



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RENATA APARECIDA GONÇALVES SILVA

**Desenvolvimento e validação de método multirresidual para determinação
de agrotóxicos em mel por cromatografia líquida de ultra eficiência
acoplada a espectrometria de massas em série**

UBERLÂNDIA

2020

RENATA APARECIDA GONÇALVES SILVA

Desenvolvimento e validação de método multirresidual para determinação de agrotóxicos em mel por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em série

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Anizio Márcio de Faria

UBERLÂNDIA

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586
2020 Silva, Renata Aparecida Gonçalves, 1988-
Desenvolvimento e validação de método multirresidual para
determinação de agrotóxicos em mel por cromatografia líquida de
ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em série
[recurso eletrônico] / Renata Aparecida Gonçalves Silva. - 2020.

Orientador: Anizio Marcio de Faria.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.1>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. I. Faria, Anizio Marcio de, 1977-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química.
III. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP
38400-902
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico, 100, PPQUI				
Data:	trinta de janeiro de dois mil e vinte	Hora de início:	13:00	Hora de encerramento:	18:45
Matrícula do Discente:	11523QMI009				
Nome do Discente:	Renata Aparecida Gonçalves Silva				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento e validação de método multirresidual para determinação de agrotóxicos em mel por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em série.				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Instrumentação Analítica e Preparo de Amostras				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de metodologias analíticas para o monitoramento de contaminantes orgânicos em matrizes alimentícias				

Reuniu-se no Auditório II, Campus Pontal, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Regina Massako Takeuchi e Sebastião de Paula Eiras, da Universidade Federal de Uberlândia; Carla Grazieli Azevedo da Silva, da Universidade Federal do Mato Grosso; Dayane Fonseca Soares, do Instituto Federal do Triângulo Mineiro e Anizio Marcio de Faria, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Anizio Marcio de Faria, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação

interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Anizio Marcio De Faria, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/01/2020, às 18:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Regina Massako Takeuchi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/01/2020, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Grazieli Azevedo da Silva, Usuário Externo**, em 30/01/2020, às 18:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dayane Fonseca Soares, Usuário Externo**, em 30/01/2020, às 18:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastião de Paula Eiras, Usuário Externo**, em 30/01/2020, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1825352** e o código CRC **493F1C70**.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

ALBERT EINSTEIN

Dedico este trabalho,
Aos meus pais, Ronaldo e Sandra,
pelo exemplo de força e determinação, e que
sempre me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, por me conceder condições físicas e mentais, e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, a minha irmã Raíssa, aos meus sobrinhos Vito e Téo, e aos meus familiares pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Anizio Marcio de Faria pela orientação, paciência, pelos conhecimentos transmitidos e incentivo, contribuindo para o meu aprendizado e desenvolvimento.

A Profa. Rosana, pela paciência, ajuda e por todas as contribuições e apoio para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação de Química da UFU pela oportunidade de realização do doutorado.

Aos amigos do laboratório de pesquisa Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia (CroMat) pelos conselhos, auxílios e incentivos.

Aos meus amigos pelos conselhos, pelas palavras de incentivos, atenção, e pelos momentos de descontração, sendo esse último não menos importante que os demais.

A empresa Ourofino Agrociência por disponibilizar espaço físico, equipamentos, padrões analíticos, materiais de laboratório e todos reagentes químicos utilizados neste trabalho.

Aos colegas de trabalho pelo incentivo e motivação.

Aos membros da Comissão Examinadora pela aceitação e contribuição para este trabalho.

RESUMO

Os agrotóxicos são amplamente utilizados em culturas agrícolas com o objetivo de otimizar a produção, mas são considerados responsáveis pelo declínio da população de polinizadores, como as abelhas. Logo, produtos apícolas provavelmente estão contaminados com resíduos de agrotóxicos. O mel, um dos principais produtos apícolas, foi alvo de estudo neste trabalho. Assim, buscou-se desenvolver e validar um método multirresíduos para a determinação dos agrotóxicos acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam em amostras de mel. Os resíduos de agrotóxicos foram extraídos pelos métodos de extração LLE-LTP e QuEChERS, seguidos da etapa de limpeza dispersiva, na qual foram utilizados sulfato de magnésio e C₁₈. Após a extração, os extratos de mel foram analisados por UHPLC-ESI-MS/MS. O método de extração QuEChERS consistiu em pesar 5,0 g de amostra de mel em um tubo de polipropileno, adicionando 5 mL de água Tipo I e 4 mL de acetonitrila, seguido de agitação. A partição dos resíduos de agrotóxicos da fase aquosa da amostra para solvente orgânico foi realizada pela adição de 6,0 g de sulfato de magnésio e 1,5 g de acetato de sódio sob agitação. O isolamento do extrato foi realizado por centrifugação. Os extratos foram purificados através da etapa de limpeza dispersiva, onde 1 mL do extrato foi transferido para outro tubo contendo 150 mg de sulfato de magnésio anidro e 50 mg de C₁₈, seguido de agitação em vórtex e filtração. As condições do método de extração LLE-LTP foram otimizadas usando o planejamento composto central. As condições ideais para a recuperação máxima de agrotóxicos foram: 3.000 g de amostra de mel, 4 mL de solvente acetonitrila e 180 minutos de congelamento. Em seguida, os extratos dos métodos de preparo de amostras, QuEChERS e LLE-LTP, foram filtrados e analisados por UHPLC-MS/MS. A metodologia foi validada de acordo com o documento SANTE/11813/2017, avaliando a linearidade, limites de detecção e quantificação, efeito matriz, seletividade, incerteza, exatidão e precisão. Os valores de recuperação ficaram na faixa de 70 a 120 % para os agrotóxicos estudados, exceto para o acefato pelo método LLE-LTP; enquanto o RSD foi inferior a 20 %. O limite de quantificação para os agrotóxicos ficou entre 2,0 e 6,7 µg kg⁻¹, indicando a alta detectabilidade das metodologias desenvolvidas. Amostras de mel da região do Triângulo Mineiro foram avaliada pelas metodologias, detectando resíduos de agrotóxicos em todas as amostras, sempre em níveis abaixo dos limites máximos residuais permitidos, destacando a alta detectabilidade das metodologias propostas.

Palavras-chave: Mel, agrotóxicos, multirresíduos, QuEChERS, LLE-LTP.

ABSTRACT

Pesticides are widely used in crops to optimize the production but are considered responsible for the decline in the pollinator population, such as bees. Therefore, bee products are likely to be contaminated with pesticide residues. Honey, one of the main bee products, was studied in this work. Thus, we sought to develop and validate a multiresidue method for the determination of the acephate, acetamiprid, carbendazim, diflubenzuron, imidacloprid, metomil and thiamethoxam in honey samples. The pesticide residues were extracted using the LLE-LTP and QuEChERS methods, followed by the dispersive cleaning step, in which magnesium sulfate and C₁₈ were used. After extraction, the honey extracts were analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS. The QuEChERS method consisted of weighing 5.0 g of honey sample in a polypropylene tube, adding 5 mL of Type I water and 4 mL of acetonitrile, followed by stirring. The pesticide residues from the aqueous phase of the sample were partitioned into an organic solvent by adding 6.0 g of magnesium sulfate and 1.5 g of sodium acetate under stirring. The extract was isolated by centrifugation. The extracts were purified through the dispersive cleaning step, where 1 mL of the extract was transferred to another tube containing 150 mg of anhydrous magnesium sulfate and 50 mg of C₁₈, followed by vortex and filtration. The conditions of the LLE-LTP method were optimized using a central composite design. The optimal conditions for maximum pesticide recoveries were: 3,000 g of honey sample, 4 mL of acetonitrile solvent and 180 minutes of freezing. Then, extracts from the QuEChERS and LLE-LTP methods were filtered and analyzed by UHPLC-MS/MS. The methodology was validated according to the SANTE/11813/2017 document, evaluating the linearity, limits of detection and quantification, matrix effect, selectivity, uncertainty, accuracy, and precision. The recoveries were in the range of 70 to 120 % for the studied pesticides, except for the acephate by the LLE-LTP method, while the RSD was less than 20 % for all pesticides. The limit of quantification for pesticides was between 2.0 and 6.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, indicating the high detectability of the developed methodologies. Honey samples from the Triângulo Mineiro region were evaluated by methodologies, detecting pesticide residues in all samples, always at levels below the permitted maximum residual limits, highlighting the high detectability of the proposed methodologies.

Keywords: Honey, pesticides, multiresidues, QuEChERS, LLE-LTP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma representativo do método QuEChERS original proposto por Anastassiades e Lehotay.....	43
Figura 2. Mapa geográfico indicando as regiões nas quais as amostras de mel foram coletadas.	55
Figura 3. Cromatograma obtido para uma solução analítica na matriz, mel, método de extração QuEChERS, contendo 2,5 µg L ⁻¹ dos agrotóxicos (1) diflubenzurom, (2) acetamiprido, (3) imidacloprido, (4) tiametoxam, (5) metomil, (6) carbendazim e 7 (acefato).	72
Figura 4. Cromatograma para uma solução do mel submetida a extração pelo método QuEChERS, empregando os sorventes (a) MgSO ₄ + C ₁₈ ; (b) PSA; (c) SiO ₂ na etapa de clean-up. (1) diflubenzurom, (2) acetamiprido, (3) imidacloprido, (4) tiametoxam, (5) metomil, (6) carbendazim e (7) acefato.....	75
Figura 5. Efeito do sorvente de clean-up na recuperação de resíduos de agrotóxicos de amostras de mel empregando UHPLC-ESI-MS/MS.....	76
Figura 6. Representação esquemática do preparo de amostra otimizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em mel utilizando QuEChERS modificado.	77
Figura 7. Efeito das variáveis no processo de extração LLE-LTP de resíduos de agrotóxicos em amostra de mel. Agrotóxicos estudados: (a) acefato, (b) acetamiprido, (c) carbendazim, (d) diflubenzuron, (e) imidacloprido, (f) metomil e (g) tiametoxam.	81
Figura 8. Efeito das variáveis no processo de extração LLE-LTP dos resíduos de acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam em amostra de mel.	83
Figura 9. Superfícies de respostas da recuperação de resíduos de agrotóxicos em mel, empregando o método LLE-LTP. Variáveis sob otimização: (a) massa de amostra vs. volume de solvente; (b) tempo de congelamento vs. massa de amostra, e; (c) tempo de congelamento vs. volume de solvente.....	86
Figura 10. Representação esquemática do preparo de amostra otimizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em mel utilizando LLE-LTP.....	89
Figura 11. Cromatogramas obtidos para os extratos das amostras de mel isentas dos agrotóxicos por UHPLC-ESI-MS/MS. (a) método de extração QuEChERS e (b) método de extração LLE-LTP. (1) diflubenzurom, (2) acetamiprido, (3) imidacloprido, (4) tiametoxam, (5) metomil, (6) carbendazim e (7) acefato.....	91
Figura 12. Efeito matriz na recuperação dos agrotóxicos por UHPLC-ESI-MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e no extrato da matriz empregando o método QuEChERS.....	95
Figura 13. Efeito matriz na recuperação dos agrotóxicos por UHPLC-ESI-MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e no extrato da matriz empregando o método LLE-LTP.	96

Figura 14. Efeito matriz na recuperação dos agrotóxicos por UHPLC-ESI-MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e no extrato da matriz empregando os métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP. (1) Acefato, (2) Acetamiprido, (3) Carbendazim, (4) Diflubenzurom, (5) Imidacloprido, (6) Metomil e (7) Tiametoxam.	96
Figura 15. Taxas de recuperação dos agrotóxicos de amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração para os ensaios de repetibilidade (Rep) e reprodutibilidade dentro do laboratório (PI), empregando o método QuEChERS e UHPLC-ESI-MS/MS.....	114
Figura 16. Taxas de recuperação dos agrotóxicos de amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração para os ensaios de repetibilidade (Rep) e reprodutibilidade dentro do laboratório (PI), empregando o método LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do mel.	32
Tabela 2. Informações físicas, químicas e toxicológicas dos agrotóxicos analisados nas amostras de mel.	39
Tabela 3. Dados das amostras de mel coletadas na região do Triângulo Mineiro.	55
Tabela 4. Relação dos agrotóxicos analisados por UHPLC-ESI-MS/MS com informação de pureza.	57
Tabela 5. Gradiente de fase móvel empregado na análise dos multirresíduos de agrotóxicos em mel por UHPLC-ESI-MS/MS.	58
Tabela 6. Variáveis e seus níveis avaliados no processo de extração LLE-LTP dos agrotóxicos em amostra de mel.	60
Tabela 7. Matriz de experimentos do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} para avaliação dos fatores que afetam a extração LLE-LTP de agrotóxicos de amostras de mel. Fatores E = A×B×C e F = B×C×D.	61
Tabela 8. Variáveis e seus níveis avaliados no planejamento composto central para a otimização do método de extração LLE-LTP dos agrotóxicos avaliados em amostra de mel.	62
Tabela 9. Matriz experimental do planejamento composto central para a otimização do método de extração LLE-LTP dos agrotóxicos avaliados em amostra de mel.	63
Tabela 10. Parâmetros otimizados do espectrômetro de massas triplo quadrupolo com fonte de ionização electrospray para cada agrotóxico.	71
Tabela 11. Tempos de retenção (t_R) para os agrotóxicos analisados no UHPLC-ESI-MS/MS.	71
Tabela 12. Limites máximos residuais para os agrotóxicos em amostras de mel de acordo com a IN N° 20/2018 do MAPA.	73
Tabela 13. Recuperação média e RSD (n=3) dos agrotóxicos extraídos da amostra de mel de acordo com o planejamento fatorial fracionário 2^{6-2}	80
Tabela 14. Recuperação média (n=3) dos agrotóxicos extraídos da amostra de mel de acordo com o planejamento composto central.	85
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para a porcentagem de recuperação de agrotóxicos de amostras de mel, empregando planejamento composto central.	88
Tabela 16. Relação das áreas dos picos de quantificação (M_1) e de confirmação (M_2) para os agrotóxicos no UHPLC-ESI-MS/MS.	92
Tabela 17. Parâmetros de validação obtidos das curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente e na matriz, empregando o método QuEChERS e a técnica UHPLC-ESI-MS/MS.	93
Tabela 18. Parâmetros de validação obtidos das curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente e na matriz, empregando o método LLE-LTP e a técnica UHPLC-ESI-MS/MS.	93

Tabela 19. Comparação entre os limites de quantificação para os agrotóxicos pelos métodos QuEChERS e LLE-LTP e os limites máximos residuais permitidos pela legislação brasileira no mel.	98
Tabela 20. Taxas de recuperação dos resíduos dos agrotóxicos, em 3 níveis de fortificação, de amostras de mel, empregando o método QuEChERS e a UHPLC-ESI-MS/MS, n = 6.	100
Tabela 21. Taxas de recuperação dos resíduos dos agrotóxicos, em 3 níveis de fortificação, de amostras de mel, empregando o método LLE-LTP e a UHPLC-ESI-MS/MS, n = 6.	100
Tabela 22. Comparativo das características do método proposto com outros métodos desenvolvidos para a determinação de agrotóxicos em amostras de mel.	102
Tabela 23. Repetibilidade de recuperação dos agrotóxicos de amostras de mel, empregando o método QuEChERS e UHPLC-ESI-MS/MS. Teste de Grubbs (G) para 97,5 % de confiança.	106
Tabela 24. Repetibilidade de recuperação dos agrotóxicos de amostras de mel, empregando o método LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS. Teste de Grubbs (G) para 97,5 % de confiança.	108
Tabela 25. Reprodutibilidade dentro do laboratório para a recuperação dos agrotóxicos, empregando o método QuEChERS e UHPLC-ESI-MS/MS. Teste de Grubbs (G) para 97,5 % de confiança.	110
Tabela 26. Reprodutibilidade dentro do laboratório para a recuperação dos agrotóxicos, empregando o método LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS. Teste de Grubbs (G) para 97,5 % de confiança.	112
Tabela 27. Percentual de incerteza (U) para cada agrotóxico oriundo das metodologias propostas, empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS.	116
Tabela 28. Comparativo dos resultados da validação das metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos de amostras de mel, empregando os preparos de amostra QuEChERS e LLE-LTP.	117
Tabela 29. Resíduos de agrotóxicos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de mel da região do Triângulo Mineiro, MG, empregando o método QuEChERS e UHPLC-ESI-MS/MS.	118
Tabela 30. Resíduos de agrotóxicos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de mel da região do Triângulo Mineiro, MG, empregando o método LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS.	119

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (Ionização Química por Pressão Atmosférica)
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i> (Ionização por Pressão Atmosférica)
C ₁₈	Octadecilsilano ligado quimicamente à sílica
CCD	<i>Central Composite Design</i> (Planejamento Composto Central)
CL50	Concentração de uma substância química que provoca a morte de 50 % de um grupo de animais expostos, em um tempo definido.
COT	Carbono Orgânico Total
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de Arranjo de Diodos)
DL50	Dose de uma substância química que provoca a morte de 50 % de um grupo de animais da mesma espécie, quando administrada pela mesma via.
DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid Microextraction</i> (Microextração Líquido-Líquido Dispersivo)
DOE	<i>Design of Experiments</i> (Planejamento de Experimentos)
DPX	<i>Disposable pipette extraction</i> (Extração por Ponteira Descartável)
dSPE	<i>Dispersive solid-phase extraction</i> (Extração por Fase Sólida Dispersiva)
ECD	<i>Electron-capture detection</i> (Detecção por Captura de Elétrons)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental)
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por Electrospray)
FE	Fases Estacionárias
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa)
GC-ECD	<i>Gas Chromatography-Electron Capture Detection</i> (Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons)
GC-FID	<i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detection</i> (Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama)
GC-MS	<i>Gas chromatography-Mass spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas)
GC-MS/MS	<i>Gas chromatography-Mass spectrometry in Tandem</i> (Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas em Série)
GC-ToF	<i>Gas chromatography-Time-of-Flight</i> (Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas por Tempo de Voo)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol/ água
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry in Tandem</i> (Cromatografia Líquida com Detector de Espectrometria de Massas em Série)
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extração Líquido-Líquido)
LLE-LTP	<i>Liquid-liquid Extraction - Low Temperature Partition</i> (Extração Líquido-Líquido com Partição à Baixa Temperatura)
LMR	Limite Máximo Residual
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MSPD	<i>Matrix Solid Phase dispersion</i> (Dispersão de Matriz em Fase Sólida)
ND-EESI-MS	<i>Neutral Desorption-Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i> (Dessorção Neutra Acoplada a Espectrometria de Massa por Ionização por Eletrospray Extrativa)
NPD	<i>Nitrogen-phosphorus detection</i> (Detector de nitrogênio-fósforo)
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PLE	<i>Pressurized Liquid Extraction</i> (Extração por Líquido Pressurizado)
PIB	Produto Interno Bruto
ppb	Partes por bilhão
PSA	<i>Primary secondary amines</i> (Amina Primária Secundária)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
QqQ	Triplo quadrupolo
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> (Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro)
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> (Desvio Padrão Relativo)
SEAPA	Secretaria do Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> (Extração Sortiva em Barra de Agitação)
SLE-LTP	<i>Solid liquid extraction with low-temperature partition</i> (Extração Sólido-Líquido à Baixa Temperatura)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i> (Monitoramento de Reação Seleccionado)
ToF	<i>Time of Flight</i> (Tempo de Voo)
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance)

UHPLC-MS/MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry in Tandem</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance Acoplada a Espectrometria de Massas em Série)
UHPLC-ESI-MS/MS	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry in Tandem with electrospray ionisation</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance Acoplada a Espectrometria de Massas em Série com Ionização Eletrospray)
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	28
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 <i>Mel</i>	29
3.2 <i>Abelhas</i>	34
3.3 <i>Agrotóxicos investigados</i>	36
3.4 <i>Preparo de amostras</i>	40
3.5 <i>Cromatografia líquida de ultra alta eficiência com detector espectrométrico de massas</i>	46
3.6 <i>Planejamento e otimização de experimentos</i>	49
3.7 <i>Validação de metodologias analíticas</i>	51
4 METODOLOGIA.....	54
4.1 <i>Amostra de mel</i>	54
4.2 <i>Instrumentação</i>	56
4.3 <i>Reagentes, solventes e materiais utilizados</i>	56
4.4 <i>Padrões analíticos</i>	57
4.5 <i>Preparo da solução estoque</i>	57
4.6 <i>Otimização dos parâmetros do detector triplo quadrupolo</i>	57
4.7 <i>Condições cromatográficas de análise</i>	58
4.8 <i>Preparação da amostra empregando o método de extração QuEChERS modificado</i>	59
4.9 <i>Otimização da etapa de extração em fase sólida dispersivo</i>	59
4.10 <i>Seleção das variáveis do preparo de amostra empregando o método de extração LLE-LTP</i>	59
4.11 <i>Otimização do preparo de amostra empregando o método de extração LLE-LTP</i>	62

4.12 Validação da metodologia	64
4.12.1 Seletividade	64
4.12.2 Linearidade	65
4.12.3 Efeito matriz.....	65
4.12.4 Limites de quantificação e de detecção	66
4.12.5 Exatidão	66
4.12.6 Repetibilidade	66
4.12.7 Precisão intermediária ou reprodutibilidade dentro do laboratório	67
4.12.8 Incerteza.....	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 Otimização dos parâmetros do detector triplo quadrupolo (MS/MS)	70
5.2 Preparação das amostras de mel	73
5.2.1 Método QuEChERS modificado	73
5.2.2 Otimização da etapa de clean-up dispersivo no método QuEChERS acetato	74
5.2.3 Otimização do método de extração LLE-LTP de resíduos de agrotóxicos de mel.....	78
5.2.3.1 Planejamento fatorial fracionário 2^{6-2}	78
5.2.3.2 Planejamento composto central	84
5.3 Validação das metodologias desenvolvidas	90
5.3.1 Seletividade/Especificidade	90
5.3.2 Faixa de trabalho e linearidade	92
5.3.3 Efeito matriz.....	94
5.3.4 Limites de quantificação e de detecção	97
5.3.5 Ensaio de recuperação	99
5.3.6 Estudos de precisão das metodologias	106
5.3.7 Incerteza.....	115

<i>5.4 Aplicação das metodologias para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel de apícolas da região do Triângulo Mineiro, MG.....</i>	<i>117</i>
6 CONCLUSÕES.....	121
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	123
8 REFERÊNCIAS	124

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002), define os agrotóxicos como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Outros sinônimos de agrotóxicos são encontrados na literatura: defensivos agrícolas, pesticidas ou praguicidas. São produtos naturais ou sintéticos que atuam sobre pragas, ervas e fungos na produção agrícola (VELASCO; CAPANEMA, 2006); substâncias com ação biológica que têm por finalidade defender as plantas de algum agente nocivo (EMBRAPA, 2004); são substâncias químicas utilizadas para prevenir, combater ou controlar uma praga, podendo ser denominadas como praguicidas ou pesticidas (MARTINS *et al.*, 2010); ainda segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*), agrotóxico é qualquer substância ou mistura de substâncias que tem por finalidade prevenir, destruir, desfolhar, dessecar, estimular ou inibir o crescimento, repelir ou mitigar qualquer peste animal ou vegetal (EPA, 2019).

Os produtos químicos utilizados na agricultura com o objetivo de otimizar a produção agrícola são classificados conforme sua finalidade e toxicidade. Segundo a finalidade, são divididos nas seguintes classes de uso: inseticidas (combatem insetos em geral), fungicidas (atingem os fungos), herbicidas (que matam as plantas invasoras ou daninhas), acaricidas (produtos químicos destinados a controlar ou eliminar ácaros), molusquicidas (agem sobre moluscos, principalmente utilizado no combate contra o caramujo da esquistossomose), algicidas (eliminação de algas), bactericidas, vermífugos, entre outros (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

O grau de toxicidade é baseado nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico (capaz de

produzir danos ao feto durante a gestação causando anomalias) e carcinogênico. A classificação toxicológica é dividida nas seguintes classes: Classe I - Extremamente tóxicos (faixa vermelha); Classe II - Altamente tóxicos (faixa amarela); Classe III - Medianamente tóxicos (faixa azul) ou Classe IV - Pouco tóxicos (faixa verde), conforme a DL50 (dose letal mediana) dérmica e oral em ratos e CL50 (concentração letal mediana) inalatória em ratos (BRAIBANTE, 2012; BRASIL, 1992).

Vários ingredientes ativos são utilizados nas formulações de defensivos agrícolas para uso específico na agricultura. Esses agrotóxicos fazem parte de uma grande variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais e, desta forma, apresentam diferentes modos de ação, biotransformação, eliminação e limites máximos residuais. Os agrotóxicos podem ser divididos conforme o grupo químico funcional: organofosforados, derivados de ureia, carbamatos, ditiocarbamatos, organoclorados, bupiridílios, piretróides, nitrocompostos, entre outros (ROSA; MARQUES; PÉREZ, 2011).

O Brasil é o terceiro maior mercado mundial de agrotóxicos, com aproximadamente 400 ingredientes ativos registrados no país. Segundo o estudo realizado pela Universidade Paulista (Unesp) campus Botucatu em 2017, o Brasil é o sétimo maior consumidor de agrotóxicos no mundo considerando a unidade de terras cultiváveis, e o décimo primeiro considerando o volume de alimento produzido e área cultivada. Segundo essa análise os países Japão e Coreia são os maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, considerando a unidade de terras cultiváveis e o volume de alimento produzido (CARBONARI, 2018). E em 2018, o agronegócio brasileiro contribuiu com aproximadamente 21,6 % do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, participando de modo significativo para o crescimento econômico do país (MAPA, 2019).

Embora os agrotóxicos tenham a finalidade de otimizar a produção agrícola, de modo a eliminar as pragas que prejudicam o desenvolvimento da lavoura, o uso indiscriminado representa um risco potencial para a saúde humana, podendo ocasionar intoxicações, e; para o meio ambiente, uma vez que possuem alta persistência ou baixa taxa de degradação, podendo permanecer no alimento, em águas de rios, nos solos e até mesmo se acumular com a aplicação contínua do agrotóxico em diferentes estágios de crescimento da planta e do fruto.

Como o risco de contaminação de alimentos pela utilização de agrotóxicos é grande, há a necessidade de se fazer um monitoramento rigoroso da exposição dos alimentos de origem natural, como frutas, legumes, hortaliças, mel, a estes compostos. Em 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), surgiu com o propósito de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal que chegam à mesa do

consumidor, certificando que os mesmos apresentam níveis de resíduos de agrotóxicos dentro dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela ANVISA, visando prevenir intoxicações agudas ou crônicas que podem resultar da exposição dietética indevida aos agrotóxicos (ANVISA, 2018).

A Instrução Normativa n° 20, de 26 de julho de 2018 definiu os limites aceitáveis de contaminantes, dentre eles antibióticos e agrotóxicos, em produtos das cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos (BRASIL, 2018). Os limites residuais máximos permitidos de agrotóxicos no mel variam de 5 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e, devido aos baixos teores permitidos, fazem-se necessárias metodologias analíticas de extração e concentração do analito que possibilitam altas porcentagens de recuperação.

O mel e as abelhas podem ser usados como indicadores para avaliação do impacto ambiental, pois por meio de análises sistêmicas dos mesmos evidencia-se o impacto causado por fatores de origem biológicas, físicas e químicas, como por exemplo contaminações causadas por indústrias e por agrotóxicos utilizados na agricultura. As abelhas podem ser usadas como bioindicadores, pois, diariamente um número considerável de abelhas fazem de dez a quinze viagens explorando 7 km^2 de área e exercendo um papel importante de polinização durante o percurso e ao longo da área visitada. No percurso percorrido pelas operárias, microrganismos, agentes químicos e particulados ficam retidos no corpo ou no sistema respiratório das mesmas (RISSATO *et al.*, 2006).

O mel, principal produto apícola, é constituído por carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, vitaminas, pigmentos, compostos aromáticos, cera e grãos de pólen. O mel é classificado de acordo com a planta de onde é extraído o néctar, localização geográfica dessas vegetações e das espécies de abelhas produtoras, abelhas *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão, apresentando aparência, consistência e sabores diferentes. O mel silvestre, ou comumente denominado por mel misto, é extraído de diversas flores pelas abelhas *Apis* e é o mais comum no país. Os méis de laranjeiras, eucalipto, cipó-uva são outros tipos de méis produzidos também pelas abelhas *Apis mellifera* e possuem aroma, sabor e aparência característica. As abelhas sem ferrão produzem os méis: uruçú, produzido na região Nordeste do Brasil; mandaçaia, produzido nas regiões Sul e Sudeste; jataí, encontrado em todo o país; uruçú-amarela, apresenta sabor ácido e produzido no estado do Pará; tiúba, produzido na região do Maranhão e Pará; borá, de sabor levemente salgado e produzido na região Sudeste; jandaíra, produzido na região do Semiárido do Rio Grande do Norte; e o mel mandaguari, produzido nas regiões Sul e Sudeste (A.B.E.L.H.A., 2019).

Este monitoramento da concentração residual de agrotóxicos em matrizes alimentícias e insetos se faz por meio da extração destes compostos das matrizes a serem avaliadas, associada à análise química por uma técnica analítica instrumental que permita separar, identificar e quantificá-los. Diante disto, é de grande importância desenvolver ferramentas analíticas que possam viabilizar o monitoramento dos níveis residuais de agrotóxicos em mel, como produto advindo das abelhas, visando garantir a segurança alimentar e monitorar os resíduos de agrotóxicos no meio ambiente. A química analítica pode contribuir de maneira substancial para tal problemática através do desenvolvimento de metodologias analíticas confiáveis e efetivas que permitam identificar e quantificar os resíduos de agrotóxicos dentro dos níveis de traços a subtraços presentes nesta matriz.

A etapa mais complexa no desenvolvimento de uma metodologia analítica para o monitoramento de níveis residuais de agrotóxicos em amostras mel e de outras matrizes alimentares é a extração dos princípios ativos das mesmas. Devido aos níveis baixos em que estes compostos normalmente se encontram nos alimentos (níveis de subtraços, normalmente em torno de 1 parte por bilhão) e a complexidade das matrizes, normalmente é necessária a utilização de métodos de extração que permitam a pré-concentração e/ou limpeza dos extratos contendo estes agrotóxicos antes das análises cromatográficas. Além disso, a seleção de métodos apropriados para a extração destes compostos vem sendo cada vez mais rigorosa, uma vez que é evidente a necessidade de se evitar metodologias laboriosas, morosas, dispendiosas e que empregam quantidades excessivas de solventes orgânicos tóxicos ao ambiente (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2000).

Dentro dessa perspectiva, novos métodos de extração vêm sendo eficientemente propostos para o isolamento dos resíduos de agrotóxicos de matrizes alimentares. Entre os métodos mais modernos e eficientes, podem se destacar o QuEChERS (abreviado do inglês: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011; CALATAYUD-VERNICH *et al.*, 2016), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*) (ZHAO *et al.*, 2007), a extração sólido líquido com partição à baixas temperaturas (SLE-LTP, do inglês *solid-liquid extraction with low-temperature partition*) (MARTHE *et al.*, 2010), a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *matrix solid phase dispersion*) (ANDRZEJEWSKI *et al.*, 2004). As principais vantagens destas técnicas na extração de compostos orgânicos de matrizes sólidas têm sido a redução do tempo de preparo de amostra, a utilização de pequenas quantidades de solventes no procedimento, a simplicidade e a compatibilidade dos métodos para a recuperação de baixos teores de resíduos nos alimentos.

As técnicas analíticas instrumentais mais empregadas para a análise dos extratos das matrizes alimentares são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; CARNEIRO *et al.*, 2013) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) (FILLION; SAUVÉ; SELWYN, 2000; FURLANI *et al.*, 2011). Apesar de algumas classes de agrotóxicos permitirem a análise por ambas as técnicas, a HPLC e a GC não competem entre si, sendo mais bem definidas como complementares. Dessa forma, a GC atua eficientemente na separação e quantificação de agrotóxicos de baixas massas molares e temperaturas de ebulição (< 300 °C), termicamente estáveis, voláteis ou volatilizáveis, enquanto que a HPLC separa e quantifica praticamente todas as demais classes de agrotóxicos que não são passíveis de serem analisadas por GC (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A quantificação dos resíduos de agrotóxicos é possível devido ao acoplamento de sistemas de detecção adequados a estas técnicas analíticas de separação. Desta forma, para a GC os detectores de nitrogênio e fósforo (NPD, do inglês *nitrogen-phosphorus detection*) e por captura de elétrons (ECD, do inglês *electron-capture detection*) são os mais frequentemente empregados para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Para a cromatografia líquida os detectores de absorção na região UV/Vis ou por arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detector*) são os mais utilizados. Contudo, quando se faz necessária a confirmação da identidade dos compostos analisados, torna-se imprescindível a utilização de um sistema de detecção qualitativo, o qual forneça informações estruturais das moléculas dos compostos analisados.

O detector espectrométrico de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é atualmente o sistema de detecção qualitativo mais empregado na área de separação, pois fornece um espectro de massas e a massa molar, que caracteriza as espécies químicas de cada composto analisado. Metodologias analíticas que empregam a UHPLC (do inglês *ultra-high-performance liquid chromatography*) acoplada a sistemas de MS em série (*in tandem*), baseados em analisadores triplo quadrupolo (QqQ) são atualmente preferidos na análise de alimentos por causa da sensibilidade elevada alcançada com o modo de aquisição de Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*). Esta técnica tem tornado possível o desenvolvimento de metodologias multirresíduos de contaminantes em níveis de subtraços. Além disso, a UHPLC-MS/MS pode reduzir significativamente o tempo de análise e aumentar a sensibilidade para a detecção dos multirresíduos de agrotóxicos nos extratos (CARNEIRO *et al.*, 2013).

Rissato e colaboradores (2006) utilizaram o mel como indicador para monitoramento de contaminação ambiental por agrotóxicos na região de Bauru/São Paulo. Monitoraram-se quarenta e oito agrotóxicos de diferentes classes: organohalogenados, organonitrogenados, organofosforados e piretróides, no período de 1999 a 2004. Para o preparo das amostras de mel foi utilizada a técnica de extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) e o extrato submetido a análise por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (MS). Os limites de quantificação encontrados ficaram entre 0,8 a 20,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, os valores de recuperação foram superiores a 76 % e os coeficientes de variação menores que 7 % (RISSATO *et al.*, 2006).

Recentemente, Tosi e colaboradores (2018) utilizaram como indicador o pólen coletado das abelhas melíferas para monitorar regiões agrícolas da Itália. Foram monitorados 53 apiários no período de alta produção agrícola entre os anos de 2012 a 2014. O resíduo de agrotóxico mais detectado, com taxa de frequência de 30 % foi o clorpirifós e em 62 % das amostras coletadas foram detectados pelo menos um resíduo de agrotóxico. A técnica analítica empregada para detectar e quantificar as 66 moléculas de agrotóxicos foi a UHPLC-MS/MS e, para a extração dos resíduos de agrotóxicos do pólen, utilizou-se uma mistura de acetonitrila e água para cada 10 g de pólen, seguindo de extração líquido-líquido utilizando o solvente hexano e combinado com dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) em amina primária secundária (PSA) e sais. A metodologia desenvolvida apresentou limites de quantificação entre 2,50 e 10,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (TOSI *et al.*, 2018).

Os métodos de determinação multirresiduais consistem na análise simultânea de agrotóxicos podendo ser estas moléculas de um mesmo ou diferentes grupos químicos, em uma ou várias matrizes (ABAD, 2006). Tette e colaboradores (2016) propuseram um método de determinação multirresidual para quantificação de 116 agrotóxicos em mel. Para o preparo das amostras de mel os autores empregaram o método QuEChERS, o qual é comumente empregado para extração de multirresíduos de agrotóxicos em diversas matrizes alimentares. O método QuEChERS envolve a extração inicial em acetonitrila, seguida de uma etapa de partição após a adição de sal e uma etapa de limpeza utilizando extração em fase sólida dispersiva. Com uma abordagem diferente do método QuEChERS, os pesquisadores, diluíram 5 g de amostra de mel em 10 mL de água, e como solvente extrator utilizou-se uma mistura de acetonitrila e acetato de etila na proporção 7:3 acidificada com 1 % de ácido acético, o que forneceu extratos visualmente mais limpos tornando a limpeza mais fácil. Em seguida, adicionaram-se os sais sulfato de magnésio e acetato de sódio, os quais juntamente com o ácido acético adicionado anteriormente tamponou a solução dos extratos melhorando a estabilidade dos agrotóxicos e

aumentando a eficiência da extração. Em seguida, a limpeza do extrato foi realizada por meio de extração em fase sólida dispersiva empregando sulfato de magnésio, PSA e florisil. O primeiro foi empregado como agente dessecante para o extrato, o segundo para reter componentes da matriz, como ácidos orgânicos polares, açúcares e ácidos graxos, e o florisil foi empregado para melhorar a limpeza dos extratos das amostras, devido à interação dos açúcares com a superfície polar deste sorvente. A técnica analítica empregada para detectar e quantificar os resíduos de agrotóxicos presentes nas amostras de mel foi a UHPLC-MS/MS. Os limites de quantificação obtidos com esse método ficaram entre 10 e 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, os valores de recuperação encontrados ficaram entre 88 e 102 % e o coeficiente de variação entre 10 e 15 % (TETTE *et al.*, 2016).

Apesar do desenvolvimento de diferentes metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, na maioria das vezes não é possível detectar a presença destes compostos pois, as metodologias requerem detectabilidade ainda menores devido ao complexo processamento do mel pelas abelhas. Face o exposto, este trabalho pretende desenvolver, otimizar e validar uma metodologia analítica de alta detectabilidade e com preparação de amostra simples para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de mel, empregando a cromatografia líquida de ultra-alta-eficiência acoplada ao espectrômetro de massas em série.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho será contribuir para a garantia da segurança alimentar da ingestão do mel, desenvolvendo e validando duas metodologias analíticas para a determinação de multirresíduos de agrotóxicos a partir dos métodos de preparo de amostras QuEChERS e extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura (LLE-LTP) e da cromatografia líquida de ultra alta eficiência com ionização *electrospray* acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-ESI-MS/MS). Para desenvolver e validar os métodos são propostas as seguintes metas:

- i) Selecionar os principais agrotóxicos empregados nos cultivos agrícolas da região;
- ii) Otimizar os parâmetros instrumentais do UHPLC-ESI-MS/MS, como: fase móvel, pH, vazão da fase móvel, voltagem do cone e do capilar, vazão dos gases de nebulização e do cone; temperaturas da fonte e de dessolvatação para a determinação dos analitos;
- iii) Aplicar o método QuEChERS e otimizar a etapa de *clean-up* do extrato para extração dos resíduos de agrotóxicos em mel a fim de se obter boas exatidão e precisão para os analitos em estudo;
- iv) Otimizar o método de extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura (LLE-LTP) para os analitos em estudo na matriz do mel;
- v) Validar as metodologias desenvolvidas empregando os métodos QuEChERS e extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura combinadas a UHPLC-ESI-MS/MS, conforme o protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos proposto pela Comunidade Europeia – Documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017);
- vi) Aplicar as metodologias desenvolvidas para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel produzidas na região do Triângulo Mineiro, MG.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mel

A Instrução Normativa nº 11 publicada em 2000 que visa padronizar o processamento de produtos de origem animal, visando assegurar condições igualitárias e total transparência na elaboração e comercialização destes produtos, inclusive referente a identidade e qualidade do mel, define o mesmo como sendo:

O produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia, sendo que a sua composição é uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração (BRASIL, 2000).

A mesma normativa classifica o mel quanto à sua origem: (1) mel floral, o qual é obtido dos néctares das flores, podendo ser unifloral ou monofloral quando o produto é oriundo de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possua características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias; mel multifloral ou polifloral, o qual é obtido a partir de diferentes origens florais; o (2) melato ou mel de melato, obtido principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (BRASIL, 2000).

O mel de melato possui menores teores de glicose, razão pela qual usualmente não cristaliza; e de frutose, e maiores teores de oligossacarídeos, de cinzas, de nitrogênio e caráter mais básico quando comparado com o mel floral (CAMPOS *et al.*, 2003).

O mel também é classificado conforme a espécie de planta que é visitada pelas abelhas. Por exemplo, no Brasil, as abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) podem produzir mel oriundo da laranjeira, eucalipto, cipó-uva, silvestre e bracatinga. O mel de laranjeira apresenta cor clara e aroma característico, comumente produzido na região de São Paulo e Minas Gerais. O mel de eucalipto apresenta coloração escura, é rico em minerais, e possui propriedades expectorantes, geralmente é produzido nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. O mel de origem do cipó-uva

apresenta aspecto transparente, costuma agradar os consumidores por sua coloração e aroma, predominantemente produzido no estado de Minas Gerais. O mel de bracatinga é classificado como melato, pois é produzido a partir de cochonilhas, insetos sugadores que secretam um líquido açucarado no tronco da árvore Bracatinga, árvore nativa das regiões mais frias do Sul do Brasil, apresenta sabor autêntico e peculiar, coloração escura e rico em minerais. O mel silvestre é o mais comum no Brasil, trata-se de um mel polifloral, isto é, composto do néctar de várias espécies de plantas, a cor varia de amarelo claro a vermelho escuro, e quanto mais escuro, maior é o teor de minerais presentes (A.B.E.L.H.A., 2019).

É necessário no mínimo 80% de dominância da planta apícola no mel para que seu nome possa ser citado no rótulo do produto. A identificação da origem do mel é realizada por meio do conteúdo polínico. As abelhas ao coletar o néctar das flores coletam involuntariamente o pólen, o qual é o indicador de sua origem botânica e geográfica. O estudo denominado melissopalínologia compara os grãos de pólen das diferentes famílias, gêneros ou espécies botânicas visitadas pelas abelhas, através do uso lâminas ou fotomicrografias (SILVA, 2014).

No Brasil a apicultura concentra-se na produção de mel e própolis. Em 2018, o Brasil produziu 42 mil toneladas de mel e a produção gerou uma receita de 502 milhões, o que proporcionou geração de empregos na fabricação, comércio de equipamentos e no beneficiamento dos produtos (IBGE, 2019).

O mel foi utilizado desde os primórdios como edulcorante, porém passou a ser substituído por açúcares refinados provenientes da cana de açúcar e da beterraba. Sempre considerado um produto especial, foi utilizado pelo homem desde os tempos mais remotos, as evidências de seu uso aparecem desde a pré-história, com inúmeras referências em pinturas rupestres, em manuscritos e pinturas do antigo Egito, Grécia e Roma (VARGAS, 2006).

No antigo Egito, há 2400 a.C., colmeias já eram utilizadas e o mel era oferecido em cerimônias religiosas aos Deuses. As colmeias eram feitas de barro, palha e estrume de gado. Papiros egípcios de cerca de 1500 a.C. relatam o uso de mel como medicamentos. Também era utilizado como conservante, sendo aplicado sobre o corpo de autoridades importantes mortas, para que pudessem ser transportadas até o funeral. Sendo assim os egípcios são considerados pioneiros na criação de abelhas e na produção de mel. Porém, a palavra colmeia vem do grego, colmo, o qual era um recipiente de palha trançada onde as abelhas eram armazenadas (VARGAS, 2006).

Na idade média, no continente europeu, era proibido derrubar árvores, pois as mesmas serviam de abrigo para as abelhas. Os enxames eram registrados em cartório e deixados como

herança a igreja ou a pessoas da família, e caso fossem roubados a punição poderia ser até a morte (ORSO, 2011).

Em 1851, Reverendo Lorenzo Lorraine Langstroth desenvolveu a colmeia de quadros móveis o que permitiu o desenvolvimento e o avanço tecnológico da apicultura, esta colmeia é a mesma utilizada hoje em dia e em todo o mundo. A partir desta inovação o homem passou a separar o mel do favo (ORSO, 2011).

O néctar das plantas coletado pelas abelhas operárias é composto por 90 a 95 % de açúcares, e pequenas quantidades de compostos nitrogenados, minerais, ácidos orgânicos, vitaminas, pigmentos e substâncias aromáticas. O néctar é sugado pelo aparelho bucal das abelhas operárias sendo armazenado na bolsa melífera, ao chegar na colmeia, o néctar é liberado ao redor dos favos e misturado com secreções salivares dos insetos, que contém as enzimas invertase, α -amilase e glicose oxidase, e o mel é produzido (SOUSA, 2008).

Primeiramente, a sacarose, o principal açúcar presente no néctar, é transformado em glicose e frutose pela ação da enzima invertase, produzindo o mel verde ou mel não maturado. A glicose oxidase, por sua vez, transforma uma pequena quantidade de glicose em ácido glicônico, que torna o mel ácido, protegendo-o de bactérias que o fariam fermentar. A α -amilase é responsável por digerir a molécula de amido, proveniente do pólen (SOUSA, 2008).

A composição química do mel depende de fatores como espécie de planta visitada pelas abelhas, estado fisiológico da colônia, maturação do mel, condições meteorológicas e ambientais, localização geográfica e processamento (ORSO, 2011).

Conforme a legislação brasileira o teor de umidade do mel deve ser menor que 20%, já que a alta concentração de água pode favorecer a proliferação de bactérias, ocorrendo a fermentação do mel.

Os minerais que podem estar presentes no mel são: alumínio, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, lítio, sódio, enxofre, potássio, cloro, manganês, cobre, sílica, boro, cromo, níquel, chumbo, selênio, estrôncio e zinco. Também podem estar presentes no mel proteínas como a albumina e globulina que são provenientes do pólen e das abelhas, e uma faixa de 0,03 a 0,50% de aminoácidos (ORSO, 2011). Na Tabela 1 encontra-se a composição típica do mel.

Tabela 1. Composição química do mel.

Componente	Concentração
Água	17 %
Frutose	38 %
Glicose	31 %
Sacarose	1 %
Maltose	7 %
Açucares superiores	2 %
Outros	3 %
Nitrogênio	< 1 %
Minerais	< 1 %
Ácidos livres	22,0 meq kg ⁻¹
Lactonas	7,1 meq kg ⁻¹
Ácidos totais	29,1 meq kg ⁻¹

Fonte: Orso (2011).

O mel possui o caráter ácido, apresentando pH na faixa de 3,4 a 6,1, devido às fontes de néctar, pela ação da enzima glicose-oxidase, a qual por meio de reações químicas forma o ácido glucômico, e pelas quantidades de minerais presentes no mel. Em pequenas quantidades estão presentes outros ácidos, como por exemplo, acético, láctico, cítrico, fórmico, málico, maleico e oxálico (ORSO, 2011, TOMASINI, 2011).

Outras substâncias voláteis podem ser encontradas no mel, como por exemplo ésteres de ácidos alifáticos e aromáticos, aldeídos, cetonas e alcoóis. Os mais importantes são a β -demascenona e fenilacetil, que são característicos do odor e sabor do mel (TOMASINI, 2011).

As substâncias fenólicas presentes, como por exemplo os flavonóides, flavonas, flavononas e ácidos benzóico e cinâmico, atribuem ao mel atividades antibacteriana e anti-inflamatória, e agem como antioxidantes naturais (TOMASINI, 2011). O mel também é fonte de vitaminas podendo ser encontradas as vitaminas: A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, C e H.

O mel é utilizado como medicamento desde a antiguidade. Os assírios, egípcios e chineses utilizam o mel na cicatrização de ferimentos e na cura de doenças intestinais como por exemplo, infecções gastrintestinais, gastrite, duodenites e úlcera gástrica. Paracelso, considerado médico, afirmava que o mel possuía ação aglutinante sobre ferimentos, ou seja, efeito cicatrizante, e aplicava-se o mel sobre as feridas, queimaduras e abscessos. O mel também

melhora a resistência imunológica, atua como anti-inflamatório, antibacteriano, analgésico, sedativos e expectorante (ESCOBAR; XAVIER, 2013).

Outros produtos apícolas como o pólen, própolis, geleia real, apitoxina e a cera possuem alta qualidade nutricional e grande potencial terapêutico. O pólen possui de 10 a 36 % de proteínas, dependendo da origem floral, é rico em aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais, açúcares, pigmentos, fibras vegetais e enzimas, e é recomendado de 5 a 25 g por dia para melhorar o estado nutricional do organismo humano. O própolis contém em média 50 a 55 % de resinas e bálsamos, 30 % de cera, 10 % de óleos voláteis e 5 % de pólen, também estão presentes no própolis: flavonoides, ácidos aromáticos, ferro, cobre, manganês, zinco e vitaminas do complexo B. O própolis possui ação cicatrizante, desinfetante, antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, anestésica, ainda pode ser usado para tratamento de gripes, resfriados, gengivite, dor de garganta, gastrites, úlceras, aftas, herpes e em algumas doenças de pele. É comercializado em forma de líquidos, cremes ou pomadas. A geleia real é indicada para tratamentos dermatológicos, reposição de aminoácidos, revitalizante, regenera células e estimula a imunidade. A apitoxina, veneno das abelhas, é produzida nas glândulas de veneno e armazenado na base do ferrão, é constituído basicamente de proteínas, polipeptídios e constituintes aromáticos. Apesar das reações alérgicas que a apitoxina pode causar, a mesma é indicada para minimizar casos de artrite, reumatismo e hipertensão, porém o uso deve ser acompanhado por um médico. A cera é utilizada como matéria prima na indústria de fármacos e cosméticos, fabricação de velas, lustrador de pisos e móveis, na fabricação de graxas e unguentos e materiais para impermeabilização (EPAGRI, 2015).

O mel é o mais antigo ingrediente utilizado no cuidado da pele mundialmente em uso. Na Ásia Oriental, as mulheres japonesas fazem o uso diário de mel nas mãos para evitar rugas. Já as mulheres chinesas misturam sementes de laranja trituradas ao mel, para fazerem hidratante corporal e removedor de cravos e espinhas. Em Louisiana, as mulheres passam em seus corpos com uma loção composta de mel e água misturado a várias substâncias à base de plantas medicinais, este tratamento é usado como cosmético e como remédio para doenças de pele. As mulheres da Península Arábica usam máscaras de mel com gema de ovo, abacate, limão e iogurte, no rosto com o objetivo de diminuir o envelhecimento. O mel ainda pode ser usado para remover sardas, para melhorar a aparência da pele, para tratamento de infecções fúngicas da pele e como agente de limpeza (BURLANDO; CORNARA, 2013).

Na indústria de cosmético, o mel é frequentemente usado como veículo nas formulações, devido suas características físicas, mas também por suas virtudes terapêuticas e antimicrobianas são fundamentais em aplicações dermatológicas. Nas formulações cosméticas,

exerce efeitos de condicionamento emoliente, umectante, calmante e condicionador do cabelo, mantém a pele juvenil e retarda a formação de rugas, regula o pH e previne infecções. Os produtos cosméticos à base de mel incluem pomadas labiais, cremes de limpeza, hidratantes, loções tônicas, xampus e condicionadores (BURLANDO; CORNARA, 2013).

Diante de todas as inúmeras aplicações que o mel de abelhas possui atualmente, a presença de resíduos de agrotóxicos em sua constituição não apenas contaminam as pessoas pela ingestão do mel como alimento, mas também como seu uso cosmético, terapêutico, farmacêutico etc. A ingestão de mel contaminado com agrotóxicos acima dos limites máximos residuais permitidos na legislação vigente pode vir causar ao ser humano doenças como câncer, distúrbios endócrinos e mutações genéticas.

3.2 Abelhas

As abelhas apareceram há 50 milhões de anos e existem mais de 4 mil gêneros e cerca de 30 mil espécies de abelhas no mundo, responsáveis pela polinização de culturas agrícolas e pela produção de mel, cera, e outros produtos apícolas, como já mencionados (A.B.E.L.H.A., 2019).

As abelhas do gênero *Apis*, especificamente a *Apis mellifera*, é a espécie mais utilizada na produção de produtos apícolas, pois são de fácil manejo e dóceis. Oriundas do continente Europeu foram trazidas para a América do Sul por meio dos colonizadores, sendo que no Brasil foram introduzidas em 1839 pelos Padres da Companhia de Jesus, especialmente para a produção de velas (KERR, 1967).

As abelhas africanas *Apis mellifera scutellata*, são conhecidas por serem altamente produtivas, resistentes, alta capacidade de adaptação, agressivas e por possuírem grande tendência de enxamear. Foram introduzidas no Brasil em 1956 pelo geneticista e professor Dr. Warwick Estevam Kerr em Camaquã na região de Rio Claro-SP com o intuito de se executar um programa de melhoramento genético que fosse capaz de aumentar a produção de mel do país, associado à baixa agressividade das abelhas e enxameação (KERR, 1967). Dr. Warwick entomologista, engenheiro agrônomo e geneticista atuou como professor na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de 1988 a 2012, onde foi responsável pela implantação dos cursos de mestrado e doutorado em Genética e Bioquímica, e por diversas pesquisas científicas com abelhas, hortaliças e frutas (UFU, 2019).

Entretanto, devido a um acidente no apiário onde as rainhas africanas estavam sob quarentena, 26 enxames com suas respectivas rainhas, escaparam e cruzaram naturalmente com

as demais subespécies de abelhas melíferas que foram introduzidas no século XIX: a italiana *Apis mellifera ligustica*, a alemã *Apis mellifera mellifera* e a austríaca *Apis mellifera carnica*. Com isso surgiram populações polí-híbridas denominadas africanizadas, com predominância de características das abelhas africanas, tais como: alta produtividade, grande capacidade de enxamear e a agressividade (KERR, 1967).

Embora altamente produtivas as abelhas africanizadas causaram, no início de sua dispersão, grande impacto na sociedade e nos apicultores, pois eram agressivas e os apicultores não tinham conhecimento técnico para manejar as mesmas, ocorrendo abandono da atividade apícola, morte de pessoas e animais e queda considerável na produção de mel, marcando o período de retrocesso na apicultura brasileira (ORSO, 2011; TETTE, 2016).

Com o intuito de discutir os problemas da apicultura nacional e como controlar a abelha poli-híbrida, realizou-se em 1970 o primeiro Congresso Brasileiro de Apicultura em Florianópolis. Em seguida, iniciou-se período de pesquisas e investimentos na apicultura brasileira, promovendo grande desafio para os pesquisadores, técnicos e apicultores brasileiros, o que desencadeou o desenvolvimento de novas metodologias de manejo e aquisição de conhecimentos sobre a biologia e comportamento dessas abelhas, proporcionando a recuperação, a expansão da apicultura brasileira e o aumento crescente da produção de mel (ORSO, 2011; TETTE, 2016).

As abelhas também apresentam importante papel na agricultura brasileira. Responsáveis pela polinização de 141 espécies de plantas cultivadas no Brasil, as abelhas *Apis mellifera* têm sido as mais utilizadas em todo o mundo para a polinização de plantas cultivadas, em razão do tamanho de suas colônias, sua abundância em diferentes ecossistemas e seu perfil generalista na busca de recursos.

Porém, trabalhos recentes têm mostrado o declínio de polinizadores silvestres e domesticados em diferentes regiões do globo. Vários fatores estão associados ao declínio das populações de abelhas tais como: a perda e fragmentação dos habitats naturais, estado nutricional e manejo das colônias, patógenos, parasitas, o uso de agrotóxicos na agricultura, mudanças climáticas etc. (PINHEIRO; FREITAS, 2010; BOVI, 2013; PIRES *et al.*, 2016; EMBRAPA, 2017; COSTA, 2019).

A mortalidades sucessivas de colônias de *A. mellifera* foram primeiramente registradas nos países da Europa e nos Estados Unidos da América, registros mostram em média perda de 30 % das colônias. O primeiro registro de morte de abelhas no continente americano ocorreu no inverno de 2006 a 2007, verificou-se que colônias que entravam em colapso apresentavam características bem definidas, como por exemplo a rápida perda de abelhas operárias, ausência

de crias e abelhas adultas mortas dentro ou fora da colmeia; e ausência de invasão imediata da colmeia por pragas como, por exemplo, traças. No entanto, o fenômeno sem causa conhecida, passou a ser tratado como uma síndrome e recebeu a denominação de “*colony collapse disorder*”, em português, distúrbio do colapso das colônias (PIRES *et al.*, 2016).

Na Europa, os ácaros *Varroa* e a exposição a agrotóxicos, especialmente os neonicotinóides amplamente empregados na cultura do girassol, têm sido apontados como os causadores do desaparecimento das abelhas. No Reino Unido a morte de colônias de *A. mellifera* foram investigados no período de 2000 a 2010 e foi evidenciada relação significativa ao uso de imidacloprido, um inseticida do grupo dos neonicotinóides. No Brasil, o desaparecimento de abelhas foi relacionado com os defensivos amplamente utilizados na cultura de cana-de-açúcar (PIRES *et al.*, 2016).

Estudos têm relacionado o crescente uso de agrotóxicos à morte (efeito letal) ou danos a vários outros aspectos da biologia das abelhas, alterações a nível fisiológico, comportamental e desenvolvimento físico (efeitos subletais). Os efeitos subletais não levam à morte imediata, mas podem afetar o sistema reprodutivo das abelhas, reduzir a longevidade, diminuir a capacidade de escaparem dos predadores ou de procurar as presas (TORRES, 2012). Os inseticidas já foram relacionados a alterações comportamentais e morfofisiológicas afetando a capacidade de forrageamento, aprendizagem e vigor da colônia (PIRES *et al.*, 2016).

Alterações significativas na taxa de sobrevivência das abelhas foram encontradas ao serem expostas às doses de 20 e 100 µg do inseticida imidacloprido por kg de abelha, em comparação ao grupo-controle, durante três anos (DIVELY *et al.*, 2015). Pesquisadores (RUNDLOF *et al.*, 2015) avaliaram, em campo, doses recomendadas da mistura de clotianidina (neonicotinoide) e beta-ciflutrina (piretroide), para o tratamento de sementes de canola, e observaram redução da população de abelhas silvestres.

Em 2015, foi desenvolvido o método analítico com o intuito de ajudar a explicar a perda de colônias de abelhas em todo o mundo, para quantificar 11 resíduos de agrotóxicos em amostras de abelhas *Apis mellifera*, pólen e cera, as quais foram coletadas no estado de Virginia, nos EUA. Dos 11 analitos avaliados, 10 foram detectados em pelo menos uma amostra (LI *et al.*, 2015).

3.3 Agrotóxicos investigados

A região do Triângulo Mineiro, no estado de Minas Gerais, possui grande participação no agronegócio brasileiro. Uberaba é a principal produtora de milho, soja e sorgo; Capinópolis

e Conceição das Alagoas também são grandes produtoras de sorgo. Uberlândia se destaca na produção de banana, laranja e manga. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (G1, 2019), e na região do Triângulo Mineiro as cidades produtoras de cana-de-açúcar são Uberaba, Frutal, Santa Vitória, Conceição das Alagoas e Campo Florido. O estado de Minas Gerais é o segundo maior produtor de laranja no Brasil, sendo a produção concentrada na região do Triângulo Mineiro nos municípios de Comendador Gomes, Prata, Frutal, Uberlândia e Monte Alegre de Minas (SEAPA, 2017).

Para garantir a alta produtividade e atender o mercado consumidor os agricultores aplicam os agrotóxicos nas culturas. Sendo assim, foram selecionados sete agrotóxicos que são usados nas culturas predominantes na região do Triângulo Mineiro, para o monitoramento nas amostras de mel, são eles: metomil, imidacloprido, acetamiprido, acefato, diflubenzurom, tiametoxam e carbendazim.

O inseticida e acaricida metomil é seletivo e possui ação de choque e residual que controla ovos, larvas e adultos em diferentes culturas, como por exemplo soja, milho, trigo, algodão, tomate, batata, brócolis e couve. É amplamente empregado contra a lagarta *Helicoverpa armigera* nas culturas de soja, milho e algodão. Trata-se de um metilcarbamato que inibe a enzima acetilcolinesterase, a qual é responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas, sendo a acetilcolina o transmissor de mensagem de um neurônio a outro, quando acetilcolinesterase é inibida inúmeras funções fisiológicas são interrompidas (TOMLIN, 2003).

Os inseticidas imidacloprido, acetamiprido e tiametoxam, oriundos da molécula de nicotina são pertencentes ao grupo químico neonicotinóides e possuem classificação toxicológica III, ou seja, medianamente tóxicos. E agem no sistema nervoso de forma semelhante aos metilcarbamatos, ocasionando o colapso do sistema nervoso. São empregados nas culturas de cana-de-açúcar, algodão, trigo, batata, feijão, soja e tomate, para controle das pragas pulgão, mosca-branca, cigarrinha e cupins (TOMLIN, 2003).

O acefato, inseticida pertence ao grupo dos organofosforados, é amplamente empregado nas culturas de soja, algodão, milho, citros para controle de percevejo, lagarta da soja, cochonilha, pulgão e cigarrinha (TOMLIN, 2003).

Já o fungicida carbendazim pertence ao grupo benzimidazol e é empregado nas culturas de algodão, citros, feijão, maçã, milho, soja e trigo para controle dos fungos antracnose, mancha-parda, verrugose-da-laranja-doce, entre outros. Age inibindo a síntese de DNA bem como o processo de mitose nos organismos alvos (TOMLIN, 2003).

O diflubenzurom é um inseticida e acaricida empregado em várias culturas, dentre elas: algodão, cana-de-açúcar, café e soja, para o controle de lagartas e broca de cana. Pertencente ao grupo químico benzoiluréia age inibindo a síntese da quitina impossibilitando o crescimento e desenvolvimento do inseto (TOMLIN, 2003).

A Tabela 2 mostra a fórmula estrutural e molecular, nome químico, massa molar, grupo químico, classificação toxicológica, meia vida em água, classe e coeficiente de partição octanol/água das moléculas de metomil, imidacloprido, acetamiprido, acefato, diflubenzurom, tiametoxam e carbendazim.

Tabela 2. Informações físicas, químicas e toxicológicas dos agrotóxicos analisados nas amostras de mel.

Princípio ativo	Nome químico	Estrutura molecular	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Grupo químico	Classificação toxicológica ^a	Meia vida em água ^b / dia	Classe	Solubilidade em água ^b / g L ⁻¹	log K _{ow} (log P) ^b
Acefato PubChem CID: 1982 C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	O,S-dimetil acetilfosforamidotoato		183,17	Organofosfato	Medianamente tóxico (classe III)	31	Inseticida e acaricida	790	-0,85
Acetamiprido PubChem CID: 213021 C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	(E)-N1-[(6-cloro-3-piridil)metil]-N2-ciano-N1-metilacetamidina		222,67	Neonicotinóide	Medianamente tóxico (classe III)	34	Inseticida	4,3	0,80
Carbendazim PubChem CID: 25429 C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	metil benzimidazol-2-ilcarbamato		191,19	Benzimidazol	Medianamente tóxico (classe III)	>350	Fungicida	0,008	1,52
Diflubenzurom PubChem CID: 37123 C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂	1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoi)ureia		310,68	Benzoiluréia	Pouco tóxico (classe IV)	>180	Inseticida e acaricida	0,00008	3,89
Imidacloprido PubChem CID: 101618973 C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidina-2-ilideneamina		256,67	Neonicotinóide	Altamente tóxico (classe II)	42	Inseticida	0,61	0,57
Metomil PubChem CID: 5353758 C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	S-metil N-(metilcarbamoiloxi)tioacetimidato		162,21	Metilcarbamato	Extremamente tóxico (classe I)	>350	Inseticida e acaricida	57,9	0,60
Tiametoxam PubChem CID: 5821911 C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinam-4-ilideno(nitro)amina		291,72	Neonicotinóide	Medianamente tóxico (classe III)	22	Inseticida	4,1	-0,13

Fonte: ^a ANVISA, <http://portal.anvisa.gov.br/>, acessado em 31 de outubro de 2019. ^b pH entre 5 e 7, temperatura: 20 a 25 °C. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.4 Preparo de amostras

A preparação da amostra é a parte fundamental de uma análise química, sendo que o objetivo é obter um extrato contendo a totalidade do(s) analito(s) inicialmente presente(s) na amostra, livre dos componentes indesejáveis da matriz e compatível com as condições de análise. O extrato deve ser solúvel na fase móvel e não afetar a retenção ou a resolução dos compostos em estudo, ou seja, apresentar compatibilidade com a fase móvel. Várias etapas fazem parte do preparo de amostras: obtenção da amostra, processamento preliminar, armazenamento, pesagem ou dissolução, remoção de particulados, extração, remoção de interferentes e derivatização. Trata-se de uma fase crítica no processo de quantificação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos, pois a amostragem, o processamento e armazenamento, a extração e concentração dos resíduos de agrotóxicos das amostras e a remoção dos interferentes implicam diretamente na precisão e exatidão do método analítico. Desta maneira, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico (LAMBROPOULO; ALBANIS, 2007).

A determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos exige etapa prévia de preparo da amostra devido à complexidade das matrizes e às baixas concentrações dos analito, sendo assim as interferências provenientes das amostras são problemas que devem ser considerados e minimizados. Logo, os principais objetivos do preparo da amostra são promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse, e a remoção dos interferentes (PRESTES *et al.*, 2009).

Conforme já mencionado vários são os métodos de extração empregados para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras alimentícias. Dentre as possibilidades de métodos de extração que podem ser empregados para o isolamento dos resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, tem-se: o QuEChERS, acrônimo para o termo *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*; a extração sólido-líquido ou líquido-líquido com partição a baixas temperaturas (LSE-LTP - *Liquid-Solid Extraction with Low-Temperature Purification* ou LLE-LTP - *Liquid-Liquid Extraction with Low-Temperature Purification*); a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD); a extração em fase sólida (SPE – *Solid-Phase Extraction*); a microextração em fase sólida (SPME - *Solid-Phase Microextraction*); extração sortiva em barra magnética

(SBSE - *Stir Bar Sorptive Extraction*); e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME - *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*).

A técnica de extração SPE é usualmente empregada para pré-concentração de agrotóxicos, consiste em extrair os analitos presente em uma matriz líquida por meio de um cartucho contendo sorvente e, posteriormente, um solvente orgânico é utilizado para eluir os analitos. Recentemente pesquisadores (RAFIQUE *et al.*, 2018) empregaram a SPE para quantificar 35 resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, as quais foram diluídas com água para reduzir a viscosidade, particionada com acetonitrila, agitada em vórtex e, em seguida, posicionada em um banho de ultrassom. Logo após, à esta solução foi adicionado NaCl para limpeza do extrato e a mistura centrifugada. O líquido sobrenadante foi eluído por um cartucho SPE para adsorção dos analitos de interesse. A eluição dos analitos foi realizada por uma mistura n-hexano e acetona (90/10) e os extratos analisados por GC-MS. O método proposto foi validado e apresentou boa repetibilidade, com desvio padrão relativo menor que 20 % (RSD, do inglês *relative standard deviation*), baixo efeito matriz, e valores de recuperação entre 70,5 e 127,5 %.

O método de extração SPME consiste em uma fibra de sílica fundida coberta por um filme polimérico, podendo ser polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato, carvão ativo microparticulado ou outros materiais com características adsorventes. A fibra é exposta na amostra aquosa ou gasosa por determinado tempo, as moléculas dos analito de interesse se deslocam da matriz e penetram no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição ou de adsorção (para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio. Uma das vantagens do método SPME é a possibilidade de automação ao sistema de amostragem do cromatógrafo a gás (VALENTE; AUGUSTO, 2000). A aplicação do método para a extração de resíduos de agrotóxicos organoclorados em amostras de plantas medicinais mostrou-se eficaz com valores de recuperação entre 70 a 113 %, com desvios padrão relativo menores que 20 % (GONDO *et al.*, 2016).

O preparo de amostra por meio do método MSPD surgiu como uma alternativa à SPE, uma vez que na mesma é necessário a amostra estar em estado líquido. O método consiste na dispersão e maceração da amostra sólida juntamente com o suporte sólido, o qual promove a ruptura da estrutura da amostra. Após a amostra apresentar aspecto homogêneo, a mesma é empacotada em uma coluna, seguida da eluição e o extrato é analisado empregando a técnica analítica instrumental adequada (CALDAS *et al.*, 2013). Para extração de resíduos de agrotóxicos em frutas tropicais, autores utilizaram como eluente acetato de etila e C₁₈ como

fase sólida. A amostra foi homogeneizada com C₁₈, em seguida, foi transferida para um cartucho contendo sílica gel, eluindo os resíduos dos agrotóxicos com acetato de etila. O extrato foi analisado em um GC-ECD. As recuperações ficaram entre 76 e 105 % e a repetibilidade foi considerada adequada, apresentando desvio padrão relativo entre 2,8 e 19,8 % e demonstrando a eficiência do método (FREITAS; SERAFIM; LANÇAS, 2018).

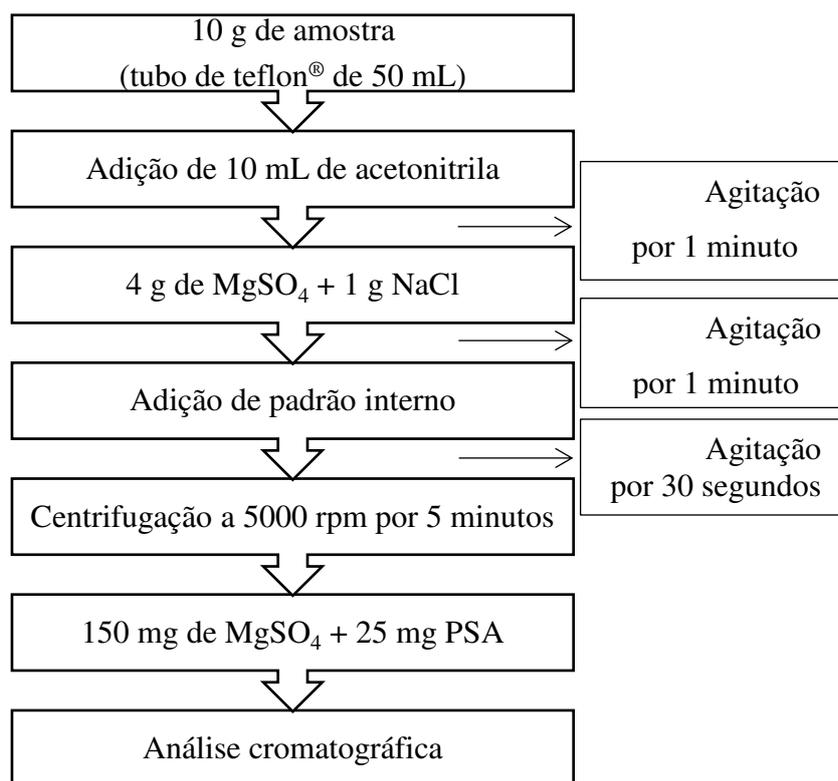
O preparo de amostra por SBSE baseia-se no equilíbrio de partição dos analitos entre a amostra e fase extratora, que são materiais poliméricos, homogêneos e não porosos, sendo o mais empregado o poli(dimetilsiloxano) (PDMS), por apresentar alta difusão e estabilidade térmica em ampla faixa de temperatura. Nas extrações SBSE, a barra de agitação magnética, a qual é revestida com a fase extratora é inserida diretamente na amostra e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos analitos entre a amostra e a fase extratora. Após sorção dos analitos na fase extratora, os mesmos podem ser termicamente dessorvidos no injetor de um cromatógrafo a gás com *headspace*, ou com solvente adequado no caso de análise utilizando a cromatografia líquida (CHAVES; QUEIROZ, 2008). Porém, o método SBSE é recomendado para moléculas de baixa polaridade devido ao PDMS ser não polar, o que implica em baixas recuperações para analitos altamente polares. Esta técnica foi demonstrada ser eficiente ao ser empregada na determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de uvas. As amostras de uva foram homogeneizadas com água ultrapura contendo 30 % de NaCl; e a suspensão transferida para um béquer contendo a barra de agitação revestida com PDMS. O material foi mantido em agitação. Após a sorção dos analitos na barra de agitação, os mesmos foram dessorvidos em metanol e a solução injetada em um LC-MS. Os valores de recuperação variaram entre 15 e 100 %, e o desvio padrão relativo entre 10 e 19 % (ABDULRA'UF; TAN, 2014). Os baixos valores de recuperação são consequência da baixa partição dos analitos da amostra para a fase extratora e, sobretudo, devido à polaridade dos analitos.

A DLLME é um método de extração e pré-concentração de amostras, e utiliza-se de um solvente dispersor, miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa). O solvente extrator é imiscível na fase aquosa, baseando, portanto, no processo de partição dos analitos entre as duas fases. O método consiste na adição da mistura dos solventes extrator e dispersor na amostra, em seguida, a solução é agitada e centrifugada. A fase sedimentada é transferida para um frasco e analisada (MARTINS *et al.*, 2012). Há um grande número de trabalhos publicados utilizando o método DLLME para quantificação de resíduos de agrotóxicos em amostras aquosas (AHMAD *et al.*, 2015). Seis agrotóxicos organofosforados (OPPs) foram determinados em água utilizando DLLME como método de preparo de amostras. Em seguida, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com detector

espectrométrico de massas. Nesse trabalho, o clorofórmio foi usado como solvente de extração e 2-propanol como solvente dispersor, e o método apresentou recuperações entre 46,1 e 129,4 % (ALVES *et al.*, 2011).

Dentre os métodos de preparo de amostras mais eficientes e empregados para matrizes alimentícias da atualidade pode ser destacado o método QuEChERS, proposto em 2003 por Anastassiades e colaboradores, tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, como sugere seu acrônimo. O método é amplamente usado para a determinação de agrotóxicos, antibióticos, hormônios, bifenilos policlorados em diversas matrizes. O fluxograma da Figura 1 apresenta a sequência de etapas experimentais para a aplicação do método QuEChERS na extração de compostos orgânicos de amostras de alimentos (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003).

Figura 1. Fluxograma representativo do método QuEChERS original proposto por Anastassiades e Lehotay.



Fonte: ANASTASSIADES; LEHOTAY (2003).

O método é baseado nas etapas de extração com acetonitrila, seguida da partição, promovida pela adição dos sais sulfato de magnésio e/ou cloreto de sódio. Outros solventes têm sido empregados, como acetona e acetato de etila, porém a acetonitrila é o solvente de extração

preferencial da metodologia, pois proporciona a extração de uma ampla faixa de resíduos de agrotóxicos com diferentes polaridades, possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como ceras, gorduras e pigmentos (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011), e pode ser facilmente separada da água sem a necessidade de adição de outro solvente apolar no processo (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003; ORSO, 2011).

Os sais promovem o efeito *salting out*, diminuindo a solubilidade dos analitos polares na fase aquosa e a quantidade de água na fase orgânica, proporcionando a separação rápida e completa das fases orgânica e aquosa (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). O sulfato de magnésio tem a finalidade de melhorar a recuperação dos resíduos de agrotóxicos polares, por ser um sal dessecante possui alta capacidade de remover água quando comparado a outros sais, reduzindo o volume de fase aquosa. A reação do sal com a água presente na amostra é do tipo exotérmica, o que ocasiona o aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C durante a etapa de partição, favorecendo a extração dos analitos. Um padrão interno, caso haja necessidade, pode ser adicionado antes da etapa de *clean-up* para minimizar erros sistemáticos relacionados com o processo de limpeza do extrato (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003).

Uma das vantagens do método QuEChERS frente a outros métodos de preparo de amostras é o baixo consumo de material (aproximadamente 1 g mL⁻¹), o que implica em menores efeitos de matriz (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011). Outra característica do método é a possibilidade de extrair de uma mesma amostra compostos de diferentes polaridades, favorecendo análises multirresiduais (ORSO, 2011).

A agitação empregada no método de QuEChERS pode ser manual ou com auxílio de um vórtex, o que permite realizar a extração *in loco* e como o processo de extração ocorre em frasco fechado o analista não é exposto (PRESTES *et al.*, 2009; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Após o processo de extração é necessária a realização de uma etapa de purificação (*clean-up*) do extrato, devido à complexidade das matrizes. Essa etapa é fundamental, uma vez que reduz as interferências e o efeito matriz, além de diminuir a necessidade de manutenção do sistema cromatográfico. O objetivo desta etapa é isolar o analito de interesse dos demais componentes da matriz, os quais poderão interferir no processo de análise (LANÇAS, 2009).

O QuEChERS tem sido o método mais empregado para a análise residual de agrotóxicos em amostras de alimentos, inclusive em mel. Porém, algumas modificações no procedimento original, apresentado na Figura 1, às vezes são necessárias dependendo dos agrotóxicos

analisados e das características da amostra, como por exemplo, a quantidade de amostra a ser utilizada, alterações no pH da amostra, e sorvente utilizado na etapa de *clean-up*. O PSA (*primary secondary amines*), sorvente original do método, retém moléculas de agrotóxicos contendo grupos carboxílicos, prejudicando a exatidão do método para determinação dessas substâncias (TETTE, 2016).

Um método para determinação de multirresíduos, empregando QuEChERS seguido de análise por GC-ECD, foi desenvolvido para quantificação de 23 resíduos de agrotóxicos em amostra de mel. O preparo de amostra consistiu em pesar a amostra e dissolvê-la em solução de Na₂EDTA, a qual foi empregada para homogeneizar as amostras de mel e para obter extratos lípidos devido à complexação de metais presentes no mel; seguida da extração com acetonitrila. À solução resultante foram adicionados sulfato de magnésio e cloreto de sódio. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi submetido a uma etapa de *clean-up* dispersivo com sulfato de magnésio e PSA. O extrato, separados dos sais, foi analisado por GC-ECD. A faixa linear de concentração das curvas analíticas situou-se entre 5,0 a 100 µg L⁻¹ e os valores de R² obtidos foram maiores que 0,99 para todos os analitos. Os valores de recuperação ficaram entre 70 e 145 % e os desvios padrão relativos foram menores que 27 % (ORSO, 2011).

Os agrotóxicos amitraz, carbendazim, dimetoato, fipronil, fluvalinato, imidacloprido, tebuconazol e tiametoxam foram determinados por LC-MS/MS, utilizando o método de preparo de amostra QuEChERS. Os resíduos dos agrotóxicos foram extraídos das amostras a partir da dissolução em hidróxido de amônio e adição de acetonitrila. As fases foram separadas pela adição de sulfato de magnésio, sendo que não foi empregada nenhuma etapa de *clean-up*. Os valores de recuperação estiveram na faixa de 70 a 112 %, com desvios padrão relativos menores que 20 %, e as curvas analíticas apresentaram valores de *r* (coeficiente de correlação linear) maiores que 0,99 para todos os analitos (TOMASINI, 2011).

Apesar da existência de métodos modernos de extração, a extração sólido-líquido e/ou líquido-líquido com partição em baixa temperatura (SLE-LTP ou LLE-LTP) tem se apresentado como uma alternativa interessante para extração de agrotóxicos em matrizes alimentícias, por ser uma técnica simples, que não exige instrumentação sofisticada, com poucas etapas e de fácil execução, empregando baixos volumes de solvente orgânico, menos tóxicos que as extrações com solventes tradicionais (JUHLER, 1997; GOULART *et al.*, 2008). O método é baseado na partição dos analitos entre as fases aquosa e orgânica miscíveis entre si, obtida a partir do abaixamento da temperatura (de -4 a -20 °C). A vantagem deste método é que os componentes da amostra são congelados com a fase aquosa, enquanto que os resíduos de agrotóxicos são extraídos para a fase orgânica (SILVÉRIO *et al.*, 2012), que permanecem em estado líquido.

Porém, há estudos utilizando a LLE-LTP e a GC-ECD ou ionização em chama (GC-FID, *flame ionization detection*) para quantificação de resíduos de agrotóxicos, e poucas são as publicações utilizando a HPLC e ainda mais incipiente com a UHPLC (PINHO *et al.*, 2010).

Pinho e colaboradores (2010) desenvolveram uma metodologia para quantificar os resíduos dos agrotóxicos clorpirifós, k-cialotrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de mel. O método de extração empregado foi baseado na extração e purificação líquido-líquido em baixa temperatura usando uma mistura de acetonitrila: acetato de etila como solvente para extração e florisil para limpeza dos extratos. O extrato foi analisado por GC-ECD. A metodologia apresentou resultados satisfatórios: curvas de quantificação com coeficientes de correlação acima de 0,99; limites de detecção e de quantificação de 0,016 e 0,033 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente; valores de recuperação entre 84,6 e 100,9 % e RSD menor que 10 % (PINHO *et al.*, 2010).

Neste trabalho, foram avaliados os métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP que apresentam como características a simplicidade e a facilidade de execução, extração rápida e eficiente de compostos orgânicos das amostras sólidas e líquidas, baixo consumo de solvente orgânico e que resultam em extratos límpidos, sem necessidade de etapas de limpeza ou concentração adicionais. A partir da otimização desses métodos, buscando maior seletividade e maior detectabilidade, os extratos foram analisados por UHPLC-ESI-MS/MS. Sendo este trabalho o primeiro registro da associação do método LLE-LTP, utilizado para extrair resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, com a técnica de análise UHPLC-ESI-MS/MS.

3.5 Cromatografia líquida de ultra alta eficiência com detector espectrométrico de massas

A cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC), implementada em 2004, desenvolveu-se com a introdução das partículas de fases estacionárias (FE) porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, juntamente com a busca contínua por análises mais rápidas e eficientes. A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ou seja, os componentes da amostra são distribuídos entre a fase estacionária e a fase móvel (MALDANER; JARDIM, 2012).

As colunas cromatográficas utilizadas em UHPLC possuem dimensões reduzidas quando comparadas com as utilizadas em HPLC, apresentam comprimento entre 5 e 10 cm, diâmetros internos entre 1,0 e 2,1 mm, e são recheadas com partículas menores que $2 \mu\text{m}$.

A técnica tem sido amplamente empregada em diversas áreas devido às vantagens que a mesma oferece, como a diminuição considerável no tempo de análise, melhor resolução e

detectabilidade, economia de solvente de fase móvel, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC e vice-versa, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos. Entretanto, o alto custo da instrumentação, dos consumíveis, manutenção e mão de obra especializada ainda são as limitações da técnica (MALDANER; JARDIM, 2012). Os equipamentos de UHPLC possuem um sistema de bombeamento robusto, sistema de injeção rápido, exato e preciso na faixa de pequenos volumes, volume morto reduzido (volumes de conexões, alça de amostragem, cela do detector e bombas), detectores com alta taxa de aquisição de dados e altamente sensíveis.

Vários são os detectores empregados em UHPLC, como por exemplo, os detectores ópticos: UV-VIS e por arranjo de diodos. O detector espectrométrico de massas é amplamente empregado para análise multirresidual de agrotóxicos em amostras alimentícias, por apresentarem alta seletividade e sensibilidade o que possibilita realizar análises com concentrações na escala de partes por bilhão (ppb) ou menores, e fornecem informação da massa molecular e características estruturais dos analitos. Os componentes do equipamento de espectrometria de massa são: sistema de introdução de amostras, geralmente trata-se de um cromatógrafo podendo ser a líquido ou a gás; fonte de ionização, analisador de massas e detector.

A união entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas foi desafiadora, pois a primeira trabalha em elevadas pressões e a amostra em estado líquido e a outra em pressões baixíssimas (alto vácuo) e amostra em estado gasoso. Para que essa união fosse possível, interfaces foram desenvolvidas para compatibilizar as duas técnicas. Várias interfaces, também denominada de fonte de ionização, foram desenvolvidas, porém as técnicas que operam em pressões atmosféricas (API – *Atmospheric Pressure Ionization*) foram as que apresentaram melhores resultados, convertendo os analitos de interesse em íons em fase gasosa (LANÇAS, 2009).

Dois tipos de fonte de ionização operam em pressão atmosférica, a *electrospray* (ESI, *electrospray ionization*) e a ionização química (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*). Na primeira, um spray é produzido com o auxílio de uma corrente elétrica, e é empregado para a análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular. Já a APCI, uma espécie química é produzida para ionizar a substância em análise, e é empregada para analisar moléculas menores e de baixa polaridade. Essas duas técnicas de ionização são complementares e os equipamentos modulares, ou seja, é possível alternar as fontes de ionização facilmente (LANÇAS, 2009).

Na fonte de ionização *electrospray*, os analitos em solução, provenientes do efluente da coluna cromatográfica, são direcionados à fonte e são ionizados quando atravessam um capilar metálico, no qual uma voltagem positiva ou negativa é aplicada. Dependendo da natureza do analito e do tipo de ionização (positiva ou negativa) alguns aditivos são adicionados na fase móvel com o objetivo de melhorar a ionização, esses aditivos devem ser voláteis e presentes em baixas concentrações, para evitar que os mesmos interfiram no processo de ionização do analito. Ao fim do capilar são geradas pequenas gotas que contém, além da fase móvel, íons carregados positivamente ou negativamente, dependendo do potencial que foi aplicado no capilar. Na fonte de ionização também é aplicado um gás inerte (geralmente nitrogênio é utilizado) com alto fluxo e a alta temperatura. Esse gás, denominado de gás de dessolvatação, tem como objetivo eliminar as moléculas de solvente, diminuindo as gotas previamente formadas até que as moléculas carregadas positivamente ou negativamente sejam ejetadas da gota, formando os íons de interesse (IGLESIAS, 2019).

Já na ionização APCI o analito é primeiramente volatilizado e, em seguida ionizado. O processo ocorre por meio de uma sonda com um capilar de sílica fundida envolto por uma resistência, na qual é aplicada uma corrente que eleva a temperatura do meio, proporcionando a vaporização da fase móvel. O analito em fase gasosa é direcionado a uma agulha metálica, com alta descarga elétrica, que gera uma corona de íons em fase gasosa em sua ponta. Inicialmente são ionizadas as moléculas do gás nitrogênio e dos solventes da fase móvel, que posteriormente transferem carga para os analitos de interesse por meio de reações íons-moléculas (IGLESIAS, 2019). Após a ionização, os analitos são encaminhados para o analisador de massas. No analisador, os íons são separados com o auxílio de diferentes campos (elétricos, magnéticos e combinação deles) conforme a razão massa e carga elétrica da molécula. Os analisadores de massas comumente empregados são: quadrupolo, aprisionador de íons (*Ion Trap*), tempo de voo (ToF, *time-of-flight*). O analisador quadrupolo é indicado para análise quantitativa pois, apresentam menor resolução na medida de massas, já o analisador ToF apresenta maior resolução do que o quadrupolo e alta exatidão sendo indicado para análises qualitativas (LANÇAS, 2009).

Com o intuito de se obter mais informações sobre a molécula do analito e promover a confirmação da sua identidade de forma segura e assertiva, dois ou mais analisadores de massas são posicionados em série, denominado sistema em tandem. Porém, para se obter informações estruturais e aumentar a seletividade é necessário a fragmentação da molécula, a qual ocorre na câmara de colisão, sendo esta posicionada entre o primeiro e o segundo analisador de massas triplo quadrupolo (QqQ). Na célula de colisão, o íon selecionado no primeiro analisador é

fragmentado ao chocar-se com moléculas de gás inerte (nitrogênio ou argônio) gerando novos íons os quais são analisados no segundo analisador de massas, aumentando a sensibilidade e a seletividade de detecção (LANÇAS, 2009).

Várias são as combinações de analisadores em tandem: triplo quadrupolo consiste na combinação em série de dois analisadores de massas quadrupolo; quadrupolo-ToF, quadrupolo-ion trap, ion trap-ToF. A definição de qual analisador a ser utilizado dependerá da aplicação e do objetivo da análise.

O detector de um espectrômetro de massas é responsável por converter o feixe de íons em sinal elétrico, posteriormente processado pelo sistema de dados do computador de aquisição. O sistema de detecção comumente empregado é o de fotomultiplicadoras de elétrons, em que os íons são convertidos em elétrons por meio de um dinodo de conversão. Esses elétrons são direcionados a uma superfície que libera fótons mediante incidência dos mesmos e essa radiação é medida (IGLESIAS, 2019).

Vários são os trabalhos publicados utilizando a UHPLC-MS/MS para análise multirresidual de agrotóxicos em diversas matrizes, devido ao alto poder de detecção e seletividade (CARNEIRO *et al.*, 2013; TETTE *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2018). Face ao exposto, esse trabalho visa empregar a técnica mencionada para quantificar resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, após extração pelos métodos QuEChERS e LLE-LTP.

3.6 Planejamento e otimização de experimentos

O planejamento de experimentos (em inglês *Design of Experiments*, DOE) é uma ferramenta importante para a melhoria e otimização dos parâmetros de processos em laboratórios de pesquisa e no setor industrial. É empregada para definir quais parâmetros, quantidades, e em que condições os dados devem ser coletados durante o experimento, buscando maior precisão estatística na resposta, menores tempo e custo. Trata-se de uma etapa crítica e, para que os objetivos do planejamento experimental sejam alcançados, alguns fatores devem ser considerados: (1) entender o problema a ser resolvido e traçar os objetivos a serem alcançados, (2) escolher as variáveis relevantes, (3) definir os valores a serem estudados (níveis) e a ordem de estudo das variáveis, (4) selecionar a(s) variável(is) resposta(s), (5) selecionar o planejamento experimental, (6) realizar os experimentos, (7) selecionar o método estatístico para a análise dos dados (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O planejamento experimental pode ser empregado no desenvolvimento de métodos analíticos, no qual são avaliados os fatores que influenciam a resposta do sistema, e que podem ser otimizados para melhorar a exatidão, precisão e sensibilidade do método analítico. Também pode ser empregado para aperfeiçoar as etapas do processo de preparo de amostra, otimizando as variáveis, como a quantidade e seleção de reagentes, tempo de extração, pH da solução, a fim de extrair completamente o analito de interesse e reduzir interferentes (EIRAS *et al.*, 2000).

O procedimento de otimização de um sistema químico deve envolver as seguintes etapas: realização de experimentos de varredura para caracterizar as variáveis do sistema, usando um planejamento fatorial; localização da região ótima ou ideal; ajuste fino da região ótima, usando planejamento fatorial e/ou superfície de respostas (EIRAS *et al.*, 2000).

O método de otimização univariada é comumente empregado para otimizar procedimentos, neste método todos os fatores que estão sendo pesquisados são fixados em determinado nível, exceto um deles, sendo este variado até que se encontre a melhor resposta. Quando a melhor resposta de um fator é encontrada, um novo fator sofre variação. A desvantagem do método de otimização univariada é o número de experimentos, pois os fatores são otimizados um de cada vez (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O método univariado é aplicado em sistemas onde as variáveis otimizadas são independentes, porém em sistemas químicos as variáveis costumam se correlacionar fortemente, interagindo através de mecanismos que proporcionam efeitos sinérgicos e/ou antagônicos, sendo nestes casos os métodos de otimização multivariados os mais indicados (EIRAS *et al.*, 2000).

Dentre os métodos de otimização multivariada destaca-se o planejamento fatorial o qual permite avaliar simultaneamente o efeito de várias variáveis, a partir de um número reduzido de experimentos quando comparado com método de otimização univariado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Inicialmente para obter a otimização de um experimento é necessário avaliar a influência das variáveis estudadas e das suas interações no sistema em estudo, esta etapa é denominada de triagem, e os planejamentos fatoriais completos ou fracionários são ferramentas indispensáveis nessa etapa (EIRAS *et al.*, 2000).

Para realizar um planejamento fatorial é necessário especificar os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores dos fatores que serão utilizados nos experimentos. Em planejamento fatorial completo (2^k) realizam-se experimentos em todas as possíveis combinações dos dois níveis dos k fatores estudados, sendo possível avaliar a influência que os fatores exercem um sobre o outro e sobre o resultado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

No planejamento fatorial completo o número de ensaios cresce a cada fator adicionado, deste modo, se os números de fatores forem relativamente altos, é possível que alguns deles não tenham influência significativa sobre a resposta. Nesse caso, um planejamento completo geraria um número grande de experimentos, sendo, o ideal realizar o planejamento fatorial fracionário (2^{k-n}), realizando uma triagem, para decidir quais são os fatores que influenciam na resposta do processo e que merecem um estudo mais aprofundado (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Para avaliar quais fatores e quais interações entre eles são significativas e influenciam na resposta do sistema, é necessário fazer um levantamento preliminar dos fatores mais relevantes e identificar os níveis mais adequados para cada fator (EIRAS *et al.*, 2000). Os efeitos dos fatores e suas interações podem ser interpretados por meio do gráfico de Pareto. A importância de cada fator e das interações entre eles é avaliada através do comprimento da barra. A linha de corte indica o limite de significância, abaixo do qual a variável pode ser considerada insignificante, ou seja, não causa influência no experimento.

Após a definição das variáveis significativas os resultados são avaliados utilizando um programa computacional adequado, sendo esta a etapa de otimização propriamente dita, a qual permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta para um dado processo. Uma das metodologias usualmente empregadas é um Planejamento Composto Central, também chamado de *Central Composite Design* (CCD), a qual baseia na modelagem de uma superfície de resposta empregando funções polinomiais, que informa as condições ótimas das variáveis estudadas (EIRAS *et al.*, 2000).

A análise da superfície de resposta indica se a função apresenta um máximo ou um mínimo, concluindo o processo de otimização; se a superfície não apresenta um ponto crítico e nesse caso, deve-se localizar uma nova região experimental e a construção de um novo planejamento; e também permite avaliar o comportamento da resposta do sistema em função do intervalo dos fatores estudados. Desta forma, o emprego do planejamento de experimento em Química, em processos industriais e em pesquisas científicas é fundamental para uma análise crítica das variáveis do sistema. Possibilitando redução de custos e tempo, aumento da resposta do processo e melhor compreensão do que ocorre no experimento.

3.7 Validação de metodologias analíticas

O desenvolvimento de uma metodologia analítica requer um processo de avaliação que ateste a eficiência do método antes da aplicação deste na análise de amostras de interesse. Esse

processo é denominado validação, que segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, é a verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido (INMETRO, 2016). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define que a validação é um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, e ressalta que é essencial que a validação seja realizada sobre o procedimento analítico exatamente da forma que ele será executado na rotina do laboratório (MAPA, 2015).

A validação da metodologia analítica é realizada por meio de um procedimento que comprova que esta oferece os resultados que se buscam de forma precisa e exata. Para tanto, alguns parâmetros analíticos são avaliados, tais como: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Estes termos também são definidos como figuras de mérito. Entretanto, as figuras de mérito que deverão ser avaliadas no processo de validação e seus critérios de aceitação podem variar de acordo com o tipo de ensaio, por exemplo, caso seja um ensaio qualitativo somente os parâmetros seletividade e limite de detecção são avaliados, enquanto que se o método for quantitativo todos os demais se fazem necessários (INMETRO, 2016).

A seletividade corresponde 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, ou seja, é a capacidade da metodologia em produzir um sinal referente à presença do analito, livre da interferência de outros componentes da matriz, de outro princípio ativo, de impurezas e de produtos de degradação, garantindo que o sinal analítico seja exclusivamente de um único componente, isto é, que não existam outras eluições simultâneas. A seletividade avalia o grau de interferência de outras espécies presentes na amostra na resposta analítica da molécula em estudo. Se a resposta do composto de interesse for distinguível das outras respostas, o método é considerado seletivo (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2009).

A linearidade de um método é a sua capacidade de produzir resultados que são diretamente, ou através de transformação matemática bem definida, proporcional à concentração do soluto nas amostras, dentro de uma determinada faixa. A concentração do analito é relacionada matematicamente com a resposta do equipamento por meio de um gráfico, sendo expressa por uma equação de reta denominada de curva. A partir da regressão linear é possível determinar os coeficientes de regressão e correlação (r), o qual conforme o documento

SANTE/11813/2017 de validação para evidenciar que há um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão deverá ser maior ou igual a 0,99 (SANTE, 2017). A curva analítica pode ser construída com o padrão analítico solubilizado em solvente, ou o padrão analítico pode ser adicionado à matriz em estudo, com o objetivo de eliminar ou compensar os efeitos dos seus interferentes.

A precisão pode ser medida em três diferentes níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade corresponde à variação da resposta sob várias reproduções do método analítico, nas mesmas condições e em um intervalo curto de tempo (precisão intra-ensaio ou intra-dia). A precisão intermediária expressa o efeito de variações como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos, etc., dentro do mesmo laboratório (precisão inter-dias). A reprodutibilidade se refere aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (INMETRO, 2016). Segundo o documento SANTE/11813/2017, os valores de precisão devem apresentar estimativas de desvio padrão relativo inferiores a 20 % (SANTE, 2017).

A exatidão é a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico e pode ser expressa através da recuperação. A recuperação é uma medida da eficiência do procedimento de extração do analito de interesse da matriz em que se encontra presente (LANÇAS, 2009). A recuperação é expressa como porcentagem da concentração verdadeira ou conhecida que foi encontrada em uma amostra. O documento SANTE/11813/2017 de validação estabelece que os resultados de recuperação devem situar dentro da faixa de recuperação de 70 a 120 % (SANTE, 2017).

O limite de detecção representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando o procedimento experimental, enquanto o limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais e geralmente é expresso em unidades de concentração. O limite de quantificação deve possuir uma relação sinal/ruído maior ou igual a 10 e corresponde ao primeiro nível da curva analítica (INMETRO, 2016).

A robustez refere-se à confiabilidade de uma análise com relação a pequenas variações no método, ou seja, é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução. Algumas variações típicas são o tempo de extração, o pH e/ou a composição da fase móvel, a temperatura, a vazão, as análises realizadas em dias diferentes etc. (INMETRO, 2016).

4 METODOLOGIA

Toda pesquisa foi desenvolvida em parceria com o Centro Tecnológico da empresa Ourofino Agrociência SA. O laboratório é acreditado na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, portanto, todos os materiais e equipamentos de laboratórios são calibrados na Rede Brasileira de Calibração. Os equipamentos são anualmente calibrados ou qualificados, e passam por manutenções preventivas. Sendo verificados periodicamente com o objetivo de evidenciar o correto funcionamento e identificar possíveis desvios.

A empresa Ourofino Agrociência SA disponibilizou para a realização deste trabalho vidrarias calibradas, reagentes e padrões analíticos, solventes grau cromatográfico, os equipamentos UHPLC acoplado a espectrometria de massas e balanças analíticas.

O desenvolvimento experimental consistiu na aplicação e validação dos métodos QuEChERS e LLE-LTP para a extração dos resíduos de agrotóxicos em mel. A quantificação dos analitos foi realizada por UHPLC-ESI-MS/MS. As figuras de mérito avaliadas no processo de validação foram a linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção e quantificação e efeito matriz.

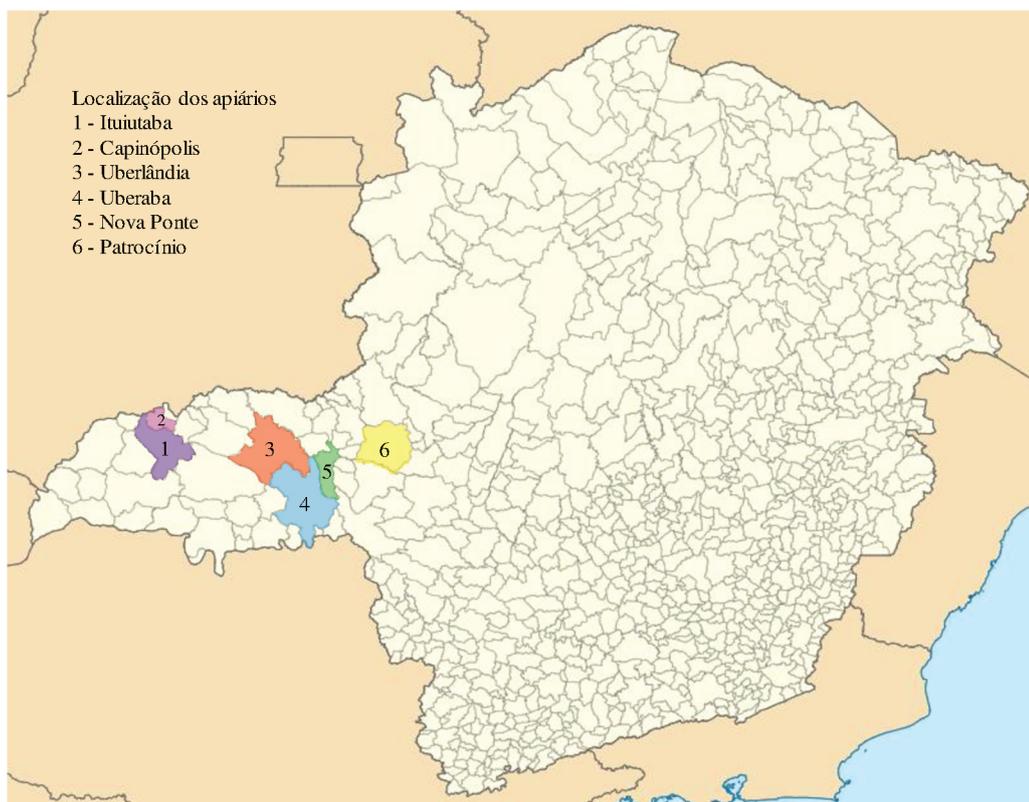
4.1 Amostra de mel

Para o desenvolvimento das metodologias analíticas foram adquiridas amostras de mel silvestre de um apiário localizado na zona urbana da cidade de Uberlândia, MG, Brasil.

Nove amostras de mel silvestre, sem qualquer tipo de tratamento, adquiridas de apiários localizados nas cidades de Uberlândia (amostra A e H), Ituiutaba (amostra B), Capinópolis (amostra C), Patrocínio (amostra D), Nova Ponte (amostra E) e Uberaba (amostras F, G e I) da região do Triângulo Mineiro foram submetidas aos métodos analíticos validados neste trabalho para a determinação de resíduos de acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzuron, imidacloprido, metomil e tiametoxam, empregando os métodos de preparo de amostra QuEChERS e LLE-LTP, e análise por UHPLC-ESI-MS/MS. As amostras foram identificadas por letras, para preservar as marcas e os fabricantes, e analisadas em triplicata. As amostras foram coletadas no período de 2018 a 2019 e armazenadas nos frascos de origem a 4 ± 1 °C em refrigerador até o momento da análise. A cidade de origem, no entanto, foi empregada para a identificação do potencial foco de contaminação pelos agrotóxicos avaliados.

A Tabela 3 apresenta dados das amostras de mel e a Figura 2 apresenta o mapa geográfico indicando as cidades nas quais os apiários estão localizados.

Figura 2. Mapa geográfico indicando as regiões nas quais as amostras de mel foram coletadas.



Fonte: A autora.

Tabela 3. Dados das amostras de mel coletadas na região do Triângulo Mineiro.

Codificação	Cidade	Data de fabricação
A	Uberlândia	Junho/ 2019
B	Ituiutaba	Outubro/ 2018
C	Capinópolis	Outubro/ 2018
D	Patrocínio	Junho/ 2019
E	Nova Ponte	Junho/ 2019
F	Uberaba	Junho/ 2019
G	Uberaba	Junho/ 2018
H	Uberlândia	Outubro/ 2019
I	Uberaba	Outubro/ 2019

Fonte: A autora.

4.2 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento da metodologia foram:

- Agitador vórtex, marca IKA, modelo MS3 digital;
- Balança analítica, marca Mettler Toledo, modelo MS-TS;
- Banho ultrassom, marca Unique;
- Centrífuga, marca Fanem, modelo Excelsa II;
- Coluna cromatográfica HSS-T3, marca Waters;
- Micropipeta eletrônica, marca Eppendorf;
- Sistema de aquisição de dados microcomputadorizado;
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 8, marca Merck Millipore;
- Software Mass Lynx versão 4.1;
- UHPLC-ESI-MS/MS, marca Waters, modelo Xevo TQ-s Micro, analisador triplo quadrupolo;

4.3 Reagentes, solventes e materiais utilizados

Os reagentes, solventes e materiais utilizados neste trabalho estão descritos a seguir:

- Acetato de sódio PA, marca Exôdo;
- Acetato de etila, grau UHPLC MS/MS, marca Merck;
- Acetonitrila grau HPLC, marca Merck;
- Ácido acético, grau UHPLC MS/MS, marca Merck;
- Água ultrapura Tipo I, purificada em sistema de água Milli-Q Direct 8, com resistividade 18,2 M Ω cm e COT (carbono orgânico total) menor que 2 ppb;
- Amina Primária Secundária (PSA), marca Sigma-Aldrich;
- Cloreto de sódio PA, marca Exôdo;
- Frasco de vidro (*vial*) transparente com capacidade de 2 mL;
- Octadecilsilano, SiO₂-C₁₈, marca Waters;
- Sílica gel 60, 230-400 mesh, marca Sigma-Aldrich;
- Sulfato de magnésio anidro, marca Exôdo;
- Tubos de polipropileno (tubos Falcon[®]), com tampa rosqueada com capacidade de 50 mL;
- Vidrarias volumétricas e graduadas de laboratório calibradas.

4.4 Padrões analíticos

A Tabela 4 lista os materiais de referências certificados utilizados e os seus respectivos graus de pureza.

Tabela 4. Relação dos agrotóxicos analisados por UHPLC-ESI-MS/MS com informação de pureza.

Analito	Marca	Pureza (% m/m)	Incerteza (%)
Acefato	Institute of Industrial Organic Chemistry	99,5	0,3
Acetamiprido	Institute of Industrial Organic Chemistry	99,8	0,1
Carbendazim	Sigma Aldrich	99,2	0,5
Diflubenzurom	Institute of Industrial Organic Chemistry	99,6	0,1
Imidacloprido	Institute of Industrial Organic Chemistry	99,9	0,1
Metomil	Institute of Industrial Organic Chemistry	99,8	0,1
Tiametoxam	Sigma Aldrich	99,7	1,0

Fonte: A autora.

4.5 Preparo da solução estoque

Pesou-se em balão volumétrico de 100 mL aproximadamente 10 mg de cada um dos padrões analíticos acefato, metomil e carbendazim, sendo o balão completado com metanol grau cromatográfico. Em um segundo balão volumétrico de 100 mL pesaram-se 10 mg dos demais padrões analíticos, sendo o balão completado com acetonitrila grau cromatográfico. Alíquotas de 10 μ L dessas soluções foram transferidas para outro balão volumétrico de 100 mL e este completado com água Tipo I, sendo 10,0 μ g L⁻¹ a concentração de cada analito nessa solução, denominada solução estoque.

Para a injeção no sistema UHPLC-ESI-MS/MS, as soluções analíticas foram preparadas nas concentrações 0,50; 1,50; 2,50; 3,50 e 4,50 μ g L⁻¹ de cada analito, a partir da solução estoque de concentração 10,0 μ g L⁻¹, em água e no extrato do mel.

4.6 Otimização dos parâmetros do detector triplo quadrupolo

Soluções dos analitos com concentração de 1,0 mg L⁻¹ foram infundidas individualmente no detector triplo quadrupolo em combinação com fase móvel proveniente do

UHPLC, a qual era composta por acetonitrila: H₂O (50:50, v/v) acidificada com 0,1% de ácido acético.

Os parâmetros otimizados no detector triplo quadrupolo com fonte de ionização *electrospray* (ESI) foram: a voltagem do capilar, a voltagem do cone, a temperatura de dessolvatação, o fluxo do gás de dessolvatação (N₂), o fluxo de gás no cone, a energia de colisão e os fragmentos massa/carga a serem monitorados.

4.7 Condições cromatográficas de análise

As condições cromatográficas empregadas foram:

Coluna cromatográfica:	HSS T3 100 mm x 2,1 mm; 1,8 µm, com grupamentos C ₁₈ ligados quimicamente a SiO ₂
Fase móvel:	Canal A: H ₂ O Tipo I 0,1 % ácido acético Canal B: Acetonitrila 0,1 % ácido acético
Fluxo:	300 µL min ⁻¹
Temperatura da coluna:	30 °C
Volume de injeção:	2 µL
Solução de limpeza da agulha:	H ₂ O: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (1:1:1:1) a 0,1 % ácido fórmico

O gradiente de fase móvel otimizado para analisar a mistura dos agrotóxicos é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Gradiente de fase móvel empregado na análise dos multirresíduos de agrotóxicos em mel por UHPLC-ESI-MS/MS.

Tempo (min)	Canal A (%)	Canal B (%)
0,0	90,0	10,0
0,25	90,0	10,0
7,75	2,0	98,0
8,50	2,0	98,0
8,51	90,0	10,0
10,00	90,0	10,0

Fonte: A autora.

4.8 Preparação da amostra empregando o método de extração QuEChERS modificado

O preparo de amostra foi realizado utilizando o método de extração QuEChERS. Para isso, 5,000 g de amostra de mel foram pesados em tubo de polipropileno de 50 mL, adicionando-se 5,00 mL de água e agitando em vórtex por 1 min. Acrescentaram-se 4,00 mL de acetonitrila grau HPLC, agitando-se novamente por 1 min. Sob agitação, foram adicionados 6,000 g de MgSO₄ e 1,500 g de acetato de sódio, permanecendo por 3 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante armazenado para realização da etapa de *clean-up*.

4.9 Otimização da etapa de extração em fase sólida dispersivo

O extrato orgânico obtido após a etapa de extração da amostra de mel foi submetido a etapa de extração em fase sólida dispersivo com o objetivo de reduzir possíveis interferentes na análise cromatográfica e minimizar o efeito matriz. Para isso, três sorventes foram avaliados: amina primária secundária (PSA), sílica (SiO₂), e mistura de sulfato de magnésio e sílica.

A avaliação da etapa de extração em fase sólida dispersivo foi realizada transferindo 950 µL do extrato para o tubo de polipropileno de capacidade de 2 mL com o sorvente, seguido da fortificação dos analitos avaliados, a qual foi realizada transferindo uma alíquota de 50 µL da solução estoque dos agrotóxicos de concentração 500 µg L⁻¹ em acetonitrila. Em seguida, agitou-se em vórtex por 1 min, filtrando a solução em seguida através de filtros com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, *poly(vinylidene fluoride)*) e porosidade de 0,22 µm. Em seguida 100 µL do extrato limpo foram diluídos em 900 µL de água Tipo I e analisado por UHPLC-ESI-MS/MS.

4.10 Seleção das variáveis do preparo de amostra empregando o método de extração LLE-LTP

O método de extração dos resíduos de agrotóxicos de amostras de mel, empregando a extração líquido-líquido a baixa temperatura (LLE-LTP) foi otimizado através de um planejamento de experimentos. Para a seleção de variáveis que afetam significativamente o método de extração LLE-LTP dos agrotóxicos avaliados em amostra de mel foi delineado um planejamento fatorial fracionário, em que foram avaliadas 6 (seis) variáveis em 2 (dois) níveis cada, conforme indicado na Tabela 6.

Tabela 6. Variáveis e seus níveis avaliados no processo de extração LLE-LTP dos agrotóxicos em amostra de mel.

Variáveis	Níveis	
	(-)	(+)
A Quantidade de amostra (g)	2,0	3,0
B Volume de solvente (mL)	2,0	6,0
C Solvente extrator	Acetonitrila	Acetato de etila
D Tempo de congelamento (h)	2	4
E Tempo de extração (min)	5	10
F Adição de NaCl (% m/v)	1	2

Fonte: A autora.

As variáveis foram combinadas de acordo com a matriz experimental apresentada na Tabela 7, através de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com duas relações geradoras, totalizando 16 (dezesseis) experimentos. Primeiramente, empregou-se o planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} . Os experimentos para os fatores E e F na Tabela 7 foram construídos a partir da interação dos fatores A, B, C e D, de forma que os 16 experimentos envolvem condições distintas entre si, com o objetivo de selecionar as variáveis que efetivamente afetam a resposta do processo de extração dos resíduos dos agrotóxicos do mel. A recuperação dos agrotóxicos avaliados foi a variável resposta monitorada.

Tabela 7. Matriz de experimentos do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} para avaliação dos fatores que afetam a extração LLE-LTP de agrotóxicos de amostras de mel. Fatores E = A×B×C e F = B×C×D.

Experimentos	Variáveis					
	A	B	C	D	E	F
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+	-
3	-	+	-	-	+	+
4	+	+	-	-	-	+
5	-	-	+	-	+	+
6	+	-	+	-	-	+
7	-	+	+	-	-	-
8	+	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	-	+
10	+	-	-	+	+	+
11	-	+	-	+	+	-
12	+	+	-	+	-	-
13	-	-	+	+	+	-
14	+	-	+	+	-	-
15	-	+	+	+	-	+
16	+	+	+	+	+	+

Fonte: A autora.

Cada experimento foi realizado em triplicata a fim de estimar o erro experimental. A amostra de mel foi fortificada com os agrotóxicos a fim de obter uma concentração final de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. A amostra de mel foi pesada em um tubo de polipropileno de 50 mL, fortificada com a solução dos agrotóxicos, seguido da adição de 4 mL de água ultrapura (contendo 40 mg ou 80 mg de NaCl). A solução resultante foi agitada em vórtex para homogeneização. Em seguida, adicionou-se ao tubo de polipropileno o volume do solvente extrator, agitou-se em vórtex mantendo-o em banho ultrassom pelos tempos de extração estudados. Posteriormente, retirou-se o frasco de polipropileno do banho e colocou em freezer sob congelamento a -30 ± 3 °C pelo tempo definido. Após o período de congelamento retirou-se uma alíquota de 100 μL da fase orgânica, transferindo-a para o *vial*, adicionando 900 μL de água ultrapura. O *vial* foi levado

para o carretel de injeção no UHPLC-ESI-MS/MS, e a recuperação para cada analito foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$R(\%) = \frac{[\text{analito}]_{\text{extraída}}}{[\text{analito}]_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.11 Otimização do preparo de amostra empregando o método de extração LLE-LTP

Após a seleção das variáveis que mais afetaram o processo de extração LLE-LTP dos agrotóxicos avaliados em amostra de mel, o método foi otimizado a partir do delineamento de um planejamento composto central (planejamento fatorial 2^3 + ponto central + planejamento axial). Para a execução deste planejamento, as variáveis e os seus níveis (Tabela 8) foram combinados uma a uma, obtendo um total de 17 experimentos, com triplicata no ponto central, conforme a matriz de experimentos da Tabela 9. Os níveis das variáveis massa de amostra, volume de solvente extrator e tempo de congelamento no planejamento axial foram determinados a partir das Equações 2 a 4, respectivamente.

$$m_c = \frac{m_R - 2,0}{1,0} \quad \text{Equação 2}$$

$$V_c = \frac{V_R - 6,0}{2,0} \quad \text{Equação 3}$$

$$t_c = \frac{t_R - 135}{45} \quad \text{Equação 4}$$

Em que: m_c , V_c e t_c são os valores dos níveis codificados para massa de amostra, volume de solvente extrator e tempo de congelamento, respectivamente; enquanto m_r , V_r e t_r correspondem aos níveis reais para as variáveis estudadas.

Tabela 8. Variáveis e seus níveis avaliados no planejamento composto central para a otimização do método de extração LLE-LTP dos agrotóxicos avaliados em amostra de mel.

	Variáveis	Níveis				
		(-1,73)	(-1)	(0)	(+ 1)	(+1,73)
A	Massa da amostra (g)	0,3	1,0	2,0	3,0	3,7
B	Volume do solvente extrator (mL)	2,6	4,0	6,0	8,0	9,4
D	Tempo de congelamento (min)	60,0	90,0	135,0	180,0	210,0

Fonte: A autora.

Tabela 9. Matriz experimental do planejamento composto central para a otimização do método de extração LLE-LTP dos agrotóxicos avaliados em amostra de mel.

Experimentos	Variáveis		
	A	B	D
17	-	-	-
18	+	-	-
19	-	+	-
20	+	+	-
21	-	-	+
22	+	-	+
23	-	+	+
24	+	+	+
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	0	0
28	-1,73	0	0
29	+1,73	0	0
30	0	-1,73	0
31	0	+1,73	0
32	0	0	-1,73
33	0	0	+1,73

Fonte: A autora.

Novamente cada experimento foi realizado em triplicata a fim de estimar o erro experimental. A amostra de mel foi fortificada com os agrotóxicos a fim de obter uma concentração final de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$. A massa de mel apropriada (0,3 a 3,7 g), fortificada com a solução dos agrotóxicos, foi pesada em um tubo de polipropileno de 50 mL, seguida da adição de 4 mL de água ultrapura e agitação em vórtex para homogeneização. Adicionou-se ao tubo de polipropileno o volume do solvente extrator (2,6 a 9,4 mL), agitou-se o tubo em agitador vórtex, mantendo-o em banho ultrassom por 5 min. Posteriormente, retirou-se o frasco do banho, colocando em freezer sob congelamento a temperatura controlada a $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ pelo tempo definido no planejamento (60 a 210 min). Após o período de congelamento, retirou-se uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ da fase orgânica, transferiu para o *vial*, adicionando $900 \mu\text{L}$ de água

ultrapura. O *vial* foi levado ao UHPLC-ESI-MS/MS para injeção dos extratos, e a recuperação para cada analito foi calculada de acordo com a Equação 1.

4.12 Validação da metodologia

Os métodos otimizados de extração dos resíduos de agrotóxicos em mel LLE-LTP e QuEChERS modificado foram validados de acordo com o protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos proposto pela Comunidade Europeia – documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017). O protocolo europeu é o mais empregado e reconhecido dentre aqueles que fazem referência a metodologias analíticas para determinação de resíduos de agrotóxicos, por apresentar critérios rigorosos e bem estabelecidos para aceitação dos parâmetros analíticos de uma metodologia. Os parâmetros validados nas metodologias analíticas propostas neste trabalho foram a seletividade/especificidade, a linearidade, o limite de quantificação, a exatidão (ensaios de recuperação) e a precisão (inter e intra-dias).

4.12.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada analisando: (1) uma amostra de mel, na qual não se identificou os agrotóxicos investigados, seguindo os métodos de extração otimizados QuEChERS modificado e LLE-LTP, a fim de avaliar possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos; (2) análise de uma solução dos agrotóxicos na matriz do mel, a $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico, com o objetivo de avaliar a interferência de outras substâncias nos tempos de retenção, nos fragmentos monitorados, e na razão massa/carga para cada íon dos analitos.

O preparo da amostra de mel, na qual não foram identificados os agrotóxicos avaliados, empregando o método de extração QuEChERS, procedeu-se pesando 5,000 g de amostra de mel em tubo de polipropileno de 50 mL, adicionando-se 5,00 mL de água e agitando em vórtex por 1 min. Acrescentaram-se 4,00 mL de acetonitrila grau HPLC, agitando novamente por 1 min. Sob agitação, foram adicionados 6,000 g de MgSO_4 e 1,500 g de acetato de sódio, permanecendo por 3 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e 1 mL do sobrenadante foi transferido para o tubo de polipropileno de capacidade de 2 mL, contendo os sorventes C_{18} e MgSO_4 . A mistura foi agitada em vórtex por 1 min e, em seguida, filtrada por um filtro com membrana de PVDF de porosidade de $0,22 \mu\text{m}$. 100 μL do extrato filtrado foram diluídos em 900 μL de água Tipo I e analisado por UHPLC-ESI-MS/MS.

Para o preparo de amostra empregando LLE-LTP, 3,000 g de amostra de mel na qual não foram identificados os agrotóxicos avaliados, foram pesadas em um tubo de polipropileno de 50 mL, seguida da adição de 4 mL de água ultrapura e agitação em vórtex por 1 min. Acrescentaram-se 4 mL de acetonitrila grau HPLC, agitando novamente em vórtex por 1 min. A solução foi deixada em banho ultrassom por 5 min, levando-a em seguida para congelamento a -30 °C por 180 min. Após esse período, 100 µL do extrato foram diluídos em 900 µL de água Tipo I e analisado por UHPLC-ESI-MS/MS.

4.12.2 Linearidade

A linearidade dos métodos foi avaliada a partir da injeção em triplicata de soluções padrões dos analitos preparadas em solvente e na matriz da amostra de mel em cinco níveis de concentração no UHPLC-ESI-MS/MS. A partir das áreas de picos de cada analito nos diferentes níveis de concentração foram construídas curvas analíticas e, a partir da regressão linear, o coeficiente de correlação linear (r) foi determinado. A linearidade foi considerada aceitável quando o r obtido foi maior que 0,99 (SANTE, 2017).

4.12.3 Efeito matriz

No processo de desenvolvimento e validação de metodologia analítica deve-se avaliar os efeitos matriz para comprovar a ausência ou presença de interferência no sinal analítico para os compostos em estudo. Para isso, o documento SANTE/11813/2017 recomenda a construção de curvas analíticas preparadas em solvente e nos extratos da matriz do mel obtidos pelos métodos QuEChERS e LLE-LTP. As soluções foram injetadas no UHPLC-ESI-MS/MS e as áreas dos picos dos agrotóxicos registradas para a construção das curvas analíticas.

Para avaliar a existência do efeito matriz nos sinais analíticos dos agrotóxicos no UHPLC-ESI-MS/MS comparou-se as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e nos extratos do mel, utilizando a Equação 5:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = \left(\frac{x_1 - x_2}{x_2} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Sendo: x_1 = inclinação da curva analítica preparada na matriz para cada agrotóxico; x_2 = inclinação da curva analítica preparada em solvente para cada agrotóxico.

4.12.4 Limites de quantificação e de detecção

Para determinar o limite de quantificação (LOQ), soluções padrões dos analitos com concentrações decrescentes foram injetadas no UHPLC-ESI-MS/MS até se obter a concentração que apresentasse razão sinal/ruído maior ou igual a 10 (SANTE, 2017) e razão íon de quantificação/íon de confirmação constante. O limite de detecção (LOD) para cada agrotóxico foi determinado dividindo o valor de LOQ por 3,3.

4.12.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir da recuperação dos resíduos de agrotóxicos, fortificados com 3 (três) diferentes concentrações (0,5; 2,5 e 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), nas amostras de mel submetidas aos processos otimizados de extração QuEChERS e LLE-LTP. A amostra de mel foi fortificada com os agrotóxicos e posteriormente seguiu o processo de extração. Todo o procedimento foi realizado em 6 (seis) replicatas para cada nível de concentração avaliado. O método foi considerado exato quando a recuperação obtida ficou na faixa de 70 a 120 % da concentração inicial (SANTE, 2017). A recuperação foi calculada segundo a Equação 1.

4.12.6 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada a partir da análise de extratos de mel em 3 (três) níveis de concentração dos analitos (0,5; 2,5 e 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), empregando os métodos de extração LLE-LTP e QuEChERS otimizados. Todo o procedimento foi realizado em 6 (seis) replicatas. O método foi considerado preciso quando o coeficiente de variação das medidas se apresentou menor que 20 % (SANTE, 2017). Também foi avaliado se havia presença de resultados discrepantes (*outliers*) por meio do teste de Grubbs (GRUBBS, 1969), considerando o nível de confiança de 97,5 %. O coeficiente de variação foi calculado seguindo a Equação 6.

$$cv = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

Equação 6

Sendo: cv = coeficiente de variação; s = desvio-padrão, e; \bar{X} = concentração média determinada.

A avaliação dos valores anômalos através do teste de Grubbs (G) foi realizada seguindo a Equação 7.

$$|G| = \frac{(x_i - \bar{x})}{s} \quad \text{Equação 7}$$

Em que: x_i = valor suspeito de ser anômalo; \bar{x} = média dos valores obtidos; s = desvio padrão dos valores obtidos.

Sendo que o valor foi considerado não anômalo quando o mesmo apresentou G menor que 1,887, o qual é o valor de Grubbs para 6 (seis) observações com nível de confiança de 97,5 %.

4.12.7 Precisão intermediária ou reprodutibilidade dentro do laboratório

A precisão intermediária ou reprodutibilidade dentro do laboratório foi avaliada de forma semelhante a repetibilidade, porém a extração dos resíduos de agrotóxicos da amostra de mel foi realizada em 3 dias distintos. O método foi considerado reprodutível dentro do laboratório quando o coeficiente de variação entre os dias para os extratos foi inferior a 20 % (SANTE, 2017). Também foi avaliado se havia presença de resultados discrepantes (*outliers*) por meio do teste de Grubbs, considerando o nível de confiança de 97,5 %.

4.12.8 Incerteza

A incerteza de um resultado é o parâmetro que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando. A incerteza é a estimativa de o quanto o resultado está próximo do melhor valor consistente com o conhecimento das fontes de erros disponíveis.

Várias são as metodologias disponíveis na literatura para cálculo da incerteza (BARATTO *et al.*, 2008; ELLISON; WILLIAMS, 2012). Neste trabalho foi empregada a metodologia Top-Down, a qual consiste em utilizar um determinado nível de informações obtidas em estudo de validação que corresponde a todo o processo de medição para resultar em uma incerteza global do ensaio, conforme descrito no guia EURACHEM (ELLISON; WILLIAMS, 2012). As fontes de incertezas consideradas foram o preparo de soluções, regressão linear, precisão intermediária e recuperação. A incerteza do preparo de soluções foi calculada conforme a Equação 8.

$$u_s = \sqrt{(u_{bal\tilde{a}o})^2 + (u_{balan\tilde{c}a})^2 + (u_{MRC})^2} \quad \text{Equação 8}$$

Sendo: u_s = incerteza do preparo de soluções. $u_{bal\tilde{a}o}$ = incerteza do balão volumétrico utilizado para preparar a solução estoque. $u_{balan\tilde{c}a}$ = incerteza da balança utilizada para preparar a solução estoque. u_{MRC} = incerteza do material de referência certificado (MRC) utilizado para preparar a solução estoque.

Para o cálculo da incerteza da regressão linear, considerou-se a Equação 9.

$$u_{reg} = \sqrt{\frac{MQ_r}{b^2}} \quad \text{Equação 9}$$

Sendo: u_{reg} = incerteza da regressão linear. MQ_r = média quadrática de resíduos. b^2 = inclinação da curva analítica; sensibilidade; coeficiente angular.

A Equação 10 foi utilizada para definir a incerteza da precisão intermediária.

$$u_{prec} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 10}$$

Sendo: u_{prec} = incerteza da precisão. s = desvio padrão dos dados da precisão intermediária. n = número de repetições.

A incerteza da recuperação foi calculada conforme a Equação 11.

$$u_{rec} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 11}$$

Sendo: u_{rec} = incerteza da recuperação. s = desvio padrão dos dados da recuperação. n = número de repetições.

Após a definição e quantificação das fontes de incertezas, calculou-se a incerteza combinada segundo a Equação 12.

$$u_c = \sqrt{(u_s)^2 + (u_{reg})^2 + (u_{prec})^2 + (u_{rec})^2} \quad \text{Equação 12}$$

Sendo: u_c = incerteza combinada. u_s = incerteza do preparo de soluções. u_{reg} = incerteza da regressão linear. u_{prec} = incerteza da precisão. u_{rec} = incerteza da recuperação.

A incerteza expandida consiste em obter um valor de incerteza que possua uma maior probabilidade de abrangência na estimativa; é calculada através do produto da incerteza combinada por um fator de abrangência, segundo Equação 13.

$$U = u_c * k \quad \text{Equação 13}$$

Sendo: U = incerteza expandida. u_c = incerteza combinada. k = fator de abrangência.

A incerteza de medição relativa é calculada de acordo com a Equação 14.

$$U (\%) = \frac{U}{\bar{X}} * 100 \quad \text{Equação 14}$$

Onde: $U (\%)$ = incerteza relativa. U = incerteza expandida. \bar{X} = valor mais provável da grandeza.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização dos parâmetros do detector triplo quadrupolo (MS/MS)

O UHPLC-ESI-MS/MS é uma técnica analítica sensível capaz de quantificar os resíduos dos agrotóxicos em concentrações muito baixas, em níveis de subtraços (< ppb). No entanto, para que a obtenção dos sinais sejam reprodutíveis e confiáveis próximos aos limites de quantificação dos compostos o sistema MS/MS requer o ajuste fino dos parâmetros no analisador de massas. Desta forma, soluções dos analitos com concentração de 1,0 mg L⁻¹ preparadas em solvente foram infundidas individualmente no detector triplo quadrupolo em combinação com fase móvel proveniente do UHPLC, a qual era composta por acetonitrila: H₂O (50:50, v/v) acidificada com 0,1% de ácido acético, para otimizar os parâmetros no analisador de espectrometria de massa triplo quadrupolo com fonte de ionização *electrospray* (ESI). Foi realizada a otimização univariada dos parâmetros do analisador triplo quadrupolo.

A fonte de ionização é responsável por converter os analitos de interesse em íons em fase gasosa, para que os mesmos possam ser analisados no espectrômetro de massas. A fonte de ionização ESI é amplamente utilizada para o acoplamento LC-MS para análise de agrotóxicos, pois esses compostos apresentam polaridade média a alta. Para moléculas de polaridade baixa a fonte de ionização ESI é ineficiente, sendo necessário outra fonte de ionização, como a APCI.

A fonte de ionização pode operar no modo positivo ou negativo, dependendo das características do analito de interesse, ocorrendo a protonação ou desprotonação (adição ou remoção de um íon H⁺) da molécula do analito. Os analitos em solução, provenientes do cromatógrafo a líquido, são ionizados ao atravessarem um capilar metálico, no qual é aplicado uma voltagem. No modo de ionização positivo é aplicada uma voltagem positiva no capilar que tem como objetivo gerar pequenas gotas que contém fase móvel e íons carregados positivamente em excesso. De maneira simultânea, é aplicado um gás com alto fluxo e temperatura, denominado gás de dessolvatação, com o objetivo eliminar as moléculas de solvente, diminuindo as gotas previamente formadas até o limite onde a repulsão entre as cargas positivas supere a tensão superficial da gota, ejetando as cargas positivas, formando os íons positivos de interesse, ou seja moléculas protonadas (GUILLARME; VEUTHEY, 2017).

Sendo assim, os analitos acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam apresentaram melhor sinal com a fonte de ionização operando no modo positivo, no modo negativo de ionização os analitos apresentaram baixa

sensibilidade. Os valores otimizados para voltagem do capilar, temperatura e fluxo do gás de dessolvatação (N₂), foram 1 kV, 450 °C e 900 L h⁻¹, respectivamente. A Tabela 10 mostra os demais parâmetros otimizados para cada analito.

Tabela 10. Parâmetros otimizados do espectrômetro de massas triplo quadrupolo com fonte de ionização electrospray para cada agrotóxico.

Analito	Voltagem no Cone (V)	Massa molar (g mol⁻¹)	Fragmento de quantificação (m/z) e energia de colisão (V)	Fragmento de confirmação (m/z) e energia de colisão (V)
Acefato	10	184	49 (17)	143 (7)
Acetamiprido	10	223	126 (19)	56 (14)
Carbendazim	10	192	160 (16)	132 (29)
Diflubenzurom	20	311	158 (13)	141 (33)
Imidacloprido	10	256	209 (13)	175 (17)
Metomil	10	163	88 (7)	106 (8)
Tiametoxam	10	292	211 (11)	181 (22)

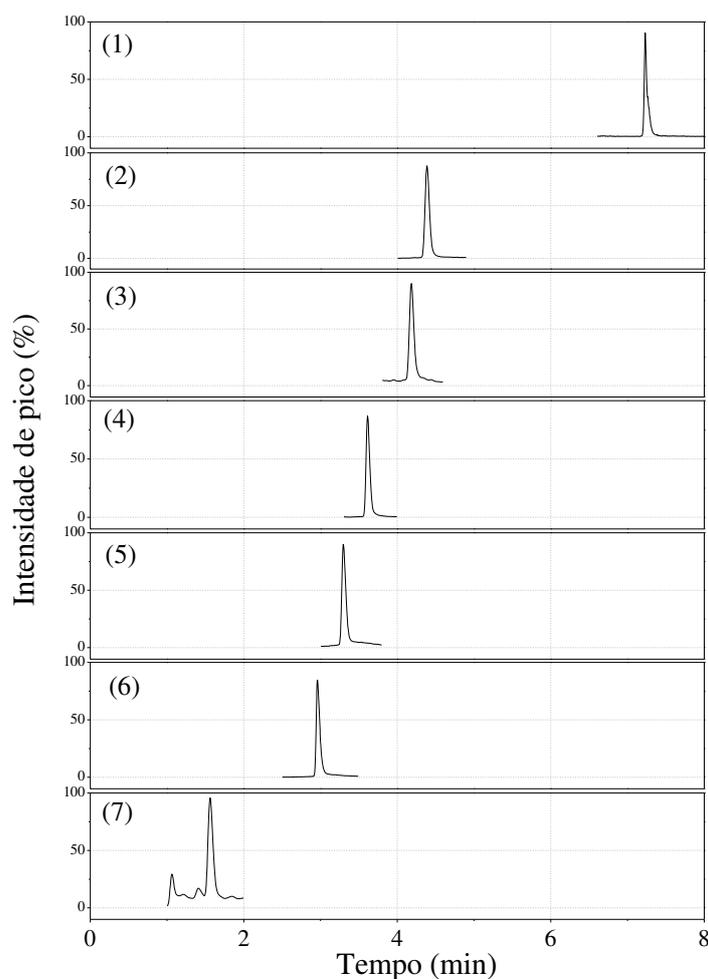
Após a definição e otimização dos parâmetros no espectrômetro de massas em série, foi preparada uma solução analítica de 2,5 µg L⁻¹ contendo a mistura dos agrotóxicos em solvente, e a mesma foi injetada no UHPLC nas condições definidas no item 4.7. Os tempos de retenção para cada um dos picos dos agrotóxicos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Tempos de retenção (t_R) para os agrotóxicos analisados no UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	t_R (min)
Acefato	1,55
Carbendazim	2,96
Metomil	3,30
Tiametoxam	3,61
Imidacloprido	4,18
Acetamiprido	4,38
Diflubenzurom	7,23

A Figura 3 apresenta um cromatograma obtido por UHPLC-ESI-MS/MS para uma solução dos agrotóxicos preparadas no mel a $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada agrotóxico.

Figura 3. Cromatograma obtido para uma solução analítica na matriz, mel, método de extração QuEChERS, contendo $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos (1) diflubenzurom, (2) acetamiprido, (3) imidacloprido, (4) tiametoxam, (5) metomil, (6) carbendazim e 7 (acefato).



Como pode ser observado na Figura 3 e Tabela 11, os picos dos agrotóxicos apresentaram boa separação no cromatograma, bem como uma alta detectabilidade, registrando elevada intensidade mesmo a $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto. Este resultado confirma a otimização dos parâmetros operacionais do analisador de massas.

5.2 Preparação das amostras de mel

5.2.1 Método QuEChERS modificado

Para garantir uma maior eficiência no preparo das amostras de mel e uma redução de interferentes no processo de análise, utiliza-se da menor quantidade de amostra possível, desde que esta garanta representatividade estatística do objeto da análise. A escolha do solvente de extração também é fundamental para garantir valores de recuperação dos analitos dentro de faixas aceitáveis (por exemplo, para resíduos de agrotóxicos em amostras complexas de 70 a 120% (SANTE, 2017).

Neste trabalho, a massa de amostra de mel processada no preparo de amostra foi determinada a partir do limite de quantificação do método multirresidual e o limite máximo residual dos agrotóxicos no mel, definido na Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento n° 20 (BRASIL, 2000). Na Tabela 12 constam os limites máximos de resíduos dos agrotóxicos estudados. No método de extração QuEChERS modificado os ensaios foram conduzidos pesando 5,000 g de mel em tubo de polipropileno (tubo Falcon) de 50 mL.

Tabela 12. Limites máximos residuais para os agrotóxicos em amostras de mel de acordo com a IN N° 20/2018 do MAPA.

Analito	LMR (mg kg⁻¹)
Acefato	20
Acetamiprido	50
Carbendazim	1000
Diflubenzurom	50
Imidacloprido	50
Metomil	20
Tiametoxam	50

Fonte: MAPA (2018).

Os solventes empregados no preparo de amostra de mel foram a água e a acetonitrila, de acordo com o método QuEChERS original (ANASTASSIADES; LEHOTAY, 2003). A água foi utilizada para diminuir a viscosidade da amostra de mel e a acetonitrila foi empregada como solvente extrator, devido à alta eficiência de extração de um amplo espectro de agrotóxicos com

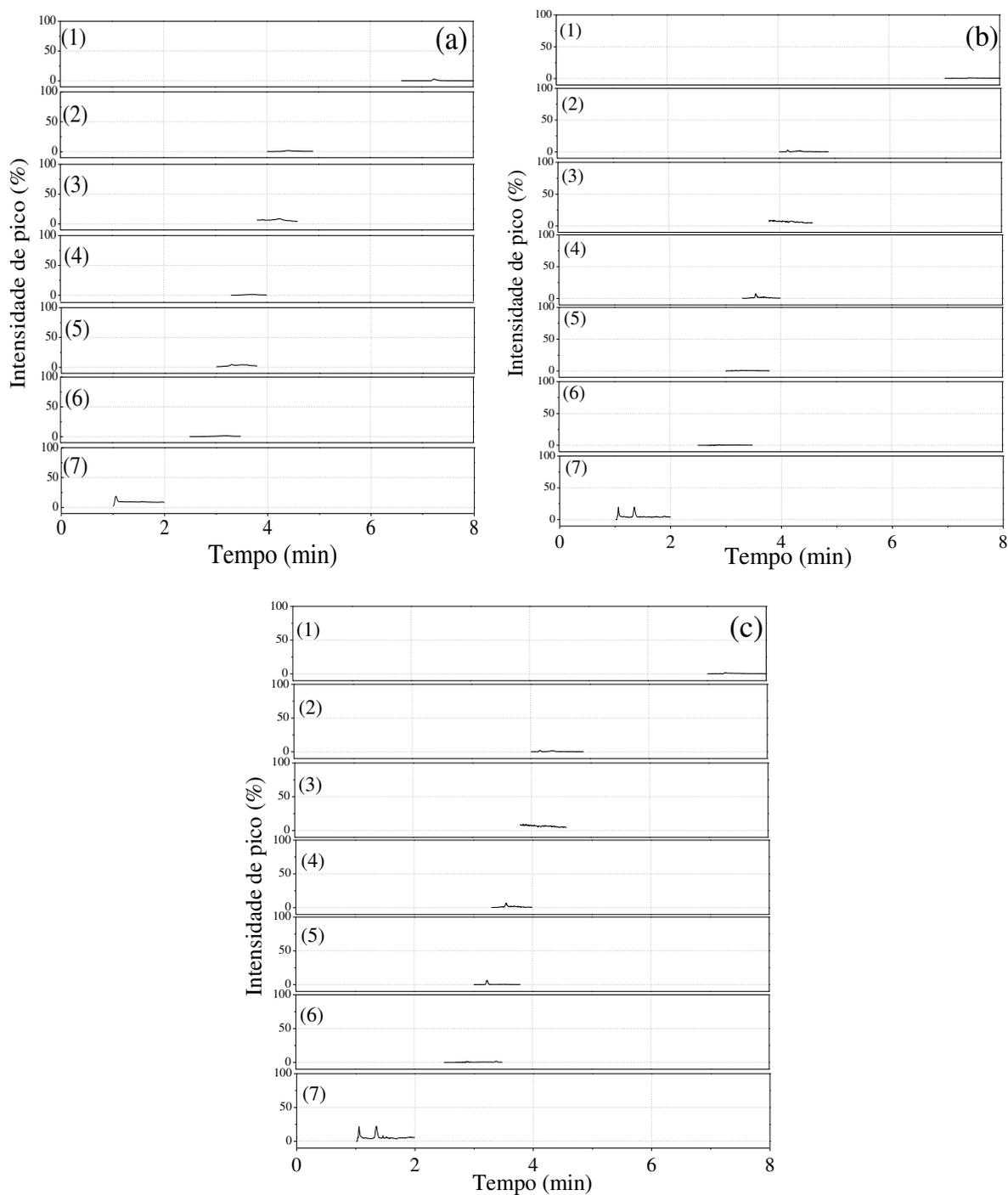
diferentes polaridades. Além disso, a acetonitrila apresenta seletividade para as moléculas dos agrotóxicos avaliados e é compatível com a fase móvel empregada em UHPLC-MS/MS e é pouco seletiva para a extração de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (PRESTES *et al.*, 2009). Os sais $MgSO_4$ e CH_3COONa foram utilizados para promover o efeito *salting out*, facilitando a partição dos agrotóxicos da fase aquosa para a fase orgânica. O sulfato de magnésio atua também como agente dessecante, reduzindo o volume de fase aquosa e favorecendo a extração. Já o acetato de sódio foi empregado para ajustar a acidez do mel (que normalmente se encontra em pH na faixa de 3,4 a 6,1) e combinado com a adição de ácido acético, mantém o pH em cerca de 4,7. Essa condição de pH proporciona melhores recuperações (maiores que 70 %) dos resíduos de agrotóxicos que se comportam como ácidos fracos, pois assim, as moléculas dos agrotóxicos apresentarão uma distribuição de espécies (forma molecular e dissociada) constante, independente da variação das matrizes das amostras de mel a serem analisadas. O método empregado neste trabalho é, portanto, uma variação do método original, denominado de método QuEChERS acetato.

5.2.2 Otimização da etapa de *clean-up* dispersivo no método QuEChERS acetato

A etapa de *clean-up* dos extratos no método QuEChERS é importante para reduzir ou eliminar co-extrativos provenientes da matriz do mel antes da análise cromatográfica. Porém, essa etapa pode ocasionar perda dos analitos devido à adsorção no material adsorvente selecionado para a limpeza do extrato. Por isso é necessário avaliar diferentes sorventes, com diferentes características de polaridade, para evitar um erro sistemático no preparo da amostra.

Neste trabalho, avaliaram-se três sorventes a amina primária secundária (PSA), a sílica (SiO_2) e uma mistura de sulfato de magnésio e octadecilsilano (C_{18}). Primeiramente, avaliou a presença de possíveis interferentes ao analisar uma amostra de mel na qual, não foram identificados os sete agrotóxicos monitorados neste trabalho. O extrato desta amostra de mel foi submetido a etapa de *clean up* empregando separadamente os três sorventes. Na Figura 4 pode se observar os cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-MS/MS para uma solução do mel aplicando os sorventes PSA, SiO_2 e uma mistura de $MgSO_4$ e C_{18} , na etapa de *clean-up*.

Figura 4. Cromatograma para uma solução do mel submetida a extração pelo método QuEChERS, empregando os sorventes (a) $MgSO_4 + C_{18}$; (b) PSA; (c) SiO_2 na etapa de clean-up. (1) diflubenzurom, (2) acetamiprido, (3) imidacloprido, (4) tiametoxam, (5) metomil, (6) carbendazim e (7) acefato.

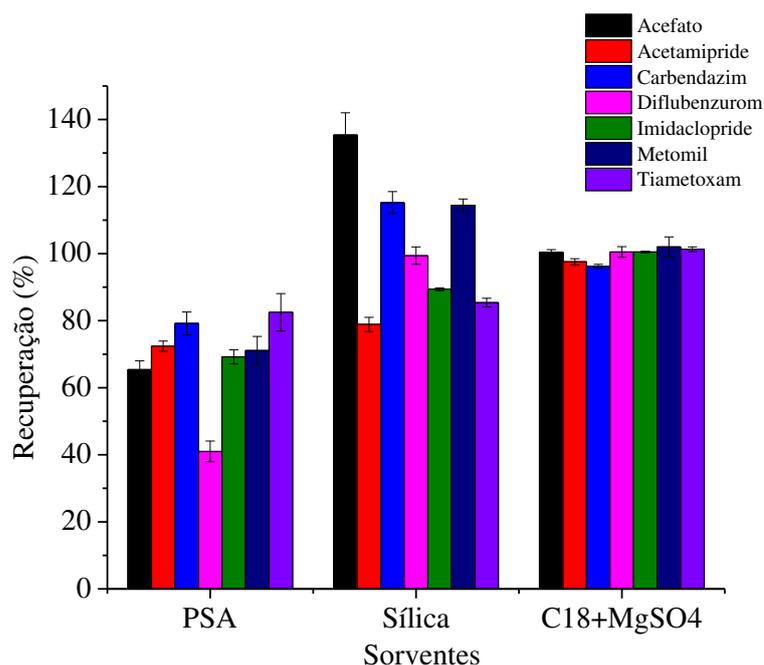


Observa-se na Figura 4 que a etapa de *clean-up* a partir da extração em fase sólida dispersiva (dSPE, *dispersive solid-phase extraction*), empregando os sorventes PSA, SiO_2 , e a

mistura $MgSO_4$ e C_{18} promoveram extratos de mel limpos, não registrando interferentes nos tempos de retenção para os compostos estudados.

Os resultados dos ensaios de recuperação dos resíduos de agrotóxicos das amostras de mel, após serem submetidos a etapa de dSPE com os sorventes selecionados, são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Efeito do sorvente de clean-up na recuperação de resíduos de agrotóxicos de amostras de mel empregando UHPLC-ESI-MS/MS.



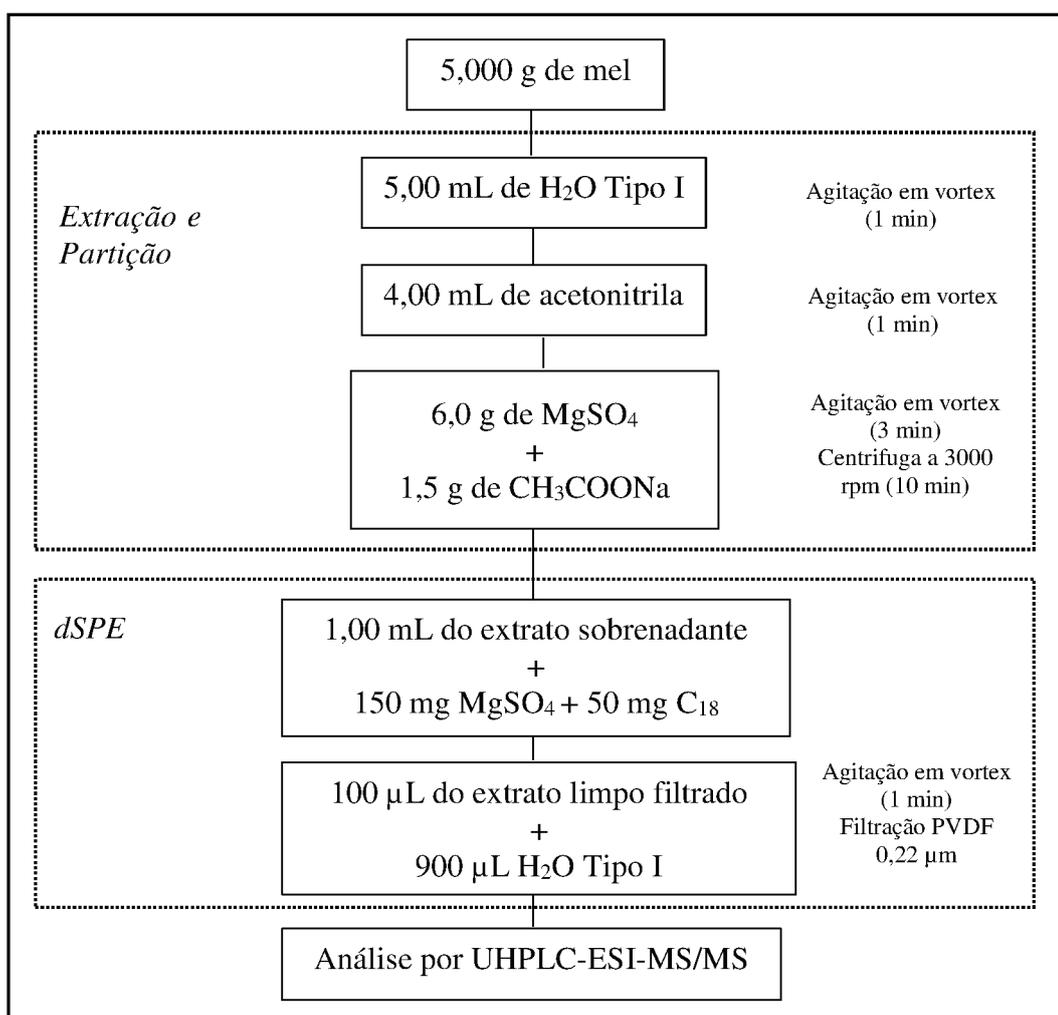
Como pode ser observado na Figura 5, a SiO_2 não foi eficiente para a remoção de componentes da matriz do mel presentes no extrato, resultando valores de recuperação relativamente altos. O sorvente PSA proporcionou extratos incolores, porém para alguns agrotóxicos a taxa de recuperação foi abaixo de 70 %, indicando que houve a remoção dos agrotóxicos junto aos componentes da matriz. O extrato incolor se deve às ligações de hidrogênio formadas entre o PSA e os pigmentos do mel, removendo-os do extrato. No entanto, provavelmente o PSA também estabeleceu ligações de hidrogênio com algumas moléculas dos agrotóxicos, retendo-as e reduzindo as suas taxas de recuperação (TETTE, 2016).

O sorvente contendo a mistura de sulfato de magnésio e C_{18} (3:1, m/m) apresentou melhores taxas de recuperação e baixo desvio padrão relativo entre as replicatas, para os agrotóxicos estudados e, também, cromatogramas mais limpos. Isso ocorre, pois, o $MgSO_4$ remove a água residual do extrato o que proporciona um extrato de baixa polaridade,

ocasionando a precipitação de co-extrativos polares provenientes da matriz. O sorvente C_{18} , por sua vez, remove com boa eficiência os interferentes apolares, tais como cera e lipídios (CABRERA *et al.*, 2012). Além disso, como os coeficientes de partição octanol/água (K_{ow}) para os agrotóxicos são menores que 2, exceto para o diflubenzurom que o $\log P$ é 3,88 (PUBCHEM, 2019), indicando maior polaridade dos compostos, o uso de um sorvente apolar confere menor risco à perda dos analitos nesta etapa, se comparado com os demais sorventes testados. Desta forma, o sorvente contendo a mistura de sulfato de magnésio e C_{18} foi utilizado na etapa de *clean-up* para cada 1 mL de extrato.

Após a escolha do sorvente dSPE para o *clean-up* dos extratos no método QuEChERS para a extração dos resíduos de agrotóxicos de amostras de mel, o método de preparação de amostra otimizado está representado no esquema da Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática do preparo de amostra otimizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em mel utilizando QuEChERS modificado.



Um método multirresidual empregando QuEChERS com análise por GC-ECD foi desenvolvido para quantificação de 23 resíduos de agrotóxicos em amostra de mel. O preparo de amostra consistiu em adicionar à amostra de mel solução de Na₂EDTA e acetonitrila na etapa de extração e sulfato de magnésio e cloreto de sódio na etapa de partição. O extrato foi submetido a uma etapa de *clean-up* com a mistura sulfato de magnésio e PSA e subsequentemente analisado por GC-ECD (ORSO, 2011). O aquecimento da amostra de mel diluída em solução Na₂EDTA foi necessário para homogeneização da amostra. O método de preparação de amostra proposto neste trabalho consistiu em homogeneizar a amostra de mel com acetonitrila e água Tipo I na proporção 1:1 à temperatura ambiente, o que proporciona redução de gastos com reagente e maior segurança para o analista, uma vez que o aquecimento da amostra não foi empregado.

Em outro método, Tette *et al.* (2016) empregaram o método QuEChERS para quantificar agrotóxicos em amostras de mel. O preparo consistiu em diluir as amostras de mel em 10 mL de água, e submeter a extração com uma mistura de acetonitrila e acetato de etila (7:3, v/v) acidificada com 1% de ácido acético. Os autores empregaram MgSO₄ e CH₃COONa na etapa de partição e MgSO₄, PSA e florissil como sorventes na etapa dSPE para obtenção de extratos mais limpos e eluições sem interferentes (TETTE *et al.*, 2016). Como observado foi necessária uma etapa de *clean-up* com maior número de sorventes, bem como maiores quantidades em massa que no método proposto neste trabalho.

5.2.3 Otimização do método de extração LLE-LTP de resíduos de agrotóxicos de mel

5.2.3.1 Planejamento fatorial fracionário 2⁶⁻²

A otimização do método LLE-LTP para os resíduos dos agrotóxicos em amostras de mel foi iniciada com a seleção de variáveis que efetivamente afetavam a porcentagem de recuperação dos agrotóxicos nas amostras de mel. Um planejamento fatorial fracionário foi então escolhido para avaliar a influência de diferentes condições experimentais (variáveis) no processo de extração dos agrotóxicos do mel, com o objetivo de avaliar um maior número de variáveis, porém realizando um número relativamente reduzido de experimentos. O planejamento fatorial fracionário permite identificar quais fatores possuem efeitos significativos e quais podem ser considerados com pouco ou nenhum efeito significativo sobre a recuperação dos agrotóxicos avaliados em mel, realizando uma fração dos experimentos necessários em um planejamento fatorial completo. A Tabela 13 apresenta as recuperações

médias percentuais e o RSD para três réplicas dos experimentos realizados de acordo com a matriz do planejamento fatorial fracionário, apresentada na Tabela 7.

Tabela 13. Recuperação média e RSD (n=3) dos agrotóxicos extraídos da amostra de mel de acordo com o planejamento fatorial fracionário 2⁶⁻².

Ensaio	Recuperação ± RSD (%)						
	Acefato	Acetamiprido	Carbendazim	Diflubenzurom	Imidacloprido	Metomil	Tiametoxam
1	21,6 ± 0,7	124,1 ± 2,4	97,9 ± 1,6	267,4 ± 4,6	177,2 ± 4,6	75,8 ± 3,2	102,2 ± 1,4
2	21,9 ± 1,2	80,2 ± 1,1	74,9 ± 1,4	156,9 ± 5,2	95,9 ± 2,7	98,5 ± 4,0	67,5 ± 0,8
3	60,4 ± 1,4	97,6 ± 3,6	102,1 ± 1,5	109,6 ± 1,8	107,8 ± 1,5	111,1 ± 3,4	87,0 ± 1,8
4	57,6 ± 0,5	90,9 ± 1,7	98,8 ± 1,8	107,3 ± 2,6	98,5 ± 3,3	108,2 ± 4,6	83,5 ± 1,7
5	6,8 ± 0,5	57,9 ± 2,7	67,8 ± 1,0	16,4 ± 0,9	65,6 ± 2,9	86,6 ± 3,0	45,9 ± 0,9
6	5,5 ± 0,7	57,4 ± 2,9	63,8 ± 1,7	18,1 ± 2,1	63,0 ± 0,71	80,2 ± 1,9	44,5 ± 1,1
7	16,9 ± 0,1	82,8 ± 1,8	90,3 ± 0,2	41,3 ± 5,3	80,2 ± 3,4	64,2 ± 3,1	73,3 ± 0,2
8	17,0 ± 0,3	79,6 ± 2,9	89,2 ± 2,9	23,0 ± 0,7	73,8 ± 1,9	68,3 ± 3,0	68,9 ± 1,5
9	21,5 ± 0,4	83,6 ± 1,8	67,0 ± 0,5	270,2 ± 3,2	86,6 ± 2,9	85,1 ± 3,0	67,4 ± 1,7
10	17,7 ± 0,6	47,1 ± 0,7	40,4 ± 0,9	54,2 ± 1,8	36,9 ± 0,8	61,3 ± 1,9	36,9 ± 0,8
11	62,1 ± 0,6	106,8 ± 1,6	105,6 ± 0,5	103,5 ± 1,4	97,7 ± 2,6	110,0 ± 2,2	97,7 ± 2,6
12	63,9 ± 1,8	102,0 ± 2,9	110,8 ± 2,2	112,1 ± 3,9	94,1 ± 2,1	109,1 ± 5,8	94,1 ± 2,1
13	8,6 ± 0,4	29,9 ± 0,8	32,5 ± 0,8	8,9 ± 1,3	34,1 ± 2,3	43,2 ± 1,2	24,3 ± 0,4
14	6,7 ± 0,2	25,7 ± 0,9	28,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3	31,3 ± 1,9	43,3 ± 0,2	21,3 ± 1,1
15	18,8 ± 0,5	88,6 ± 2,1	95,3 ± 2,9	42,6 ± 2,5	93,1 ± 1,7	82,3 ± 3,4	77,5 ± 1,2
16	18,1 ± 0,6	85,6 ± 2,0	96,7 ± 1,0	19,6 ± 0,8	89,4 ± 4,7	83,2 ± 2,7	73,8 ± 1,2

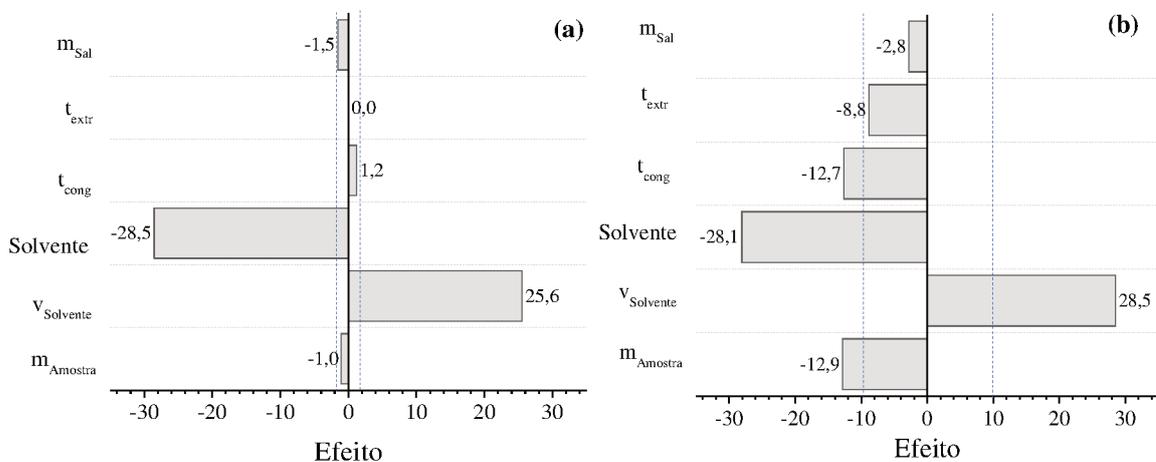
Conforme observado na Tabela 13, alguns experimentos não resultaram em extrações dos agrotóxicos, indicando que algumas variáveis podem influenciar negativamente no processo de remoção desses do mel. Outros experimentos apresentaram altos valores de recuperação, indicando que alguns componentes da matriz não foram totalmente removidos, influenciando no processo de ionização dos analitos, aumentando o sinal relativo do analito. Para avaliar a importância de cada uma das variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} para a extração dos agrotóxicos avaliados no mel, foram calculados os seus efeitos sobre a taxa de recuperação média dos agrotóxicos. O efeito de uma variável é obtido pela diferença entre a média das recuperações de cada agrotóxico no nível (+) e a média das recuperações no nível (-) daquela variável, conforme a Equação 15.

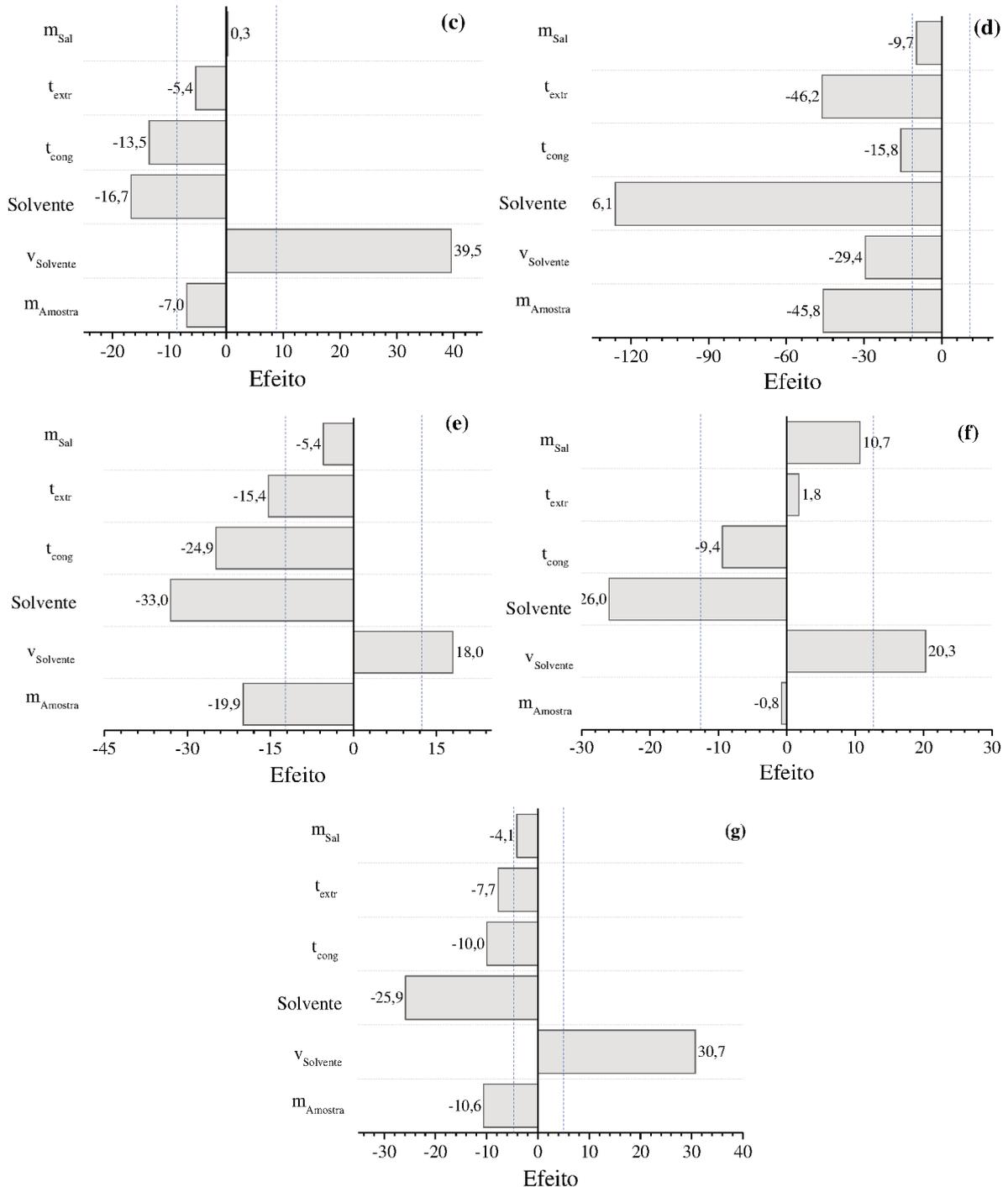
$$E_f = \bar{R}_+ - \bar{R}_- \quad \text{Equação 15}$$

Em que: \bar{R}_+ = média das respostas no nível alto e \bar{R}_- = média das respostas no nível baixo.

Aplicando a Equação 15 para as seis variáveis, obtêm-se valores que correspondem à significância dos efeitos, ou seja, quanto maior o valor de efeito maior a importância da variável no processo de extração dos agrotóxicos no mel empregando a LLE-LTP. A Figura 7 apresenta os gráficos de Pareto com os valores de efeitos para as variáveis principais estudadas no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} .

Figura 7. Efeito das variáveis no processo de extração LLE-LTP de resíduos de agrotóxicos em amostra de mel. Agrotóxicos estudados: (a) acefato, (b) acetamiprido, (c) carbendazim, (d) diflubenzuron, (e) imidacloprido, (f) metomil e (g) tiametoxam.

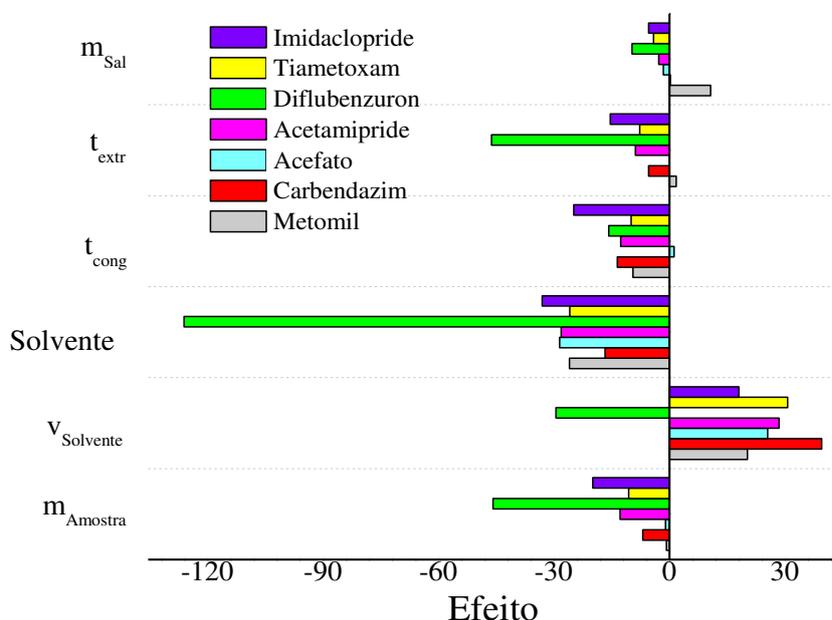




De acordo com o planejamento fatorial fracionário as principais variáveis que afetam a extração dos agrotóxicos das amostras de mel pelo método LLE-LTP são o tipo de solvente, o volume de solvente, a massa da amostra de mel e o tempo de congelamento que possuem os maiores efeitos na recuperação dos agrotóxicos. Como o tipo de solvente é uma variável categórica (qualitativa), fixou-se esta variável no nível de maior resposta para a recuperação dos agrotóxicos que foi a acetonitrila (nível -). O solvente acetato de etila proporcionou baixos valores de recuperação dos agrotóxicos, provavelmente devido a incompatibilidade deste

solvente com a fase móvel do método cromatográfico. O aumento do volume de solvente extrator resulta em melhores rendimentos de recuperação para todos os agrotóxicos, exceto para o diflubenzurom, o qual apresentou valor negativo do efeito na Figura 7d. O tempo de extração em banho ultrassom apresentou influência significativa na resposta, porém com menores valores de efeitos, um menor tempo de extração (efeito negativo) indicou maior influência na recuperação dos agrotóxicos. A adição de eletrólito não apresentou efeito significativo na recuperação dos agrotóxicos.

Figura 8. Efeito das variáveis no processo de extração LLE-LTP dos resíduos de acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam em amostra de mel.



Na Figura 8, que apresenta um gráfico de Pareto para o efeito das seis variáveis sobre os sete agrotóxicos, observa-se que o tipo de solvente apresentou o maior efeito significativo que as demais variáveis, em especial para a molécula diflubenzurom, que se deve ao alto valor de coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) para esta molécula, cujo $\log P$ é de 3,88 (PUBCHEM, 2019), indicando maior apolaridade deste composto.

Deste modo, as variáveis volume de solvente, massa de amostra de mel e tempo de congelamento foram selecionadas para a otimização das mesmas empregando o planejamento composto central com o objetivo de alcançar os maiores valores de recuperação no processo de extração LLE-LTP dos agrotóxicos acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam das amostras de mel. O tempo de extração foi fixado no

menor nível, 5 min, e a solução eletrolítica não foi empregada uma vez que não causa efeito significativo na recuperação dos agrotóxicos.

5.2.3.2 Planejamento composto central

Após definir as variáveis mais significativas no processo LLE-LTP, foi realizado um planejamento composto central com o intuito de otimizar os níveis destas variáveis, avaliando a recuperação dos agrotóxicos, como fator de resposta. Ao total foram realizados 17 (dezesete) experimentos, combinando todos os níveis das variáveis (matriz de planejamento, Tabela 9), e os resultados de recuperação para cada analito em cada experimento é apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Recuperação média (n=3) dos agrotóxicos extraídos da amostra de mel de acordo com o planejamento composto central.

Ensaio	Recuperação Média (%)							Recuperação média (%) ^(a)
	Acefato	Acetamiprido	Carbendazim	Diflubenzurom	Imidacloprido	Metomil	Tiametoxam	
17	23,6	151,7	89,6	175,8	153,5	75,0	117,6	112,4
18	26,1	148,0	91,3	192,0	152,9	79,2	132,4	117,4
19	48,2	119,4	80,1	129,3	116,3	59,3	99,6	93,2
20	50,3	123,7	82,9	132,4	119,2	63,6	111,9	97,7
21	27,5	147,7	96,7	170,3	151,4	77,2	115,3	112,3
22	29,6	148,4	97,0	185,0	158,6	83,9	127,9	118,6
23	51,7	123,7	91,4	129,5	118,9	62,0	102,9	97,2
24	49,3	121,2	90,7	131,6	121,5	64,2	111,8	98,6
25	41,5	132,8	87,8	132,9	129,7	84,1	115,1	103,4
26	43,7	134,0	89,5	134,3	139,6	66,7	116,9	103,5
27	41,1	140,1	91,7	132,8	145,3	70,7	118,0	105,7
28	41,9	137,2	90,4	135,7	134,4	68,3	99,8	101,1
29	43,1	129,0	84,6	149,9	129,5	68,4	115,7	102,9
30	21,2	183,6	94,4	129,3	187,3	87,8	134,2	119,7
31	52,7	125,0	84,8	120,7	120,7	59,2	104,4	95,4
32	37,6	132,9	86,6	136,8	130,0	65,7	112,3	100,3
33	43,8	131,0	109,4	147,8	129,9	74,6	133,9	110,1

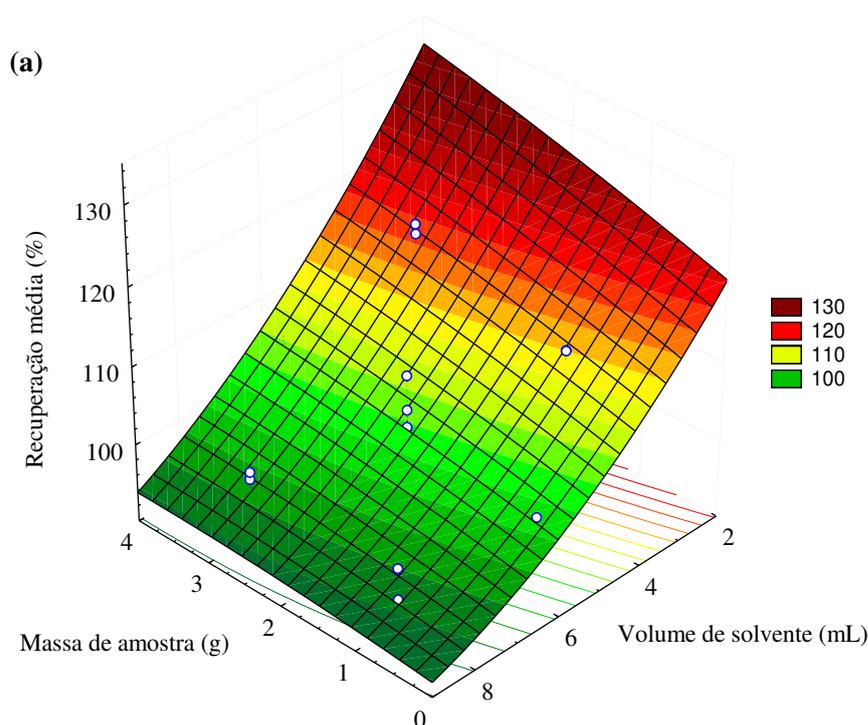
(a) Média das recuperações dos sete agrotóxicos para um dado ensaio.

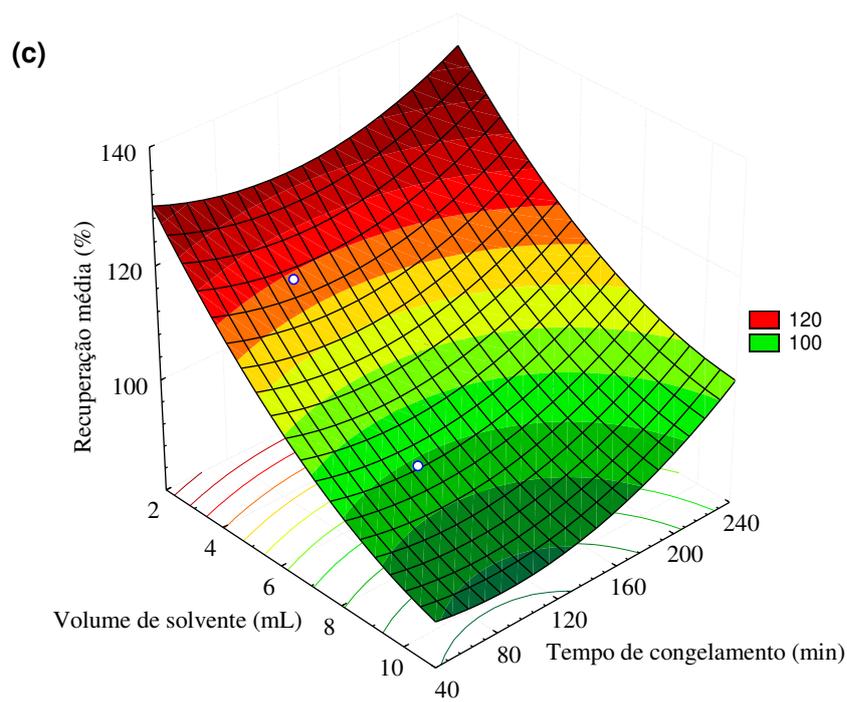
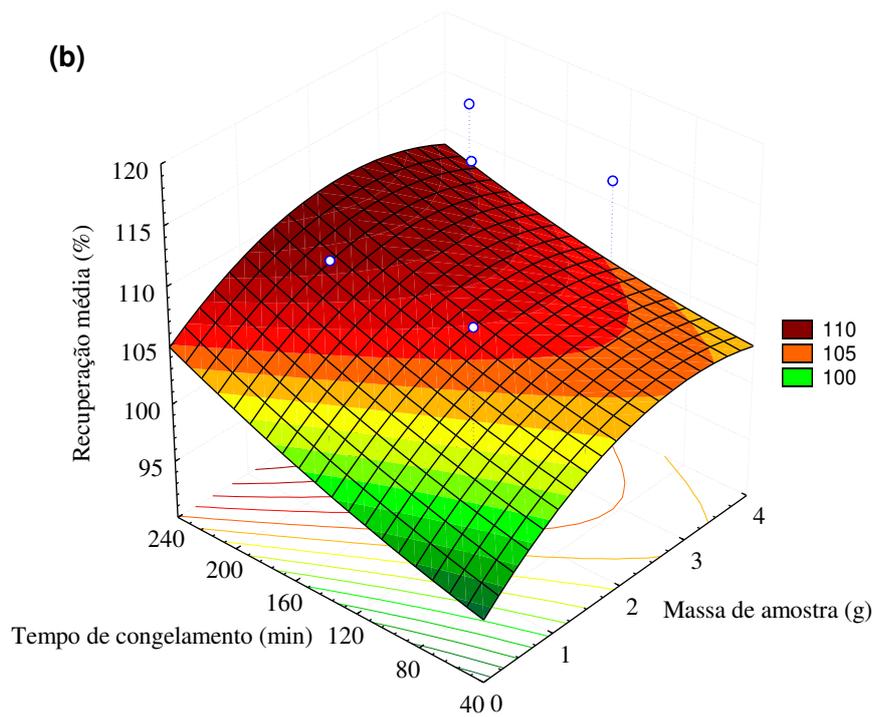
De uma forma geral, como apresentado na Tabela 14, os resultados da média de recuperação dos agrotóxicos em mel ficaram na faixa de 70-120%, recomendada para resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentícias (SANTE, 2017). Os agrotóxicos acefato e metomil apresentaram os menores valores de recuperação devido a hidrofiliabilidade dessas moléculas e suas interações mais fracas com a acetonitrila.

A otimização do volume de solvente extrator, massa de amostra de mel e tempo de congelamento foi realizada através da aplicação da metodologia de superfície de respostas aos resultados de recuperação média de cada experimento para os resíduos dos agrotóxicos acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam pelo método LLE-LTP. Foi considerado a média de recuperação para cada experimento para obter condição otimizada para todos os agrotóxicos simultaneamente, já que se a otimização for realizada individualmente é possível encontrar diferentes procedimentos otimizados para cada analito.

Três superfícies de respostas, que representam as combinações entre duas das variáveis e a resposta, porcentagem de recuperação, foram construídas para a obtenção das condições experimentais que levam às maiores recuperações desses agrotóxicos em amostra de mel. Estas superfícies estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9. Superfícies de respostas da recuperação de resíduos de agrotóxicos em mel, empregando o método LLE-LTP. Variáveis sob otimização: (a) massa de amostra vs. volume de solvente; (b) tempo de congelamento vs. massa de amostra, e; (c) tempo de congelamento vs. volume de solvente.





A primeira superfície de resposta, Figura 9a, apresenta a relação entre o volume de acetonitrila e a massa da amostra de mel empregados no processo de extração LLE-LTP dos agrotóxicos acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam do mel. Na Figura 9b é apresentada a superfície de resposta que relaciona o tempo de congelamento e a massa de amostra e na Figura 9c a relação entre o tempo de congelamento e o volume de acetonitrila na recuperação dos agrotóxicos pelo método LLE-LTP. De uma forma

geral, observa-se que o efeito do volume de solvente na recuperação dos agrotóxicos foi mais significativo do que para as demais variáveis. Quanto menor o volume de solvente orgânico extrator melhor a taxa de recuperação dos agrotóxicos. Das superfícies de respostas da Figura 9 foi extraído o modelo estatístico, Equação 16, construído a partir das recuperações médias obtidas nos experimentos delineados pelo planejamento composto central.

$$\hat{y} = \underset{\pm 0,75}{104,20} + \underset{\pm 0,40}{1,05x_1} - \underset{\pm 0,40}{8,69x_2} + \underset{\pm 0,39}{1,87x_3} - \underset{\pm 0,38}{0,67x_1^2} + \underset{\pm 0,38}{1,18x_2^2} + \underset{\pm 0,38}{0,39x_3^2} - \underset{\pm 0,55}{1,37x_1x_2} + \underset{\pm 0,55}{0,88x_2x_3} \quad \text{Equação 16}$$

O modelo da Equação 16 é a representação da relação matemática entre as variáveis tempo de congelamento, volume de solvente e massa de amostra e a recuperação dos sete agrotóxicos estudados neste trabalho. Este modelo prediz a taxa de recuperação máxima alcançada pelo método LLE-LTP de resíduos de agrotóxicos de amostras de mel, dentro da região experimental investigada. A validade deste modelo foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA), apresentada na Tabela 15.

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para a porcentagem de recuperação de agrotóxicos de amostras de mel, empregando planejamento composto central.

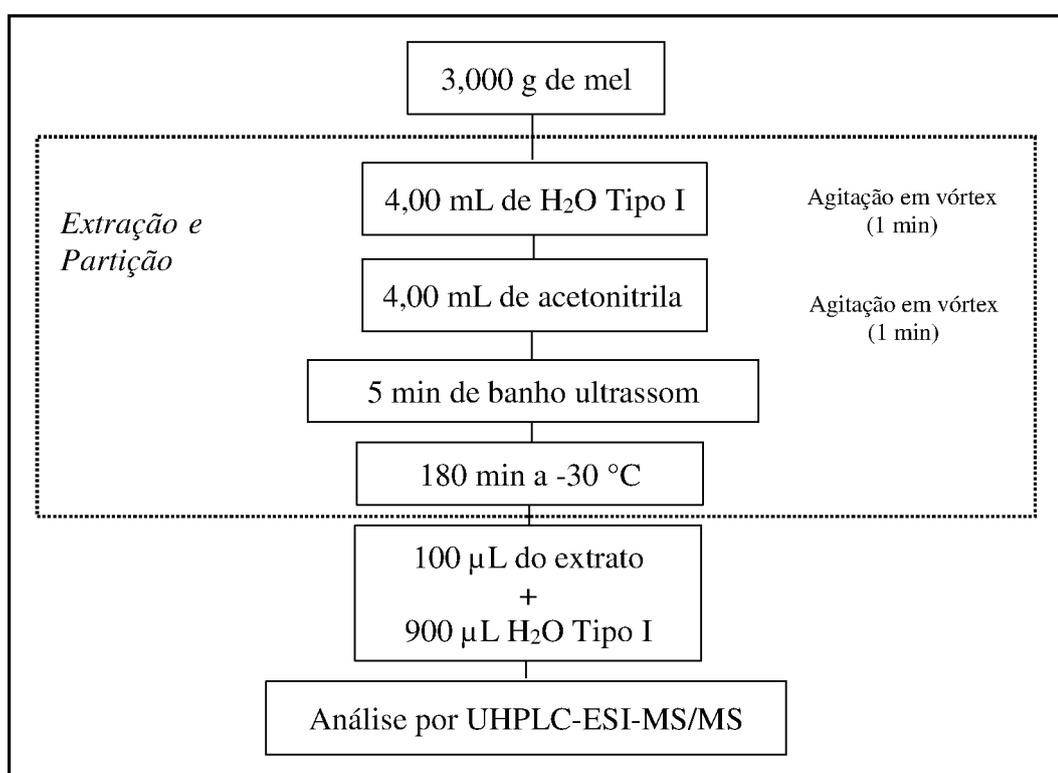
Fontes de variação	SQ	GL	MQ	F
REGRESSÃO	1076,02	10	107,60	
RESÍDUOS	45,16	6	7,53	
Falta de ajuste	41,78	4	10,44	6,18
Erro Puro	3,38	2	1,69	
TOTAL	1121,18	16		
% variação explicada	95,97			
% variação explicável	99,70			

Como pode ser observada na Tabela da ANOVA, a porcentagem de variação explicável (R^2) é de 99,70 %, enquanto a variação explicada (R^2 ajustado) pelo modelo foi de 95,97 %, indicando que o mesmo se encontra ajustado aos dados experimentais. Outro parâmetro que confirma o ajuste do modelo aos resultados experimentais é o teste F, que relaciona as médias quadráticas da Falta de Ajuste pelo Erro Puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}), apresenta um valor menor que o $F_{crítico}$ tabelado que é 19,25 no nível de 95 % de confiança. Desta forma, o modelo da Equação

16 pode ser empregado para prever as condições ótimas das variáveis para a extração dos resíduos dos agrotóxicos das amostras de mel.

A partir do modelo, empregando o Excel® com a função Solver, as condições ótimas para recuperação máxima dos agrotóxicos foram: 3,000 g de amostra de mel, 4 mL de solvente acetonitrila e 180 min de congelamento, que resulta em uma recuperação média para todos os agrotóxicos de 116,9 %. Logo, a extração dos resíduos de agrotóxicos empregando LLE-LTP seguiu o procedimento descrito na Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática do preparo de amostra otimizado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em mel utilizando LLE-LTP.



O preparo de amostra otimizado conforme descrito na Figura 10 apresentou extratos límpidos, adequados para as medidas cromatográficas. A baixa temperatura empregada, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, promoveu a separação e precipitação dos materiais gordurosos, ceras e graxas presentes na amostra de mel. A mistura da amostra de mel e água seguida da adição do solvente acetonitrila foi resfriada a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Com o abaixamento da temperatura a fase aquosa foi congelada. A acetonitrila, de temperatura de congelamento igual a $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ (PUBCHEM, 2019), fica líquida e a alíquota que será diluída e, posteriormente, injetada é facilmente retirada com auxílio de uma seringa convencional.

Comparando os dois métodos de extração otimizados, pode-se dizer que o método QuEChERS apresentou menor dispersão dos resultados, no entanto, o método LLE-LTP apresenta menos etapas e menor interferência do analista na preparação da amostra. Apesar do tempo de congelamento longo, o restante do processo de extração LLE-LTP é inferior a 3 min e não apresentou a necessidade de uma etapa de *clean-up* como no método QuEChERS. Em ambos os métodos foram empregados 4 mL de acetonitrila como solvente extrator, porém no método QuEChERS faz-se uso de outras substâncias, como MgSO₄, CH₃COONa e C₁₈ para a obtenção do extrato límpido e com os resíduos de agrotóxicos livres de componentes da matriz do mel.

5.3 Validação das metodologias desenvolvidas

Os procedimentos de preparo de amostra otimizados, QuEChERS e LLE-LTP, foram aplicados em amostras de mel, nas quais não foram detectados os agrotóxicos investigados, para a realização do estudo de validação da metodologia proposta para a determinação dos agrotóxicos acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam em amostras de mel empregando UHPLC-ESI-MS/MS.

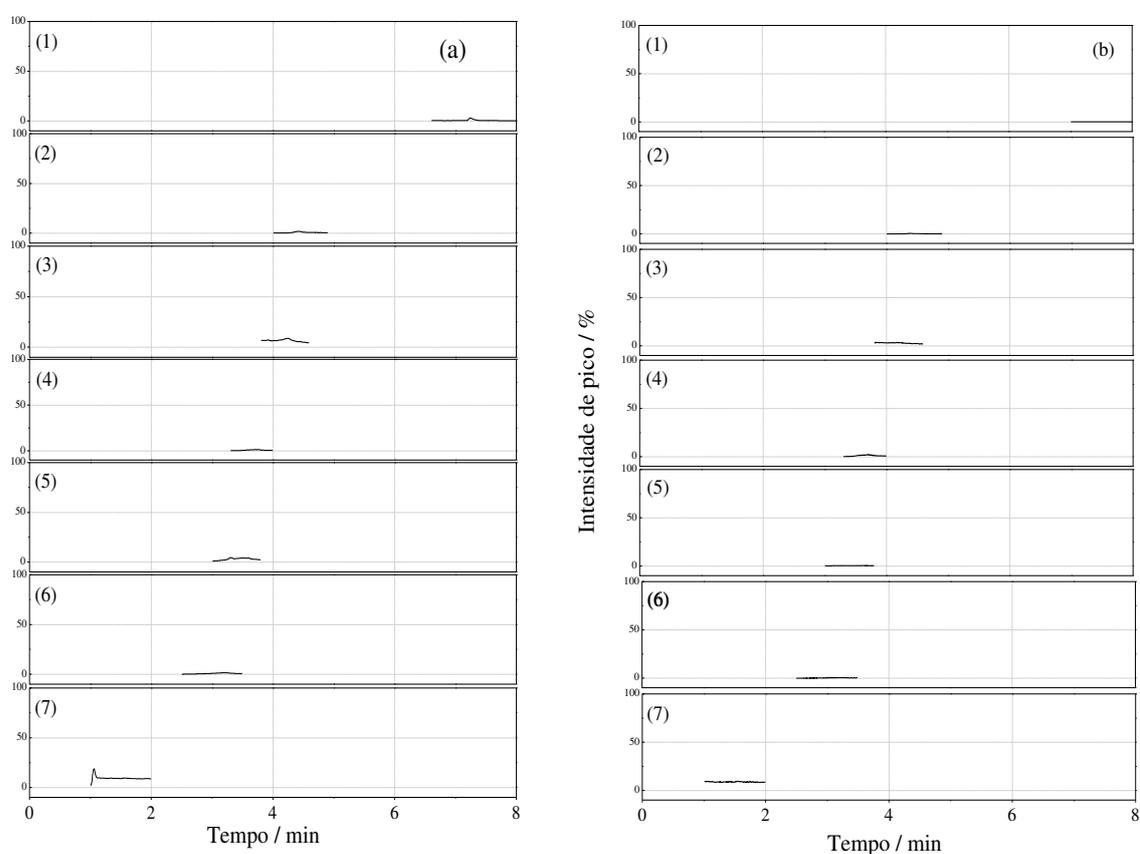
Primeiramente, empregou-se a metodologia de determinação dos agrotóxicos em uma amostra de mel para avaliar potenciais interferentes e não se observou nenhuma contaminação dos solventes e reagentes utilizados na extração e na análise cromatográfica do mel, nos tempos de retenção dos agrotóxicos. Em seguida, foi realizado o estudo da validação da metodologia para determinação de agrotóxicos nas amostras de mel, empregando os métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP nas condições previamente otimizadas com a quantificação dos resíduos de agrotóxicos nos extratos por UHPLC-ESI-MS/MS. Os parâmetros analíticos de desempenho das metodologias avaliados foram a seletividade/especificidade, faixa de trabalho, linearidade, limite de quantificação, exatidão (ensaios de recuperação) e precisão (repetibilidade e reprodutibilidade dentro do laboratório), seguindo o documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017).

5.3.1 Seletividade/Especificidade

A seletividade/especificidade do método foi avaliada pela presença de interferentes nos tempos de retenção dos picos dos agrotóxicos no cromatograma, bem como com relação aos íons monitorados e a razão entre as áreas dos picos de quantificação e confirmação de cada

agrotóxico no espectrômetro de massas. A Figura 11 apresenta os cromatogramas obtidos por UHPLC-ESI-MS/MS dos extratos das amostras de mel isentas dos agrotóxicos monitorados neste trabalho. Os extratos foram obtidos pela aplicação dos métodos QuEChERS e LLE-LTP otimizados. Percebe-se a inexistência de picos cromatográficos nos tempos de retenção dos compostos para ambos métodos de extração.

Figura 11. Cromatogramas obtidos para os extratos das amostras de mel isentas dos agrotóxicos por UHPLC-ESI-MS/MS. (a) método de extração QuEChERS e (b) método de extração LLE-LTP. (1) diflubenzurom, (2) acetamiprido, (3) imidacloprido, (4) tiametoxam, (5) metomil, (6) carbendazim e (7) acefato.



Conforme o guia de validação SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017), os cromatogramas dos extratos de amostra devem apresentar picos cromatográficos com tempo de retenção ($\pm 0,1$ min), formato semelhantes e a relação da área dos picos de quantificação e confirmação (razão íon) deve apresentar variação de no máximo $\pm 30\%$ quando comparados com a razão íon dos padrões analíticos. Quando um desses parâmetros diverge evidencia-se a interferência analítica, sendo a quantificação do analito não confiável. Neste caso é necessário rever os parâmetros cromatográficos, reagentes e solventes utilizados, e o preparo de amostra a fim de identificar a

fonte de interferência e erradicá-la. A Tabela 16 apresenta a relação das áreas dos picos de quantificação e de confirmação, extraídas do cromatograma do UHPLC-ESI-MS/MS, para a solução dos agrotóxicos preparados em solvente.

Tabela 16. Relação das áreas dos picos de quantificação (M_1) e de confirmação (M_2) para os agrotóxicos no UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	M_1/M_2
Acefato	0,36
Acetamiprido	1,51
Carbendazim	5,35
Diflubenzurom	1,60
Imidacloprido	1,05
Metomil	1,45
Tiametoxam	2,15

A relação das áreas dos picos de quantificação e de confirmação é um parâmetro que deve ser monitorado, pois esse indica se os fragmentos gerados são realmente do composto de interesse. Quando a razão íon dos picos cromatográficos provenientes de uma amostra real apresenta variação maior que $\pm 30\%$ (SANTE, 2017) em relação a razão íon dos picos cromatográficos dos padrões analíticos, indica que os fragmentos encontrados não correspondem aos fragmentos do analito de interesse.

5.3.2 Faixa de trabalho e linearidade

A partir da construção das curvas analíticas para os agrotóxicos extraídos das amostras de mel e também para as soluções dos agrotóxicos preparadas em solvente (acetonitrila: H₂O, 10:90, v/v) foram determinados alguns dos parâmetros analíticos de validação dos métodos, tais como a linearidade (medida pelo coeficiente de determinação, R^2), a sensibilidade (medida pelo coeficiente angular das curvas analíticas) e a faixa dinâmica de trabalho (range) da metodologia para cada composto. Os parâmetros de faixa de trabalho, linearidade e sensibilidade da metodologia proposta a cada composto estão apresentados na Tabela 17, quando empregada a extração pelo método QuEChERS e na Tabela 18 quando empregada a extração pelo método LLE-LTP.

Tabela 17. Parâmetros de validação obtidos das curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente e na matriz, empregando o método QuEChERS e a técnica UHPLC-ESI-MS/MS.

Analitos	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Padrão externo (solvente)		Calibração na matriz (mel)	
		Linearidade (R^2)	Sensibilidade ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	Linearidade (R^2)	Sensibilidade ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)
Acefato	0,5 - 4,5	0,9990	2716	0,9996	2994
Acetamiprido	0,5 - 4,5	0,9991	8090	0,9986	7439
Carbendazim	0,5 - 4,5	0,9977	12242	0,9991	17004
Diflubenzurom	0,5 - 4,5	0,9986	2614	0,9968	2759
Imidacloprido	0,5 - 4,5	0,9942	2215	0,9996	2260
Metomil	0,5 - 4,5	0,9910	3543	0,9990	3139
Tiametoxam	0,5 - 4,5	0,9994	8307	0,9994	7520

Tabela 18. Parâmetros de validação obtidos das curvas analíticas dos agrotóxicos preparadas em solvente e na matriz, empregando o método LLE-LTP e a técnica UHPLC-ESI-MS/MS.

Analitos	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Padrão externo (solvente)		Calibração na matriz (mel)	
		Linearidade (R^2)	Sensibilidade ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	Linearidade (R^2)	Sensibilidade ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)
Acefato	0,5 - 4,5	0,9994	3985	0,9974	4249
Acetamiprido	0,5 - 4,5	0,9988	3029	0,9973	3027
Carbendazim	0,5 - 4,5	0,9992	9951	0,9992	10600
Diflubenzurom	0,5 - 4,5	0,9991	2127	0,9988	2330
Imidacloprido	0,5 - 4,5	0,9988	1158	0,9980	1180
Metomil	0,5 - 4,5	0,9966	536	0,9963	598
Tiametoxam	0,5 - 4,5	0,9985	2378	0,9990	2951

Avaliando os coeficientes angulares das equações das retas em solvente e no extrato da matriz preparado empregando os métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP, nota-se que o agrotóxico carbendazim apresenta maior sensibilidade entre os agrotóxicos analisados por UHPLC-ESI-MS/MS. O imidacloprido e o metomil apresentaram as menores sensibilidades, quando empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP, respectivamente. De uma forma geral, para ambos os métodos de extração, observa-se que não há variação significativa na sensibilidade para os agrotóxicos quando são analisados em soluções preparadas em solvente e na matriz do mel. A sensibilidade da metodologia para os agrotóxicos é, em média, maior

quando se emprega extração QuEChERS do que quando se emprega a LLE-LTP. As faixas de trabalho para os resíduos de agrotóxicos empregando as duas metodologias foram de 0,5 a 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, a mesma foi padronizada considerando: o menor LMR entre os agrotóxicos avaliados, 20 mg kg^{-1} , o qual corresponde ao nível intermediário da faixa de trabalho de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; o menor nível de concentração da faixa de trabalho, 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi definido considerando a razão sinal ruído aproximadamente igual a 10 nos fragmentos de quantificação e confirmação, para os analitos acefato, diflubenzurom, imidacloprido, e metomil, os quais apresentam menor sensibilidade.

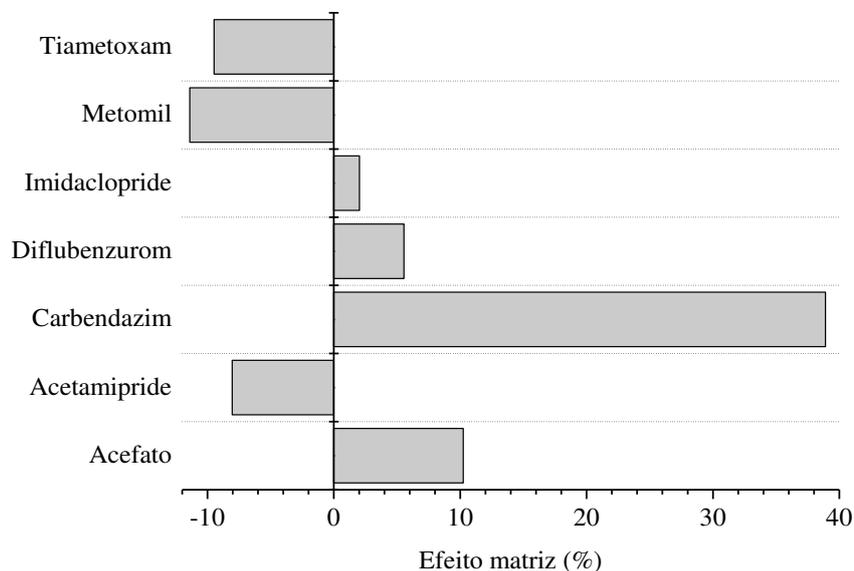
Para todos os agrotóxicos avaliados, empregando os métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP, os coeficientes de determinação obtidos a partir das equações das retas foram todos maiores que 0,9910, portanto, em acordo com o protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos proposto pela Comunidade Europeia – documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017).

5.3.3 Efeito matriz

O efeito matriz deve ser considerado e estimado em análises quantitativas por cromatografia líquida com detector por espectrometria de massas com fonte de ionização *electrospray*. Os componentes da matriz podem melhorar ou suprimir o sinal dos analitos e o efeito pode variar de amostra para amostra. No caso da fonte de ionização ESI os componentes da matriz podem afetar a eficiência de ionização dos analitos. Para reduzir os efeitos da matriz é importante ter uma preparação de amostra e uma separação cromatográfica eficientes, além disso a diluição do extrato antecedendo a injeção cromatográfica pode contribuir para a redução dos efeitos matriz. Esta solução foi adota neste trabalho independente das metodologias empregadas.

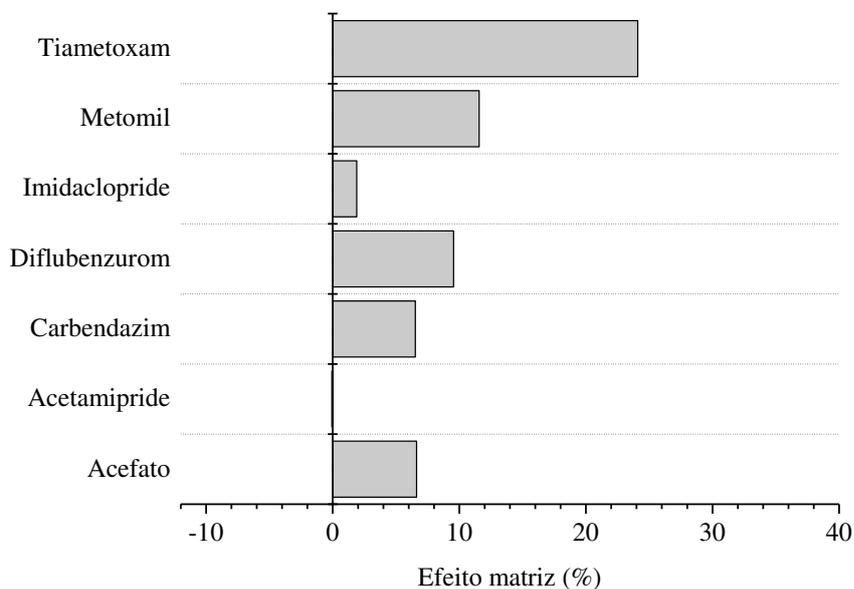
As Figuras 12 e 13 mostram os resultados do efeito matriz na recuperação dos agrotóxicos a partir de soluções preparadas em solvente e nos extratos da matriz obtidos dos métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP, respectivamente.

Figura 12. Efeito matriz na recuperação dos agrotóxicos por UHPLC-ESI-MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e no extrato da matriz empregando o método QuEChERS.



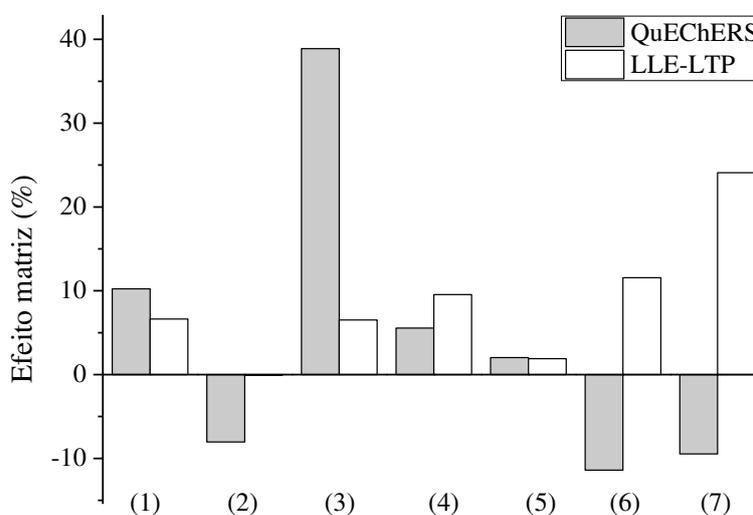
Nota-se que o efeito de matriz foi negativo para os analitos acetamiprido, metomil e tiametoxam, provavelmente devido a competição por ionização entre os analitos e outros componentes da amostra que não foram eliminados no preparo de amostra empregando o método QuEChERS. Para os agrotóxicos acefato, carbendazim, diflubenzurom e imidacloprido o efeito de matriz foi positivo, neste caso a presença dos co-extrativos resultou em sinergismo na ionização dos analitos.

Figura 13. Efeito matriz na recuperação dos agrotóxicos por UHPLC-ESI-MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e no extrato da matriz empregando o método LLE-LTP.



Nota-se que o efeito matriz foi positivo para todos os analitos exceto para o acetamiprido no qual não foi evidenciado o efeito matriz, ao empregar o método de preparo de amostra LLE-LTP. Um comparativo entre as duas metodologias e o efeito matriz na recuperação dos agrotóxicos é apresentado na Figura 14.

Figura 14. Efeito matriz na recuperação dos agrotóxicos por UHPLC-ESI-MS/MS, a partir de soluções preparadas em solvente e no extrato da matriz empregando os métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP. (1) Acefato, (2) Acetamiprido, (3) Carbendazim, (4) Diflubenzurom, (5) Imidacloprido, (6) Metomil e (7) Tiametoxam.



Pode-se observar na Figura 14 que os efeitos matriz na recuperação dos agrotóxicos são influenciados pelos métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP empregados na metodologia. A recuperação do agrotóxico imidacloprido foi influenciada na mesma magnitude pelo efeito matriz para ambos métodos de extração, para todos os demais o comportamento apresentou interferência do método de extração. Para os agrotóxicos acefato, acetamiprido e carbendazim o efeito matriz foi menor ao empregar o preparo de amostra LLE-LTP. Para os agrotóxicos diflubenzurom e tiametoxam o efeito matriz foi menor ao empregar o método QuEChERS. Já para o agrotóxico metomil, o valor do efeito de matriz em módulo foi igual para ambos os métodos de preparo de amostra, porém o sinal é suprimido no método QuEChERS e ampliado no método LLE-LTP.

O maior efeito matriz registrado quando se empregou o método QuEChERS foi para o agrotóxico carbendazim, 38,9 %. No método LLE-LTP, o maior efeito matriz observado foi para o agrotóxico tiametoxam, 24,1 %. O que evidencia que mesmo não aplicando a etapa de *clean-up* no método de extração LLE-LTP o mesmo remove com eficiência os componentes da matriz. Os valores de efeitos matriz indicam que, apesar dos métodos QuEChERS e LLE-LTP removerem com eficiência os componentes da matriz, há necessidade de se preparar as soluções dos agrotóxicos nas amostras de mel e construir as curvas analíticas pelo método da calibração na matriz.

5.3.4 Limites de quantificação e de detecção

Os valores dos LOD e LOQ foram obtidos através da relação sinal/ruído e da razão íon de quantificação/íon de confirmação para cada um dos agrotóxicos estudados, seguindo os métodos QuEChERS e LLE-LTP, como apresentados no item 4.10.3. As soluções da mistura de agrotóxicos foram preparadas no extrato da matriz de mel. Os valores de LOD obtidos empregando o método QuEChERS foram de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o extrato de carbendazim, que corresponde a 0,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de resíduos de carbendazim no mel e 1,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$) para o acetamiprido, tiametoxam, diflubenzurom, acefato, imidacloprido e metomil. De acordo com a relação entre o LOQ e LOD que é de 3,3, os LOQ para o carbendazim foi de 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 4,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para todos os demais agrotóxicos, empregando o método QuEChERS.

Os valores de LOD para os agrotóxicos extraídos de amostras de mel empregando o método LLE-LTP foram de 0,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o carbendazim e de 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os demais

agrotóxicos, enquanto que os valores de LOQ foram de 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o carbendazim e 6,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para acetamiprido, tiametoxam, diflubenzurom, acefato, imidacloprido e metomil.

Os valores de LOD e LOQ são muito inferiores aos estabelecidos como limite máximo de resíduos (LMR) para os agrotóxicos em mel pela IN N° 20/2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil (BRASIL, 2000), como pode ser observado na Tabela 19. Os valores de LOQ para os resíduos de agrotóxicos obtidos neste método são inferiores também a outras metodologias propostas para determinação de resíduos de agrotóxicos em mel, empregando diferentes métodos de preparação de amostras e técnicas analíticas na literatura. Essa alta detectabilidade do método está associada à técnica de UHPLC-ESI-MS/MS, que apresenta alta sensibilidade no modo MRM.

Tabela 19. Comparação entre os limites de quantificação para os agrotóxicos pelos métodos QuEChERS e LLE-LTP e os limites máximos residuais permitidos pela legislação brasileira no mel.

Classe	LOQ _{QuEChERS} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ _{LLE-LTP} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR (mg kg^{-1}) ^a
Acefato	4,0	6,7	20
Acetamiprido	4,0	6,7	50
Carbendazim	2,0	3,0	1000
Diflubenzurom	4,0	6,7	50
Imidacloprido	4,0	6,7	50
Metomil	4,0	6,7	20
Tiametoxam	4,0	6,7	50

^a MAPA. Instrução Normativa N° 20. (BRASIL, 2000).

As soluções dos agrotóxicos a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ apresentaram valores de recuperações entre 89,3 e 106,6 % e desvio padrão relativo inferior a 13,8 %, ao empregar os métodos de extração QuEChERS, portanto conforme recomendado pelo documento SANTE/11813/2017, indicando que a metodologia proposta neste trabalho, apresenta sinal no limite de quantificação para os compostos com boa exatidão e adequada precisão nas concentrações de 2,0 e 4,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o carbendazim e para os demais agrotóxicos, respectivamente. Empregando o método de extração LLE-LTP foram obtidos valores de recuperação entre 100,5 e 115,3 % para os agrotóxicos acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam em concentração nos valores do LOQ para cada agrotóxico e RSD menores que 5,0 %. Porém,

o agrotóxico acefato apresentou valor médio de recuperação de 41,6 % na mesma concentração, o que evidencia uma baixa exatidão da metodologia para este agrotóxico.

Comparando os valores de LOQ obtidos neste trabalho pelos métodos QuEChERS e LLE-LTP com outros similares na literatura, pode ser observado que os métodos propostos apresentam alta detectabilidade, principalmente se considerar que os extratos foram diluídos 10 vezes antes da injeção cromatográfica para minimizar o efeito matriz nas medidas. Tette (2016) propôs um método QuEChERS seguido de análise por UHPLC-ESI-MS/MS para quantificação de 116 agrotóxicos em amostras de mel. Os limites de detecção e quantificação alcançados pelo autor foram respectivamente: 5,0 e 25,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o acetamiprido; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o carbendazim, compostos analisados em comum aos deste trabalho.

Kiljanek e colaboradores (2016) desenvolveram um método para a determinação de 200 resíduos de agrotóxicos em abelhas. Para o preparo de amostra empregou-se o método de extração QuEChERS e o extrato foi analisado por LC-MS/MS. Os limites de quantificação obtidos foram de 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para os analitos carbendazim, acetamiprido, diflubenzurom e imidacloprido; para o agrotóxico tiametoxam o limite de quantificação encontrado foi de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Wiest e colaboradores (2011) propuseram um método para quantificar 80 resíduos de agrotóxicos em mel. A técnica de preparo de amostra empregada foi QuEChERS e os extratos foram analisados por LC-ESI-MS/MS. Nesse trabalho os valores de LOQ foram de 4,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o carbendazim, 10,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para metomil, 4,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para tiametoxam e 3,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o imidacloprido.

Nota-se que os métodos QuEChERS e LLE-LTP otimizados neste trabalho resultaram em baixos limites de detecção e quantificação, quando comparados com os valores encontrados na literatura. Considerando a complexidade da matriz analisada, as diluições dos extratos pré-análise cromatográfica e as boas exatidão e precisão alcançadas nas análises dos agrotóxicos nas concentrações definidas como LOQ, os limites de quantificação podem ser considerados satisfatórios e ambos os métodos de alta detectabilidade.

5.3.5 Ensaios de recuperação

Para avaliar a exatidão da metodologia de determinação dos resíduos de agrotóxicos em amostras de mel, ensaios de recuperação foram realizados empregando amostras de mel, isentas de agrotóxicos, fortificadas em três níveis de concentração, 0,5; 2,5 e 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP e a análise dos extratos por UHPLC-ESI-MS/MS. Para o

cálculo de recuperação dos agrotóxicos foram empregadas as curvas analíticas preparadas no extrato da matriz. Conforme estabelecido no documento SANTE (2017), foram realizadas as análises das amostras fortificadas em três níveis de concentração dos agrotóxicos dentro da faixa de 1 a 10 vezes os LOQ em sextuplicata (6 réplicas para cada amostra). As Tabelas 20 e 21 apresentam os resultados de recuperação para os agrotóxicos, empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP, respectivamente.

Tabela 20. Taxas de recuperação dos resíduos dos agrotóxicos, em 3 níveis de fortificação, de amostras de mel, empregando o método QuEChERS e a UHPLC-ESI-MS/MS, n = 6.

Analito	Taxa de recuperação					
	0,5 µg L ⁻¹		2,5 µg L ⁻¹		4,5 µg L ⁻¹	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Acefato	102,2	1,0	100,4	0,8	100,8	0,5
Acetamiprido	96,8	1,4	97,6	0,9	99,4	1,2
Carbendazim	89,3	1,3	96,2	0,6	97,1	0,9
Diflubenzurom	105,4	1,4	100,5	1,6	102,3	1,4
Imidacloprido	98,2	1,7	100,5	0,2	100,4	0,3
Metomil	96,5	13,8	102,0	3,0	100,4	1,5
Tiametoxam	106,6	2,8	101,3	0,7	100,7	0,6

Tabela 21. Taxas de recuperação dos resíduos dos agrotóxicos, em 3 níveis de fortificação, de amostras de mel, empregando o método LLE-LTP e a UHPLC-ESI-MS/MS, n = 6.

Analito	Taxa de recuperação					
	0,5 µg L ⁻¹		2,5 µg L ⁻¹		4,5 µg L ⁻¹	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
Acefato	41,6	5,2	43,0	2,7	46,2	4,0
Acetamiprido	112,1	1,9	117,2	5,7	116,9	2,3
Carbendazim	100,5	1,3	100,0	3,8	105,9	1,2
Diflubenzurom	105,2	1,8	110,8	2,1	112,8	2,1
Imidacloprido	115,3	3,5	115,4	2,2	116,8	2,4
Metomil	107,7	5,0	114,5	2,8	114,5	1,7
Tiametoxam	102,2	3,3	105,9	2,2	110,5	1,3

De acordo com a Tabela 20, ao aplicar o método QuEChERS as taxas de recuperação dos agrotóxicos variaram na faixa de 89,3 a 106,6 %, dentro do critério estabelecido pelo documento SANTE (2017) que é de 70 a 120 %. O carbendazim e o tiametoxam apresentaram o menor e o maior valores de recuperação, respectivamente, no menor nível de concentração. Para o método LLE-LTP, observa-se na Tabela 21 que a faixa de recuperação ficou entre 100,5 e 117,2 % para quase todos os agrotóxicos. No entanto, o acefato apresentou taxa de recuperação abaixo da faixa sugerida (SANTE, 2017). Isso se deve ao coeficiente de partição octanol/água do acefato ser -0,85 (PUBCHEM, 2019), indicando maior polaridade desse composto e maior tendência desse analito permanecer na fase aquosa não sendo particionado para a fase orgânica durante a etapa de congelamento. Esse mesmo comportamento não se observa quando a separação de fases ocorre pela adição de sais, como o ocorre no método QuEChERS, provavelmente porque o volume da fase aquosa é reduzido na presença de $MgSO_4$, favorecendo a partição para o maior volume da fase orgânica. O composto acetamiprido apresentou o maior valor de recuperação, 117,2 %, apesar de não ter apresentado efeito matriz conforme indicado anteriormente.

De uma forma geral, todos os demais agrotóxicos avaliados, empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP, apresentaram valores de recuperação entre 70 e 120 %, portanto, em acordo com o protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos proposto pela Comunidade Europeia – documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017).

A Tabela 22 apresenta o comparativo das características do método proposto com outros métodos desenvolvidos para a determinação de agrotóxicos em amostras de mel.

Tabela 22. Comparativo das características do método proposto com outros métodos desenvolvidos para a determinação de agrotóxicos em amostras de mel.

Número de agrotóxicos	Classe	Técnica analítica	Método de extração	Solvente	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
7	Organofosfato, neonicotinóide, benzimidazol, benzoiluréia, metilcarbamato de oxima	UHPLC-ESI-MS/MS	QuEChERS	Acetonitrila	0,6 a 1,3	2,0 a 4,0	89,3 – 106,6	Método proposto
			LLE-LTP	Acetonitrila	0,9 a 2,0	3,0 a 6,7	46,2 – 117,2	
5	Neonicotinóide	LC-MS/MS	QuEChERS citrato e SPE	Acetonitrila	0,05 a 0,97	0,15 a 3,25	68,2 – 113,6	(MRZLKAR <i>et al.</i> , 2019)
207	Organoclorado, piretroide, organofosforado, neonicotinóides, pirazol, triazol, organofosforado, carbamatos, ureias, triazinas,	LC-MS/MS e GC-MS/MS	QuEChERS acetato	Acetonitrila	-	1,0 a 10,0	63,0 – 128,0	(GAWEL <i>et al.</i> , 2019)
16	Neonicotinóide	LC-MS/MS	DPX	Acetonitrila	0,3 a 3	0,1 a 10,0	72,0 – 111,0	(SONG <i>et al.</i> , 2018)
35	Organoclorado, piretroide, organofosforado, neonicotinóides, pirazol, triazol, organofosforado	GC-MS	SPE	Acetonitrila	-	1,0 a 50,0	70,5 – 127,5	(RAFIQUE <i>et al.</i> , 2018)
6	Amidina, neonicotinóide, bis-arilformamida, piretróide, organofosforado	LC-MS/MS	QuEChERS fosfato	Acetonitrila	0,4 a 2,0	1,0 e 5,0	62,1 – 108,8	(ZHENG <i>et al.</i> , 2017)

5	Organofosforado e carbamatos	ND-EESI-MS	QuEChERS	Acetonitrila	1,16 a 4,18	20,0	87,0 a 115,0	(DENG <i>et al.</i> , 2017)
116	Acilaminoácido, benzofurano, anilino pirimidinas, carbamatos, ariloxifenoxipropionatos, benzimidazóis, carbanilato, carboxamidas, cloroacetamidas, cianoimidazol, diacilhidrazinas, dicarboximidas, dinitroanilina, hidroxianilida, imidazóis, morfollinas, neonicotinóides, organofosforado, oxadiazina, fenilamidas, fenilpirazóis, fenilureias, fosforotiolato, pirazóis, piretróides, piridinas, piridazinona, pirimidinas, ureias, estrobilurinas, éster de sulfito, triazinas, tetrazina, ácido tetrônico, triazóis	UHPLC-MS/MS	QuEChERS Acetato	Acetonitrila e acetato de etila	5,0	10 e 25	81,6 – 108,9	(TETTE <i>et al.</i> , 2016)

52	Organoclorado, piretroide, organofosforado, pirazol, neonicotinoide, uréia, triazina, triazol,	LC-MS/MS	QuEChERS citrato	Acetonitrila	-	0,2 a 10	21 – 96	(CALATAYUD -VERNICH <i>et al.</i> , 2016)
23	Organoclorado, piretroide, organofosforado, estrobilurina, clorociclodieno, pirazol, cloroaromático, clorodifenilsulfona, oximinoacetato, dinitroanilina	GC-ECD	QuEChERS Acetato	Acetonitrila	3,0 a 6,0	10,0 a 20,0	70 - 145	(ORSO, 2011)
9	Pirazol, neonicoinóide, bis-arilformamidina, piretróide, organofosforado, benzimidazol, triazol	LC-MS/MS	QuEChERS	Acetonitrila	1,6 a 330	5 a 1000	70 - 112	(TOMASINI, 2011)
12	Organofosforado e carbamatos	LC-MS/MS	PLE	Acetato de etila	7	595	82 - 104	(BLASCO <i>et al.</i> , 2011)
80	Organohalogéneo, organofosforado, piretróide, carbamato, triazol, nicotinóide, avermectina, piridina, dicarboxiamida, imidazol, formamida, tetrazina, tiazolidina	LC-MS/MS e GC-ToF	QuEChERS citrato	Acetonitrila	0,1 a 23,9	3,0 a 70,4	6 - 136	(WIEST <i>et al.</i> , 2011)

4	Organofosforado e piretróide	GC-ECD	LLE-LTP	Acetonitrila e acetato de etila	16	33	84,6 – 100,9	(PINHO <i>et al.</i> , 2010)
48	Organohalogenios, organofosforado, piretróides e organonitrogenio	GC-MS	LLE	Acetato de etila	0,2 a 5,0	0,8 a 20	76 - 95	(RISSATO <i>et al.</i> , 2006)

5.3.6 Estudos de precisão das metodologias

A repetibilidade e a reprodutibilidade em laboratório (precisão intermediária) das metodologias propostas foram avaliadas, seguindo as recomendações do documento SANTE (2017). Amostras de mel, fortificadas em três níveis de concentrações 0,5; 2,5 e 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, foram submetidas a extração em sextuplicata pelos métodos QuEChERS e LLE-LTP otimizados, sendo os extratos analisados por UHPLC-ESI-MS/MS. A repetibilidade foi avaliada mantendo-se todas as condições da metodologia idênticas de uma amostra para outra, medindo a dispersão (RSD) dos resultados de recuperação obtidos. As Tabelas 23 e 24 apresentam os resultados de precisão da metodologia obtidos a partir dos ensaios de repetibilidade empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP, respectivamente.

Tabela 23. Repetibilidade de recuperação dos agrotóxicos de amostras de mel, empregando o método QuEChERS e UHPLC-ESI-MS/MS. Teste de Grubbs (G) para 97,5 % de confiança.

Analito	Níveis de fortificação									
	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$			2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$			4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$			
	$\mu\text{g L}^{-1}$	G	RSD (%)	$\mu\text{g L}^{-1}$	G	RSD (%)	$\mu\text{g L}^{-1}$	G	RSD (%)	
Acefato	0,514	0,604		2,474	1,686		4,527	0,560		
	0,505	1,259		2,530	1,001		4,519	0,942		
	0,507	0,949	1,0	2,503	0,307	0,8	4,515	1,171	0,4	
	0,513	0,293		2,507	0,089		4,555	0,891		
	0,518	1,432		2,530	1,025		4,552	0,738		
		0,511	0,121		2,510	0,056		4,558	1,044	
		0,493	1,221		2,426	0,698		4,502	0,500	
	0,472	1,723		2,452	0,546		4,416	1,093		
Acetamiprido	0,484	0,000	1,4	2,462	1,025	0,9	4,515	0,741	1,2	
	0,483	0,144		2,418	1,081		4,469	0,111		
	0,484	0,072		2,422	0,890		4,408	1,242		
		0,489	0,718		2,464	1,097		4,540	1,205	

	0,456	1,558		2,396	0,564		4,365	0,116	
	0,450	0,473		2,407	0,208		4,338	0,841	
Carbendazim	0,441	0,946	1,3	2,399	0,380	0,6	4,384	0,380	0,8
	0,450	0,473		2,429	1,863		4,438	1,830	
	0,442	0,863		2,390	1,005		4,347	0,613	
	0,443	0,696		2,402	0,123		4,346	0,640	
	0,518	1,206		2,558	1,088		4,566	0,587	
	0,521	0,808		2,561	1,149		4,552	0,815	
Diflubenzurom	0,537	1,250	1,4	2,503	0,249	1,6	4,580	0,376	1,4
	0,536	1,117		2,521	0,188		4,565	0,607	
	0,525	0,277		2,464	1,210		4,719	1,758	
	0,527	0,077		2,474	0,967		4,645	0,626	
	0,480	1,337		2,507	1,175		4,516	0,111	
	0,488	0,372		2,511	0,452		4,516	0,136	
Imidacloprido	0,485	0,794	1,7	2,514	0,090	0,2	4,514	0,343	0,3
	0,497	0,653		2,523	1,808		4,499	1,548	
	0,496	0,533		2,514	0,090		4,527	0,778	
	0,502	1,317		2,511	0,362		4,534	1,360	
	0,488	0,072		2,598	0,628		4,555	0,536	
	0,443	0,601		2,596	0,595		4,453	0,970	
Metomil	0,410	1,088	13,8	2,481	0,925	3,0	4,454	0,948	1,5
	0,530	0,701		2,456	1,249		4,619	1,470	
	0,438	0,669		2,650	1,308		4,556	0,551	
	0,589	1,585		2,524	0,357		4,475	0,639	
	0,547	0,950		2,520	0,659		4,551	0,689	
	0,533	0,006		2,540	0,449		4,507	1,057	
Tiametoxam	0,543	0,680	2,8	2,515	0,965	0,7	4,524	0,375	2,1
	0,527	0,399		2,543	0,651		4,506	1,117	
	0,507	1,782		2,557	1,460		4,547	0,549	
	0,541	0,545		2,516	0,936		4,566	1,311	

Tabela 24. Repetibilidade de recuperação dos agrotóxicos de amostras de mel, empregando o método LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS. Teste de Grubbs (G) para 97,5 % de confiança.

Analito	Níveis de fortificação									
	0,5 µg L ⁻¹			2,5 µg L ⁻¹			4,5 µg L ⁻¹			
	µg L ⁻¹	G	RSD (%)	µg L ⁻¹	G	RSD (%)	µg L ⁻¹	G	RSD (%)	
Acefato	0,207	0,207		1,093	0,603		2,097	0,202		
	0,197	0,446		1,092	0,567		2,012	0,830		
	0,193	0,707	7,5	1,059	0,591	2,6	2,127	0,567	3,9	
	0,218	0,924		1,026	1,749		2,214	1,623		
		0,184	1,294		1,083	0,252		2,034	0,563	
		0,224	1,316		1,102	0,918		1,998	1,000	
Acetamiprido	0,560	0,302		2,875	1,087		5,171	1,087		
	0,551	1,055		2,860	0,585		5,099	0,585		
	0,559	0,151	1,2	2,799	1,454	1,1	5,150	1,454	1,1	
	0,565	1,055		2,855	0,418		5,111	0,418		
		0,549	1,357		2,854	0,384		5,151	0,384	
		0,564	0,905		2,812	1,020		5,160	1,020	
Carbendazim	0,512	1,390		2,562	0,657		4,751	0,282		
	0,501	0,219		2,479	0,220		4,677	1,207		
	0,504	0,219	1,4	2,592	0,974	3,8	4,796	1,187	1,1	
	0,502	0,073		2,587	0,921		4,747	0,201		
		0,505	0,366		2,394	1,118		4,774	0,745	
		0,491	1,683		2,385	1,213		4,677	1,207	
Diflubenzurom	0,551	0,576		2,750	0,309		4,951	1,014		
	0,548	0,072		2,755	0,619		4,895	0,556		
	0,545	0,719	0,8	2,731	0,866	0,6	4,948	0,930	0,7	
	0,552	0,791		2,721	1,485		4,935	0,566		
		0,541	1,583		2,748	0,186		4,861	1,510	
		0,553	1,007		2,765	1,237		4,899	0,444	

Imidacloprido	0,575	0,987		2,875	1,338		5,173	0,705	1,4
	0,521	1,512		2,621	1,421		5,090	0,485	
	0,538	0,725	3,9	2,735	0,183	3,3	5,005	1,704	
	0,548	0,262		2,799	0,512		5,150	0,375	
	0,569	0,709		2,801	0,534		5,124	0,002	
	0,571	0,802		2,680	0,780		5,201	1,106	
Metomil	0,557	0,671		2,926	0,786		4,677	1,432	1,5
	0,489	1,842		2,799	0,799		4,751	0,372	
	0,540	0,043	5,0	2,921	0,724	2,8	4,747	0,430	
	0,553	0,524		2,733	1,623		4,774	0,043	
	0,531	0,289		2,876	0,162		4,865	1,260	
	0,563	0,893		2,923	0,749		4,848	1,017	
Tiametoxam	0,547	1,268		2,701	0,886		4,860	1,070	1,6
	0,539	0,120		2,658	0,227		4,798	0,267	
	0,528	1,459	1,3	2,531	1,718	2,5	4,659	1,532	
	0,532	0,885		2,601	0,646		4,708	0,897	
	0,541	0,407		2,679	0,549		4,809	0,410	
	0,542	0,550		2,689	0,702		4,830	0,682	

De forma análoga ao estudo de repetibilidade, as amostras de mel foram fortificadas com os agrotóxicos nos três níveis de concentração e submetidas a extração pelos métodos QuEChERS e LLE-LTP, em sextuplicata, e os extratos quantificados por UHPLC-ESI-MS/MS. No entanto, para o estudo da reprodutibilidade dentro do laboratório, o procedimento foi executado em três dias distintos conforme recomendado pelo documento SANTE/11813/2017 para avaliação deste parâmetro analítico. As Tabelas 25 e 26 apresentam os resultados do ensaio de reprodutibilidade dentro do laboratório empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP, respectivamente.

Tabela 25. Reprodutibilidade dentro do laboratório para a recuperação dos agrotóxicos, empregando o método QuEChERS e UHPLC-ESI-MS/MS. Teste de Grubbs (G) para 97,5 % de confiança.

Analito	Níveis de fortificação									
	0,5 µg L ⁻¹			2,5 µg L ⁻¹			4,5 µg L ⁻¹			
	µg L ⁻¹	G	RSD (%)	µg L ⁻¹	G	RSD (%)	µg L ⁻¹	G	RSD (%)	
Acefato	0,538	1,040		2,538	1,025		4,647	0,420		
	0,543	1,385		2,553	0,264		4,629	1,094		
	0,510	0,925	2,8	2,543	0,621	0,5	4,628	1,131	0,6	
	0,523	0,006		2,545	0,410		4,686	0,986		
		0,513	0,684		2,572	1,823		4,682	0,857	
		0,511	0,822		2,550	0,031		4,681	0,802	
Acetamiprido	0,595	1,234		2,538	0,969		4,466	1,245		
	0,579	0,025		2,516	0,157		4,559	1,499		
	0,585	0,479	2,3	2,494	1,310	0,8	4,533	0,725	0,8	
	0,555	1,789		2,500	0,995		4,485	0,703		
		0,581	0,176		2,540	1,074		4,513	0,130	
		0,577	0,126		2,527	0,419		4,495	0,406	
Carbendazim	0,503	1,207		2,501	0,163		4,474	1,811		
	0,497	0,618		2,499	0,259		4,547	0,313		
	0,471	1,735	2,3	2,517	0,601	0,8	4,537	0,024	0,8	
	0,493	0,256		2,487	0,832		4,527	0,279		
		0,487	0,287		2,483	1,023		4,565	0,819	
		0,489	0,060		2,539	1,676		4,569	0,934	
Diflubenzurom	0,576	1,143		2,142	1,060		4,142	1,182		
	0,574	1,051		2,138	1,192		4,215	0,197		
	0,557	0,239	3,9	2,191	0,383	1,6	4,185	0,366	1,3	
	0,536	0,711		2,170	0,235		4,161	0,816		
		0,522	1,383		2,219	1,192		4,287	1,539	
		0,544	0,340		2,209	0,913		4,238	0,629	

	0,391	0,396		2,158	0,071		4,112	0,989	
	0,379	0,311		2,169	0,675		4,153	0,112	
Imidacloprido	0,395	0,622	4,6	2,150	0,639	0,7	4,196	1,254	0,9
	0,408	1,358		2,152	0,497		4,124	0,667	
	0,374	0,594		2,182	1,634		4,118	0,842	
	0,358	1,471		2,144	1,101		4,191	1,133	
	0,471	0,499		2,258	0,859		4,270	0,055	
	0,493	0,617		2,268	0,520		4,255	0,582	
Metomil	0,461	1,006	4,1	2,269	0,487	1,3	4,250	0,767	0,6
	0,472	0,448		2,305	0,699		4,250	0,787	
	0,515	1,732		2,336	1,720		4,275	0,240	
	0,473	0,397		2,267	0,553		4,314	1,842	
	0,458	1,476		2,383	0,313		4,297	1,472	
	0,454	0,031		2,382	0,199		4,349	0,005	
Tiametoxam	0,456	0,534	0,6	2,369	1,223	0,4	4,321	0,801	0,8
	0,454	0,031		2,388	0,939		4,394	1,239	
	0,450	1,539		2,369	1,223		4,359	0,275	
	0,453	0,408		2,389	0,995		4,377	0,764	

Tabela 26. Reprodutibilidade dentro do laboratório para a recuperação dos agrotóxicos, empregando o método LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS. Teste de Grubbs (G) para 97,5 % de confiança.

Analito	Níveis de fortificação								
	0,5 µg L ⁻¹			2,5 µg L ⁻¹			4,5 µg L ⁻¹		
	µg L ⁻¹	G	RSD (%)	µg L ⁻¹	G	RSD (%)	µg L ⁻¹	G	RSD (%)
Acefato	0,210	0,958	4,4	1,080	1,449	0,6	2,080	0,780	2,0
	0,198	0,395		1,091	0,259		2,088	0,594	
	0,195	0,733		1,088	0,207		2,090	0,547	
	0,211	1,071		1,094	0,725		2,184	1,641	
	0,189	1,409		1,085	0,673		2,150	0,850	
	0,206	0,507		1,098	1,346		2,089	0,570	
Acetamiprido	0,550	1,020	1,1	2,872	0,688	1,5	5,110	0,731	0,3
	0,559	0,469		2,860	0,400		5,099	1,401	
	0,549	1,185		2,873	0,712		5,125	0,183	
	0,562	0,965		2,875	0,760		5,139	1,035	
	0,563	1,130		2,789	1,305		5,141	1,157	
	0,554	0,358		2,791	1,257		5,118	0,244	
Carbendazim	0,510	1,326	1,6	2,501	0,004	0,9	4,569	1,190	2,0
	0,505	0,695		2,510	0,436		4,610	0,746	
	0,499	0,063		2,485	0,721		4,789	1,194	
	0,502	0,316		2,487	0,652		4,785	1,150	
	0,492	0,947		2,483	0,837		4,689	0,110	
	0,489	1,326		2,539	1,779		4,631	0,518	
Diflubenzurom	0,552	0,104	0,9	2,748	0,043	0,8	4,988	1,412	1,7
	0,547	0,936		2,756	0,304		4,871	0,030	
	0,555	0,728		2,735	0,609		4,758	1,306	
	0,559	1,560		2,745	0,174		4,921	0,620	
	0,547	0,936		2,721	1,217		4,884	0,183	
	0,549	0,520		2,789	1,739		4,789	0,939	

Imidacloprido	0,578	1,459		2,871	1,172		5,189	1,143		
	0,531	0,403		2,524	1,486		5,015	0,966		
	0,521	0,799	4,7	2,654	0,490	4,8	5,121	0,319	1,6	
	0,511	1,195		2,784	0,506		5,184	1,083		
		0,545	0,152		2,824	0,812		5,058	0,444	
		0,561	0,786		2,651	0,513		5,001	1,135	
Metomil	0,541	0,114		2,928	1,702		4,721	1,030		
	0,489	1,855		2,741	0,508		4,669	0,250		
	0,551	0,492	4,9	2,702	0,969	3,0	4,681	0,045	0,9	
	0,538	0,000		2,714	0,828		4,694	0,365		
		0,568	1,136		2,798	0,166		4,705	0,636	
		0,541	0,114		2,821	0,437		4,605	1,826	
Tiametoxam	0,541	0,483		2,801	1,087		4,801	0,501		
	0,550	0,925		2,741	0,235		4,759	1,133		
	0,501	1,481	3,8	2,702	1,095	1,6	4,951	1,754	1,4	
	0,511	0,990		2,768	0,360		4,799	0,531		
		0,536	0,237		2,799	1,043		4,855	0,311	
		0,548	0,826		2,699	1,161		4,841	0,100	

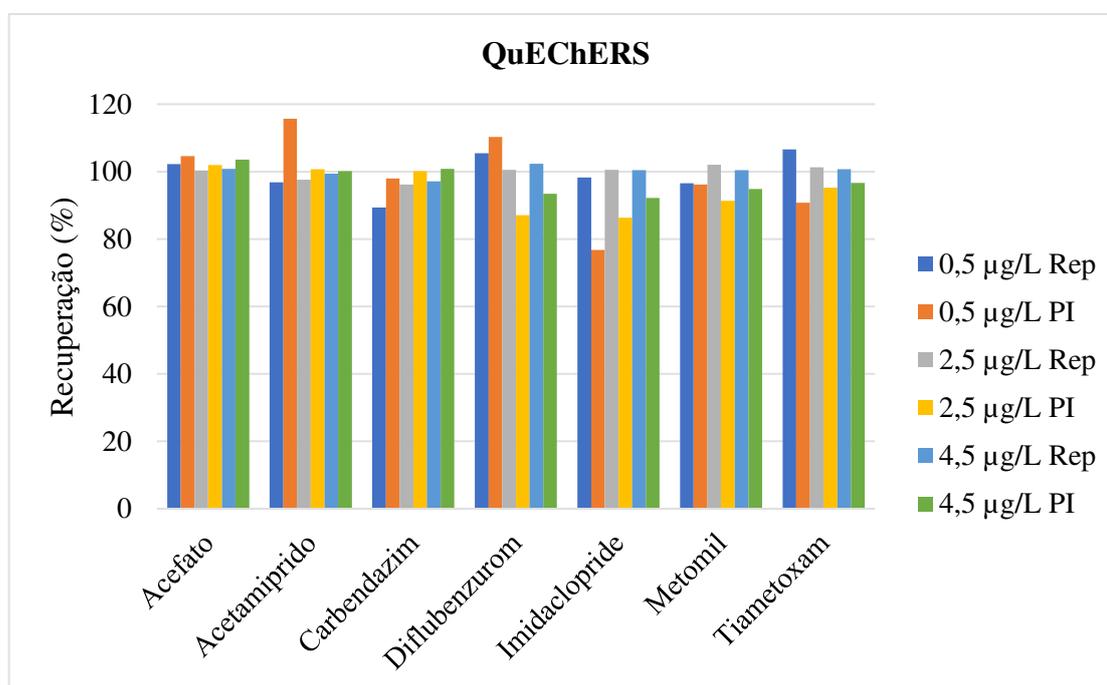
As recuperações dos agrotóxicos no mel fortificado, nos ensaios de repetibilidade e de reprodutibilidade dentro do laboratório, empregando o método de extração QuEChERS, ficaram próximos ao valor adicionado inicialmente, conforme se observam nas Tabelas 23 e 25, sendo o maior RSD encontrado de 13,8 %. Para o método de preparo de amostra LLE-LTP, observa-se que a recuperação do agrotóxico acefato nos ensaios de repetibilidade e de reprodutibilidade em laboratório foi menor que 70 %. Para os demais agrotóxicos, conforme se observam nas Tabelas 24 e 26, os valores de recuperações ficaram próximos aos valores adicionados e apresentaram RSD menores que 4,9 %, portanto, abaixo do limite de 20 % recomendado pelo documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017). Desta forma, ambas as metodologias desenvolvidas podem ser consideradas de boa precisão, tanto em termos de repetibilidade quanto de reprodutibilidade dentro do laboratório.

O teste de Grubbs demonstrou que não houve valores dispersos nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade, ao empregar os métodos QuEChERS e LLE-LTP, uma vez

que os resultados do teste foram sempre menores que 1,887, o qual é o valor de Grubbs para 6 (seis) observações com nível de confiança de 97,5 %.

A Figura 15 apresenta as taxas de recuperação para os resíduos dos agrotóxicos nas amostras de mel de acordo com os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade dentro do laboratório nos níveis de fortificação de 0,5; 2,5 e 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, empregando o método QuEChERS. As recuperações variaram de 76,8 a 115,7 % e os desvios padrão relativos foram menores que 5 %, portanto, dentro dos níveis recomendados pelo documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017), podendo a metodologia ser considerada de boa precisão e boa exatidão. Nota-se que as taxas de recuperação no ensaio de reprodutibilidade dentro do laboratório foram menores quando comparados com as recuperações obtidas no ensaio de repetibilidade para os agrotóxicos tiametoxam, metomil e imidacloprido, indicando uma pequena influência do dia de extração na recuperação desses agrotóxicos.

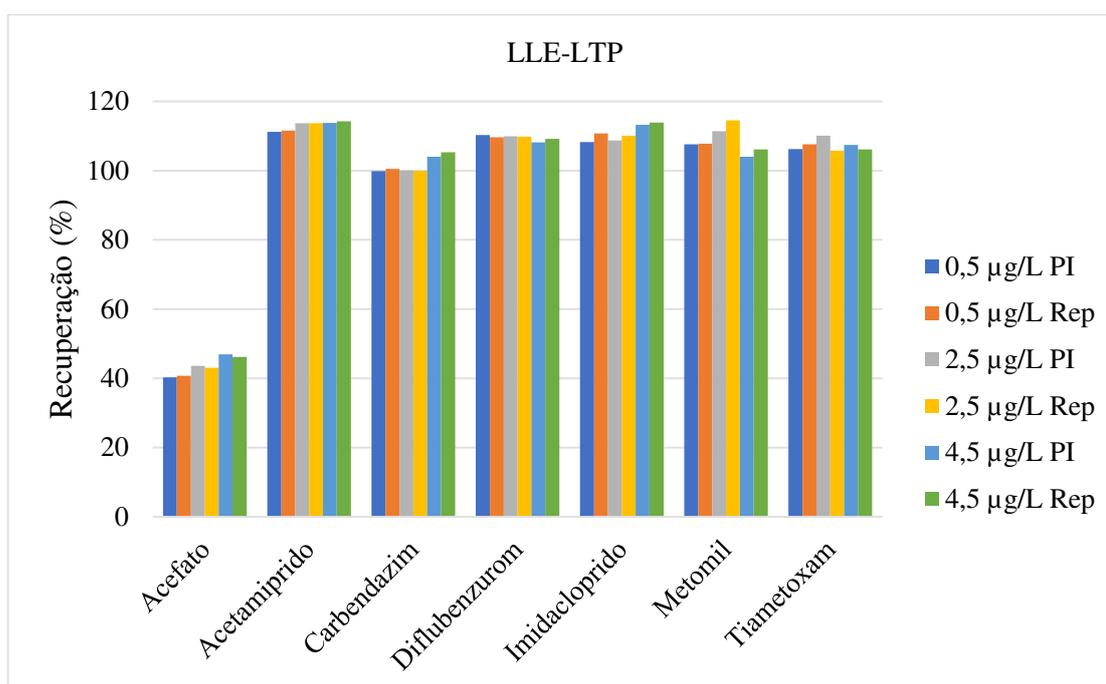
Figura 15. Taxas de recuperação dos agrotóxicos de amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração para os ensaios de repetibilidade (Rep) e reprodutibilidade dentro do laboratório (PI), empregando o método QuEChERS e UHPLC-ESI-MS/MS.



A Figura 16 mostra as taxas de recuperação dos agrotóxicos das amostras de mel obtidas nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade dentro do laboratório nos níveis de fortificação de 0,5; 2,5 e 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, empregando o método LLE-LTP. Para os agrotóxicos acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam as recuperações variaram

de 99,9 a 114,5 % e os valores de RSD foram menores que 7,5 %, portanto, dentro dos níveis recomendados pelo documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017), podendo esta metodologia ser considerada de boa precisão e boa exatidão para esses agrotóxicos. Porém, a recuperação média para o agrotóxico acefato foi de 43,5 %, portanto fora dos critérios de aceitabilidade de exatidão pelo guia de validação da comunidade europeia.

Figura 16. Taxas de recuperação dos agrotóxicos de amostras de mel fortificadas em 3 níveis de concentração para os ensaios de repetibilidade (Rep) e reprodutibilidade dentro do laboratório (PI), empregando o método LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS.



5.3.7 Incerteza

A incerteza da medição descreve o intervalo em torno do resultado experimental, dentro do qual se encontra o valor verdadeiro considerando uma probabilidade definida (nível de confiança). A Tabela 27 apresenta os valores de incerteza relativa calculada para cada agrotóxico, com probabilidade de 95 % de nível de confiança e fator de abrangência (k) 2. Pode-se observar que não houve diferença significativa nos valores de incerteza entre os métodos de extração QuEChERS e LLE-LTP.

Tabela 27. Percentual de incerteza (U) para cada agrotóxico oriundo das metodologias propostas, empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS.

Analito	U (%)	
	QuEChERS	LLE-LTP
Acefato	22,18	22,31
Acetamiprido	28,79	27,59
Carbendazim	25,67	25,31
Diflubenzurom	37,85	37,57
Imidacloprido	21,07	19,93
Metomil	27,98	25,49
Tiametoxam	22,34	21,36

Ao relatar o resultado de uma amostra de mel utilizando as metodologias propostas nesse trabalho a incerteza deverá ser considerada. Por exemplo, ao analisar uma amostra de mel e encontrar o resultado de $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de tiametoxam, o resultado deverá ser expresso considerando a incerteza, ou seja, $0,7 \mu\text{g L}^{-1} \pm 22,34 \%$ ou $0,7 \pm 0,16 \mu\text{g L}^{-1}$. Interpretando este exemplo, o valor verdadeiro da concentração de tiametoxam na amostra de mel, considerando 95 % de nível de confiança e fator de abrangência 2 está contido no intervalo de 0,54 a $0,86 \mu\text{g L}^{-1}$.

O método de extração LLE-LTP apresentou as seguintes características: menor número de etapas experimentais, menor consumo de reagentes e produção de resíduos, baixo custo, fácil execução, porém, alto tempo de preparo devido ao tempo de congelamento necessário para a separação da fase extratora. Já o método de extração QuEChERS apresentou bom tempo de preparo de amostra, altos valores de recuperação para moléculas hidrofílicas, porém, alto consumo de reagentes e produção de resíduos. A Tabela 28 apresenta um resumo dos resultados de validação para as duas metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel.

Tabela 28. Comparativo dos resultados da validação das metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos de amostras de mel, empregando os preparos de amostra QuEChERS e LLE-LTP.

Figuras de mérito	Métodos de preparo de amostra	
	QuEChERS	LLE-LTP
Seletividade	seletivo	seletivo
Linearidade (R^2)	0,9910 – 0,9994	0,9966 – 0,9994
Efeito de matriz	presente	presente
LOD, $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,6 – 1,3	0,9 – 2,0
LOQ, $\mu\text{g kg}^{-1}$	2,0 – 4,0	3,0 – 6,7
Recuperação, %	89,3 – 106,6	41,6 – 117,2
Repetibilidade, % RSD	0,3 – 13,8	0,6 – 7,5
Reprodutibilidade, % RSD	0,4 – 4,6	0,6 – 4,9
Incerteza, %	21,70 – 37,85	19,93 – 37,57

5.4 Aplicação das metodologias para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel de apícolas da região do Triângulo Mineiro, MG

Nove amostras de mel oriundas de 6 cidades da região do Triângulo Mineiro foram analisadas em triplicata seguindo os métodos propostos. Curvas analíticas foram construídas em matriz e uma da amostra de mel foi fortificada na concentração $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos, para verificar a conformidade da curva analítica.

A amostra fortificada apresentou valores de recuperação entre 88,9 e 118,5 % para todos os agrotóxicos, empregando os métodos QuEChERS e LLE-LTP, exceto para o acefato o qual apresentou valor de recuperação de 49,3 %, empregando o método LLE-LTP. As Tabelas 29 e 30 apresentam os resultados das análises das amostras de mel das apícolas do Triângulo Mineiro, submetidas aos métodos QuEChERS e LLE-LTP, respectivamente.

Tabela 29. Resíduos de agrotóxicos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de mel da região do Triângulo Mineiro, MG, empregando o método QuEChERS e UHPLC-ESI-MS/MS.

Compostos	Amostras									LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ^b ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ^c (mg kg^{-1})
	A	B	C	D	E	F	G	H	I			
Acefato	-	-	-	-	-	-	-	<LOQ ^a	<LOQ	4,0	20	20
Acetamiprido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	50	50
Carbendazim	-	-	-	-	-	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	2,0	1000	1000
Diflubenzurom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	50	50
Imidacloprido	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4,5 ± 1,0	14,0 ± 2,9	4,6 ± 1,0	-	-	4,0	50	50
Metomil	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,1 ± 3,7	18,3 ± 5,1	4,0	10	20
Tiametoxam	-	-	-	-	-	<LOQ	-	-	<LOQ	4,0	50	50

^a < LOQ – Menor que o limite de quantificação do método proposto; ^b LMR – limites máximos de resíduos dos agrotóxicos em mel estabelecidos pela legislação europeia; ^c LMR – limites máximos de resíduos dos agrotóxicos em mel estabelecidos pelo MAPA.

Tabela 30. Resíduos de agrotóxicos ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de mel da região do Triângulo Mineiro, MG, empregando o método LLE-LTP e UHPLC-ESI-MS/MS.

Compostos	Amostras									LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ^b ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ^c (mg kg^{-1})	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I				
Acefato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,7	20	20
Acetamiprido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,7	50	50
Carbendazim	-	-	-	-	<LOQ ^a	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,0	1000	1000
Diflubenzurom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,7	50	50
Imidacloprido	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	$12,9 \pm 2,6$	<LOQ	-	-	-	6,7	50	50
Metomil	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	$15,8 \pm 4,0$	$16,2 \pm 4,1$	-	6,7	10	20
Tiametoxam	-	-	-	-	<LOQ	<LOQ	-	-	<LOQ	<LOQ	6,7	50	50

^a < LOQ – Menor que o limite de quantificação do método proposto; ^b LMR – limites máximos de resíduos dos agrotóxicos em mel estabelecidos pela legislação europeia; ^c LMR – limites máximos de resíduos dos agrotóxicos em mel estabelecidos pelo MAPA.

Todos os agrotóxicos identificados nas amostras de mel apresentaram variação razão inferior que $\pm 30\%$, evidenciando que os fragmentos encontrados nas amostras de mel por UHPLC-ESI-MS/MS correspondem aos analitos de interesse.

Observa-se que ao submeter as amostras de mel ao método QuEChERS foram detectados em todas as amostras os resíduos dos agrotóxico metomil e que duas amostras, H e I, oriundas das cidades de Uberlândia e Uberaba, respectivamente, apresentaram resíduos de metomil acima dos limites máximos residuais permitidos pela União Europeia, porém abaixo do estabelecido pela legislação brasileira. Resíduos de imidacloprido foram detectados em 78 % das amostras de mel, sendo que a amostra F apresentou a maior concentração residual, $14,0 \mu\text{g kg}^{-1}$. A amostra F, obtida de colmeia localizada na cidade de Uberaba também apresentou, além do imidacloprido e metomil, resíduos de carbendazim e de tiametoxam. Os compostos acetamiprido e diflubenzurom não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. E o composto acefato foi identificado em 22 % das amostras analisadas.

Ao submeter as amostras de mel ao método LLE-LTP, resultados semelhantes aos obtidos empregando o método QuEChERS foram encontrados. Resíduos do agrotóxico metomil foram detectados em 89 % das amostras de mel, e novamente as amostras, H e I, apresentaram resíduos de metomil acima LMR permitidos pela União Europeia, porém dentro do estabelecido pela legislação brasileira. Resíduos do imidacloprido foram detectados em 78 % das amostras de mel, sendo que a amostra F apresentou a maior concentração residual, $12,9 \mu\text{g kg}^{-1}$. As amostras E e F, também apresentaram, além do imidacloprido e metomil, resíduos de carbendazim e de tiametoxam. Na amostra I foram encontrados além do resíduo de metomil, traços de acefato, carbendazim e tiametoxam. Os compostos acefato, acetamiprido e diflubenzurom não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas pelo método LLE-LTP.

É importante mencionar que o imidacloprido e o metomil são inseticidas comumente empregados nas culturas de milho e soja que estão espalhadas por toda região do Triângulo Mineiro. Portanto, a presença desses dois resíduos na maioria das amostras de mel analisadas é um forte indicativo do uso demasiado dos agrotóxicos nestes cultivos ao longo de toda a região do Triângulo Mineiro. Os outros dois resíduos detectados em uma das amostras analisadas são comumente empregados nas lavouras soja e de cana-de-açúcar, como fungicida (carbendazim) e inseticida (tiametoxam), respectivamente. Os resíduos de agrotóxicos encontrados nas amostras de mel F, H, I, oriundas de colmeias situadas nas cidades de Uberlândia e Uberaba, podem indicar o elevado uso destes agrotóxicos nestas regiões e a conseqüente contaminação de colmeias de abelhas e dos produtos apícolas comercializados na região.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as metodologias propostas utilizando os métodos LLE-LTP e QuEChERS seguido de dSPE com a mistura de sorventes MgSO_4 e C_{18} , apresentam vantagens em relação aos métodos de preparos de amostra tradicionais, além de simples, rápidos e de baixo custo, possuem poucas etapas analíticas, o que contribui para menor valor de incerteza de medição e redução do tempo de execução do método.

O método QuEChERS empregado para a extração dos agrotóxicos acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam em amostras de mel por UHPLC-ESI-MS/MS demonstrou ser eficiente, com recuperações obtidas na faixa de 70 a 120 % e desvio padrão relativo menor que 20 % para todos os agrotóxicos, portanto, estando de acordo com os critérios de validação de metodologia analítica proposta no protocolo de validação de métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos definido pela Comunidade Europeia – documento SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017).

A etapa de *clean-up* pela aplicação da extração em fase sólida dispersiva utilizando os sorventes sulfato de magnésio e C_{18} , conseguiu remover eficientemente interferentes da matriz, dentre estes açúcares, cera, corantes e lipídeos, proporcionando extratos limpos e baixo efeito matriz. O método de extração LLE-LTP mesmo não possuindo etapa de *clean-up* removeu com eficiência os componentes do mel com baixo efeito matriz.

As curvas de calibração preparadas em extrato da matriz apresentaram linearidade entre 0,5 a 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,99, para ambas as metodologias. Os baixos limites de detecção, 0,6 a 1,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o método de extração QuEChERS; e de 0,9 a 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o método de extração LLE-LTP, e os baixos limites de quantificação ficaram abaixo dos limites máximos residuais permitidos para esses agrotóxicos em amostras de mel, de acordo com as legislações nacional e internacional vigentes.

O método LLE-LTP otimizado neste trabalho para extração residual dos agrotóxicos acefato, acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam do mel, demonstrou ser eficiente, robusto, e preciso para todos os agrotóxicos, exceto para o acefato, para o qual o valor de recuperação foi de 43,6 %.

As vantagens do método de extração LLE-LTP otimizado neste trabalho para a extração de resíduos de agrotóxicos em amostra de mel frente ao método de extração QuEChERS seguindo da etapa de *clean up* da extração em fase sólida dispersiva são o menor número de etapas experimentais, menor consumo de reagentes, menor produção de resíduos, baixo custo e fácil execução. Entretanto, o tempo de preparo de amostra no método QuEChERS é menor

quando comparado com o método LLE-LTP, devido ao tempo de congelamento necessário para a separação da fase extratora neste último, além de proporcionar altos valores de recuperação para moléculas hidrofílicas.

Das nove amostras de mel analisadas 78 % apresentaram resíduos do agrotóxico imidacloprido, sendo que a amostra F apresentou a maior concentração residual deste agrotóxico. A maioria das amostras apresentaram traços do agrotóxicos metomil, sendo que as amostras H e I apresentaram altos valores residuais de metomil. Traços do agrotóxico carbendazim foram encontrados em 55 % das amostras. Em 33 % das amostras de mel foram encontrados traços de tiametoxam, e 22 % apresentaram traços do agrotóxico acefato. Os agrotóxicos acetamiprido e diflubenzurom não foram encontrados nas amostras de mel analisadas.

Logo, conclui-se que os métodos de extração otimizados neste trabalho, QuEChERS e LLE-LTP seguidos da análise por UHPLC-ESI-MS/MS são adequados para a determinação dos resíduos dos agrotóxicos acefato (exceto para o método LLE-LTP), acetamiprido, carbendazim, diflubenzurom, imidacloprido, metomil e tiametoxam em amostras de mel, podendo ser empregado para análises de rotinas, pois os parâmetros analíticos de validação da metodologia proposta encontram-se dentro dos limites exigidos nos principais protocolos recomendados pelas agências internacionais e nacionais de regulamentação.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- i) Aplicar a metodologia de preparo de amostra LLE-LTP seguida da análise por UHPLC-MS/MS otimizada neste trabalho para a detecção e quantificação de contaminantes em outros produtos apícolas;
- ii) Realizar o monitoramento das amostras analisadas;
- iii) Realizar o monitoramento da região do Triângulo Mineiro realizando análise de outras amostras de mel;
- iv) Identificar e quantificar outros possíveis contaminantes em produtos apícolas.

8 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDO DAS ABELHAS. Conheça 12 tipos de mel ideais para o seu dia a dia. *In*: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDO DAS ABELHAS. **A.B.E.L.H.A.** Disponível em: <http://abelha.org.br/conheca-12-tipos-de-mel-ideais-para-o-seu-dia-dia/>. Acesso em: 10 mar. 2019.

ABAD, F. C. **Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Cenouras Utilizando Extração com Líquido Pressurizado e Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/8605>. Acesso em: 02 abr. 2018.

ABDULRA'UF, L. B.; TAN, G. H. Review of SBSE Technique for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. **Chromatographia**, v. 77, n. 1-2, p. 15-24, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2566-8>.

AHMAD, W.; AL-SIBA'AI, A. A.; BASHAMMAKH, A. S.; ALWAEEL, H.; EL-SHAHAWI, M. S. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 72, p. 181-192, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.022>.

ALVES, A. C. H.; GONÇALVES, M. M. P. B.; BERNARDO, M. M. S.; MENDES, B. S. Validated dispersive liquid-liquid microextraction for analysis of organophosphorous pesticides in water. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 1326-1332, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201100111>.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.

ANDRZEJEWSKI, D.; ROACH, J. A. G.; GAY, M. L.; MUSSER, S. M. Analysis of Coffee for the Presence of Acrylamide by LC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1996–2002, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0349634>.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>. Acesso em: 12 set. 2018.

BARATTO, A. C.; DAMASCENO, J. C.; ALVES, J. A. P.; TROTA FILHO, J.; COUTO, P. R. G.; OLIVEIRA, S. P. **Avaliação de dados de medição — Guia para a expressão de incerteza de medição**. 1ª ed., INMETRO: JCGM, 2008. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/noticias/conteudo/iso_gum_versao_site.pdf.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.

BLASCO, C.; VAZQUEZ-ROIG, P.; ONGHENA, M.; MASIA, A.; PICÓ, Y. Analysis of

insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p. 4892-4901, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.045>.

BOVI, T. S. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.** 2013. vii, 55 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/104999>. Acesso em: 10 out. 2019.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012. Disponível em: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf. Acesso em: 03 out. 2019.

BRASIL, **Instrução Normativa nº 3 de 16 de janeiro de 1992** que ratificou os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins. 1992. Disponível em: http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1/1992/prt0003_16_01_1992.html. Acesso em: 25 fev. 2020.

BRASIL, **Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000** que aprovou o regulamento técnico de Identidade e Qualidade do Mel. 2000. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>. Acesso em: 10 ago. 2018.

BRASIL, **Instrução Normativa nº 20 de 26 de julho de 2018** que provou o plano de amostragem e limites de referência para o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal - PNCRC de 2018 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/PlanoAmostragemPNCRC2018INPortugus.pdf>. Acesso em 05 jan. 2019.

BRASIL. **Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002** que regulamenta a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 4 abr. 2018.

BURLANDO, B.; CORNARA, L. Honey in dermatology and skin care: a review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 306-313, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jocd.12058>.

CABRERA, L. C.; MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de resíduos e contaminantes em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227-240, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.013>.

CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMÓ, E.; PICÓ, Y. Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. **MethodsX**, v. 3, n. 2015, p. 452–458, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.05.005>

CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; BARNES, M.; CERQUEIRA, R.; SOARES, B. M.; PRIMEL, E. G. Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 3, p. 190-

213, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2014.004>.

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 1-5, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000100002>.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; MORENO-CORDERO, B.; PÉREZ-PAVÓN, J. .; GARCÍA-PINTO, C.; FERNÁNDEZ LAESPADA, E. Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 251-265, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00837-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00837-2).

CARBONARI, C. **Desafio 2050**. Disponível em: [http://desafio2050.org/arquivos/pdf/Eficiencia no uso da Terra e Insumos-Caio Carbonari.pdf](http://desafio2050.org/arquivos/pdf/Eficiencia%20no%20uso%20da%20Terra%20e%20Insumos-Caio%20Carbonari.pdf). Acesso em: 4 abr. 2018.

CARNEIRO, R. P.; OLIVEIRA, F. A. S.; MADUREIRA, F. D.; SILVA, G.; DE SOUZA, W. R.; LOPES, R. P. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 413-423, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.027>.

CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1814-1819, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700037>.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000300030>.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. **Fundamentos de cromatografia**. 4ª ed. Campinas: Unicamp, 2006.

COSTA, F. Agrotóxicos podem ter causado a morte de 480 milhões de abelhas no RS. **Jornal da Universidade**, ed. 225. Agosto de 2019. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/jornal/agrotoxicos-podem-ter-causado-a-morte-de-480-milhoes-de-abelhas-no-rs/>. Acesso em: 02 fev. 2020.

DENG, M.; YU, T.; LUO, H.; ZHU, T.; HUANG, X.; LUO, L. Direct detection of multiple pesticides in honey by neutral desorption-extractive electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 422, p. 111-118, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2017.09.005>.

DIVELY, G. P.; EMBREY, M. S.; KAMEL, A.; HAWTHORNE, D. J.; PETTIS, J. S. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-25, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118748>.

EIRAS, S. D. P.; COSCIONE, A. R.; CUSTODIO, R.; ANDRADE, J. C. Métodos de Otimização em Química. **Revista ChemKeys**, n. 3, p. 1-18, 2000. DOI: <https://doi.org/10.20396/chemkeys.v0i3.9626>.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (ed.). **EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3^a ed., 2012.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Normas gerais sobre o uso de agrotóxicos**. 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/407676/normas-gerais-sobre-o-uso-de-agrotoxicos>. Acesso em: 16 jun. 2015.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cientistas preocupados com a perda de colônias de abelhas**. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/26769725/cientistas-preocupados-com-a-perda-de-colonias-de-abelhas>. Acesso em: 01 fev. 2020.

EPA. US Environmental Protection Agency. **Basic information about pesticide ingredients**. 2019. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticides>. Acesso em: 11 dez. 2019.

EPAGRI, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Nota Técnica **Produtos das abelhas**. Florianópolis: Editora EPAGRI/GMC, 12p, 2015. Disponível em: http://ciram.epagri.sc.gov.br/ciram_arquivos/arquivos/apicultura/acervo/produtos-abelhas.pdf. Acesso em: 03 mar. 2019.

ESCOBAR, A. L. S.; XAVIER, F. B. Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas. **Revista Uningá**, v. 37, n. 1, p. 159-172, 2013. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/1115>. Acesso em: 24 fev. 2020.

FILLION, J.; SAUVÉ, F.; SELWYN, J. Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 3, p. 698-713, 2000.

FREITAS, S. S.; SERAFIM, F. A. T.; LANÇAS, F. M. Determination of target pesticide residues in tropical fruits employing matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction followed by high resolution gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 1140-1148, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180041>.

FURLANI, R. P. Z.; MARCILIO, K. M.; LEME, F. M.; TFOUNI, S. A. V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1283-1287, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.074>.

G1. **Abelhas ajudam indústrias de alimentos, beleza e farmacêutica**. 13 de abril de 2018. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/agro-a-industria-riqueza-do-brasil/noticia/abelhas-ajudam-industrias-de-alimentos-beleza-e-farmacaceutica.ghtml>. Acesso em: 03 mar. 2019.

G1. **Brasil é maior produtor de cana-de-açúcar do mundo**. 01 de outubro de 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/agro-a-industria-riqueza-do-brasil/noticia/2019/10/01/brasil-e-o-maior-produtor-de-cana-de-acucar-do-mundo.ghtml>. Acesso em: 10 out. 2019.

GAWEŁ, M.; KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; SEMENIUK, S.; GOLISZEK, M.; BUREK, O.; POSYNIK, A. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide

residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 282, p. 36-47, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.003>.

GONDO, T. T.; OBUSENG, V. C.; MMUALEFE, L. C.; OKATCH, H. Employing solid phase microextraction as extraction tool for pesticide residues in traditional medicinal plants. **Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. 1-11, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2890219>.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320-1323, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.058>.

GRUBBS, F. E. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1080/00401706.1969.10490657>.

GUILLARME, D.; VEUTHEY, J.-L. Theory and practice of UHPLC and UHPLC-MS. In: **Handbook of Advanced Chromatography /mass Spectrometry Techniques**. Elsevier, p. 1-38, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811732-3.00001-7>.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/74#resultado>. Acesso em: 24 fev. 2020

IGLESIAS, A. H. **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas**. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2019.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 14 abr. 2019.

JUHLER, R. K. Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 796, n. 1, p. 145-153, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00690-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00690-0).

KERR, W.E. The history of introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, v. 39, n. 2, p. 3-5, 1967.

KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; SEMENIUK, S.; GAWEŁ, M.; BORZĘCKA, M.; POSYNIK, A. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry-Honeybee poisoning incidents. **Journal of Chromatography A**, v. 1435, p. 100-114, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.045>.

LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 6, p. 1663-1683, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1348-2>.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LI, Y.; KELLEY, R. A.; ANDERSON, T. D.; LYDY, M. J. Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honey bees, pollen, and wax by gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 140, p. 81-87, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.031>.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC - Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 197-207, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.014>.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica - Resíduos e contaminantes em alimentos**. 2015, 51p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/manual-de-garantia-qualidade-analitica.pdf>. Acesso em: 12 set. 2019.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros>. Acesso em: 12 set. 2019.

MARTHE, D. B.; BITTENCOURT, L. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1389-1393, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600030>.

MARTINS, M. S.; MACULAN, L. S.; PANDOLFO, A.; REINEHR, R.; ROJAS, J. W. J.; PANDOLFO, L. M.; KUREK, J. Segurança do trabalho: estudos de casos nas áreas agrícola, ambiental, construção civil, elétrica, saúde. **SGE**, p. 174, 2010. Disponível em: http://www.protecao.com.br/upload/protecao_materiaarquivo/264.pdf. Acesso em: 10 out. 2018.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 35-51, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.004>.

MRZLIKAR, M.; HEATH, D.; HEATH, E.; MARKELJ, J.; BOROVSŠAK, A. K.; PROSEN, H. Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC-MS/MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 104, p. 45-52, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.017>.

ORSO, D. **Determinação de resíduos de agrotóxicos em mel empregando método QuEChERS modificado e GC-ECD**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, Santa Maria, 2011. Disponível em: <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/10490>. Acesso em: 12 mai. 2019.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 266-281, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.16>.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, p. 1307-1311, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.006>.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, É. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 422-442, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4322/sc.2011.004>.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600046>.

PUBCHEM, National Center for Biotechnology Information. 2019. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 10 jun. 2019.

RAFIQUE, N.; NAZIR, S.; AKRAM, S.; AHAD, K.; GOHAR, A.; ABBASI, S. T.; AHMED, I.; RAFIQUE, K. Screening of multiclass pesticide residues in honey by SPE-GC/MSD: a pilot study. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 11, p. 666-676, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7041-4>.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. do R. N.; DE ANDRADE, R. M. B.; DE ALMEIDA, M. V. 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, p. 950-955, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500012>.

ROSA, A. C. P.; MARQUES, M. R. C.; PÉREZ, D. V. Metodologia para Preservação do Fungicida Mancozebe em Amostra de Solo. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1639-1642, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900025>.

RUNDLOF, M.; ANDERSSON, G. K. S.; BOMMARCO, R.; FRIES, I.; HEDERSTROM, V.; HERBERTSSON, L.; JONSSON, O.; KLATT, B. K.; PEDERSEN, T. R.; YOURSTONE, J.; SMITH, H. G. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. **Nature**, v. 521, p. 77-80, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14420>.

SANTE, European Commission. 2017. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed, SANTE/ 11813/2017, implemented by 01/01/2018**. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf. Acesso em: 02 fev. 2019.

SEAPA, Secretaria do Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do**

Agronegócio. 2017. 98p. Disponível em:

http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Publicacoes/projecoes_2017_a_2027.pdf. Acesso em: 10 fev. 2019.

SILVA, J. C. **Apicultura: gerando emprego e renda no município de Salgado de São Félix - PB.** 2014. 29f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Geografia - EAD)- Universidade Estadual da Paraíba, Itabaiana, 2014. Disponível em:

<http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/6905>. Acesso em: 03 nov. 2018.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052-2056, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001000027>.

SONG, S.; ZHANG, C.; CHEN, Z.; HE, F.; WEI, J.; TAN, H. Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC-MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1557, p. 51-61, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.003>.

SOUSA, G. L. **Composição e qualidade de méis de abelhas (*Apis mellifera*) e méis de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*).** 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, São Paulo, 2008. Disponível em:

https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-06092017-121421/publico/Graziela_Leal_Sousa_Mestrado.pdf. Acesso em: 10 fev. 2020.

TETTE, P. A. S. **Métodos analíticos para determinação da qualidade do mel por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.** 2016. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-AN3GWW>. Acesso em: 10 fev. 2018.

TETTE, P. A. S.; DA SILVA OLIVEIRA, F. A.; PEREIRA, E. N. C.; SILVA, G.; DE ABREU GLÓRIA, M. B.; FERNANDES, C. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 211, p. 130-139, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.036>.

TOMASINI, D. **Otimização de validação de método de extração (QuEChERS) e de análise (LC-DAD e LC-APCI-MS/MS) para determinação simultânea de agrotóxicos e hidroximetilfurfural em mel.** 2011. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande, 2011. Disponível em:

https://lacom.furg.br/images/stories/debora_tomasini.pdf. Acesso em: 12 mai. 2018.

TOMLIN, C. D. S. **The Pesticide Manual: A World Compendium of Pesticides.** 13^a ed. Reino Unido: BCPC, 2003.

TORRES, L. Efeitos subletais dos pesticidas nos artrópodos auxiliares. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 43-52, 2012. Disponível em:

<http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v35n2/v35n2a04.pdf>. Acesso: 10 jun. 2018.

TOSI, S.; COSTA, C.; VESCO, U.; QUAGLIA, G.; GUIDO, G. A 3-year survey of Italian

honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides.

Science of The Total Environment, v. 615, p. 208-218, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.226>.

UFU. **Dr. Kerr: um paradigma quebrado**. 01 de outubro de 2019. Disponível em:

<http://www.comunica.ufu.br/noticia/2018/09/dr-kerr-um-paradigma-quebrado>. Acesso em: 10 out. 2019.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000400016>.

VARGAS, T. **Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná**. 2006. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação Stricto sensu, Ponta Grossa, 2006. Disponível em:

http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=140886. Acesso em: 05 nov. 2018.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O setor de agroquímicos. **BNDES Setorial**, v. 24, p. 69-96, 2006. Disponível em:

https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/4643/1/BS%2024%20O%20Setor%20de%20Agroqu%c3%admicos_P.pdf. Acesso em: 12 jan. 2018.

WIEST, L.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; FRATTA, C.; AMIC, S.; LAMBERT, O.; POULIQUEN, H.; ARNAUDGUILHEM, C. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 34, p. 5743-5756, 2011. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.079>.

ZHAO, E.; ZHAO, W.; HAN, L.; JIANG, S.; ZHOU, Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, n. 1, p. 137-140, 2007. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.069>.

ZHENG, W.; PARK, J.; EL-ATY, A. M. A.; KIM, S.; CHO, S.; CHOI, J.; YI, H.; CHO, S.; RAMADAN, A.; JEONG, J. H.; SHIM, J.; SHIN, H. Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly. **Journal of Chromatography B**, v. 1072, n. 1, p. 60-69, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.011>.