto dispersa seus componentes sobre um suporte sólido tal como Florisil, alumina, sílica gel, C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub> entre outros, produzindo um único material com a fase sólida da coluna o que permite um novo grau de fracionamento da amostra; o homogeneizado é

Tabela 08: Aplicações da MSPD para análise de resíduos de pesticidas em diversas matrizes.

Referência	Matriz	Analito	Suporte sólido	Co-sorvente	Eluente	Análise
Macedo et al., 2009	leite de vaca	inseticida	C <sub>18</sub>	Florisil	10 mL acetonitrila	GC-MS
Llasera, 2009	fígado e músculo bovino	5 pesticidas	C <sub>18</sub>	Sílica	15 mL acetonitrila	LC-UV/DAD
Abhilash, 2009	Frutas, vegetais e plantas medicinais	pesticidas	Florisil	Alumina neutra	10 mL Hexano:acetato (3:1, v/v)	GC-ECD
Santos et al., 2008	própolis	4 pesticidas	Sílica	Florisil	20 mL DCM:acetato (9:1, v/v)	GC-MS
Zhu et al., 2007	vinho	fungicidas	Florisil	-	5 mL acetato:hexano (70:30, v/v)	GC - ECD
Silva, 2007	polpa de coco	8 pesticidas	C <sub>18</sub>	Florisil	40 mL acetonitrila:hexano	GC-MS
Michel et al., 2006	grão de trigo	fungicidas	Sílica gel	-	MeOH:DCM (1:5, v/v)	LC-UV/DAD
Valsamaki et al., 2006	ovos de galinha	20 OCs 8 PCBs	Florisil	-	10 mL DCM: hexano (1:1, v/v)	GC-ECD
Menezes Filho, 2005	tomate	5 pesticidas	Alumina neutra	Florisil	20 mL diclorometano	GC-MS
Dórea et al., 2004	quiabo	5 pesticidas	Sílica gel	Alumina neutra	40 mL acetato de etila	GC-MS
Albero et al., 2004	cenoura, uva e sucos	15 herbicidas	Florisil	-	5 mL acetato de etila	GC-MS

OCs – organoclorados; PCBs – bifenilas policloradas; DCM – diclorometano; MeOH - metanol

então transferido para uma coluna de onde será eluído com solvente ou mistura deles.

A escolha do suporte sólido ideal e do solvente de eluição recai na polaridade do analito e na natureza da matriz, de modo que proporcione apenas o isolamento dos compostos de interesse e minimize a eluição dos compostos interferentes da matriz (DÓREA, 2004; BOGIALLI, 2007; MENEZES FILHO, 2005). Posterior à etapa de pré-concentração/purificação da amostra, o extrato é analisado comumente por cromatografia a gás ou cromatografia líquida dependendo da sua polaridade, volatilidade e estabilidade térmica.

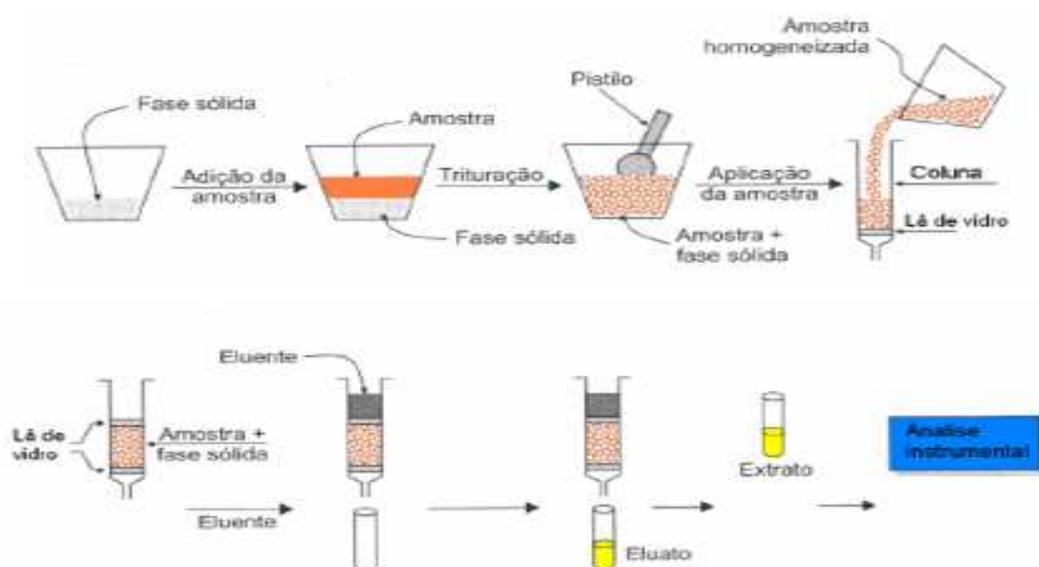


Figura 05: Esquema representativo do processo de extração MSPD. Adaptado de Barker, 2000.

#### 2.4.2 – Técnicas cromatográficas de análise

A cromatografia a gás tem sido extensamente usada para determinação/quantificação de pesticidas (Tabela 08), utilizando diferentes sistemas de detecção seletivos a determinados grupos funcionais presentes nas moléculas, tais como o detector de captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detector*), detecção de nitrogênio e fósforo (NPD, do inglês *nitrogen-phosphorus detection*), e por fotometria de chama (FPD, do inglês *flame photometry detector*).

A GC é uma técnica rápida com poder de resolução excelente empregada na análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis. No entanto, não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando, muitas vezes, de técnicas auxiliares para identificação segura dos compostos presentes na amostra. A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é uma técnica analítica que devido a sua associação, através de interface, com as técnicas cromatográficas, permite não apenas detectar e quantificar os analitos presentes na amostra mas também identificar esses componentes com base na sua estrutura (RIAL-OTERO, 2007; AQUINO NETO, 2003).

A GC acoplada a MS é utilizada na identificação de componentes presentes em sistemas naturais e biológicos, permitindo a caracterização de substâncias em diversas amostras e na quantificação dos compostos. O espectrômetro de massas funciona como detector de caráter universal e alta sensibilidade, bastante eficiente na análise de misturas complexas fornecendo informações qualitativas através da interpretação dos espectros de massa, característico de cada substância. Tais propriedades o tornam um dos mais apropriados métodos físico-químicos para elucidação e determinação estrutural de diversos compostos orgânicos (COLLINS, 2006; SKOOG, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência é empregada na separação e análise qualitativa e quantitativa de compostos termicamente instáveis, não voláteis ou de elevada polaridade. A separação se dá pela interação entre soluto, fase estacionária (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub> ou ciano) e fase móvel (aquosa ou não-

aquosa). Diferentemente da GC, a fase móvel é um parâmetro importante no processo de separação, já que por si mesma pode mudar a seletividade das separações. Na cromatografia no modo normal (fase estacionária mais polar que fase móvel), os solventes utilizados são normalmente uma mistura de solventes orgânicos sem adição de água enquanto que na cromatografia em modo reverso (fase móvel mais polar que fase estacionária), é comum o uso de fases móveis aquosas. Os detectores seletivos (UV, fluorescência, eletroquímico, dentre outros) utilizados em HPLC são sensíveis a alguma propriedade do soluto e os não-seletivos (índice de refração, infravermelho, espalhamento de luz) detectam propriedades existentes tanto na fase móvel como nos solutos (COLLINS, 2006; BARCELÓ, 1997).

### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 – Geral

Desenvolver método analítico para determinação de resíduos de pesticidas que podem ser incorporados ao mel de abelha de maneira direta pela prática apícola e/ou indireta pelo ambiente.

#### 3.2 – Específicos

Identificar os pesticidas utilizados nas culturas em que abelhas são úteis à polinização e aqueles mais comuns para o tratamento de doenças que afetam as abelhas.

Obter as condições cromatográficas ideais para análise dos pesticidas por GC-MS e HPLC-UV/DAD.

Desenvolver e validar procedimento analítico para extração dos resíduos de pesticidas utilizando dispersão da matriz em fase sólida (MSPD).

Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras de mel de abelha comercializados em Aracaju/SE.

## 4 – EXPERIMENTAL

### 4.1 – Materias utilizados

Béquer (100 mL), balão volumétrico (1;5;10 e 25 mL), proveta (10 a 25 mL), vial (1;5;10 e 50 mL), balão de fundo redondo (50 mL), seringa de polietileno (20 mL), pipeta Pasteur, micropipetas de volumes variados 0,5-10  $\mu\text{L}$ , 10-100 $\mu\text{L}$  e 100-1000 $\mu\text{L}$  (Jencons, modelo Sealpette), lâ de vidro, vidro de relógio, bastão de vidro, espátula, pinça, cadinho, pistilo.

### 4.2 – Reagentes e adsorventes

Diclorometano, acetona, acetato de etila, n-hexano (Tedia Company, USA) e, acetonitrila (Mallinckrodt Chemicals, USA) todos grau HPLC; sílica gel 60 – 200 mesh (J. T. Baker, USA), alumina neutra 70 – 290 mesh (Macherey – Nagel, Alemanha), Florisil 60 – 100 mesh (Sigma, USA),  $\text{C}_{18}$  50  $\mu\text{m}$  – 65  $\text{Å}$  (Waters, USA), sulfato de sódio anidro (Merck, Alemanha), grau p.a.

### 4.3 – Equipamentos utilizados

Balança analítica *Sartorius TE214S*, evaporador rotatório *Fisatom 802D*, Sistema para SPE *Vacuum Manifold* (Varian, Walnut Creek, CA, EUA), cromatógrafo à gás 2010 acoplado a espectrômetro de massas modelo QP2010plus Shimadzu (Kyoto, Japão), cromatógrafo à líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo *Prominence*.

### 4.4 – Padrões e soluções

As soluções estoques dos padrões certificados (AccuStandard, USA) de pirimicarbe 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , bifentrina 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , malationa 406  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e procimidona 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas em diclorometano, enquanto piraclostrobina 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada em acetona. As soluções estoques de flumetralina 392  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , fluvalinato 380  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , coumafós 308  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foram preparadas em acetato de etila. A partir destas foi preparada 10 mL da solução

intermediária dos analitos com concentração  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  da qual foram preparadas soluções de trabalho para a curva analítica e ensaios de recuperação com concentração entre  $0,2 - 3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.5 – Obtenção da amostra de mel

As amostras de mel não contaminadas (testemunha) foram adquiridas em supermercado de Aracaju, Sergipe, e armazenada no laboratório sob temperatura ambiente para evitar cristalização. A amostra utilizada foi produzida e envazada em Maceió, Alagoas.

#### 4.6 – Condições cromatográficas de análise

##### 4.6.1 – Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas

O cromatógrafo a gás 2010 acoplado a espectrômetro de massas QP2010plus Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com auto injetor AOC – 20i operou com coluna DB5MS - 5% fenil e 95% polidimetilsiloxano ( $30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ ) J & W Scientific, com rampa de temperatura  $60^\circ\text{C}$  (1,5 min); taxa de aquecimento  $6^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $300^\circ\text{C}$ , gás de arraste He (pureza 99,995%) com vazão constante de  $1,6 \text{ mL min}^{-1}$ , modo splitless (50s) de injeção e volume de injeção  $1 \mu\text{L}$ . Temperatura do injetor e da interface mantidas a  $250^\circ\text{C}$  e  $280^\circ\text{C}$ , respectivamente. O espectrômetro de massas operou com monitoramento de íons seletivos (SIM) no modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV). Tempo total da corrida 30 minutos.

##### 4.6.2 – Cromatógrafo a líquido com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos

O cromatógrafo a líquido Shimadzu Prominence (software LC Solution) equipado com auto injetor SIL 20A, desgaseificador DGU-20A, sistema de bombas recíprocas LC-6AD/7A e CBM-20A e detector espectrofotométrico com arranjo de diodos, operou com coluna analítica Synergi  $4\mu$  Polar – RP 80A ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ) Phenomenex. A análise foi realizada em modo gradiente de

eluição com fase móvel acetonitrila:água, aumentando a proporção de 60% a 95% de acetonitrila em 8 min, reduzindo para 90% em 7 min e, finalmente reequilibrando a 60% por 10 min. O comprimento de onda ( $\lambda$ ) selecionado para estudo foi 200 nm, o volume de injeção foi 20  $\mu\text{L}$  e a vazão da fase móvel foi de 0,8  $\text{mL min}^{-1}$ . Tempo de corrida 30 min.

#### 4.7 – Método de extração por MSPD

##### 4.7.1 – Extração dos pesticidas para análise no GC-MS

O mel foi pesado (1,0 g) em cápsula de porcelana. Adicionou-se o adsorvente (1,0 g de sílica) e homogenizou-se por aproximadamente 3 min até a obtenção de uma massa uniforme. Em seguida, transferiu-se o homogeneizado (matriz + adsorvente) para a seringa de polietileno contendo a lã de vidro (base de sustentação) e 1,0 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. A eluição dos pesticidas foi realizada com 10 mL de acetonitrila e o extrato foi concentrado em evaporador rotatório (80 rpm; 50°C) por aproximadamente 15 min e, em seguida, sob fluxo de  $\text{N}_2$  até 1,0 mL. Uma alíquota de 1,0  $\mu\text{L}$  foi analisado por GC-MS. A Figura 04 sintetiza as etapas do procedimento de extração.

##### 4.7.1 – Extração dos pesticidas para análise no HPLC-UV

O mel foi pesado (1,0 g) em cápsula de porcelana. Adicionou-se o adsorvente (1,5 g de Florisil) e homogenizou-se por aproximadamente 5 min até a obtenção de uma massa uniforme. Em seguida, transferiu-se o homogeneizado (matriz + adsorvente) para a seringa de polietileno contendo a lã de vidro (base de sustentação) e 1,0 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. A eluição dos pesticidas foi realizada com 20 mL de uma mistura dos solventes acetonitrila:acetato de etila (1:4, v/v) e o extrato foi concentrado em evaporador rotatório (80 rpm; 50°C) por aproximadamente 15 min e, em seguida, sob fluxo de  $\text{N}_2$  até 1,0 mL. Uma alíquota de 20,0  $\mu\text{L}$  foi analisado por HPLC-UV. A Figura 04 apresenta as etapas do procedimento de extração.

#### 4.8 – Limpeza do material

Todo o material utilizado no preparo das soluções e no processo de extração foram enxaguados em água corrente (3x), deixados de molho em solução de Extran 2% por 24 horas, novo enxague com água corrente (3x), lavados com água destilada e, em seguida com acetona, secos em estufa ou sob condição ambiente para então serem guardados com as extremidades cobertas com papel filme ou laminado.

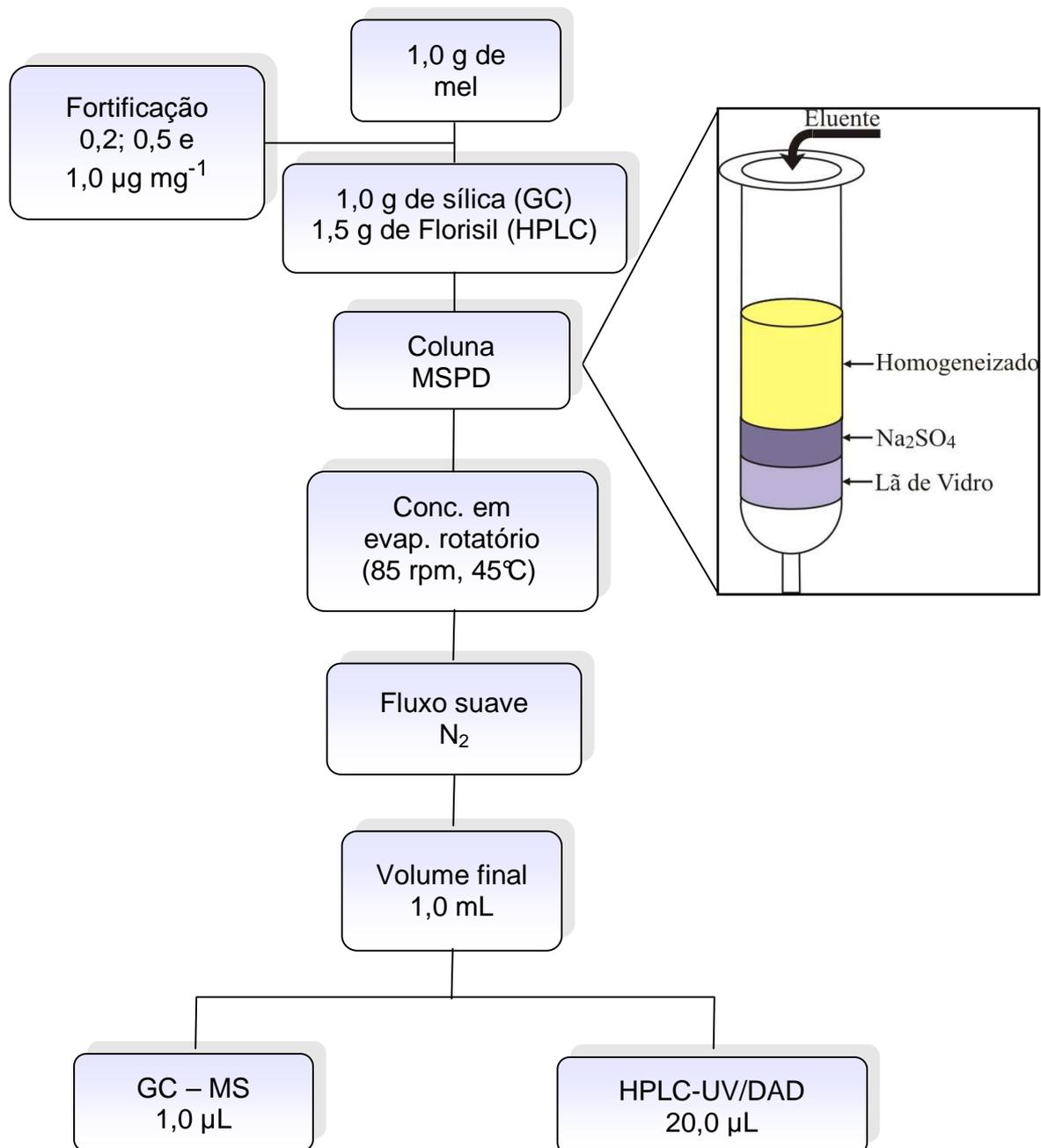


Figura 06: Fluxograma geral do processo de extração e coluna MSPD.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – Desenvolvimento do método analítico

Para o desenvolvimento de métodos multirresíduos de análise de pesticidas, é necessário explorar as características físico-químicas dos analitos visando a alta seletividade e sensibilidade na detecção e quantificação, melhores desempenho na extração e pré-concentração, maior rapidez no procedimento analítico e menor custo econômico e ambiental da análise, pois na maioria das vezes os compostos possuem características distintas, no que se refere a polaridade, volatilidade ou ainda nas propriedades de detecção (SABIN, 2007).

Os pesticidas em estudo foram quantificados pelo método de padronização externa e a eficiência da extração para desenvolvimento do método foi analisada em termos de recuperação dos analitos em ensaios (nível de fortificação  $1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ) realizados em duplicata. A eficiência foi calculada comparando as áreas dos picos de cada composto extraído nos ensaios com aquela obtida da solução padrão preparada no extrato da matriz pela diluição de  $500 \mu\text{L}$  da solução padrão dos pesticidas  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em  $500 \mu\text{L}$  do extrato da amostra testemunha da matriz, de forma a minimizar os erros por excesso ou redução gerados pelo efeito matriz, bastante acentuado em matrizes complexas como o mel. Esse efeito é atribuído a uma elevada transferência de compostos da matriz para o extrato durante a extração dos analitos de interesse, os quais podem co-eluir junto ou muito próximos ao tempo de retenção dos pesticidas bem como reprimir ou aumentar a área do mesmo.

Um método analítico para determinação de resíduos de pesticidas em matrizes complexas requer o isolamento dos resíduos da matriz e limpeza dos extratos antes da análise cromatográfica. A MSPD é um método de extração que envolve diversas variáveis no seu desenvolvimento, entretanto sua aplicação para análises de rotina é notável, pois fornece resultados similares a procedimentos clássicos. Para desenvolver um método de extração por MSPD

é necessário testes para escolha do adsorvente e proporção matriz:adorvente ideal, de forma a promover a dispersão homogênea da matriz no suporte sólido. As principais fases utilizadas são sílica, alumina e Florisil, entretanto há casos em que, o analito é adsorvido de forma irreversível a este suporte sólido (SABIN, 2007). Além disso, o solvente de eluição deve ser escolhido de acordo com a polaridade dos analitos, o volume do solvente e a proporção entre solventes diferentes para garantir a eluição completa dos pesticidas.

#### 5.1.1 – Otimização das condições cromatográficas de análise

O desenvolvimento e otimização do sistema GC-MS foi iniciado pela escolha das condições de separação incluindo características da fase estacionária e programação de temperatura, buscando-se sempre aumento de sensibilidade, seletividade e redução de tempo de análise.

Para obter as condições cromatográficas ideais no equipamento, foram realizadas injeções individuais das soluções padrão dos analitos em solvente (diclorometano, DCM) para identificação dos tempos de retenção ( $t_R$ ) e ajuste das condições propícias à separação cromatográfica de análise simultânea dos resíduos. As injeções individuais das soluções padrão dos analitos foram realizadas no modo de varredura linear (SCAN) para obtenção dos tempos de retenção e identificação dos picos mais intensos de forma a promover um aumento da resposta analítica quando o espectromêtro de massa operasse no modo monitoramento de íons seletivos (SIM, do inglês *single ion monitoring*). Para cada analito, íons característicos foram monitorados como estão dispostos na Tabela 09.

Tabela 09: Pesticidas em estudo com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ) no GC-MS e fragmentos utilizados para a sua identificação nos extratos das amostras.

Pesticidas	$t_R$ (min)	Íons monitorados (m/z)
Pirimicarbe	16,7	72, 166, 238
Malationa	18,1	93, 127, 256
Procimidona	19,4	96, 186, 283
Bifentrina	22,8	165, 181

A resposta do detector é mostrada na Figura 07 pelo cromatograma da solução padrão dos analitos em concentração  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  obtidos no GC-MS, operando no modo SIM.

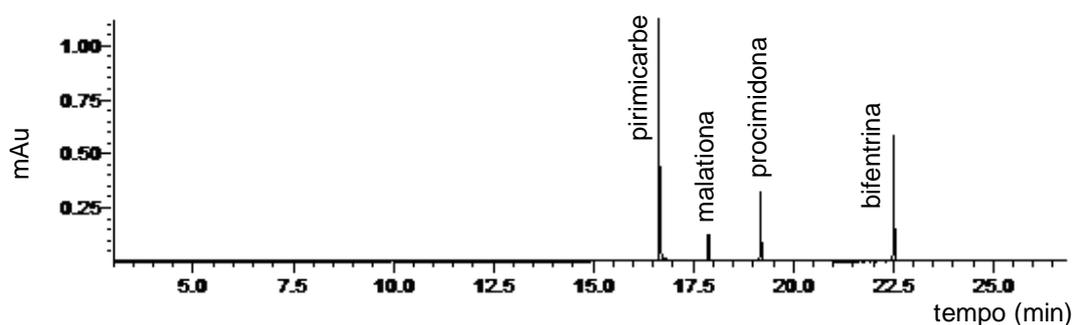


Figura 07: Cromatograma da solução padrão dos pesticidas em estudo (modo SIM),  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em acetonitrila, obtido por GC-MS. Para condições cromatográficas ver item 4.7.1.

Considerado como uma amostra analítica, o mel é uma das misturas mais complexas produzida naturalmente, pois possui diversos compostos, tais como carboidratos, cera, matéria orgânica, íons inorgânicos dentre outros (HERRERA, 2005). Dessa forma, para avaliar um provável efeito matriz na resposta cromatográfica e identificação de possíveis compostos interferentes da matriz, foi realizada uma injeção da amostra testemunha em modo SCAN.

Nenhum pico interferente foi observado nas áreas de interesse, pois a maioria dos compostos da matriz é detectada até o 14<sup>o</sup> minuto da corrida e, por esse motivo não representa interferência direta neste trabalho, no qual os analitos possuem tempos de retenção acima de 16 minutos (Figura 07).

Nas condições cromatográficas estabelecidas o mel apresenta poucos interferentes, o que permite a análise de outros pesticidas que sejam eluídos em tempos menores.

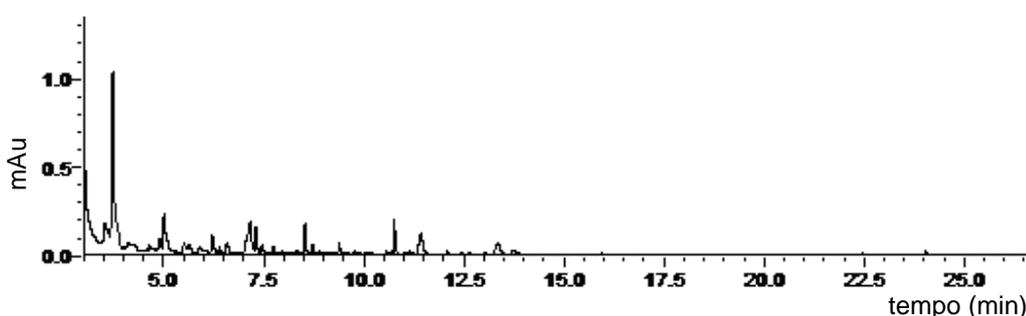


Figura 08: Cromatograma da amostra testemunha de mel eluída com acetonitrila (10 mL), obtido no GC-MS modo SCAN. Para condições cromatográficas ver item 4.7.1.

No HPLC-UV, os testes para otimizar as condições cromatográficas de separação foram realizadas em diferentes colunas, fase móvel e gradientes de eluição. Injeções individuais dos padrões analíticos dos pesticidas coumafós, piraclostrobina, flumetralina e fluvalinato foram realizadas em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) diversos para reconhecimento dos tempos de retenção ( $t_R$ ) e  $\lambda$  de absorção máxima para identificação e quantificação dos mesmos. A Tabela 08 apresenta os pesticidas em análise e seus respectivos tempos de retenção e comprimentos de onda máximo de absorção.

Tabela 10: Pesticidas em estudo no HPLC-UV com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ) e comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{máximo}}$ ).

Pesticidas	$t_R$ (min)	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)
Coumafós	9,6	313
Piraclostrobina	10,7	242
Flumetralina	12,2	254
Fluvalinato	14,5	254

A condição inicial com coluna  $C_{18}$  Microsorb-MV 100-5  $C_{18}$  (250 x 4,6 mm x 1/4") Varian e gradiente binário ACN:H<sub>2</sub>O não forneceu boa resolução, pois um par de princípios ativos - coumafós e piraclostrobina - apresentaram tempos de retenção muito próximos e, conseqüentemente, resolução inadequada com picos sobrepostos. Para promover a separação efetiva, vários gradientes da fase móvel ACN:H<sub>2</sub>O bem como mudança da fase móvel para MeOH:H<sub>2</sub>O foram estabelecidas sem alcançar êxito, pois a pressão da bomba atingiu o limite do equipamento. A separação dos componentes deste par foi possível apenas quando a coluna ciano Microsorb-MV 100-5 CN (250 x 4,6 mm x 1/4") Varian, fase polar quimicamente ligada usada em modo normal ou reverso de eluição, foi utilizada com gradiente binário ACN:H<sub>2</sub>O. Entretanto, com o elevado número de injeções, a resolução da mesma reduziu e os picos já não eram bem resolvidos. Dessa forma, uma coluna  $C_{18}$  modificada (Synergi) foi testada utilizando o mesmo gradiente binário (ACN:H<sub>2</sub>O), a qual forneceu cromatograma bem definido livre de interferentes e separação efetiva, como mostra a Figura 09.

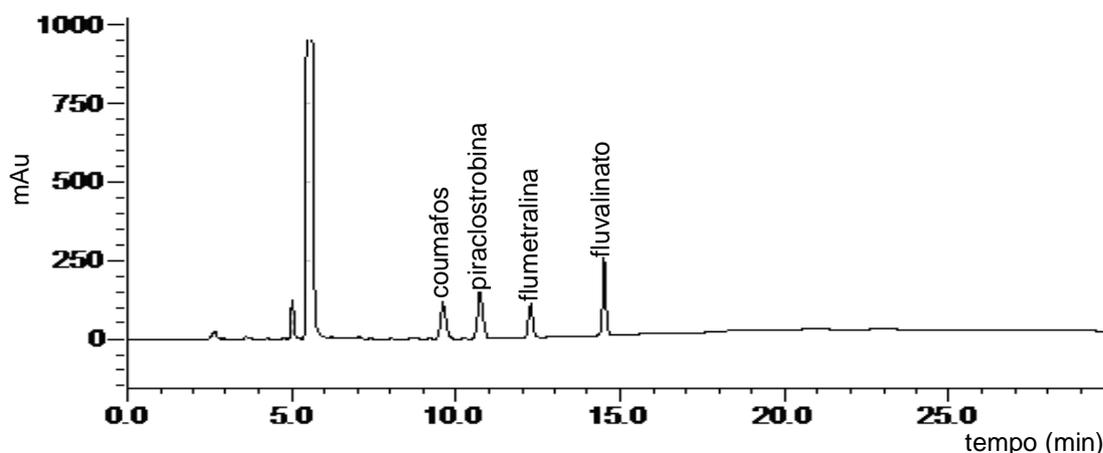


Figura 09: Cromatograma da mistura padrão dos pesticidas em estudo  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em acetonitrila obtido por HPLC-UV. Para condições cromatográficas ver item 4.7.2.

5.1.2 – Ensaios para desenvolvimento do método MSPD de extração dos pesticidas em análise por GC-MS

5.1.2.1 – Escolha do adsorvente e proporção matriz:adsorvente

No procedimento de MSPD a matriz deve estar dispersa no adsorvente formando uma mistura uniforme para promover o rompimento da estrutura da matriz e permitir a interação dos pesticidas aos compostos da mesma de forma que facilite a remoção destes da coluna pelo solvente de eluição. Os ensaios iniciais para escolha do adsorvente apropriado e da proporção adequada adsorvente:amostra foram realizados de maneira qualitativa com sílica, alumina,  $C_{18}$  e Florisil como suportes sólidos em diversas proporções com o mel tais como, 1:1, 1:2 e 1:3 (m/m) e eluição com 20 mL de acetato de etila, um solvente de característica medianamente polar. Os melhores resultados apontaram sílica e Florisil como suportes ideais, visto que a fase única formada por esses componentes apresentou melhor uniformidade quando comparadas a  $C_{18}$  e

alumina que criaram uma fase floculada dificultando a passagem do eluente formando caminhos preferenciais além da grande quantidade utilizada para dispersão do mel, o que não é adequado, visto que o método busca miniaturização do consumo de reagentes e sorventes. Dessa forma, os ensaios subsequentes foram realizados apenas com sílica e Florisil em proporções 1:1 e 1:1,5 (m/m) com o mel, respectivamente e eluição com 20 mL de hexano (apolar) e diclorometano (polaridade intermediária). Em 2002, Morzycka demonstrou a eficiência desses suportes sólidos para extração de inseticidas em abelhas utilizando dispersão da matriz em fase sólida.

A sílica e o Florisil são adsorventes com características polares. Florisil é o sorvente mais polar, frequentemente utilizado em análise de resíduos de pesticidas; entretanto, pode ocasionar adsorção irreversível com pesticidas de caráter polar sendo por esse motivo utilizado com reservas nessas condições. Sua utilização é preferida para limpeza de pesticidas apolares em matrizes altamente gordurosas devido a sua facilidade em reter lipídios (DOPICO-GARCIA et al., 2007). A sílica possui superfície ligeiramente ácida que facilita a retenção de compostos básicos, e propriedades mais polares que o Florisil interagindo com mais facilidade com pesticidas mais polares (LANÇAS, 2004; SABIN, 2007; ZHU et al., 2007; LLASERA, 2009).

Nos ensaios realizados as recuperações atingiram valores diferenciados (Figuras 10 e 11). Dado a característica polar dos analitos, quando sílica e Florisil foram utilizados, o eluente apolar e com menor força eluotrópica em sílica (hexano) não foi eficiente para extração dos compostos chegando a atingir recuperações abaixo de 1%. Seu uso é bastante útil para eluição de pesticidas com características mais apolares. Os analitos mais polares como o pirimicabe, procimidona, flumetralina, fluvalinato e piraclostrobina geralmente tem grupos amino e por esse motivo possuem probabilidade de interações iônicas secundárias com os grupos silanois residuais na superfície da sílica que solventes menos polares não conseguem romper. Essas interações iônicas entre analitos e grupos silanois residuais pode ser evitada com a adição de cátions competitivos como a amônia ou trietilamina ao eluente ou ainda usando

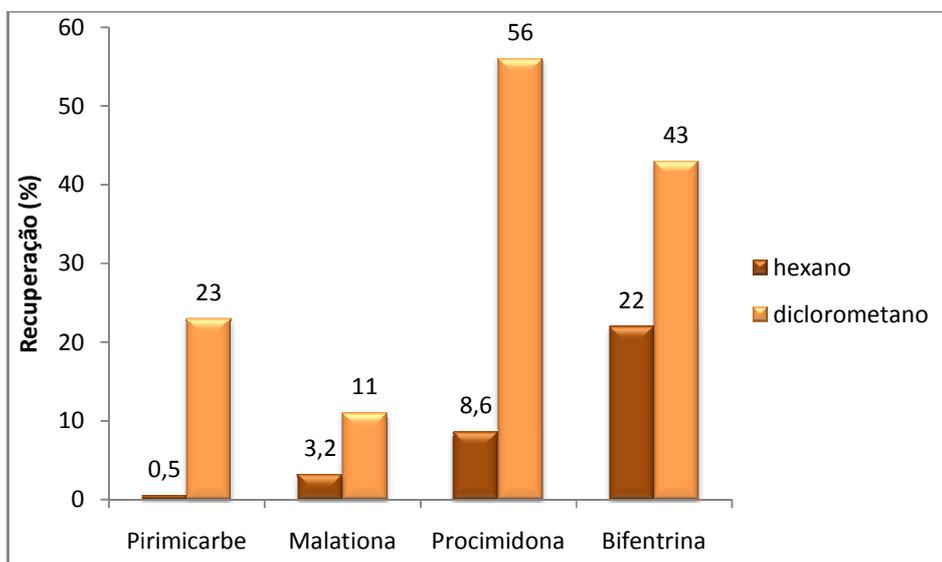


Figura 10: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando **sílica** como suporte sólido e eluição com 20 mL dos solventes hexano e diclorometano. Para condições cromatográficas de análise ver item 4.7.1.

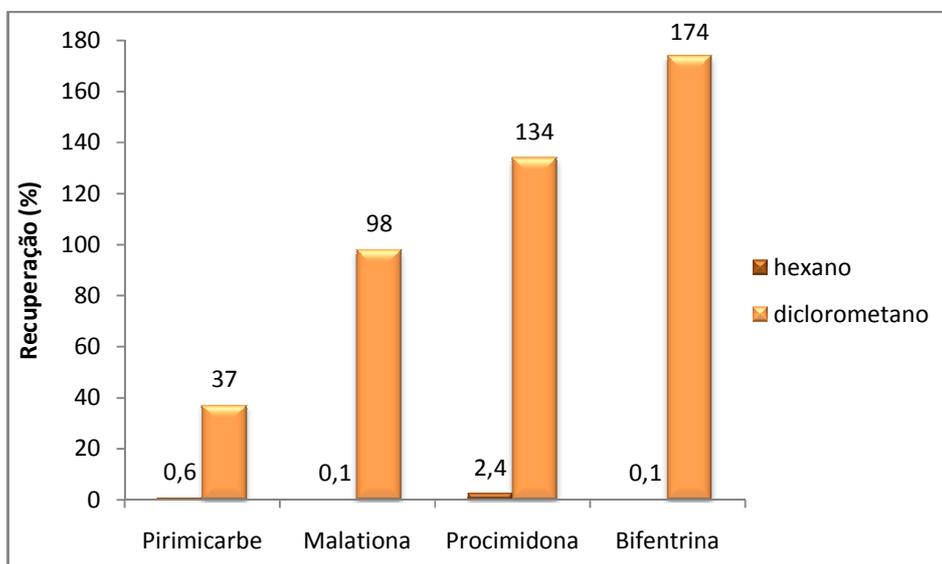


Figura 11: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando **Florisil** como suporte sólido e eluição com 20 mL dos solventes hexano e diclorometano. Para condições cromatográficas de análise ver item 4.7.1.

um tampão de elevada força iônica desde que os analitos sejam estáveis em meio alcalino (KORTA et al., 2001).

Dentre os resultados obtidos, as melhores recuperações médias aparecem nas extrações efetuadas com um solvente de característica polar em relação ao hexano, como o diclorometano, com valores entre 11-56% quando a sílica foi utilizada como suporte sólido e 37-174% com o Florisil. Este último arrastou os analitos de interesse, mas, por outro lado, também arrastou compostos interferentes, responsáveis pela recuperação elevada da bifentrina (174%) e procimidona (134%), no ensaio com Florisil, evidenciando efeito matriz. Entretanto, os valores encontrados podem ser considerados dentro do limite, visto que não houve uso da etapa de limpeza (solvente auxiliar), responsável pela retenção dos compostos endógenos da matriz, nestes ensaios.

#### 5.1.2.2 – Ensaios para seleção do solvente de eluição

Um solvente apropriado ou mistura de solventes deve permitir a eluição dos analitos livres dos componentes da matriz bem como melhorar as recuperações. A seleção do solvente apropriado leva em consideração as polaridades dos analitos e dos solventes (VALSAMAKI, 2006). Para os compostos mais polares a recuperação aumenta com o aumento da polaridade do solvente. Esta tendência foi observada em ensaios mantendo a proporção matriz:adsorvente para os dois ensaios utilizando solventes com características mais polares, tais como acetona, acetonitrila e uma mistura hexano:acetato de etila (1:4, v/v). Os valores médios de recuperação obtidos nesses ensaios (Figuras 12 e 13) foram maiores comparados a ensaios anteriores com hexano e diclorometano (Figuras 10 e 11).

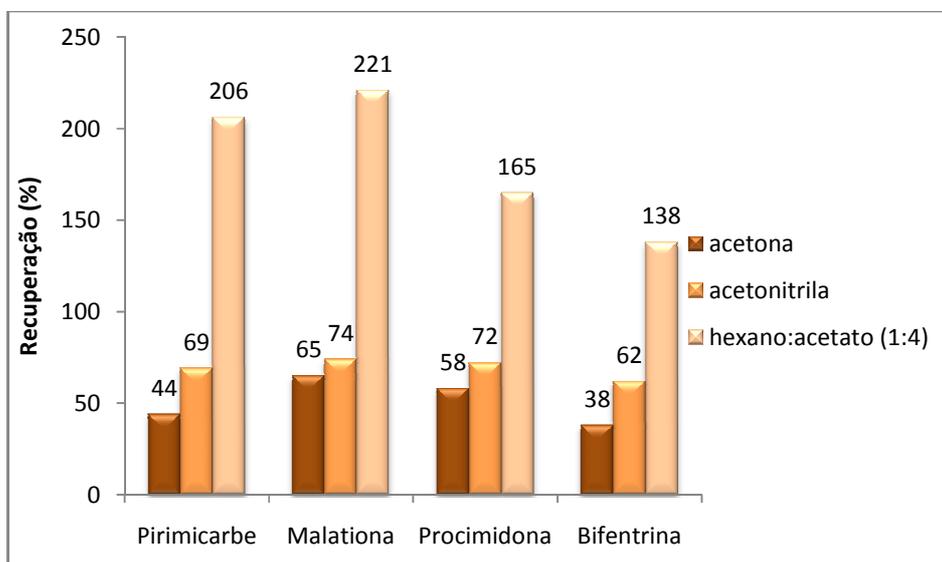


Figura 12: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando **sílica** como suporte sólido e eluição com 20 mL dos solventes acetona, acetonitrila e mistura de solventes hexano:acetato de etila (1:4, v/v).

A acetonitrila, o solvente de polaridade superior a acetona e a mistura hexano:acetato (1:4, v/v), eluiu com maior eficiência os pesticidas em interesse nos ensaios com sílica. A mistura de solventes hexano:acetato (1:4, v/v), de caráter menos polar extraiu além dos pesticidas de interesse, os compostos endógenos da matriz ocasionando efeito matriz acentuado, com valores de recuperação entre 140 (bifentrina)-221% (malationa). Os valores médios de recuperação oscilaram entre 62-74% para acetonitrila e, 38-65% para a acetona, evidenciando a superior eficiência da extração com acetonitrila nestes ensaios.

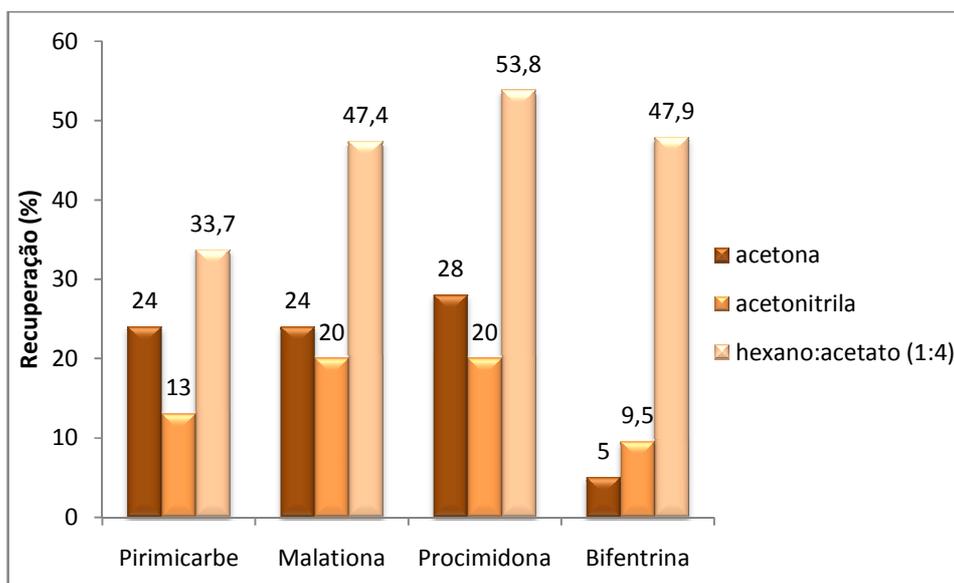


Figura 13: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando **Florisil** como suporte sólido e eluição com 20 mL dos solventes acetona, acetonitrila e mistura de solventes hexano:acetato de etila (1:4, v/v).

Com o Florisil, a mistura de solventes hexano:acetato de etila (1:4, v/v) mostrou-se mais eficiente na extração dos analitos comparada aos solventes acetona (5,0-28%) e acetonitrila (9,5-20%), com recuperação média entre 34-54%. Entretanto esses baixos valores de recuperação (em relação a ensaios com sílica) obtidos quando Florisil foi utilizado como suporte sólido evidenciam uma provável interação forte dos compostos com o adsorvente ou eluição mal efetuada de forma que nem um solvente polar conseguiu romper. Dessa maneira, os ensaios posteriores foram realizados apenas com sílica e eluição com acetonitrila pois este foi o procedimento que apresentou melhores valores de recuperação média (62-74%).

### 5.1.2.3 – Ensaios para seleção do volume de solvente

Os testes para escolha do volume de solvente utilizado para extração foram realizados com 10, 15 e 20 mL de acetonitrila mantendo sílica como suporte sólido em proporção 1:1 com a amostra de mel.

Os resultados sugerem similaridade nas recuperações obtidas dos ensaios com uma pequena redução no percentual de recuperação para a maioria dos pesticidas, exceto para malationa, na qual foi observado um aumento na recuperação quando o volume foi de 15 para 20 mL. Essa variação pode ser explicada pela faixa de dispersão dos valores de recuperação, a qual não foi calculada neste trabalho.

Dessa forma, o volume escolhido para eluição dos pesticidas foi 10 mL de acetonitrila, como é mostrado na Figura 14.

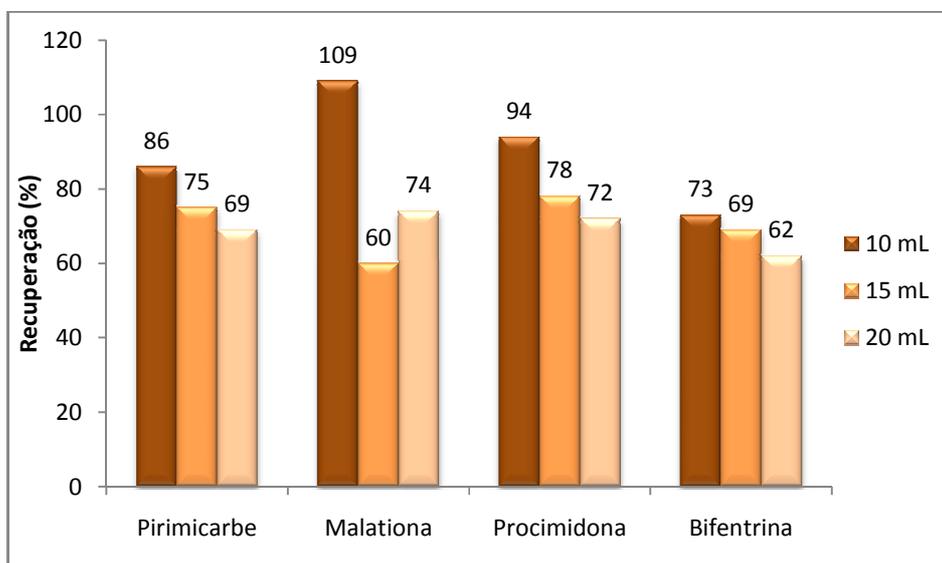


Figura 14: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando sílica como suporte sólido e **diferentes volumes do solvente de eluição** acetonitrila.

#### 5.1.2.4 – Ensaios para seleção de sorvente auxiliar (*clean up*)

A etapa de limpeza (*clean up*) na coluna de MSPD tem a finalidade de reter os compostos endógenos da matriz para obtenção de extratos mais limpos, de modo que a influência da matriz seja minimizada e a quantificação não seja errônea. Sua utilização tem se mostrado muito útil na retenção dos compostos endógenos da matriz em alguns trabalhos descritos na literatura (NAVARO et al., 2002; LLASERA et al., 2009; FERRER et al., 2005). Nesse trabalho foram testados três tipos de sorventes auxiliares (Florisil, alumina e C<sub>18</sub>), 1,0 g de cada. A alumina tem caráter anfótero, ou seja, possui características alcalinas, embora possa também ser preparada para apresentar característica neutra ou ácida (COLLINS, 2006). A sílica modificada, C<sub>18</sub>, possui caráter apolar, e facilita a retenção de espécies lipofílicas.

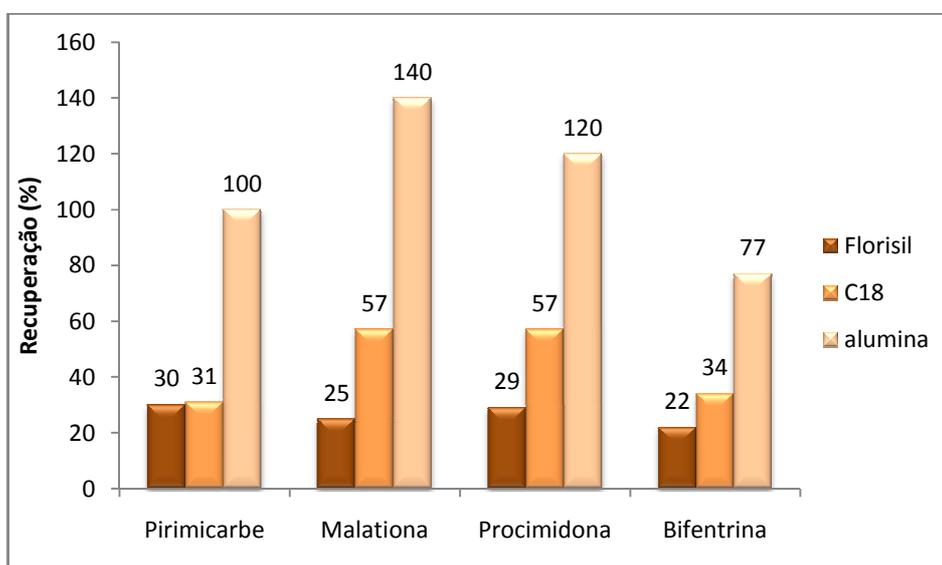


Figura 15: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando sílica como suporte sólido, eluição com 10 mL de acetonitrila e **diferentes co-sorventes**.

Os valores de recuperação (Figura 15) obtidos estão abaixo do valor considerado aceitável segundo Ribani (2004) - 120% para amostras complexas - principalmente quando a extração é realizada com sorventes auxiliares, Florisil e C<sub>18</sub>, responsável pela limpeza do extrato e conseqüente minimização do efeito matriz. Porém, nestes experimentos, os sorventes auxiliares utilizados além de reter os interferentes da matriz, também provocaram a retenção dos analitos. Essa tendência é comum quando se trata da purificação do extrato em relação a recuperação adequada dos pesticidas e deve ser avaliada cuidadosamente (FERRER et al., 2005).

O processo de limpeza com Florisil produziu extratos limpos e, conseqüentemente, melhores cromatogramas. Todavia, esse adsorvente fornece recuperações bem inferiores (22-30%) quando comparadas a outros adsorventes. Por outro lado, o método mostrou melhor eficiência no ensaio adsorvente sílica/co-coluna alumina, o qual apresentou recuperação entre 77% a 140%, valores aceitáveis exceto para malationa.

Apesar desse resultado favorável, optou-se pela retirada do sorvente auxiliar visto que o ensaio em que a matriz foi homogeneizada com sílica e a eluição dos analitos foi efetuada com 10 mL de acetonitrila, mostrou-se eficiente para extração dos analitos com valores médios de recuperação entre 73-109%, aceitáveis para trabalhar com análise de resíduos e, cromatogramas livres de interferentes, como pode ser observado na Figura 20 apresentada na página 57.

### 5.1.3 – Ensaios de desenvolvimento do método MSPD para extração dos pesticidas em análise por HPLC-UV/DAD.

Assim como para os pesticidas em análise por GC-MS, a escolha do adsorvente e proporção matriz:adsorvente foi realizada com sílica e Florisil como suportes sólidos nas proporções 1:1 e 1:1,5, respectivamente, com o mel e eluição com 20 mL de acetato de etila, como mostra a Figura 16.

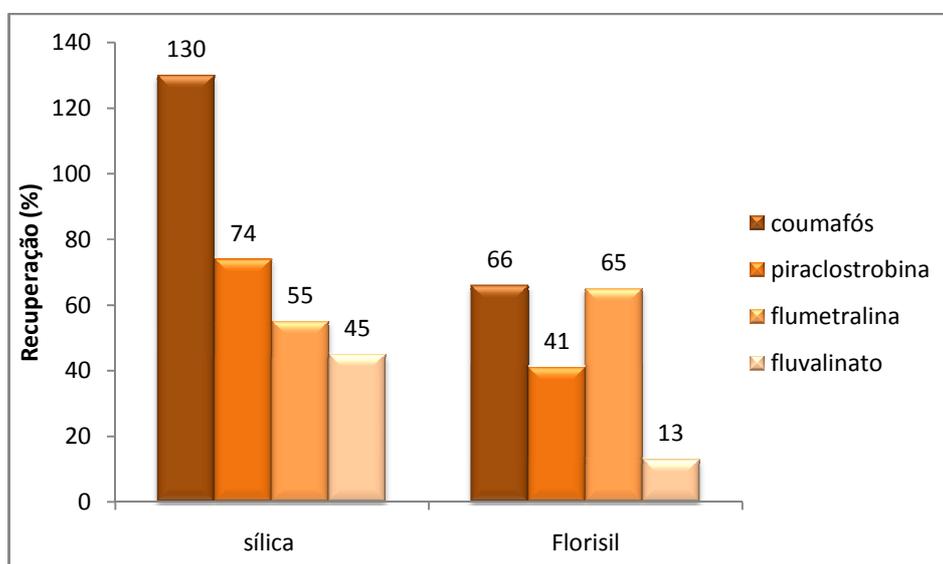


Figura 16: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando **sílica e Florisil** como suporte sólido e eluição com 20 mL de acetato de etila.

O acetato de etila, solvente de caráter medianamente polar, extraiu melhor os pesticidas quando sílica foi utilizada para dispersão dos analitos, com valores médios de recuperação entre 45-130%. Apenas o coumafós apresentou percentual acima de 120%, o que evidencia um leve efeito matriz para este analito. Os ensaios realizados com Florisil forneceram, recuperações médias mais baixas para os pesticidas em análise, devido a sua elevada capacidade de retenção e insuficiente polaridade do solvente de eluição utilizado. É importante

ressaltar que o fluvalinato, composto de característica mais apolar dos pesticidas selecionados para análise por HPLC, apresentou os menores valores de recuperação nos ensaios com sílica (45%) e Florisil (13%) e eluição com acetato de etila.

A escolha do solvente de eluição foi realizada com 20 mL dos solventes acetona, acetonitrila, diclorometano e, misturas de solventes hexano:acetato de etila (1:4, v/v) e acetonitrila:acetato de etila (1:4, v/v).

As recuperações médias obtidas quando sílica foi utilizada como suporte sólido foram, em geral, muito elevadas. Os solventes de alta polaridade como acetona e acetonitrila extraíram os pesticidas de maneira eficiente mas arrastou os compostos endógenos da matriz, o que pode ser observado pelos elevados valores de recuperação (30-334%) para a maioria dos pesticidas (Figura 17). Por esse motivo, um solvente menos polar, diclorometano, e uma mistura de solventes com caráter mais apolar - hexano:acetato - foi utilizado para eluição. Os valores de recuperação obtidos nestes ensaios foram menores exceto para coumafós que apresentou 171 e 186% de recuperação, respectivamente. O último ensaio testado, acetonitrila:acetato de etila, apresentou valores de recuperação elevados para coumafós (138%) e piraclostrobina (177%), baixo para flumetralina (40%) e excelente para fluvalinato (80%). Uma visão geral dos testes de recuperação demonstra que coumafós foi recuperado em todos os ensaios com valores entre 106-186%. A melhor recuperação da piraclostrobina foi obtida quando a eluição foi realizada com diclorometano (76%), chegando a atingir 285% de recuperação no ensaio com acetona. Flumetralina mostrou-se coerente em todos os ensaios com valores de recuperação entre 41-74% e fluvalinato, por sua característica mais apolar, obteve recuperações baixas em todos os ensaios, exceto quando acetonitrila foi usada como solvente de eluição. A melhor eficiência foi obtida no ensaio com hexano:acetato para eluição dos pesticidas.

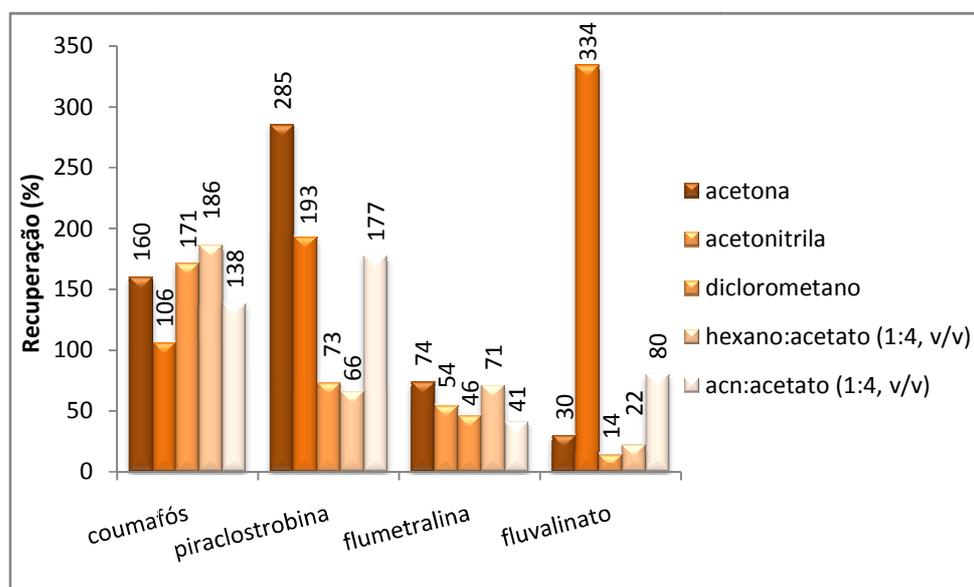


Figura 17: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando **sílica** como suporte sólido, e eluição com 20 mL de diversos solventes de eluição.

Quando Florisil foi utilizado como suporte sólido (Figura 18), os valores de recuperação ficaram entre 9 – 489%. A acetona não foi eficiente para extração dos pesticidas, pois arrastou compostos interferentes da matriz causando desvios elevados na análise evidenciados pelos valores de recuperação muito flutuantes entre 9% (flumetralina) e 489% (piraclostrobina). Acetonitrila e diclorometano apresentaram valores médios de recuperação muito semelhantes em torno de 14-156%. Piraclostrobina e fluvalinato foram os pesticidas com maior (110 e 156%) e menor (14 e 17%) valores de recuperação nestes ensaios. A mistura de solventes foi uma alternativa para controlar os desvios de análise observados. A mistura mais apolar - hexano:acetato de etila - mostrou-se eficiente para este propósito com recuperações médias entre 62 e 76%, todavia o fluvalinato ainda permanecia com valores baixos de recuperação (11%). O problema foi completamente contornado com a mistura de solventes acetonitrila:acetato de etila, o qual recuperou de 90%

(piraclostrobina) – 97% (flumetralina e fluvalinato) dos princípios ativos em análise.

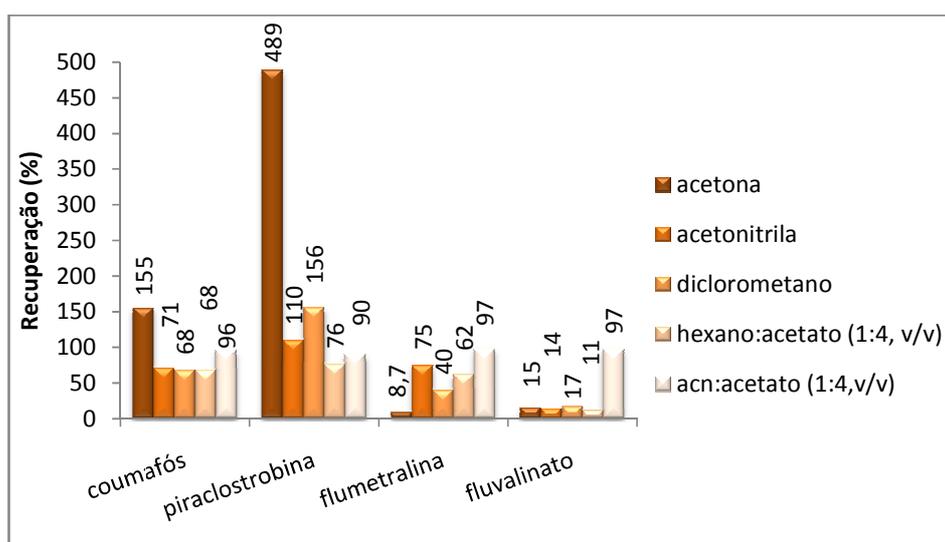


Figura 18: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando **Florisil** como suporte sólido, e eluição com 20 mL de diversos solventes de eluição

Para minimizar a presença dos compostos interferentes da matriz no cromatograma, foram testados sorventes auxiliares para limpeza dos extratos tais como sílica, Florisil, C<sub>18</sub> e alumina neutra (Figura 19). O uso de sorvente auxiliar não se mostrou eficiente visto que as recuperações médias foram bem maiores em comparação ao ensaio sem o uso do sorvente auxiliar, exceto quando a alumina neutra foi utilizada para este fim, a qual obteve valores muito baixos, como mostra a Figura 19.

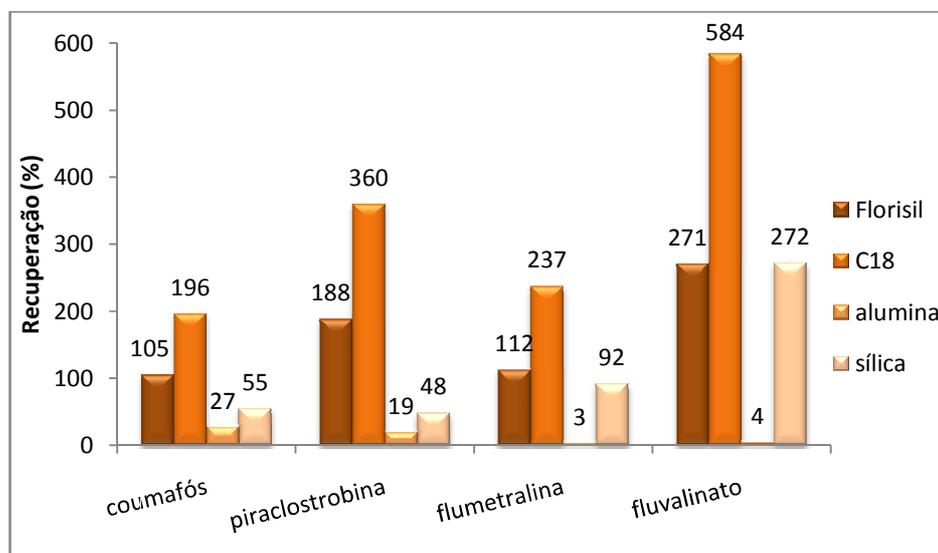


Figura 19: Eficiência na recuperação (n = 2) dos pesticidas em mel utilizando **Florisil** como suporte sólido, e diversos sorventes auxiliares.

Apesar dos valores alcançados de recuperação, a validação do método para determinação dos pesticidas coumafós, flumetralina, fluvalinato e piraclostrobina não foi realizada em virtude da disponibilidade reduzida do equipamento.

## 5.2 – Validação do método analítico

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação, um processo bem definido e documentado certificado pelos chamados parâmetros de desenvolvimento analítico ou figuras de mérito. A validação é um conjunto de ensaios que se destinam a verificar se um determinado método analítico é apto a produzir resultados confiáveis e adequados aos objetivos a que se propõe pois, dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e muitos outros prejuízos irreparáveis. É através da validação que se tem conhecimento das limitações e da confiabilidade das medidas obtidas na análise por meio da metodologia desenvolvida (GAUJAC, 2005; RIBANI et al., 2004).

Embora não haja consenso sobre quais parâmetros devem ser incluídos em um processo de validação de um método analítico, alguns normalmente fazem parte da maioria dos processos de validação tais como exatidão, precisão, linearidade, sensibilidade, especificidade, seletividade, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaio e métodos analíticos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) que disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos (LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

Em análise de resíduos de pesticidas, a validação do método ocorre, usualmente, por meio de ensaios de recuperações intralaboratoriais, ou seja, no próprio laboratório onde se deseja validar o método. Para a determinação quantitativa de resíduos de pesticidas em mel de abelhas *Apis mellifera*, foi considerada a metodologia de validação estabelecida pelo INMETRO. A eficiência do método foi avaliada com relação à precisão pela determinação do desvio padrão relativo (RSD), exatidão em termos de recuperação, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), mediante o

estudo em amostras testemunha fortificadas em diferentes níveis de concentração.

### 5.2.1 – Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Em outras palavras, avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes, e garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (LANÇAS, 2004; INMETRO, 2003).

A seletividade do método desenvolvido foi assegurada pela ausência de picos muito próximos ou sobrepostos ao tempo de retenção dos analitos em uma amostra fortificada da matriz. Para tanto, as condições de extração e de análise cromatográfica otimizadas envolveram parâmetros de adsorção, solubilidade, limpeza dos extratos, estabilidade térmica e fase estacionária de forma a garantir a maior eficiência e aplicabilidade para análise de rotina do método desenvolvido. O processo de obtenção da seletividade está descrito nos itens 5.1.1, 5.1.2 e 5.1.3.

### 5.2.2 – Exatidão e Precisão

Segundo Leite (1998), os parâmetros exatidão e precisão são considerados os mais relevantes, porque permitem estimar os erros e as variações inerentes ao resultado analítico.

A exatidão de um método pode ser definida como o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência, aceito como verdadeiro e os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são materiais de referência, comparação de métodos, adição de padrão e ensaios de recuperação. Este último constitui o procedimento mais utilizado e reflete a medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse, presente ou adicionada na porção analítica da matriz (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004). A recuperação é determinada pela relação:

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100$$

A eficiência do método varia em função da concentração da substância, ou seja, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente entre valores altos e baixos. Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa de 70-120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  são aceitas. Entretanto, para matrizes complexas tal como o mel, estes valores podem ser de 50-120% de recuperação, com precisão de até  $\pm 15\%$  (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004).

Já a precisão de um método representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas e pode ser determinada em condições de repetibilidade (quando as medidas são efetuadas sob as mesmas condições de método, laboratório, operador, equipamento e amostra) ou reprodutibilidade (medidas efetuadas da mesma amostra e método em diferentes laboratórios, operadores e equipamentos). Usualmente, é expressa em termos de estimativa do desvio padrão absoluto (s) ou desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*), também conhecido como

coeficiente de variação (CV) (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004) e seus valores aceitáveis para análise de traços ou impurezas chega até 20%.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Onde:

$s$  = estimativa do desvio padrão da recuperação

$\bar{x}$  = média aritmética dos valores de recuperação

A avaliação da exatidão do método (em termos de recuperação) foi realizada por meio de ensaios de fortificação de amostras testemunhas do mel em três níveis distintos, 0,2; 0,5 e 1,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  em uma série de sete replicatas para cada nível. As amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração, purificação e concentração otimizado, sendo posteriormente analisadas no sistema cromatográfico. A Figura 20 apresenta os cromatogramas do branco dos reagentes, do extrato fortificado da matriz e da solução de comparação.

Os resultados mostrados na Tabela 11 revelam a eficiência da extração e a coerência dos valores para dois (1,0 e 0,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dos três níveis diferentes de fortificação com valores acima de 50% para todos os pesticidas. O nível de fortificação intermediário (0,5  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) apresentou valores abaixo do estabelecido por Ribani (2004) como aceitável para metodologias de extração em matrizes complexas (50 – 120%). As recuperações variaram de 34 – 64%, com precisão adequada evidenciada pelos baixos valores do desvio padrão relativo (CV).

Tabela 11. Resultados de recuperação média (n = 7) com intervalos de confiança (95%) e coeficiente de variação (CV%) do procedimento para extração dos pesticidas avaliados em amostra de mel de abelhas *Apis mellifera*.

Pesticidas	LMR* (mgKg <sup>-1</sup> )	Nível de concentração (µg g <sup>-1</sup> )	Recuperação média (%)	CV (%)
Pirimicarbe	-	1,0	56 ± 2,6	3,7
		0,5	45 ± 2,8	5,0
		0,2	55 ± 4,6	6,7
Malationa	4,0	1,0	64 ± 3,5	4,4
		0,5	46 ± 3,5	6,2
		0,2	57 ± 6,0	8,5
Procimidona	0,07	1,0	64 ± 3,2	4,0
		0,5	49 ± 4,1	6,7
		0,2	59 ± 3,0	4,1
Bifentrina	-	1,0	43 ± 4,0	7,4
		0,5	34 ± 3,1	7,1
		0,2	41 ± 3,7	7,1

\*estabelecido pela ANVISA para cultura de citros.

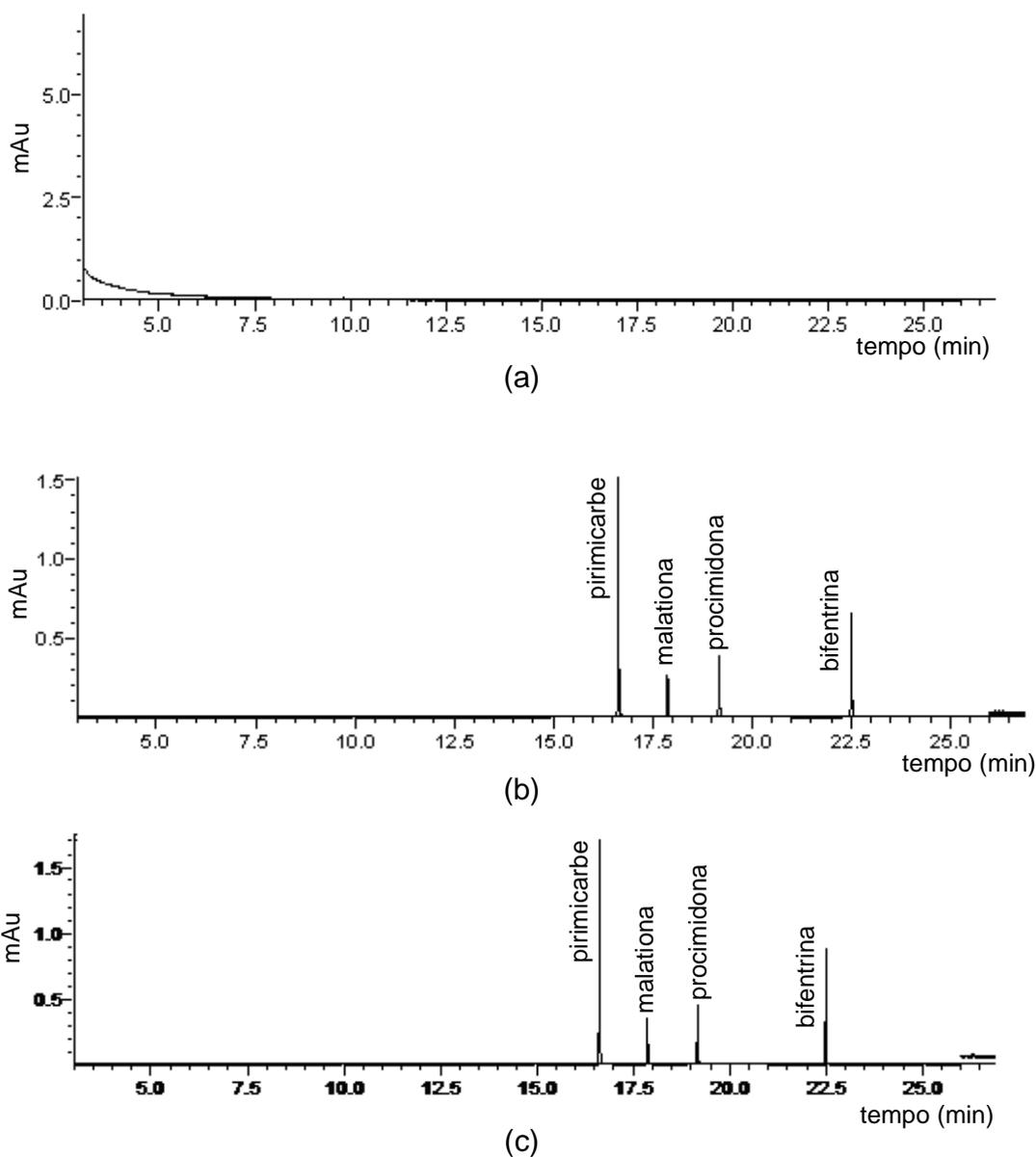


Figura 20: Cromatogramas obtidos no GC-MS do branco dos reagentes (a), do extrato fortificado da matriz no nível de fortificação 1,0 µg g<sup>-1</sup> (b) e da solução padrão de comparação 1,0 µg g<sup>-1</sup> (c). Para condições cromatográficas de análise ver item 4.7.1.

### 5.2.3 – Linearidade e curva analítica

A linearidade corresponde a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação, ou seja, é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. Na prática é determinada por intermédio de gráficos de calibração ou curva de calibração, sendo o eixo x o da concentração e o eixo y o da resposta (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004). Já a curva analítica é o método de quantificação mais frequentemente utilizado e geralmente envolve um intervalo mais restrito da faixa linear, pois a maioria dos métodos são desenvolvidos para análise de traços ou resíduos de substâncias (RHODEN, 2005).

A faixa linear de cada analito e curva analítica preparadas no extrato da matriz mel, bem como em solvente foram determinadas a partir de um conjunto de medições experimentais, usando o método de regressão linear descrita pela relação  $y = ax + b$  e coeficiente de correlação,  $r$ . Seus valores estão agrupados nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12: Intervalos de faixa linear de trabalho, equações da reta e coeficientes de correlação para os pesticidas em análise preparadas no extrato da matriz ( $n = 2$ ).

Pesticida	Intervalo ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação da reta*	Coefficiente de correlação ( $r$ )
Pirimicarbe	0,02 – 10,0	$y = 406402x + 8326$	0,9995
Malationa	0,2 – 10,0	$y = 78659x - 733,95$	0,9986
Bifentrina	0,02 – 10,0	$y = 220213x - 8803,6$	0,9992
Procimidona	0,05 – 10,0	$y = 109836x + 5143,1$	0,9998

\* $y = ax + b$  ( $y = \text{área do pico}$ ;  $x = \text{concentração do analito em } \mu\text{g mL}^{-1}$ )

Para linearidade, foram feitas injeções em triplicata para cada um dos oito níveis de concentração (0,02; 0,05; 0,2; 0,8; 1,0; 1,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os valores encontrados para o coeficiente de correlação ( $r > 0,99$ ) evidenciam a resposta linear do detector na faixa estabelecida para cada analito. Para os pesticidas pirimicarbe e bifentrina a relação linear foi observada em todo o intervalo estudado (0,02 – 10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), enquanto para malationa e procimidona estes intervalos foram menores (ver Tabela 12).

As curvas analíticas obtidas preparando-se as soluções padrões dos princípios ativos em acetonitrila e no extrato testemunha da matriz mostraram-se lineares com coeficientes de correlação ( $r$ ) maior que 0,99 para todos os analitos (ver Tabela 13). A Figura 21 demonstra o exemplo da curva analítica para bifentrina.

Tabela 13: Intervalos de concentração, equações da reta e coeficientes de correlação da curva analítica para os pesticidas em análise preparados no extrato da matriz ( $n = 2$ ).

Pesticida	Intervalo ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação da reta*	Coefficiente de correlação ( $r$ )
Pirimicarbe	0,2 – 1,5	$y = 122560x - 2499$	0,9993
Malationa	0,2 – 1,5	$y = 10649x - 271,7$	0,9988
Bifentrina	0,2 – 1,5	$y = 52735x - 753,8$	0,9995
Procimidona	0,2 – 1,5	$y = 37187x + 503,0$	0,9996

\* $y = ax + b$  ( $y$  = área do pico;  $x$  = concentração do analito em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

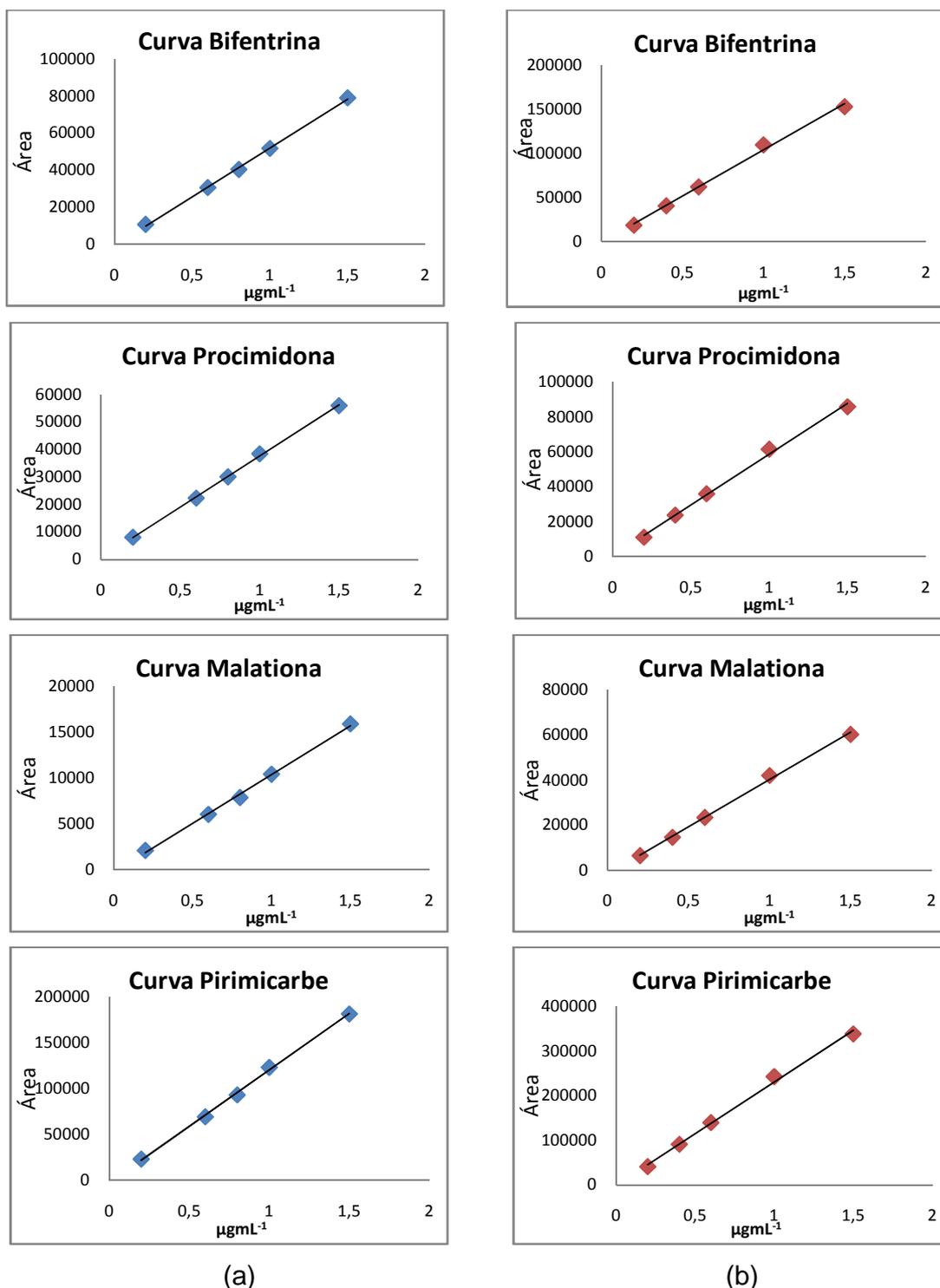


Figura 21. Curvas analíticas obtidas em solvente (a) e no extrato da matriz (b) para os pesticidas em estudo no GC-MS.

#### 5.2.4 – Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado e/ou quantificado pelo método (INMETRO, 2003).

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental, ou seja, é a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança (relação 3:1 sinal/ruído) (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004). O LOD pode ser expresso como:

$$LOD = t_{95\%} \times \frac{s}{S}$$

Onde:

$t_{95\%}$  = coeficiente de Student para 95% de confiança

$s$  = desvio padrão

$S$  = coeficiente angular da curva analítica

Já o limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com um nível de precisão e veracidade, utilizando a relação 10:1 sinal/ruído. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (INMETRO, 2003).

$$LOQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde:

$s$  = desvio padrão

$S$  = coeficiente angular da curva analítica

Tabela 14: Valores obtidos de LOD e LOQ instrumental ( $LOD_i$  e  $LOQ_i$ ) e do procedimento ( $LOD_p$  e  $LOQ_p$ ) para cada extrato de matriz analisado.

Pesticida	Limite de detecção ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		Limite de quantificação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	$LOD_i$	$LOD_p$	$LOQ_i$	$LOQ_p$
Pirimicarbe	0,039	0,022	0,125	0,070
Malationa	0,062	0,037	0,199	0,118
Bifentrina	0,066	0,026	0,209	0,083
Procimidona	0,033	0,088	0,104	0,282

Para determinação do LOD instrumental foram feitas sete injeções de uma solução na concentração  $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$  (menor ponto da curva analítica) e os valores de LOQ, foram calculados pela relação citada anteriormente. Já na determinação do LOD e do LOQ do procedimento, extratos de amostras em branco foram fortificados com os pesticidas na mesma concentração e injetados sete vezes. A diferenciação do LOD e LOQ instrumental e do método é importante para saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método caso este venha a ser utilizado em um equipamento diferente daquele com o qual foi desenvolvido (RHODEN, 2005).

## 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o procedimento analítico de extração por MSPD proposto para determinação simultânea de quatro pesticidas (pirimicarbe, malationa, bifentrina e procimidona) em amostras de mel de abelhas *Apis mellifera*, empregando GC-MS, mostrou-se eficiente, rápido, preciso e exato e requer pouca quantidade de amostra, adsorvente e volume de solventes. As condições cromatográficas adotadas permitiram a obtenção de bons resultados de resolução e separação dos compostos em análise.

O método de extração desenvolvido envolve a homogeneização da amostra de mel (1,0 g) em suporte sólido sílica (1,0 g), sem a etapa de purificação (*clean up*) e eluição com 10 mL de acetonitrila.

Na etapa de validação do procedimento proposto para extração dos pesticidas em análise no GC-MS, foram avaliados as figuras de mérito seletividade, exatidão e precisão, linearidade e curva analítica e por fim, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Os valores médios de recuperação obtidos em três níveis de fortificação estiveram entre 34-64%, dentro da faixa aceitável descrita na literatura para análise de resíduos de pesticidas em amostras complexas (50-120%) e concordância entre os valores com CV menores que 8,5%. Os LOD e LOQ instrumental foram menores que 0,066 e 0,209  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente, enquanto os LOD e LOQ do método não excederam 0,088 e 0,282  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

A validação do método desenvolvido para HPLC-UV/DAD não foi possível devido a falta de tempo disponível do equipamento. Entretanto, é possível afirmar uma tendência favorável a este propósito, visto que os resultados médios de recuperação obtidos no ensaio utilizando Florisil (1,5 g) como suporte sólido e eluição com 20 mL de acetonitrila:acetato de etila estiveram na faixa de 90-97%. Em geral, o método constitui um avanço em simplificação e eficiência, que o torna possível para exame de muitas amostras e análise de rotina.

## 7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Para concluir o trabalho de desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos dos pesticidas coumafós, piraclostrobina, flumetralina e fluvalinato utilizando as técnicas de dispersão da matriz em fase sólida e HPLC-UV/DAD em mel de abelhas *Apis mellifera*, ensaios de fortificação em três níveis diferentes será realizado para validação do método proposto.

Além disso, os métodos desenvolvidos serão aplicados para análise de amostras reais de mel de abelhas *Apis mellifera*, coletadas em apiários próximos a culturas agrícolas, supermercados da capital e mel orgânico.

## 8 – REFERÊNCIAS

- ABILASH, P. C.; SINGH, V.; SINGH, V. Simplified determination of combined residues of lindane and other HCH isomers in vegetables, fruits, wheat, pulses and medicinal plants by matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by GC–ECD. *Food Chemistry*, 113, 267–271, 2009.
- ABREU, S. M. et al. Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine. *Analytica Chimica Acta*, 573–574, 291–297, 2006.
- ADAMCZYK, S. et al. Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Analytica Chimica Acta*, 581, 95-101, 2007.
- ALBERO, B. et al. Determination of herbicide residues in juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1043, 127 – 133, 2004.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Sistema de Informações sobre agrotóxicos*. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em 27/02/2009.
- BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L. P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – A biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69, 246–253, 2008.
- BALAYIANNIS, G.; BALAYIANNIS, P. Bee Honey as an Environmental Bioindicator of pesticides' Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece. *Arch Environ Contam Toxicol*, 55, 462–470, 2008.
- BARBOSA, L. C. A. *Os pesticidas, o homem e o meio ambiente*. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.
- BARCELÓ, D.; HENNION, C. M. *Trace determination of pesticides and their degradation products in water*. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. Elsevier. 116-121 p. 1997.
- BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal Biochemistry Biophysical Methods*, 70, 151 – 162, 2007.
- BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885, 115-127, 2000.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, 108, 669-680, 2008.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Methods for Determining Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Food Samples—Problems and Challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 888-904, 2008.

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

BOGIALLI, S.; DI CORCIA, A. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *Journal Biochemistry Biophysical Methods*, 70, 163 – 179, 2007.

CALDOW, M. et al. Development and validation of an analytical method for total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography – mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, n. 24, v. 3, 280 – 284, 2007.

CANO, C. B. et al. Optimization of mobile phase for separation of carbohydrates in honey by high performance liquid chromatography using a mixture design. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, n. 17, v. 3, 588 – 593, 2006.

CARVALHO, S. M. *Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros a operárias de Apis mellifera linnaeus, 1758 (hymenoptera: apidae)*. 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

CHARLTON, A. J. A.; JONES, A. Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1141, 117 – 122, 2007.

CHEN, H. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Analytica Chimica Acta*, 632, 80–85, 2009.

CHOUDHARY, A.; SHARMA, D. C. Dynamics of pesticide residues in nectar and pollen of mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) grown in Himachal Pradesh (India). *Environmental Monitoring Assess*, 144, 143–150, 2008.

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

CODEX ALIMENTARIUS. Disponível em: [www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net). Acesso em: 20/01/2009.

COLLINS, C. H.; BONATO, P.; BRAGA, G. L. *Fundamentos de Cromatografia*. Editora Unicamp. Campinas – São Paulo, 2006.

CORTA, E. et al. Study of the degradation products of bromopropylate, chlordimerform, coumaphos, flumethrin and tau-fluvalinate in aqueous media. *Talanta*, 52, 169 – 180, 2000.

COSTA, C. C.; PEREIRA, R. G.; PRATA FILHO, D. A. Influência da centrífuga no processamento do mel de abelha. *Eng. Agric*, n. 25, v. 3, 809 – 816, 2005.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 15, 65-72, 2005.

DEBAYLE, D.; DESSALCES, G.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 391, 1011–1020, 2008.

DESNEUX, N.; DESCOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81 – 106, 2007.

DOPICO-GARCIA, M. S. et al. Solid-phase extraction versus matrix solid-phase dispersion: Application to white grapes. *Talanta*, 74, 20–31, 2007.

DÓREA, H. S.; LOPES, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por GC – EM. *Química Nova*, v. 27, n. 6, 892-896, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de Produção. Disponível em: [www.embrapa.br](http://www.embrapa.br). Acesso em 05/12/2007.

ERDOGRUL, O. Levels of selected pesticides in honey samples from Kahramanmaras, Turkey. *Food Control*, 18, 866 – 871, 2007.

FERNANDES, J. O.; SOARES, C. Application of matrix – solid phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips. *Journal of Chromatography A*, 1175, 1-6, 2007.

FERRER, C. et al. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1069, 183–194, 2005.

FIDENTE, P. et al. Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography – eletrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1094, 175-178, 2005.

GAUJAC, A. *Otimização e validação de método para determinação de BTEX em amostras ambientais aquosas empregando microextração em fase sólida e GC-FID*. 2006. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2006.

GRISOLIA, C. K. *Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução*. Riscos ao homem e ao meio ambiente, pela avaliação de genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos sobre a reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005. 392 p.

HAJSLOVÁ, J; ZROSTLIKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*. v. 1000, p.181-197, 2003.

HERRERA, A. et al. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 381, 695 – 701, 2005.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*. DOG-CGCRE-008, 2003.

IOANNIDOU, M. D. et al. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, 65, 92 –97, 2005.

JIMÉNEZ, J. J. et al. Gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil column Influence of the honey matrix on the quantitative results. *Journal of Chromatography A*, 823, 381–387, 1998.

JIMÉNEZ, J. J. et al. Liquid-liquid extraction followed by solid-phase extraction for the determination of lipophilic pesticides in beeswax by gas chromatography-electron-capture detection and matrix-matches calibration. *Journal of Chromatography A*, 1048, 89 – 97, 2004.

KARAZAFIRIS, E.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; THRASYVOULOU, A. New multiresidue method using solid-phase extraction and gas chromatography-micro-electron-capture detection for pesticide residues analysis in royal jelly. *Journal of Chromatography A*, 1209, 17–21, 2008.

KORTA, E. et al. Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax. *Analytica Chimica Acta*, 475, 97-103, 2003.

KORTA, E. et al. Study of semi-automated solid-phase extraction for the determination of acaricide residues in honey by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 930, 21-29, 2001a.

KORTA, E. Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5835-5842, 2001b.

KOSHIO, S.; MURADIN, L. B. A. Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10 – hidróxi-2-decenóico (10 – HDA) em geléia real pura adicionado a mel brasileiro. *Química Nova*, n. 26, v. 5, 670 – 673, 2003.

KRISTENSON, M. E.; RAMOS, L.; BRINKMAN, U. T. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 2, 2006.

KRUIVE, A. et al. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58–66, 2008.

KUJAWSKI, M. W.; NAMIESNICK, J. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 9, 785-793, 2008.

LANÇAS, F. M. *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. São Carlos: RiMa, 2004. 62 p.

LEITE, F. *Validação em Análise Química*. Campinas: Editora Átomo, 1998.

LLASERA, M. P.G.; REYES-REYES, M. L. A validated matrix solid-phase dispersion method for the extraction of organophosphorus pesticides from bovine samples. *Food Chemistry*, 114, 1510–1516, 2009.

MACEDO, A. N.; NOGUEIRA, A. R. A.; BRONDI, S. H. G. Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction for Analysis of Cypermethrin Residue in Cows' Milk. *Chromatographia* 69, 571 – 573, 2009.

MACIEL, E. *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multiresíduos para quantificação de resíduos de pesticidas em manga (mangifera indica)*. 2005, 70p. Dissertação (Ecologia de Agroecossistema) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MCKEE, B. Prevention of residues in honey: a future perspective. *Apiacta*, 38, 173 – 177, 2003.

MENEZES FILHO, A. *Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em tomate por dispersão da matriz em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas*. 2005. 91 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2005.

MICHEL, M.; GNUSOWSKI, B.; BUSZEWSKI, B. Comparasion of various extraxtion techniques to determine fungicide residue in wheat grain. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29 (2), 247-261, 2006.

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

MUITNELLI, F.; BAGGIO, A. Use of medical drugs against varroosis. *Apiacta*, 39, 53-62, 2004.

NAVICKIENE, S.; RIBEIRO, M. L. A simple and rapid extraction for gás chromatographic determination of thiabendazole and imazalil residues in lemons. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 5, 592-596, 2002.

NICA, D. BIANU, E.; CHIOVEANU, G. A case of acute intoxication with deltamethrin in bee colonies in Romania. *Apiacta*, 39, 71-77, 2004.

NOZAL, M. J. et al. Trace analysis of tiamulin in honey by liquid chromatography – diode – array – eletrospray ionization mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1116, 102 – 108, 2006.

OTTENI, M.; RITTER, W. Acute – paralysis infection of bee brood (*Apis mellifera* L.) from colonies treated with tau-fluvalinate. *Apiacta*, 39, 83 – 90, 2004.

PATACA, L. C. M. *Análises de mel e própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração*. 2006. 97 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PICÓ, Y. et al. Curent trens in solid-phase extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal Biochemistry Biophysical Methods*, 70, 117 – 131, 2007.

PICÓ, Y. et al. Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 882, 153–173, 2000.

PINTO, G. M. F. *Desenvolvimento de metodologia para determinação de multirresíduos de herbicidas e seus metabólitos em água e em solo por*

*cromatografia líquida de alta eficiência*. 2002. 182 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

PIRARD, C. et al. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1152, 116–123, 2007.

PIRO, R.; MUTINELLI, F. The EU legislation for honey residue control. *Apiacta*, 38, 15 – 20, 2003.

POOLE, C. F. Matrix – induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1158, 241 – 250, 2007.

Porrini, C. et al. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, n. 38, 63-70, 2003.

QUEIROZ, S. C. N. *Determinação multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em detecção por espectrometria de massas e novos sorventes para extração em fase sólida*. 2001. 153 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

RIAL-OTERO, R. et al. Gas chromatography mass spectrometry determination of acaricides from honey after a new fast ultrasonic-based solid phase micro-extraction sample treatment. *Talanta*, 71, 1906-1914, 2007a.

RIAL-OTERO, R.; et al. Chromatography – based methods for pesticide determination in honey: an overview. *Talanta*, 71, 503 – 514, 2007b.

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos de análise. *Química Nova*, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

RISSATO, S. R. et al. Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio – indicador. *Química Nova*, v. 29, n. 5, 950 – 955, 2006.

RISSATO, S. R. et al. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, 101, 1719–1726, 2007.

RODHEN, K. K. *Desenvolvimento e validação de método multirresíduo, empregando GC-ECD e GC-MS, para a investigação de pesticidas em morango, maçã e uva*. 2005. 111 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

ROSSI, S. et al. Use of high - performance liquid chromatography - UV and gas chromatography - mass spectrometry for determination of the imidacloprid content of honeybees, pollen, paper filters, grass, and flowers. *Chromatographia*, 61, 189 – 195, 2005.

SABATINI, A. G. et al. Presence of acaricides and antibiotics in samples of Italian honey. *Apiacta* 38, 46 – 49, 2003.

SABIN, G. P. *Desenvolvimento e validação de método utilizando SPE e GC-MS para a determinação multirresíduo de pesticidas em água potável*. 2007. 140 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SAMMATARO, D.; GERSON, U.; NEEDHAM, G. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annual Review of Entomology*, 45, 519 – 548, 2000.

SANTOS, T. F. S. et al. MSPD procedure for determining buprofenzin, tetradifon, vinclozolin, and bifenthrin residue in propolis by gas chromatography – mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 390-1425, 2008.

SARAJI, M.; ESTEKI, N. Analysis of carbamate pesticides in water samples using single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 391, 1091–1100, 2008.

SEBRAE, Cooperação. *Diagnóstico Mercadológico Projeto Apis – Sergipe*. Dezembro, 2005.

SEBRAE. *Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia*. Relatório Completo, 2006. Série Mercado.

SEBRAE. *Pesquisa mel de abelhas e derivados – Perfil do consumidor*. 2002. 17p.

SEGERENE, P. A apicultura nas regiões tropicais.

SHAMPSIPUR, M. et al. Headspace solvent microextraction-gas chromatographic thermionic specific detector determination of amitraz in honey after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 264-270, 2008.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico – química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, n. 8, v. 2/3, 260 – 265, 2004.

SILVA, M. G. D. *Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em polpa de coco utilizando dispersão da matriz em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas*. 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2007a.

SILVA, R. A. (Ed.). *Boletim Técnico. Dicas & Notícias & Informações apícolas*. Ano I. n. 18. Fevereiro 2007b.

SKOOG, D. A. HOLLER, F. J.; NIEMAM, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora, 2002.

SOUZA, D. C. (Org.). *Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural*. 2ª ed. Brasília: Sebrae, 2007a. 186 p.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As abelhas como insetos polinizadores. *Revista Eletrônica de Veterinária*, v. 8, n.3, 1-7, 2007b.

TARCOMNICU, I. et al. Development and application of a high – performance liquid chromatography – mass spectrometry method to determine alendronate in human urine. *Journal of Chromatography A*, 1160, 21 – 33, 2007.

TILHE, R. A. C. *Análise de resíduos de pesticidas organoclorados em mel de abelhas proveniente de áreas críticas*. 2003. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

TOMLIN, C. (Ed.). *A World Compendium the Pesticide Manual. Incorporating the Agrochemicals Handbook*. Tenth Edition, 1994.

TOTTI, S. et al. 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*, 69, 724-729, 2006.

TSIGOURI, A. Fluvalinate residues in Greek honey and beeswax. *Apiacta*, 38, 50-53, 2003.

VALENZUELA, A. I. et al. Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit. *Journal of Chromatography A*, 839, 101–107, 1999.

VALSAMAKI, V. I. et al. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. *Analytica Chimica Acta*, 573 – 574, 195 – 201, 2006.

WILCZYNSKA, A.; PRZYBYLOWSKI, P. Residues of organochlorine pesticides in Polish honeys. *Apiacta*, 42, 16 – 24, 2007.

ZHEN, J. et al. Determination of Multiple Pesticide Residues in Honey Using Gas Chromatography-Electron Impact Ionization-Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, v. 24, n. 5, 440-446, 2006.

ZHOU, J. et al. Rapid and sensitive determination of two degradation products of flumethrin in honey by ultrasonically assisted extraction and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Separation Science*, 30, 1912 – 1919, 2007.

ZHU, S. et al. Determination of pesticides in honey using excitation–emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration and second-order standard addition methods. *Analytica Chimica Acta*, 619, 165–172, 2008.

ZUIN, V. G.; Yariwake, J. H.; Lanças, F. M. Analysis of pesticide residues in brazilian medicinal plants: matrix solid phase dispersion versus conventional (European Pharmacopoeia) methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, v. 2, 304 – 309, 2003.