



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE FIPRONIL E IMIDACLOPRIDO EM
MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA E
LÍQUIDA**

Nancy Rodrigues da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

Brasília – DF

2014

NANCY RODRIGUES DA COSTA

**DETERMINAÇÃO DE FIPRONIL E IMIDACLOPRIDO EM MEL UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA GASOSA E LÍQUIDA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

Brasília – DF

2014

*Dedico este estudo primeiramente a minha mãe,
que sempre me apoiou e me deu todos os
recursos necessários a minha formação, a meu
pai, a meu noivo e melhor amigo e a todos os
amigos que se fazem essenciais no meu dia a dia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe, por ser mais que uma mãe, sempre minha amiga, companheira, conselheira e porto seguro.

A minha mãe Nelcilurdes e meu pai Divino, por sempre acreditarem na minha capacidade, por me dar motivação para estudar, por me darem carinho e atenção nos momentos que eu mais precisava, e a meu irmão Gui, por ser tão carinhoso e atencioso.

Ao meu futuro esposo e eterno companheiro Tony, com quem eu posso contar sempre, por ser sempre o melhor que pode ser, por me dar todo o amor que eu preciso para continuar. Por me ouvir, me dar conselhos e me ajudar, seja no que for, até mesmo quando foge um pouco dos seus conhecimentos.

Aos meus AQQUAmiguinhos Carlinha, Gabi, Rosy, Lorena, Tati, Joyce, Normara, Marina, Lilian, Raphael Seiti, Rafael, Eve, João, Artur, Gabriel, Daniel, Douglas, Ju, Angélica, Gustavo e Ângela, que acompanharam cada etapa do meu trabalho, que me ajudaram, tiraram dúvidas e colaboraram imensamente com o meu mestrado. Em especial, a Carlinha, Gabi e Rosy, por serem mais que amigas de trabalho, por me aconselharem e por estarem ao meu lado sempre que eu precisei.

À Profa Dra Fernanda, por ser mais que uma simples orientadora, por ser amiga, sempre compreensiva, e por me motivar quando eu estava desanimada.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem compartilhar seus conhecimentos e contribuir para o aperfeiçoamento do meu trabalho.

Aos professores do AQQUA Fernanda, Fernando, Jez, Valéria, Ana Cristi e Alexandre, por estarem sempre disponíveis a tirar dúvidas e por fazerem do laboratório um excelente local de trabalho.

Aos amigos Artur e Arilson da Central Analítica do Instituto de Química, por me ajudarem com os problemas de infraestrutura e por estarem sempre disponíveis a tirar dúvidas. Em especial ao Arilson, por solucionar todos os meus problemas técnicos de cromatografia.

Ao CNPq e ao INCTAA pelo auxílio financeiro prestado.

À UnB, ao Instituto de Química e ao PPGQ pela experiência.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

COSTA, N. R. *Determinação de fipronil e imidacloprido em mel utilizando cromatografia gasosa e líquida*. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, **2014**.

Nos últimos anos tem se observado um aumento significativo na mortalidade das abelhas, sendo um dos fatores suspeitos de causa o uso intensivo de agrotóxicos, entre eles o fipronil e o imidacloprido, amplamente utilizados no Brasil e no mundo. Com o objetivo de subsidiar pesquisas que buscam relacionar o aumento da mortalidade das abelhas com a presença de agrotóxicos em produtos apícolas, foi desenvolvido um método de determinação de fipronil e imidacloprido em mel, por Cromatografia Gasosa com Detector por Captura de Elétron (GC-ECD) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector com Arranjo de Diodos (HPLC-DAD), respectivamente. A extração foi realizada com cartuchos SPE C18 e metanol. O método para determinação de fipronil e seus produtos de degradação envolveu calibração em extrato da matriz branca fortificada e padronização interna, resultando em bons coeficientes de correlação, todos maiores que 0,99, recuperações de 59 a 99 %, limite de detecção e de quantificação de até 0,014 e 0,072 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e precisão com coeficientes de variação de até 6 %. Já o método para determinação de imidacloprido envolveu calibração externa em metanol, obtendo bons coeficientes de correlação, todos maiores que 0,999, recuperações de 72 a 100 %, limite de detecção e de quantificação de 0,03 e 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e precisão com coeficiente de variação de 10 %. Por último foram analisadas 28 amostras comerciais, onde 11 apresentaram resultados acima do limite de quantificação apenas para o fipronil dessulfínil (na faixa de concentração de 0,075 - 0,155 $\mu\text{g g}^{-1}$), o principal produto de degradação do fipronil.

Palavras-chave: Mel, Agrotóxico, Fipronil, Produtos de degradação, Imidacloprido, Cromatografia.

ABSTRACT

Recently, there has been a worldwide problem of increase bee mortality (Colony Collapse Disorder) and the intensive use of pesticides is considered one of the suspected causes. In this work, commercial honey samples were analyzed with respect to fipronil and imidacloprid, using High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector(HPLC -DAD) and Gas Chromatography with Electron Capture Detector (GC -ECD), aiming to present new data to support researches about colony collapse disorder. Honey extraction was performed using C18-SPE and methanol as solvent. The analytical quantification method for fipronil and its degradation products was reformed by matrix matched standards, internal standard calibration which resulted in analytical curves presenting correlation coefficients higher than 0.99, recoveries around 59-99 %, detection and quantification limits lower than 0.014 e 0.072 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and relative standard deviations lower than 7 %. The analytical quantification method for imidacloprid used external standard calibration in methanol and resulted in analytical curves presenting correlation coefficients higher than 0.999, recoveries around 72-100 %, detection and quantification limits lower than 0.03 and 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, and relative standard deviation of 10 %. Finally, 28 commercial samples were analyzed and 11 conferred results above quantification limits for dessulfanyl fipronil (in the concentration range from 0,075 - 0,155 $\mu\text{g g}^{-1}$), which consist of the major degradation product of fipronil.

Keywords: Honey, Pesticide, Fipronil, Degradation Products, Imidacloprid, Chromatography.

LISTA DE ABREVIATURAS

AQUA	Laboratório de Automação, Quimiometria e Química Ambiental
CAIQ-UnB	Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coeficientes de Variação
GABA	Ácido gama-aminobutírico, do inglês <i>Gamma-AminoButyric Acid</i>
GC-ECD	Cromatografia Gasosa acoplada a Detector por Captura de Elétrons, do inglês <i>Gas Chromatography Coupled with Electron Capture Detector</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detector</i>
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Ultravioleta, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography Coupled with Ultraviolet Detector</i>
IA	Ingredientes Ativos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC-ESI-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Eletrospray e Espectrômetro de Massas, do inglês <i>Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Source and Mass Spectrometry</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas, do inglês <i>Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry</i>

LD	Limite de Detecção
LD₅₀	Dose Letal para 50 % dos organismos
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês <i>Liquid-liquid Extraction</i>
LQ	Limite de Quantificação
ODS	Octadecilsilano
OPT	Tecnologia de Polímero Otimizado, do inglês <i>Optimized Polymer Technology</i>
PCB	Bifenila Policlorada, do inglês <i>Polychlorinated Biphenyl</i>
PI	Padrão Interno
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O MEL	4
2.1.1. A CONTAMINAÇÃO DO MEL	4
2.2. A PROBLEMÁTICA DAS ABELHAS	5
2.3. AGROTÓXICOS AVALIADOS.....	6
2.3.1. O FIPRONIL.....	7
2.3.2. O IMIDACLOPRIDO.....	10
2.4. A ANÁLISE DO MEL	12
2.5. DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS FIPRONIL E IMIDACLOPRIDO	13
2.5.1. FIPRONIL.....	14
2.5.2. IMIDACLOPRIDO.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. LIMPEZA DAS VIDRARIAS.....	17
3.2. PREPARO DE AMOSTRA	17
3.2.1. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	17
3.2.2. ESCOLHA DO ADSORVENTE	18
3.2.2.1. ADSORVENTE C18.....	19
3.2.2.1.1. CONDICIONAMENTO DOS CARTUCHOS.....	20
3.2.2.1.2. CARGA DOS CARTUCHOS.....	20
3.2.2.1.3. ELUIÇÃO DOS ANALITOS.....	21
3.2.2.2. ADSORVENTE OPT	21
3.2.2.2.1. CONDICIONAMENTO DOS CARTUCHOS.....	22
3.2.2.2.2. CARGA DOS CARTUCHOS.....	22
3.2.2.2.3. ELUIÇÃO DOS ANALITOS.....	22
3.2.2.3. CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS.....	22
3.2.3. ESCOLHA DO SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO	23
3.2.4. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MEL.....	24

3.3. DETERMINAÇÃO DE FIPRONIL EM MEL.....	25
3.3.1. ABERTURA DAS AMPOLAS DO FIPRONIL E DOS SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	25
3.3.2. CONSTRUÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DO FIPRONIL E DOS SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	26
3.3.2.1. CURVA ANALÍTICA EM METANOL	26
3.3.2.2. CURVA ANALÍTICA EM EXTRATO DA MATRIZ BRANCA FORTIFICADA..	27
3.3.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE INSTRUMENTAL.....	27
3.3.4. VALIDAÇÃO.....	29
3.3.4.1. LINEARIDADE	29
3.3.4.2. PRECISÃO	29
3.3.4.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	30
3.3.4.4. TESTES DE RECUPERAÇÃO	31
3.4. DETERMINAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO EM MEL	32
3.4.1. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO IMIDACLOPRIDO	32
3.4.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE INSTRUMENTAL.....	32
3.4.3. VALIDAÇÃO.....	33
3.4.3.1. LINEARIDADE	34
3.4.3.2. PRECISÃO	34
3.4.3.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	34
3.4.3.4. RECUPERAÇÃO	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1. PREPARO DE AMOSTRA	36
4.1.1. ESCOLHA DO ADSORVENTE	36
4.1.2. ESCOLHA DO SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO	37
4.2. DETERMINAÇÃO DE FIPRONIL EM MEL.....	39
4.2.1. PADRÃO INTERNO	40
4.2.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE INSTRUMENTAL.....	41
4.2.2.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	46
4.2.2.1.1. LINEARIDADE	46

4.2.2.1.2. PRECISÃO	47
4.2.2.1.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	49
4.2.2.1.4. RECUPERAÇÃO	49
4.2.3. DETERMINAÇÃO DE FIPRONIL NAS AMOSTRAS DE MEL	50
4.3. DETERMINAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO EM MEL	52
4.3.1. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS	52
4.3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	53
4.3.2.1. LINEARIDADE	53
4.3.2.2. PRECISÃO	55
4.3.2.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	55
4.3.2.4. RECUPERAÇÃO	56
4.3.3. DETERMINAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO NAS AMOSTRAS DE MEL	57
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICES	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do fipronil (Adaptada de Gunasekara & Troung, 2007).	8
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do imidacloprido (adaptada de Fossen, 2006).	10
Tabela 3. Amostras de mel utilizadas para determinação de imidacloprido, fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto.	18
Tabela 4. Concentrações finais de fipronil, imidacloprido, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona nos extratos da amostra fortificada para estudo do cartucho mais adequado ao método de extração.....	19
Tabela 5. Combinações de solventes testadas para otimização da extração de imidacloprido e fipronil de amostras de mel.	23
Tabela 6. Concentrações resultantes dos analitos nos extratos preparados a partir de amostras de mel para a escolha do solvente de extração.....	24
Tabela 7. Concentração das soluções-mãe de fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto e respectivas concentrações resultantes após a diluição.....	26
Tabela 8. Concentração da solução-mãe preparada a partir das e dos padrões utilizados para a construção da curva analítica do fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto.....	27
Tabela 9. Condições cromatográficas do GC-ECD para determinação de fipronil e seus produtos de degradação em amostras de mel.	28
Tabela 10. Concentração final das amostras empregadas no teste de recuperação do método de extração.....	31
Tabela 11. Concentração da solução-mãe preparada e dos padrões utilizados para a construção da curva analítica do imidacloprido.	32
Tabela 12. Condições cromatográficas do HPLC-DAD para determinação de imidacloprido em mel.....	33
Tabela 13. Concentração final das amostras para o teste de recuperação do método de extração.....	35

Tabela 14. Recuperações médias das extrações realizadas com os adsorventes C18 e OPT, obtidas através das curvas analíticas dos padrões em metanol, sem utilização do padrão interno decaclorobifenila.	36
Tabela 15. Índice de polaridade e temperatura de ebulição dos solventes estudados na extração de fipronil e imidacloprido do mel (Adaptado de Tabela de Miscibilidade de Solventes, 2014)	38
Tabela 16. Recuperações médias dos testes para escolha do solvente, em cartucho C18, com calibração em matriz branca fortificada e padrão interno para os analitos fipronil, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona e curva analítica em metanol para o imidacloprido.	38
Tabela 17. Precisão em nível de repetitividade das extrações e injeções para o fipronil dessulfenil, fipronil e fipronil sulfona.	48
Tabela 18. Precisões intermediárias das injeções para o fipronil dessulfenil, fipronil e fipronil sulfona.	48
Tabela 19. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfato e fipronil sulfona.....	49
Tabela 20. Recuperações das extrações de fipronil dessulfenil, fipronil e fipronil sulfona para os níveis de fortificação de 200 µL e de 400 µL.	50
Tabela 21. Resultados das análises realizadas nas amostras de mel para o fipronil e seus produtos de degradação, interpolando-se os valores na curva analítica do analito em extrato de mel.....	51
Tabela 22. Repetitividade das injeções para o imidacloprido.	55
Tabela 23. Precisões intermediárias das injeções para o imidacloprido.	55
Tabela 24. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o imidacloprido.	56
Tabela 25. Recuperações das extrações de imidacloprido para os níveis de fortificação de 150 µL e de 400 µL.....	56
Tabela 26. Resultados das análises realizadas nas amostras de mel para o imidacloprido.	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formas de contaminação das abelhas e do mel. À esquerda a contaminação direta, onde o agrotóxico é aplicado diretamente na colmeia, e à direita a contaminação indireta, onde as abelhas são contaminadas através do contato com plantas, solo, ar e água contaminados.5
- Figura 2.** Fipronil e seus produtos de degradação fipronil sulfeto, fipronil sulfona, fipronil dessulfenil e fipronil amida (Adaptado de Gunasekara & Troung, 2007).....9
- Figura 3.** Produtos de degradação do imidacloprido em água (Adaptado de Fossen, 2006).....11
- Figura 4.** Produtos de degradação do imidacloprido em solo (Adaptado de Fossen, 2006).....12
- Figura 5.** Variação da concentração de fipronil em mel com o tempo de armazenamento (Adaptado de Jiménez e colaboradores, 2008).....14
- Figura 6.** Estrutura química dos inseticidas imidacloprido, acetamiprido, tiacloprido e tiametoxam (Adaptado de Fidente e colaboradores, 2005).....16
- Figura 7.** Aparelhagem utilizada para o condicionamento, carga e lavagem dos cartuchos para extração dos agrotóxicos fipronil e imidacloprido em mel. À direita, uma bomba de vácuo acoplada ao sistema.20
- Figura 8.** *Manifold* utilizado para realizar a eluição dos cartuchos de extração em fase sólida (SPE) para extração dos agrotóxicos fipronil e imidacloprido em mel.21
- Figura 9.** Aparelhagem utilizada para aplicação de fluxo de nitrogênio para concentração dos extratos obtidos a partir de amostra de mel.23
- Figura 10.** GC-ECD, Shimadzu CG-2010, localizado na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (CAIQ-UnB).28
- Figura 11.** HPLC-DAD PerkinElmer localizado na CAIQ-UnB.33

Figura 12. Cromatograma de solução de padrão de fipronil e seus produtos de degradação, onde F é fipronil, FD é fipronil dessulfenil, FSE é fipronil sulfeto e FSO é fipronil sulfona.	39
Figura 13. Estrutura química do triclosan.	40
Figura 14. Curva analítica do fipronil em metanol levando-se em consideração o padrão interno (PI) triclosan.	40
Figura 15. Estrutura química do PCB 209 (decaclorobifenila).	41
Figura 16. Curva analítica do fipronil, fipronil sulfeto, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona em metanol, com decaclorobifenila como padrão interno.	42
Figura 17. Curva analítica utilizando o somatório das intensidades relativas dos analitos fipronil, fipronil sulfona, fipronil sulfeto e fipronil dessulfenil (fipronil total) versus somatório das concentrações, em metanol.	43
Figura 18. Comparação entre as curva analíticas do fipronil em metanol e do fipronil em extrato de mel isento dos ingredientes ativos (Mel 3).	44
Figura 19. <i>Liner</i> do injetor de um GC demonstrando as possíveis adsorções dos analitos quando dissolvidos em solvente puro (A) e quando dissolvidos no extrato da matriz (B) (Pinho e colaboradores, 2009).	45
Figura 20. Curva analítica para fipronil, fipronil sulfeto, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona em matriz branca fortificada.	47
Figura 21. Estudo da faixa linear dinâmica para o método de determinação de imidacloprido em mel.	53
Figura 22. Curva analítica do imidacloprido realizada no HPLC.	54
Figura 23. (a) Cromatograma de uma solução padrão de imidacloprido ($c = 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) em metanol comparado com (b) cromatograma de uma amostra de mel (Mel 10) também em metanol. Abaixo, (c) espectro de absorção do sinal cromatográfico do imidacloprido e (d) espectro de absorção do(s) analito(s) interferente.	57

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com o uso abusivo de agrotóxicos no Brasil não é unicamente devido ao risco de intoxicação a que está sujeita a população, mas também à ameaça que outras espécies sofrem com isso. Nos últimos anos tem-se observado o declínio das abelhas e, conseqüentemente, da polinização em ambientes próximos ao uso de agrotóxicos. Dessa forma, a preocupação com a conservação das abelhas vem aumentando, visto que aproximadamente 75% das espécies de plantas dependem da polinização para existirem, sendo as abelhas consideradas as principais polinizadoras. Sendo assim, o declínio das abelhas pode causar um colapso na economia de muitos países, tanto pela queda na produção de produtos melíferos quanto pela queda na produção agrícola devido à diminuição da taxa de polinização (Freitas & Pinheiro, 2010).

Diante do problema do aumento da mortalidade e dos efeitos subletais causados nas abelhas, torna-se imprescindível que medidas sejam tomadas acerca dessa questão e, para isso, é necessário que se tenha à disposição mais informações sobre a relação entre certos agrotóxicos e a contaminação das abelhas. Com o intuito de se observar essa relação, vários autores têm realizado a determinação de agrotóxicos em mel, o principal produto das abelhas. Dois dos agrotóxicos estudados são o fipronil e o imidacloprido, largamente utilizados no Brasil e no mundo. As pesquisas em relação a esses ingredientes ativos em mel vêm crescendo muito nos últimos anos, mas ainda permanecem com lacunas. Ambas as substâncias possuem produtos de degradação em variadas matrizes ambientais, mas raramente são incluídos nas análises de mel (Gunasekara e Troung, 2007; Fossen, 2006).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método para determinação de fipronil e imidacloprido em mel e a aplicação deste método na análise de amostras comerciais, a fim de fornecer dados com o intuito de subsidiar pesquisas que buscam relacionar o aumento da mortalidade das abelhas com a presença de agrotóxicos no mel, em especial os agrotóxicos estudados. Com estudos mais aprofundados desses agrotóxicos na matriz em questão, em conexão com pesquisas

feitas em outras matrizes como abelhas, pólen, néctar, etc. espera-se obter resultados cada vez mais completos, fornecendo ferramentas suficientes para se tomar decisões acerca do uso e da forma de aplicação desses produtos químicos, a fim de se evitar ao máximo a contaminação das abelhas e de seus produtos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A economia brasileira é fortemente dependente da agricultura, visto que a produção nacional é hegemonicamente baseada em monocultivos para exportação. No Brasil, o uso de agrotóxicos começou a se difundir por volta de 1940 e, graças aos incentivos fiscais e à política de subsídios dados pelo governo ao longo desses anos, o país se tornou, em 2008, o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Entretanto, com a facilidade encontrada para a aquisição desses produtos, os pequenos agricultores e até mesmo os produtores familiares utilizam-nos, muitas vezes de forma indiscriminada e sem respeitar às prescrições técnicas, expondo-se aos riscos inerentes ao uso desses ingredientes ativos (Porto & Soares, 2012).

Os efeitos nocivos que os agrotóxicos apresentam para a população são variados, desde a intoxicação a que estão submetidos os trabalhadores rurais que manipulam diretamente esses produtos, muitas vezes sem qualquer equipamento de proteção, até aqueles efeitos a longo prazo a que estão submetidos os consumidores dos produtos agrícolas. Entre os principais prejudicados pelo uso inadequado desses ingredientes ativos (IA) estão os trabalhadores rurais que frequentemente desrespeitam os prazos de carência, alteram as quantidades utilizadas e as formas de aplicação, e resistem em usar equipamentos de proteção individual (Porto & Soares, 2012).

Os agrotóxicos possuem diversas rotas de degradação no ambiente e podem se dispersar das mais variadas formas, sendo muitas vezes encontrados em compartimentos distintos aos que foram aplicados e na forma de um produto de degradação. Esses produtos químicos podem entrar em contato com a água e o solo por meio da lixiviação e pelo escoamento da água, assim como podem ser transferidos para a atmosfera através da volatilização, da ressuspensão de partículas e principalmente pela dispersão no momento da aplicação aérea (Kurz e colaboradores, 2013). Esse último aspecto é de extrema relevância, pois ao serem aplicados podem atingir áreas muito mais amplas do que o esperado, afetando seres vivos não desejados, como as abelhas, por exemplo.

2.1. O MEL

Na busca por hábitos alimentares cada vez mais saudáveis, as pessoas têm optado por produtos naturais, entre eles o mel, cujas propriedades benéficas são conhecidas desde tempos antigos. O mel é o resultado final da elaboração do néctar retirado das flores pelas abelhas, que passa por transformações químicas dentro do seu corpo e posteriormente por evaporação e ventilação dentro da colmeia. Além da produção de mel, as abelhas são também fundamentais para a polinização das culturas agrícolas e das espécies nativas. Ao sugar o néctar, as abelhas esbarram nas anteras (elemento masculino das flores) e, conseqüentemente, acabam entrando em contato com o pólen, que adere ao seu corpo. Ao visitar uma nova flor, o pólen cai e atinge o estigma (elemento feminino das flores), provocando a sua fecundação (Apacame, 2013).

2.1.1. A CONTAMINAÇÃO DO MEL

A cada dia, as abelhas fazem sucessivas viagens, percorrendo vários quilômetros, recolhendo o néctar, a água e o pólen das flores. Durante esse trajeto, acabam entrando em contato com diversas partículas e microorganismos presentes no ar, no solo ou na água, ficando retidos nos pelos superficiais do seu corpo ou sendo inalados e aderidos ao seu aparelho respiratório. Dessa forma, as abelhas podem também ser utilizadas como bio-indicadores para monitoramento de impacto ambiental causados, por exemplo, por agrotóxicos (Rissato e colaboradores, 2006). Essas partículas, quando levadas pelas abelhas para a colmeia, acabam contaminando o mel, podendo diminuir suas propriedades benéficas e, se presentes em grandes quantidades, podendo apresentar ameaças à saúde humana. Além da contaminação por forrageamento (viagens realizadas pelas abelhas na procura por alimento), os produtos melíferos também podem ser contaminados pela aplicação direta de agrotóxicos no tratamento da colmeia (Kujawski & Namiesnik, 2011), como ilustra a Figura 1, que apresenta formas de contaminação das abelhas e, conseqüentemente, do mel.

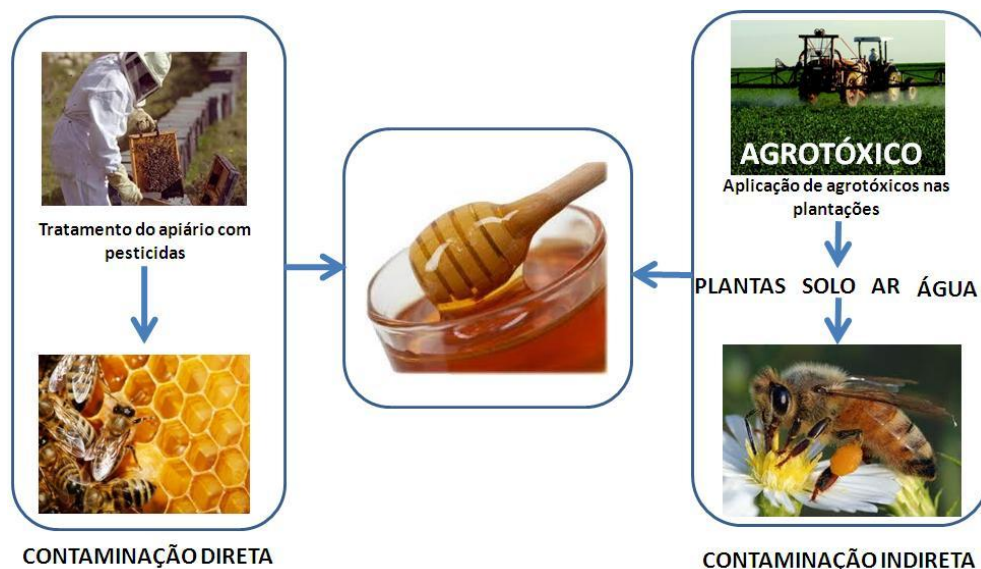


Figura 1. Formas de contaminação das abelhas e do mel. À esquerda a contaminação direta, onde o agrotóxico é aplicado diretamente na colmeia, e à direita a contaminação indireta, onde as abelhas são contaminadas através do contato com plantas, solo, ar e água contaminados.

2.2. A PROBLEMÁTICA DAS ABELHAS

As abelhas são de extrema relevância para a economia brasileira, seja por desempenharem papel fundamental na polinização das culturas agrícolas, seja pela prática da apicultura. Além das abelhas do gênero *Apis*, existe no país uma numerosa variedade de abelhas nativas, responsáveis por grande parte da polinização e reprodução de várias espécies de plantas. Por meio das pesquisas já realizadas, as estimativas são de que no país existem cerca de três mil espécies de abelhas nativas (Carvalho e colaboradores, 2011). Por este motivo, órgãos do poder executivo brasileiro, preocupados em proteger esses organismos, publicaram em 2004 a Resolução CONAMA nº 346 (CONAMA, 2004).

Nos últimos anos, tem sido observado no Brasil e em todo o mundo uma significativa perda de colmeias, fenômeno conhecido como desordem do colapso das colônias. No entanto, a mortalidade de abelhas brasileiras continua a ser um assunto polêmico, em comparação com os países do hemisfério norte, onde já constam vários relatórios que mostram que o desaparecimento de abelhas é associado a doenças

causadas por *Varroa* (um ácaro ectoparasita), *Nosema* (um tipo de fungo microsporídeo), vírus ou agrotóxicos (Carvalho e colaboradores, 2011).

As abelhas possuem um nível de organização muito avançado no trabalho por castas, ou seja, qualquer perturbação que possa alterar de alguma forma a rotina desses insetos pode resultar em consequências negativas para a colônia. Além do aumento da mortalidade facilmente perceptível, os ingredientes ativos causam também efeitos subletais nas abelhas que ainda não são tão amplamente conhecidos (Freitas & Pinheiro, 2010).

Entre os efeitos tóxicos subletais causados pelos agrotóxicos nas abelhas pode-se citar: redução da longevidade, alterações na divisão do trabalho, dificuldades no forrageamento e na comunicação da fonte de alimento a outras abelhas da colônia, decréscimo na produção de progênie, alteração na capacidade da rainha em produzir feromônios que inibem a produção de novas rainhas, irritabilidade, excessiva autolimpeza, abdômen contraído e defeitos morfogênicos como pequeno tamanho do corpo, malformação das asas e deformação das pernas, sendo que todos esses fatores afetam diretamente o desempenho da colônia. Dado que as abelhas são responsáveis pela polinização de aproximadamente 73 % das espécies cultivadas no mundo, é de fundamental importância que métodos mais seguros de defesa da agricultura sejam utilizados (Freitas & Pinheiro, 2010).

2.3. AGROTÓXICOS AVALIADOS

Segundo relatório do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) de 2009, as classes de defensivos agrícolas mais comercializadas no Brasil são os herbicidas, seguidos pelos inseticidas e pelos fungicidas (IBAMA, 2009). Classificado como inseticida, formicida e cupinicida, o fipronil é um pirazol considerado como de última geração, amplamente utilizado no Brasil e no mundo em culturas como batata, cana-de-açúcar, milho, algodão, arroz, eucalipto, soja, cevada, feijão e trigo. Já o imidacloprido, pertencente à classe dos inseticidas, é um neonicotinóide largamente utilizado no mundo para o controle de pragas, sendo

registrado no Brasil para um grande número de culturas, tais como algodão, amendoim, arroz, aveia, cevada, feijão, milho, soja, trigo, abacaxi, abóbora, abobrinha e alface (Freitas & Pinheiro, 2010; Agrofit, 2013). Entretanto, nos últimos anos, esses agrotóxicos vêm sendo banidos em vários países, como França, Alemanha e Itália (Flores-Ramírez e colaboradores, 2012; Casida, 2012), devido à sua toxicidade elevada a outros organismos não-alvo, como aves, mamíferos e abelhas.

2.3.1. O FIPRONIL

O fipronil (5-amino-1-[2,6dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-[(trifluorometil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) é um agrotóxico utilizado no controle de uma grande variedade de insetos como cupim, formiga, insetos de solo, barata, mosquito, gafanhoto, carrapato e pulga. É uma molécula muito ativa, interferindo nos receptores ácido gama-aminobutíricos (também conhecido pela sigla inglesa GABA - Gamma-AminoButyric Acid), rompendo com o influxo das transmissões nervosas, como a passagem de íons cloreto, causando hiperexcitação, paralisia e morte do inseto. Apresenta baixa solubilidade em água, preferindo matrizes orgânicas (ou lipofílicas) e é bastante estável à temperatura ambiente. Apresenta baixa volatilidade, indicando baixas concentrações no ar, mas durante aplicação aérea uma grande quantidade do produto pode sofrer deriva. Apresenta tempos de meia-vida variáveis no solo, dependendo da predominância de processos aeróbicos ou anaeróbicos, e moderada mobilidade no solo (Tabela 1) (Gunasekara & Troung, 2007).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do fipronil (Adaptada de Gunasekara & Troung, 2007).

Solubilidade	Água (pH = 5): 1,9 mg L ⁻¹ Água (pH = 9): 2,4 mg L ⁻¹ Hexano: 28,0 mg L ⁻¹ Tolueno: 3000 mg L ⁻¹
Tempo de meia-vida	Hidrólise: (pH = 5 – 7) > 100 dias; (pH = 12) = 2,4 horas Solo aeróbico: 188 dias Solo anaeróbico: 18,3 – 22,2 dias
LogK_{ow}	3,5
K_{oc}	427-1248
Pressão de Vapor	3,7x10 ⁻⁴ mPa

O fipronil se degrada rapidamente por meio de redução, hidrólise, oxidação e fotólise para quatro metabólitos majoritários que, assim como o fipronil, agem no receptor GABA e são biologicamente ativos. Os quatro produtos de degradação (Figura 2) e os meios mais prováveis de formação são (Gunasekara & Troung, 2007):

- Fipronil sulfeto – principal produto de degradação em solo, resultante da degradação por reações biótica e redução, bem como fotólise em campos com folhagens;
- Fipronil sulfona – resultante da degradação por reações bióticas e oxidação em solo e fotólise em campos com folhagens;
- Fipronil dessulfínil – resultante de fotólise em solo e campos com folhagens;
- Fipronil amida – resultante de degradação por reações bióticas em solo e hidrólise em água.

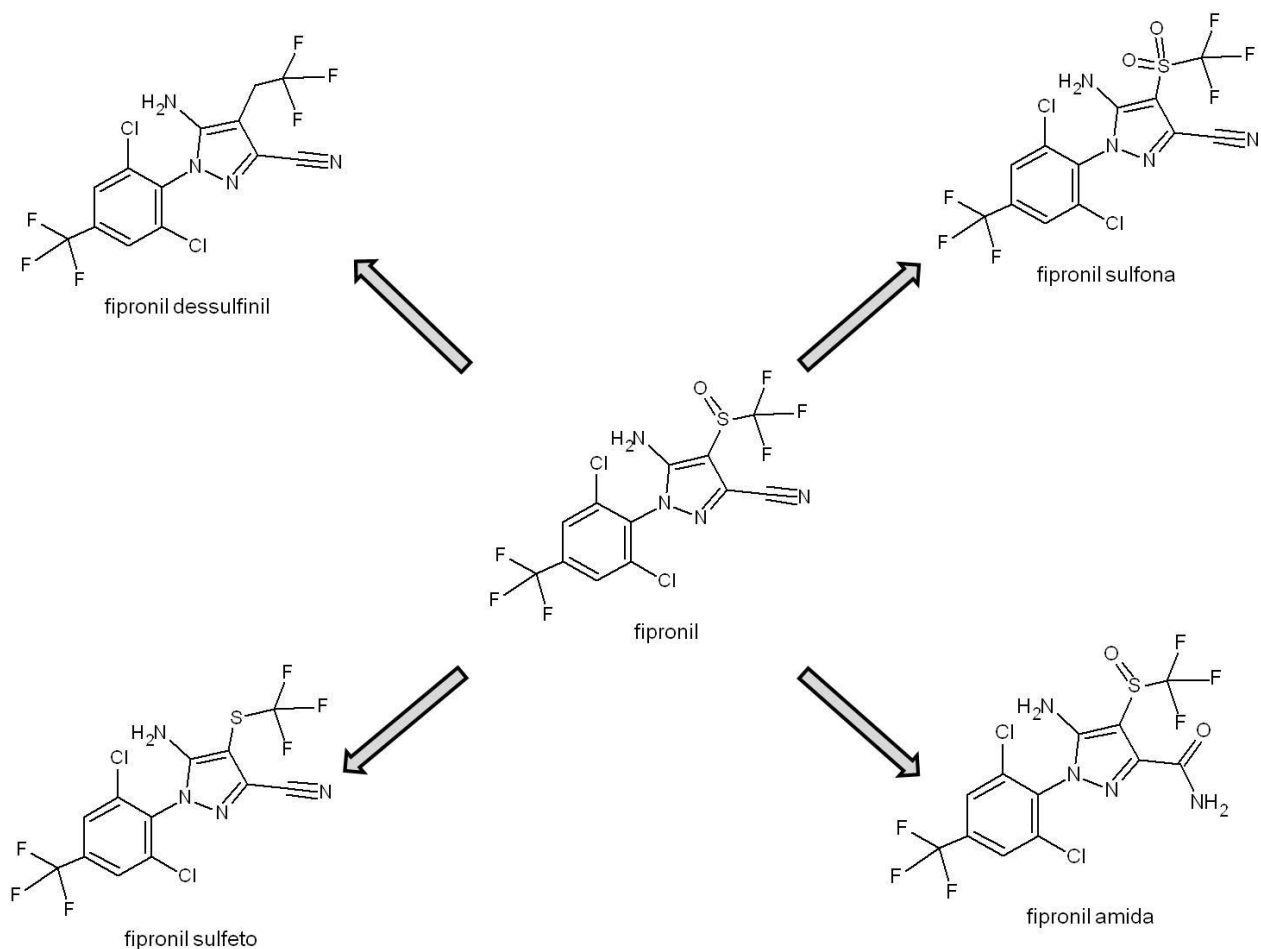


Figura 2. Fipronil e seus produtos de degradação fipronil sulfeto, fipronil sulfona, fipronil dessulfínil e fipronil amida (Adaptado de Gunasekara & Troung, 2007).

O fipronil tem sido muito estudado nos últimos anos devido à sua elevada toxicidade para alguns seres vivos, como aves, organismos aquáticos e insetos. O fipronil tem se apresentado bastante tóxico para uma grande variedade de aves tanto por meio de exposição aguda quanto crônica. Também apresenta elevada toxicidade para organismos aquáticos, podendo ser bioacumulado em alguns. Seus produtos de degradação, mesmo em baixas concentrações, também têm revelado elevada toxicidade. Quanto aos insetos, além da elevada toxicidade aos organismos alvo, o fipronil tem se mostrado bastante tóxico para abelhas, cuja dose letal varia de 4 a 6,2

ng, o que tem despertado a atenção de vários países quanto ao uso deste ingrediente ativo (Gunasekara & Troung, 2007).

2.3.2. O IMIDACLOPRIDO

O imidacloprido (1-[(6-cloro-3-piridinil)metil]-N-nitro-2-imidazolidinimina) é um inseticida cloronicotinóide que mata os insetos via ingestão ou contato, interferindo no sistema nervoso. É amplamente utilizado para controle de vários insetos no tratamento de sementes, do solo e de plantações e até mesmo no controle de pulgas em animais domésticos. A baixa adsorção em matéria orgânica do solo e a elevada solubilidade em água revelam uma alta tendência de sofrer lixiviação e, conseqüentemente, dissipação no ambiente. Já a sua elevada suscetibilidade a sofrer fotodegradação e baixa afinidade por matéria orgânica revela um baixo potencial em sofrer bioacumulação (Fossen, 2006).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do imidacloprido (adaptada de Fossen, 2006).

Solubilidade	Água (pH = 7): 514 mg L ⁻¹
Tempo de meia-vida	Hidrólise: (pH = 7) > 30 dias Meio aeróbico: 997 dias Meio anaeróbico: 27,1 dias
LogK_{ow}	0,57
K_{oc}	132 a 310
Pressão de Vapor	1,33x10 ⁻⁸ mPa

A persistência do ingrediente ativo no ambiente e a formação de seus produtos de degradação, muitos deles tóxicos, depende do meio em que este está inserido, bem como das condições ambientais, tais quais pH, luz, tipo de solo, presença de água, oxigênio, vegetação etc. (Rossi e colaboradores, 2005). Seus principais produtos de degradação em água e em solo são ilustrados na Figura 3 e na Figura 4, respectivamente, e servem como orientação dos possíveis produtos de degradação do

imidacloprido nas demais matrizes ambientais, dependendo de suas características físico-químicas.

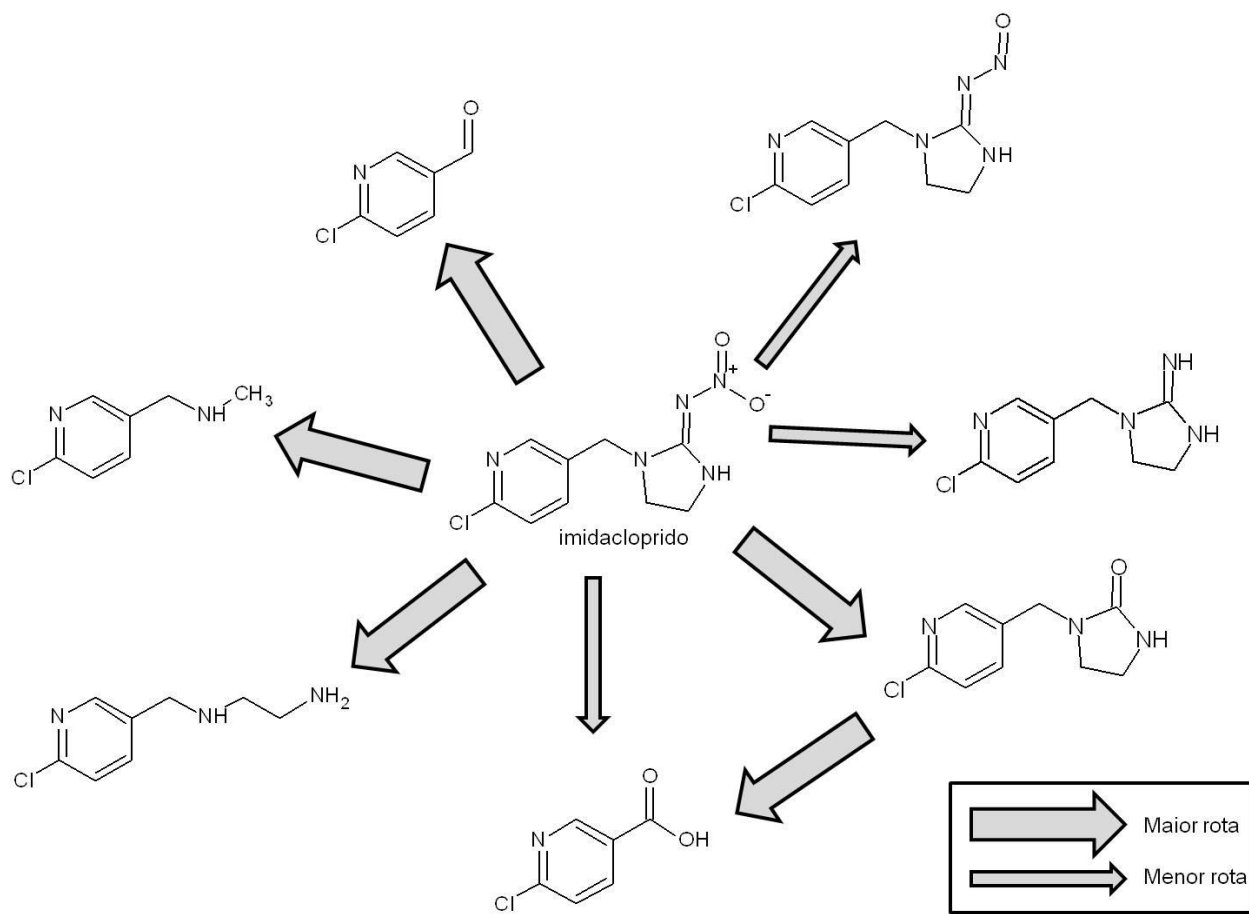


Figura 3. Produtos de degradação do imidacloprido em água (Adaptado de Fossen, 2006).

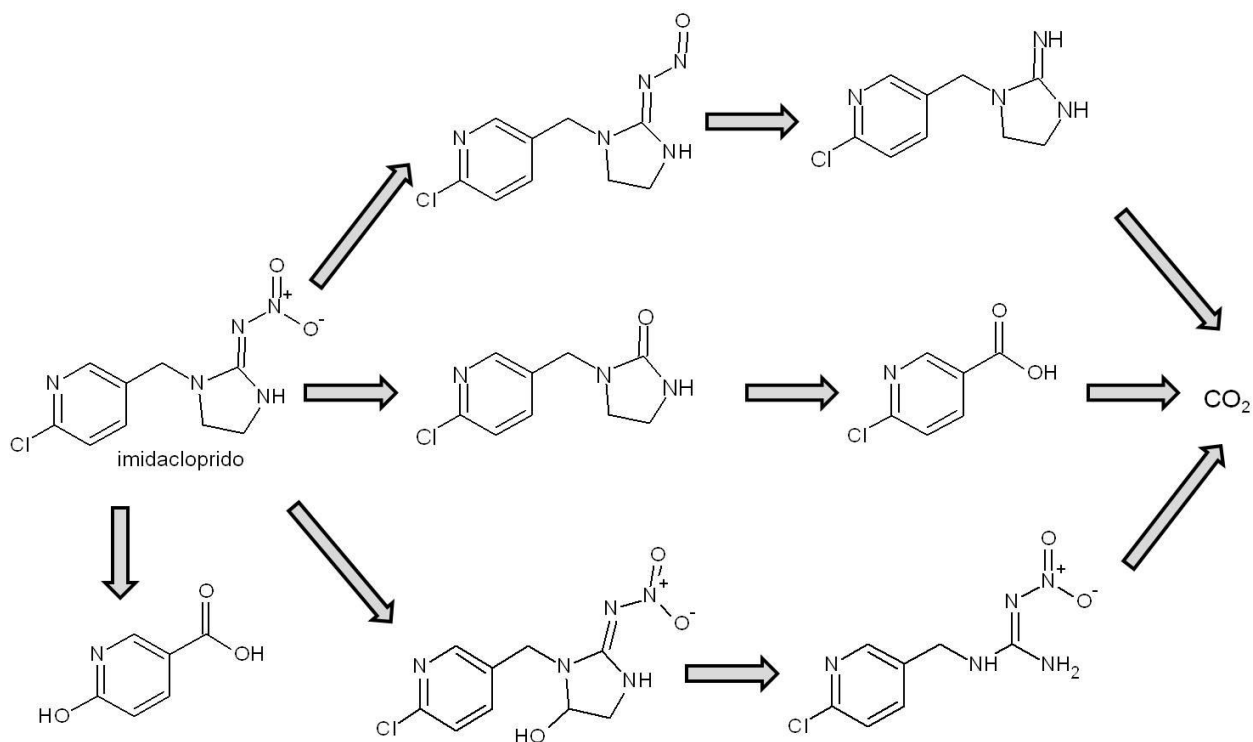


Figura 4. Produtos de degradação do imidacloprido em solo (Adaptado de Fossen, 2006).

Vários estudos vêm sendo conduzidos sobre os efeitos do imidacloprido em insetos, principalmente em abelhas devido aos baixos valores de LD_{50} (dose letal para 50 % das abelhas estudadas), atingindo 8 ng (Fossen, 2006).

2.4. A ANÁLISE DO MEL

O mel é basicamente uma mistura altamente concentrada de açúcares, cuja composição varia de acordo com as espécies de plantas, a raça das abelhas, a composição do solo, seu estado de maturação, condições meteorológicas do campo etc. (Vilhena & Almeida-Muradian, 1999). Dentre os açúcares constituintes do mel, os monossacarídeos representam a grande maioria, variando de 85 a 95 % de sua composição (Marchini e colaboradores, 2005). Além dos açúcares, o mel também é composto por ácidos orgânicos, vitaminas, flavonoides, acetilcolina, minerais, enzimas e muitos outros compostos orgânicos responsáveis por suas características organolépticas (Vilhena & Almeida-Muradian, 1999). Devido a essa complexidade da

matriz, a determinação de traços de agrotóxicos no mel é uma tarefa difícil, requerendo uma etapa de *clean-up* a fim de eliminar possíveis interferentes (Kujawski & Namiesnik, 2011).

O preparo de amostra ideal reduz a interferência de matriz, aumentando a sensibilidade, reduzindo os limites de detecção e quantificação e melhorando a precisão do método. As seguintes etapas são frequentemente necessárias: amostragem e homogeneização, extração, pré-concentração, *clean-up* e concentração final para análise instrumental. Para a etapa de extração, a técnica mais comumente utilizada é a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*) ou a Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês, *Liquid-liquid Extraction*), sendo esta última geralmente seguida por uma etapa de *clean-up* utilizando coluna SPE. Além disso, como os efeitos de matriz são acentuados, é interessante que uma calibração utilizando os extratos da própria matriz seja empregada (Kujawski & Namiesnik, 2011).

2.5. DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS FIPRONIL E IMIDACLOPRIDO

O fipronil, por apresentar grupos eletronegativos (halogênios), normalmente é determinado através da técnica GC-ECD (do inglês, *Gas Chromatography Coupled with Electron Capture Detector*), pois a presença de halogênios causa uma supressão do fluxo de elétrons, levando à formação do sinal instrumental, e GC-MS (do inglês, *Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*) (Kurz e colaboradores, 2013; Gan e colaboradores, 2012; Jiménez e colaboradores 2008; Flores-Ramírez e colaboradores 2012; Sánchez-Brunete e colaboradores 2008). Já o imidacloprido é detectado por radiação ultravioleta com comprimento de onda máximo em 270 nm e, conseqüentemente, a técnica mais comumente empregada é HPLC-DAD (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detector*) (Rossi e colaboradores 2005; Seccia e colaboradores, 2008), mas há também quem o faça utilizando GC-MS, como é o caso de Rossi e colaboradores (2005).

2.5.1. FIPRONIL

Sánchez-Brunete e colaboradores (2008) desenvolveram uma metodologia analítica para determinação de resíduos de Fipronil em mel. Para o preparo da amostra, uma porção de 10 g de mel foi dissolvida em uma mistura de água-metanol (7:3 v/v) e a solução foi fortificada com uma mistura de fipronil e heptacloro (padrão interno). A amostra foi inserida em um cartucho SPE C18 e o analito eluído com 2x5 mL de hexano-acetato de etila (1:1 v/v). O eluato foi então concentrado a 1 mL e analisado por GC-ECD e por GC-MS.

Entretanto, segundo estudos feitos por Jiménez e colaboradores (2008), o fipronil se degrada no mel, e seus produtos de degradação também devem ser levados em consideração na análise. Esses estudos envolveram extrações com SPE e análise por GC-MS de amostras de mel fortificadas com $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Constatou-se que após 52 dias a concentração resultante de fipronil foi de apenas $0,29 \text{ mg kg}^{-1}$, ou seja, a concentração havia decrescido em 41 %, conforme a Figura 5.

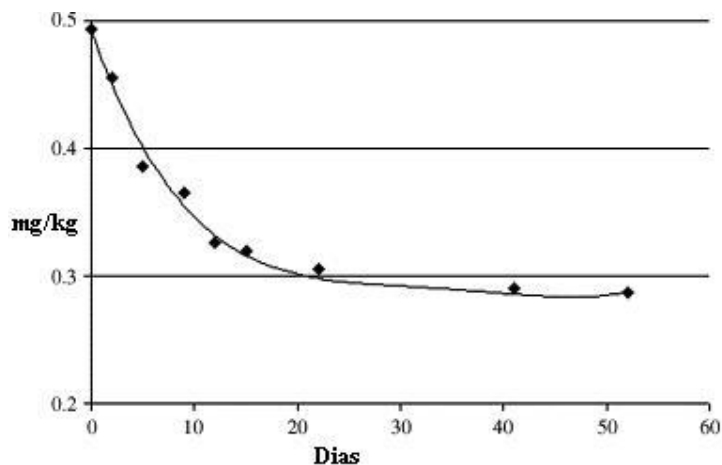


Figura 5. Variação da concentração de fipronil em mel com o tempo de armazenamento (Adaptado de Jiménez e colaboradores, 2008).

Dessa forma, pode-se concluir que determinações de fipronil em mel podem não representar fielmente a contaminação se os produtos de degradação não forem avaliados, visto que se a amostra for armazenada por um longo período de tempo, o

que geralmente ocorre com mel comercial, os analitos encontrados a partir da contaminação com fipronil podem ser o fipronil sulfeto, o fipronil sulfona e o fipronil dessulfínil.

Artigos de determinação simultânea de fipronil e seus produtos de degradação em mel não foram encontrados na literatura, através da busca com as palavras-chave *fipronil; degradation; honey*. Flores-Ramírez e colaboradores (2012) desenvolveram um método analítico para determinação de fipronil e seus produtos de degradação em amostras de solo, o que pode ser considerado como uma referência para o desenvolvimento do respectivo método para análises em mel. Dessa forma, utilizando-se como base estudos feitos em outras matrizes, como em solo, por exemplo, pode-se ter uma orientação para o desenvolvimento de um método para a matriz mel, de forma a determinar fipronil juntamente com seus produtos de degradação e obter resultados mais fidedignos acerca de contaminação de mel com o agrotóxico.

2.5.2. IMIDACLOPRIDO

Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura que determinaram imidacloprido na matriz mel realizaram análises simultâneas com outros agrotóxicos nicotinóides. Fidente e colaboradores (2005) desenvolveram um método para análise de quatro inseticidas nicotinóides em mel, sendo eles imidacloprido, acetamiprido, tiacloprido e tiametoxam (Figura 6). Inicialmente, uma porção de 5 g de mel foi dissolvida em água e fortificada com os agrotóxicos. Em seguida a amostra foi extraída em cartucho SPE (Extrelut-NT 20, Merck), onde o analito foi eluído com 5 x 20 mL de diclorometano. O eluato foi então evaporado completamente e redissolvido em 1 mL de metanol para análise por LC-ESI-MS (do inglês, *Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Source and Mass Spectrometry*).

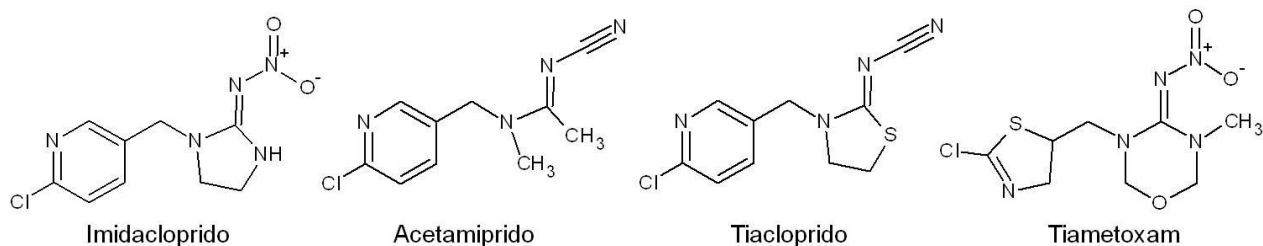


Figura 6. Estrutura química dos inseticidas imidacloprido, acetamiprido, tiacloprido e tiametoxam (Adaptado de Fidente e colaboradores, 2005).

Ding e colaboradores (2011) estudaram os produtos de degradação do imidacloprido em água a temperatura ambiente, aplicando radiação ultravioleta com comprimentos de onda superiores a 280 nm, até que todo ou quase todo o material de partida desaparecesse. O ingrediente ativo, juntamente com os seus produtos de fotólise, foram detectados por LC-MS (do inglês, *Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*).

A formação dos produtos de degradação do imidacloprido depende da matriz e das condições ambientais, como o pH, luz, tipo de solo, presença ou ausência de água, presença de vegetação, etc. Rossi e colaboradores (2005), ao determinarem a presença de imidacloprido em abelhas, pólen, mel, grama e flores, avaliaram a presença do ácido 6-cloronicotínico, descrito como principal produto de degradação. As determinações foram feitas utilizando-se HPLC-UV (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography Coupled with Ultraviolet Detector*) e GC-MS. Os resultados de limites de detecção, de quantificação e as recuperações analíticas para o método usando HPLC foram maiores que para o CG-MS, visto que nesse método utiliza-se radiação ultravioleta, que também é responsável pela degradação parcial do imidacloprido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento do método analítico foi realizado com base em diversos artigos que tratam dos mesmos analitos, mas, devido à escassez de dados bibliográficos, na maioria das vezes em matrizes diferentes, como leite, solo e água. Além disso, o desenvolvimento de um método para análise simultânea de dois analitos distintos como o fipronil e o imidacloprido apresenta algumas dificuldades, como o método de detecção comum a ambos e a escolha do solvente e do cartucho adequado para extração representativa dos dois analitos. Dessa forma, a escolha dos parâmetros tais como o solvente a ser utilizado na extração, a composição da fase móvel na cromatografia líquida, o solvente em que está inserido o analito, entre outros, requereu várias tentativas, até a definição do método final otimizado.

3.1. LIMPEZA DAS VIDRARIAS

Todas as vidrarias foram lavadas com água e sabão e, em seguida, com água destilada por osmose reversa (Osmose Reversa OS10 LX, Gehaka, 2012). As vidrarias não volumétricas foram então deixadas em uma mufla por 4 horas a 350 °C e as vidrarias volumétricas foram enxaguadas com etanol 99,5 %, metanol grau HPLC e hexano grau HPLC, todos por duas vezes. Tal procedimento de limpeza é imprescindível para minimizar a presença de interferentes.

3.2. PREPARO DE AMOSTRA

O preparo de amostra foi realizado em diversas etapas teste, a fim de se obter os melhores parâmetros para a extração simultânea de todos os analitos, sendo eles imidacloprido, fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto.

3.2.1. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de mel escolhidas foram produtos comerciais disponíveis no comércio local, selecionadas de forma a se obter a maior diversidade possível das fontes do mel. Cada uma delas está devidamente identificada na Tabela 3, sendo que a marca foi omitida a fim de se preservar legalmente os dados gerados.

Tabela 3. Amostras de mel utilizadas para determinação de imidacloprido, fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto.

	Marca	Florada Predominante
Mel 1 (Orgânico)	Marca 1	Silvestre
Mel 2 (Orgânico)	Marca 2	*
Mel 3		Silvestre - Cipó
Mel 4		Laranjeira
Mel 5	Marca 3	Silvestre - Carvoeiro
Mel 6		Silvestre – Aroeira
Mel 7		Silvestre - Sabiá
Mel 8 (Orgânico)	Marca 4	Silvestre
Mel 9 (Orgânico)	Marca 5	Eucalipto
Mel 10 (Orgânico)	Marca 6	*
Mel 11 (Orgânico)	Marca 7	*
Mel 12		*
Mel 13 (Orgânico)	Marca 8	*
Mel 14		*
Mel 15		*
Mel 25	Marca 9	*
Mel 16	Marca 10	*
Mel 17	Marca 11	*
Mel 18	Marca 12	*
Mel 19	Marca 13	Laranjeira
Mel 20	Marca 14	Silvestre
Mel 21	Marca 15	Silvestre
Mel 22 (Orgânico)	Marca 16	*
Mel 23	Marca 17	Silvestre
Mel 24 (Orgânico)	Marca 18	*
Mel 26	Marca 19	Silvestre da Serra
Mel 27	Marca 20	Silvestre
Mel 28	Marca 21	Silvestre

*Informação não fornecida pelo fabricante.

3.2.2. ESCOLHA DO ADSORVENTE

A escolha do adsorvente para extração foi feita avaliando dois cartuchos disponíveis no AQQUA (Laboratório de Automação, Quimiometria e Química Ambiental), sendo eles Agilent SampliQ C18 (500 mg / 6 mL) e Agilent SampliQ OPT (60 mg / 3 mL). Para realização do estudo, duas alíquotas da amostra (Mel 2) foram

fortificadas com concentrações diferentes dos ingredientes ativos e extraídas com os cartuchos OPT e C18. O adsorvente escolhido seria, então, o que apresentasse melhores recuperações para o fipronil e para o imidacloprido.

Foram pesados 7 g de mel em um erlenmeyer, o que equivale a aproximadamente 5 mL. Em seguida, completou-se o volume para 35 mL com água destilada e homogeneizou-se a solução (branco). O mesmo procedimento foi repetido para 7 g da mesma amostra de mel, desta vez adicionando 50 µL de cada solução dos padrões de fipronil e seus metabólitos e 100 µL da solução de imidacloprido (*spike* baixo). Em uma terceira amostra foram adicionados 150 µL de cada solução dos padrões de fipronil e seus metabólitos e 300 µL da solução de imidacloprido (*spike* alto). Devido a baixa disponibilidade dos cartuchos, este estudo foi desenvolvido com uma única replicata do branco e 3 replicatas dos *spikes* baixo e alto. As concentrações das soluções dos padrões e as concentrações dos agrotóxicos esperadas nos extratos são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações finais de fipronil, imidacloprido, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona nos extratos da amostra fortificada para estudo do cartucho mais adequado ao método de extração.

Analito	Sol. estoque (µg mL ⁻¹)	Volume Adicionado (µL)		Concentração esperada na solução final (µg g ⁻¹)	
		Fortificação 1	Fortificação 2	Fortificação 1	Fortificação 2
Fipronil	11,5	50	150	0,082	0,246
Fipronil Dessulfenil	12,0	50	150	0,086	0,257
Fipronil Sulfona	11,8	50	150	0,084	0,253
Imidacloprido	8,0	100	300	0,114	0,343

Obs: A solução padrão de fipronil sulfeto disponível era unicamente qualitativa.

3.2.2.1. ADSORVENTE C18

Os cartuchos de extração em fase sólida da marca Agilent SampliQ C18 são constituídos por um adsorvente de fase reversa, octadecilsilano (ODS ou C18), podendo ser utilizados para separar compostos levemente ácidos, básicos e neutros de

matrizes complexas. Esse adsorvente apolar forma ligações com compostos hidrofóbicos, além de interações polares associadas à superfície dos grupos silanóis. Dessa forma, esse adsorvente é aplicável tanto para analitos polares quanto apolares, permitindo aplicações nas áreas farmacêuticas, ambientais e forenses.

3.2.2.1.1. CONDICIONAMENTO DOS CARTUCHOS

O condicionamento dos cartuchos foi realizado com base no procedimento padrão da Agilent, disponível em sua página eletrônica (Agilent, 2014).

Após conectar os cartuchos à aparelhagem de extração representada na Figura 7, adicionou-se 5 mL de metanol, aplicou-se vácuo e descartou-se o solvente, sem permitir a secagem do adsorvente. Em seguida, o procedimento foi repetido com 5 mL de água destilada MilliQ (Millipore).

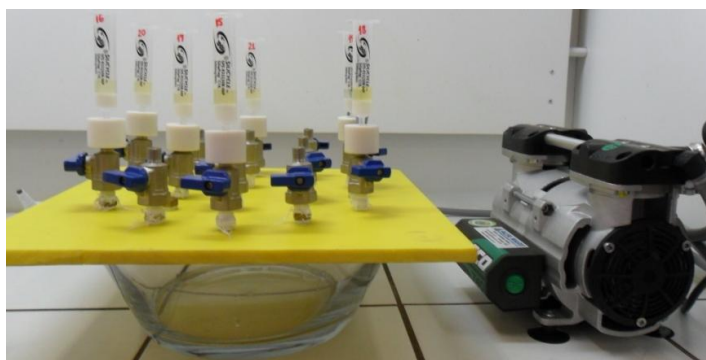


Figura 7. Aparelhagem utilizada para o condicionamento, carga e lavagem dos cartuchos para extração dos agrotóxicos fipronil e imidacloprido em mel. À direita, uma bomba de vácuo acoplada ao sistema.

3.2.2.1.2. CARGA DOS CARTUCHOS

Os cartuchos C18 foram carregados, sob vácuo, com 5 mL da solução do mel preparada de acordo com o item 0., descartando o resíduo da extração. Em seguida os cartuchos foram lavados com 5 mL de água e aguardou-se até a completa secagem destes.

3.2.2.1.3. ELUIÇÃO DOS ANALITOS

Para eluição dos analitos de interesse, os cartuchos foram conectados ao *manifold* ilustrado na Figura 8 e foi aplicado vácuo. Adicionou-se a cada cartucho C18 3 mL de metanol três vezes, visto que este solvente apresentava polaridade adequada, e os eluídos foram coletados em um mesmo *vial*. Em cada passagem do solvente permitiu-se a secagem completa do adsorvente.



Figura 8. *Manifold* utilizado para realizar a eluição dos cartuchos de extração em fase sólida (SPE) para extração dos agrotóxicos fipronil e imidacloprido em mel.

3.2.2.2. ADSORVENTE OPT

O adsorvente do tipo OPT (do inglês *Optimized Polymer Technology*), pode ser utilizado para compostos com uma ampla faixa de polaridade, pKas e solubilidades, sendo proposto para isolar tanto compostos neutros quanto básicos. A fase estacionária é constituída por uma resina inerte a uma grande variedade de solventes, estável na faixa de pH de 0 a 14 e aplicável a soluções aquosas. Essa resina exhibe retenção tanto para compostos polares quanto apolares, graças à propriedade de balanço hidrofílico/lipofílico. O comportamento é de fase reversa, que possibilita a análise dos extratos tanto por meio de técnicas de cromatografia líquida quanto gasosa.

3.2.2.2.1. CONDICIONAMENTO DOS CARTUCHOS

O condicionamento dos cartuchos foi realizado com base no procedimento padrão da Agilent, disponível em sua página eletrônica (Agilent, 2014), semelhante ao já descrito no item 3.2.2.1.1, mas com apenas 3 mL de metanol e 3 mL de água.

3.2.2.2.2. CARGA DOS CARTUCHOS

Os cartuchos OPT foram carregados, sob vácuo, com 3 mL da solução do mel preparada de acordo com o item 0, descartando o resíduo da extração. Em seguida os cartuchos foram lavados com 1 mL da mistura água-metanol (95:5) e aguardou-se até a completa secagem do adsorvente.

3.2.2.2.3. ELUIÇÃO DOS ANALITOS

Para a eluição dos analitos de interesse, os cartuchos foram conectados ao *manifold* representado na Figura 8 e foi aplicado vácuo. Adicionou-se a cada cartucho OPT 2 mL de metanol três vezes, visto que este solvente apresentava polaridade adequada, e os eluídos foram coletados em um mesmo *vial*. Em cada passagem do solvente permitiu-se a secagem completa do adsorvente.

3.2.2.3. CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS

Todos os extratos foram concentrados sob fluxo de nitrogênio a uma temperatura de 40 °C (Concentrador TE-019, Tecnal, Figura 9), até a completa evaporação do solvente. O extrato seco foi ressuscendido com frações de metanol e transferido quantitativamente para *vials* de cromatografia até um volume final de 1 mL. Após esse procedimento, os *vials* foram tampados, envolvidos em papel alumínio e armazenados no congelador até o momento da determinação cromatográfica.



Figura 9. Aparelhagem utilizada para aplicação de fluxo de nitrogênio para concentração dos extratos obtidos a partir de amostra de mel.

3.2.3. ESCOLHA DO SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO

Foi preparada uma solução aquosa de 15 mL contendo 5 g de mel (Mel 1), 400 μ L da solução dos padrões analíticos de fipronil e seus metabólitos com concentração de aproximadamente 2,3 μ g mL⁻¹ e 400 μ L da solução de imidacloprido com concentração de 8 μ g mL⁻¹. Uma alíquota de 1 mL dessa solução foi carregada em 4 cartuchos SPE cujo adsorvente (C18) foi selecionado na etapa de escolha do cartucho (C18 17 % 500 mg / 6 mL, Ultrapure Silica Gels, Silicycle), em duplicata, previamente condicionados de acordo com o item 3.2.2.1.1. Os cartuchos foram lavados com 5 mL de água destilada e eluídos com as combinações de solvente descritas na Tabela 5. As concentrações finais resultantes nos extratos estão representadas na Tabela 6.

Tabela 5. Combinações de solventes testadas para otimização da extração de imidacloprido e fipronil de amostras de mel.

Cartucho 1	3 x 3 mL de metanol
Cartucho 2	3 x 3 mL de isopropanol
Cartucho 3	2 x 3 mL de metanol + 3 mL de isopropanol
Cartucho 4	3 x 3 mL de mistura isopropanol-hexano (1:1 v/v)

Obs.: O adsorvente secava completamente entre cada adição de solvente.

Tabela 6. Concentrações resultantes dos analitos nos extratos preparados a partir de amostras de mel para a escolha do solvente de extração.

Analito	Solução estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume Adicionado (μL)	Concentração na solução final ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Fipronil	2,30	400	0,184
Fipronil Dessulfenil	2,40	400	0,192
Fipronil Sulfona	2,36	400	0,1888
Imidacloprido	8,00	400	0,64

Os eluídos foram secos sob fluxo de nitrogênio, a temperatura de 40 °C, até a completa evaporação do solvente. Os analitos foram ressuspensos em metanol e transferidos quantitativamente para *vials* de cromatografia, com 0,032 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de decaclorobifenila (padrão interno), até que completasse 1 mL de solução. Cada *vial* foi tampado, envolvido em papel alumínio e armazenado no congelador, até o momento da determinação cromatográfica.

3.2.4. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MEL

Aproximadamente 1 g de cada amostra de mel foi pesada em tubos de ensaio utilizando-se uma balança analítica com precisão de quatro casas decimais. Em seguida, cada amostra foi diluída em água até o volume de 3 mL (em um tubo de ensaio previamente calibrado) e a solução foi homogeneizada sob agitação. O condicionamento dos cartuchos SPE (C18 17 % 500 mg / 6 mL, Ultrapure Silica Gels, Silicycle) foi realizado de acordo com o Item 3.2.2.1.1. Os cartuchos foram carregados com 1 mL da solução da amostra e lavados com 5 mL de água destilada. Essas etapas foram realizadas permitindo-se a completa secagem do adsorvente.

Com base nos estudos anteriores, no sistema *manifold*, os extratos foram eluídos com 3 x 3 mL de metanol e coletados em tubos de ensaio. Os eluídos foram secos sob fluxo de nitrogênio, a temperatura de 40 °C, até a completa evaporação do solvente. Os analitos foram ressuspensos em metanol e transferidos quantitativamente para *vials*

de cromatografia, com $0,032 \mu\text{g mL}^{-1}$ de decaclorobifenila (padrão interno), até que completasse 1 mL de solução. Cada *vial* foi tampado, envolvido com papel alumínio e armazenado no congelador, até o momento da determinação cromatográfica.

3.3. DETERMINAÇÃO DE FIPRONIL EM MEL

Para a determinação de fipronil e de seus metabólitos em mel foi necessário realizar várias etapas prévias, tais como o preparo das soluções padrão para trabalho, a extração das amostras fortificadas, a otimização dos parâmetros cromatográficos e a validação do método para, finalmente, se determinar e quantificar os analitos nas amostras comerciais. Essas etapas são descritas mais detalhadamente nas próximas seções.

3.3.1. ABERTURA DAS AMPOLAS DO FIPRONIL E DOS SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

As ampolas, preservadas no congelador, foram abertas na Central Analítica do Instituto de Química, onde o ambiente é refrigerado por ar condicionado, a fim de se minimizar a evaporação do solvente durante o preparo das soluções. O conteúdo de cada ampola foi medido utilizando uma seringa *gas-tight* de vidro de 1 mL e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com metanol (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração das soluções-mãe de fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto e respectivas concentrações resultantes após a diluição.

Analito (marca)	Concentração nas ampolas	Volume contido na ampola (mL)	Concentração final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Fipronil (P-738S AccuStandard)	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol	1,15	11,5
Fipronil Dessulfenil (P-782S-A AccuStandard)	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetona	1,2	12,0
Fipronil Sulfona (P-780S-A AccuStandard)	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetona	1,18	11,8
Fipronil Sulfeto (P-782S-A AccuStandard)	A solução de fipronil sulfeto disponível era unicamente qualitativa.		

Cada solução estoque foi dividida em dois frascos com tampa e armazenadas no congelador. Apenas um dos frascos foi aberto para o preparo das soluções de trabalho.

3.3.2. CONSTRUÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DO FIPRONIL E DOS SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Duas curvas analíticas foram preparadas: uma em solvente puro (metanol, visto que os extratos foram preparados neste solvente) e outra no extrato visando avaliar o efeito de matriz.

3.3.2.1. CURVA ANALÍTICA EM METANOL

Uma única solução-mãe contendo todos os analitos foi preparada a partir das soluções estoque descritas no Item 3.3.1 e, a partir desta, procedeu-se a preparação dos padrões para a curva analítica em metanol grau HPLC. À solução de cada ponto da curva foi adicionado um volume fixo do padrão interno decaclorobifenila (concentração final de 0,032 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As concentrações da solução-mãe e das soluções da curva analítica estão representadas na Tabela 8.

Tabela 8. Concentração da solução-mãe preparada a partir das e dos padrões utilizados para a construção da curva analítica do fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto.

	Soluções ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Concentrações das soluções-padrão utilizadas para construção da curva analítica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Solução estoque	Solução-mãe	PAD1	PAD2	PAD3	PAD4	PAD5	PAD6
Fipronil	11,5	0,230	0,0230	0,0322	0,0414	0,0552	0,0690	0,0828
Fipronil Dessulfenil	12,0	0,240	0,0240	0,0336	0,0432	0,0576	0,0720	0,0864
Fipronil Sulfona	11,8	0,236	0,0236	0,0330	0,0425	0,0566	0,0708	0,0850
Fipronil Sulfeto	11,5	0,230	0,0230	0,0322	0,0414	0,0552	0,0690	0,0828

Obs.: Ao se injetar 1 μL das soluções de fipronil sulfeto, de concentrações desconhecidas, no GC-ECD, obteve-se sinais cromatográficos semelhantes aos do fipronil nas concentrações correspondentes ao preparo. Dessa forma, as concentrações relativas ao fipronil sulfeto foram consideradas iguais as do fipronil a fim de se trabalhar com valores reais de concentração.

3.3.2.2. CURVA ANALÍTICA EM EXTRATO DA MATRIZ BRANCA FORTIFICADA

Com o objetivo de melhorar a linearidade do método e reduzir os efeitos de matriz, uma nova curva analítica foi construída utilizando-se extrato da matriz branca fortificada. Para isso, partindo-se da solução-mãe apresentada na Tabela 8, fortificou-se um extrato previamente analisado e isento dos ingredientes ativos (extrato do Mel 3, extraído conforme o item 3.2.4), sucessivas vezes, originando soluções padrão com as concentrações descritas na tabela, que foram injetadas no GC-ECD a cada fortificação. Esse método foi utilizado juntamente com a padronização interna, onde a concentração de decaclorobifenila foi a já descrita no item 3.3.2.1.

3.3.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE INSTRUMENTAL

O volume de injeção das amostras foi de 1 μL e as injeções foram realizadas manualmente no GC-ECD (Shimadzu GC-2010; Figura 10), com gás de arraste hélio 5.0, gás *make-up* nitrogênio 5.0 e coluna capilar cromatográfica com filme de 5% de

fenil e 95% de metilpolisiloxano Rtx[®]-5 Restek (comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,25 mm e espessura do filme: 0,25 µm). Os demais parâmetros cromatográficos do método estão descritos na Tabela 9.



Figura 10. GC-ECD, Shimadzu CG-2010, localizado na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (CAIQ-UnB).

Tabela 9. Condições cromatográficas do GC-ECD para determinação de fipronil e seus produtos de degradação em amostras de mel.

Injetor	Temperatura (°C)	260
	Modo de Injeção	<i>Splitless</i>
	Tempo de Amostragem (min)	2,0
	Razão de <i>split</i>	1:20
	Gás de arraste	Hélio
	Modo de controle de fluxo	Pressão
	Fluxo na coluna (mL min ⁻¹)	0,92
Coluna	Temperatura (°C)	100
	Programação da Temperatura	100 °C por 1 min; 15 °C min ⁻¹ até 230 °C; 2 °C min ⁻¹ até 256 °C por 2 min; 20 °C min ⁻¹ até 280 °C por 10 min
	Tempo total da corrida cromatográfica (min)	35,87
Detector	Temperatura (°C)	305
	Gás <i>Make-up</i>	Nitrogênio
	Fluxo do gás <i>Make-up</i> (mL min ⁻¹)	20

3.3.4. VALIDAÇÃO

Com a finalidade de se atestar a confiabilidade do método, algumas figuras de mérito foram avaliadas, tais como linearidade, limites de detecção e de quantificação, repetitividade e recuperação, com base em Ribani e colaboradores (2004) e Valderrama e colaboradores (2009).

3.3.4.1. LINEARIDADE

A linearidade do método foi avaliada por meio do coeficiente de correlação (r) da curva analítica. A curva foi gerada a partir de 6 pontos, em triplicata, de concentrações distintas dos analitos em extrato de mel (Mel 3) isento do ingrediente ativo, utilizando a padronização interna, onde o padrão interno foi selecionado com base em tentativas empíricas. A área do sinal de cada analito foi dividida pela área do padrão interno (decaclorobifenila, $c = 0,032 \mu\text{g mL}^{-1}$) gerando-se um gráfico a partir da relação razão das intensidades dos picos *versus* concentração do analito. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação, conforme a RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003 da ANVISA, deve ser $= 0,99$ (ANVISA, 2013).

O tempo de retenção utilizado para a construção da curva analítica do fipronil sulfeto é de 15,3 minutos, do fipronil de 15,6 minutos e do fipronil sulfona 17,5 minutos. O tempo de retenção utilizado para a construção da curva analítica do fipronil dessulfínil foi o somatório das intensidades de dois sinais cromatográficos, com tempo de retenção de 13,3 e 19,6 minutos, visto que ambos os sinais correspondem ao analito em questão, como pode ser observado na Figura 12.

O estudo da faixa linear dinâmica não foi realizado devido à indisponibilidade de novos cartuchos.

3.3.4.2. PRECISÃO

A precisão do método foi avaliada em níveis de repetitividade das extrações e injeções e de precisão intermediária das injeções. Como cada extrato foi injetado em triplicata, utilizou-se a equação abaixo para o cálculo do desvio padrão, conforme

recomendação do Manual da Garantia da Qualidade Analítica do Ministério da Agricultura:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\hat{x}_{ij} - \bar{\hat{x}}_i)^2}{I (J-1)}} \quad (1)$$

Onde s é a precisão, I é o número de amostras e J o número de replicatas.

A precisão relativa foi então avaliada por meio do desvio padrão relativo (RSD), ou coeficiente de variação (CV), em níveis de repetitividade das extrações e das injeções e de precisão intermediária das injeções:

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} 100\% \quad (2)$$

Onde s é a precisão absoluta determinada na Equação 1 e \bar{x} a média dos valores.

Para os ensaios de repetitividade, uma amostra de mel (Mel 3) isenta dos analitos estudados foi fortificada com a concentração intermediária da curva analítica, e seis replicatas da extração dessa amostra foram realizadas, utilizando-se cartuchos SPE (C18 17 % 500 mg / 6 mL, Ultrapure Silica Gels, Silicycle). Esses extratos ($C_{\text{ripironil}} = 0,046 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram então analisados no GC-ECD em triplicata e os desvios padrão relativos para cada analito foram calculados.

Para os ensaios de precisão intermediária das injeções, um dos extratos utilizado nos ensaios de repetitividade foi injetado em triplicata em seis dias diferentes, não necessariamente consecutivos, ao longo de duas semanas e os desvios padrão relativos para cada analito foram calculados.

3.3.4.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) foi determinado utilizando-se o método visual, que consiste em injetar soluções de concentração crescente, até o aparecimento de um sinal analítico visível. O limite de detecção seria então a menor concentração capaz de gerar esse sinal analítico detectável. Para isso, um extrato de mel isento do analito (Mel

3) foi fortificado com uma pequena concentração de fipronil, fipronil sulfeto, fipronil sulfona e fipronil dessulfinil e injetado no GC-ECD. O mesmo extrato foi fortificado outras vezes, aumentando-se a concentração dos analitos, até que fosse gerado um sinal cromatográfico.

O limite de quantificação (LQ) foi considerado a concentração do menor ponto da curva analítica, visto que amostras com concentrações inferiores a esse valor não poderiam ser quantificadas por fugirem da linearidade do método.

3.3.4.4. TESTES DE RECUPERAÇÃO

Inicialmente, 5 g da amostra de mel (Mel 1) foram pesados em três erlenmeyers separados. A um deles, foram adicionados 200 μL da solução de fipronil e de seus produtos de degradação e a outro, foram adicionados 400 μL da mesma solução (Tabela 10). A cada erlenmeyer, previamente calibrado, foi adicionada água MilliQ até o volume de 15 mL. Os cartuchos SPE (C18 17 % 500 mg / 6 mL, Ultrapure Silica Gels, Silicycle) foram condicionados conforme o item 3.2.2.1.1, e a seguir foram carregados com 1 mL da solução da amostra, sendo o branco feito em uma única replicata e cadem nível de fortificação em triplicata. Os cartuchos foram então lavados com 5 mL de água MilliQ, permitindo a completa secagem. Os analitos foram ressuspensos em metanol e transferidos quantitativamente para *vials* de cromatografia, com decaclorobifenila na concentração de $0,032 \mu\text{g mL}^{-1}$, até que completasse 1 mL de solução. Cada *vial* foi tampado, envolvido em papel alumínio e armazenado no congelador, até a determinação cromatográfica.

Tabela 10. Concentração final das amostras empregadas no teste de recuperação do método de extração.

	Solução Estoque ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C. Final 1* ($\mu\text{g g}^{-1}$)	C. Final 2** ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Fipronil	2,30	0,092	0,184
Fipronil Dessulfinil	2,40	0,096	0,192
Fipronil Sulfona	2,36	0,094	0,189

*C. Final 1 = Concentração final obtida com a fortificação de 200 μL .

**C. Final 2 = Concentração final obtida com a fortificação de 400 μL .

3.4. DETERMINAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO EM MEL

Para a determinação de imidacloprido em mel também foram necessárias várias etapas prévias, a maioria já descrita para o fipronil, sendo grande parte delas realizada simultaneamente para ambos os ingredientes ativos.

3.4.1. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO IMIDACLOPRIDO

Uma solução estoque foi preparada pesando-se 8,0 mg de imidacloprido (pureza 99,9 % grau HPLC, Sigma-Aldrich) em uma balança analítica com precisão de quatro casas decimais e dissolvendo-se este sólido em 10 mL de metanol. A partir desta solução, foi preparada uma solução-mãe de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da qual foram preparadas as soluções de trabalho, todas em metanol. As concentrações da solução estoque, da solução-mãe e das soluções de trabalho estão representadas na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração da solução-mãe preparada e dos padrões utilizados para a construção da curva analítica do imidacloprido.

	Concentração das soluções ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Concentrações das soluções padrão utilizadas na construção da curva analítica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	Solução estoque	Solução-mãe	PAD1	PAD2	PAD3	PAD4	PAD5
Imidacloprido	800	4,00	0,04	0,08	0,16	0,32	0,40

3.4.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE INSTRUMENTAL

O volume de injeção das amostras foi de 30 μL e as injeções foram feitas de forma automática em um HPLC-DAD (PerkinElmer; Figura 11). A coluna cromatográfica utilizada foi a Brownlee Analytical C18, 5 μm , 250 x 4,6 mm da marca PerkinElmer. Os parâmetros cromatográficos do método de determinação estão descritos na Tabela 12.



Figura 11. HPLC-DAD PerkinElmer localizado na CAIQ-UnB.

Tabela 12. Condições cromatográficas do HPLC-DAD para determinação de imidacloprido em mel.

Detector	Lâmpada	UV
	Comprimento de onda (nm)	270
Bomba	Modo de eluição	Isocrático
	Tempo da corrida (min)	8,0
	Fase móvel	Água-acetonitrila (70:30 v/v)
	Fluxo (mL min ⁻¹)	1,0
Forno	Temperatura (°C)	25,0
Amostrador	Volume de injeção (µL)	30

3.4.3. VALIDAÇÃO

A fim de se atestar a confiabilidade do método, algumas figuras de mérito foram estudadas, sendo elas linearidade, precisão, limites de detecção e de quantificação e recuperação.

3.4.3.1. LINEARIDADE

A linearidade do método foi avaliada por meio do coeficiente de correlação da curva analítica. A curva foi gerada a partir de 5 pontos de concentrações distintas em metanol, em triplicata e utilizando a padronização externa. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação, conforme a RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003 da ANVISA, deve ser = 0,99 (ANVISA, 2013).

A faixa linear dinâmica do método foi testada por meio da injeção de padrões com concentrações crescentes em uma ampla escala (de 0,03 a 8,00 µg mL⁻¹). Um gráfico foi então construído, com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. Foram traçadas outras duas linhas horizontais paralelas no gráfico, para 80 e 120 % da linha da faixa linear.

3.4.3.2. PRECISÃO

A precisão do método foi avaliada em níveis de repetitividade e precisão intermediária das injeções. Para avaliar a repetitividade, injetou-se uma solução com a concentração intermediária da curva (c = 0,16 µg mL⁻¹) seis vezes, e calculou-se a precisão com base na equação abaixo:

$$\text{Precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}{I-1}} \quad (3)$$

Onde I é o número de replicatas.

Já para a precisão intermediária, foi avaliada a precisão das injeções ao longo de seis dias distintos, em um intervalo de tempo de 3 meses. Para isso, a precisão foi calculada da mesma forma já descrita para o fipronil, Item 3.3.4.2, visto que cada injeção foi realizada em triplicata.

3.4.3.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LD) foram determinados da mesma forma já descrita para o fipronil, conforme o item 3.3.4.3.

3.4.3.4. RECUPERAÇÃO

Inicialmente, 5 g da amostra de mel escolhida como branco (Mel 1) foram pesados em três erlenmeyers distintos. A um deles, foram adicionados 150 μL da solução de imidacloprido e a outro, foram adicionados 400 μL da mesma solução (Tabela 13). A cada erlenmeyer, previamente calibrado, foi adicionada água MilliQ até o volume de 15 mL. Os cartuchos SPE (C18 500 mg / 6 mL, Agilent) foram condicionados conforme o item 3.2.2.1.1, e carregados com 1 mL da solução da amostra, sendo o branco feito em uma única replicata e cadem nível de fortificação em triplicata. Os cartuchos foram lavados com 5 mL de água MilliQ, permitindo a completa secagem destes. Os analitos foram ressuspensos em metanol e quantitativamente transferidos para *vials* de cromatografia, até que completasse 1 mL de solução. Cada *vial* foi tampado, envolvido em papel alumínio e armazenado no congelador, até a determinação cromatográfica. Para a análise cromatográfica, foi necessário diluir os extratos em um fator de 3:11, a fim de obter a concentração no intervalo da curva analítica.

Tabela 13. Concentração final das amostras para o teste de recuperação do método de extração.

	Solução	C. Final 1*	C. Final 2**
	Estoque	($\mu\text{g g}^{-1}$)	($\mu\text{g g}^{-1}$)
	C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1 mL	1 mL
Imidacloprido	8,0	0,0655	0,1745

*C. Final 1 – Concentração resultante da fortificação de 150 μL .

**C. Final 2 – Concentração resultante da fortificação de 400 μL .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PREPARO DE AMOSTRA

O preparo de amostra descrito inclui os melhores resultados para as duas classes de ingredientes ativos, fipronil e imidacloprido, visto que o objetivo inicial do trabalho é a obtenção de um método comum para ambos os analitos. Dessa forma, partindo-se de resultados obtidos em outros trabalhos, foi testado cada parâmetro da extração dos analitos do mel, sendo o escolhido aquele que apresentou os melhores resultados para o conjunto de analitos estudados.

4.1.1. ESCOLHA DO ADSORVENTE

As recuperações obtidas para as extrações feitas com os adsorventes OPT e C18 para o fipronil dessulfinil, fipronil, fipronil sulfona e imidacloprido estão representadas na Tabela 14.

Tabela 14. Recuperações médias das extrações realizadas com os adsorventes C18 e OPT, obtidas através das curvas analíticas dos padrões em metanol, sem utilização do padrão interno decaclorobifenila.

	Rec1 (%)		Rec2 (%)	
	OPT	C18	OPT	C18
Fipronil Dessulfinil	56	94	66	56
Fipronil	55	55	58	50
Fipronil Sulfona	120	102	100	82
Imidacloprido	66	60	46	88

Obs.: Na tabela, Rec1 OPT e Rec1 C18 são as recuperações da fortificação menor para os extratos preparados nos adsorventes OPT e C18, respectivamente; Rec2 OPT e Rec2 C18 são as recuperações da fortificação maior para os extratos preparados nos adsorventes OPT e C18, respectivamente.

Fidente e colaboradores (2005), ao determinarem imidacloprido e outros inseticidas neonicotinóides em mel, realizaram estudos de recuperação com concentrações de 0,1 e 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ e obtiveram recuperações de 76 a 99 %. Kurz e colaboradores (2013) ao

determinarem fipronil e seus produtos de degradação em águas ambientais trabalharam com concentrações de 5 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e obtiveram recuperações de 83 a 112 %. Dessa forma, embora os resultados de recuperação para os analitos estudados não estejam tão altos quanto nos trabalhos citados, deve-se levar em consideração que o objetivo deste trabalho é quantificar a concentração destes analitos em amostras comerciais e, para isso, as concentrações de interesse devem ser as menores possíveis. Dessa forma, as concentrações dos ingredientes ativos adicionados foram muito inferiores às empregadas nos métodos referenciados. Provavelmente por este motivo, as recuperações não foram tão altas quanto as destes trabalhos de referência.

Deve-se levar em consideração, ainda, que os estudos de recuperação para a escolha do adsorvente para extração dos analitos foram realizados sem a utilização do padrão interno e, portanto, os valores estavam sujeitos a flutuações com as variações do equipamento. Além disso, as recuperações foram calculadas com base na curva analítica do fipronil em metanol e, como apresentado no item 4.2.2, os efeitos de matriz são muito acentuados levando a erros significativos.

Pode-se observar na Tabela 14 que os resultados das recuperações para o fipronil e seus produtos de degradação nos dois adsorventes avaliados não foram significativamente diferentes. Entretanto, as recuperações obtidas para o imidacloprido nas extrações realizadas com fortificação mais alta foram bem melhores com o adsorvente C18. Com base nesses dados, concluiu-se que o adsorvente C18 é mais adequado à extração desses ingredientes ativos e, portanto, foi escolhido para ser utilizado nas demais etapas do trabalho.

4.1.2. ESCOLHA DO SOLVENTE PARA EXTRAÇÃO

Para a escolha do solvente de extração foram avaliadas algumas combinações de solventes, a fim de se obter a fase móvel mais eficiente para o método. Os solventes testados foram escolhidos com base em sua polaridade e em sua disponibilidade no laboratório. Com o intuito de se obter misturas de solventes com uma ampla faixa de polaridade, foram utilizadas misturas de polaridades baixas como hexano-isopropanol

(1:1 v/v), polaridades intermediárias como isopropanol puro, e polaridades altas como metanol puro (Tabela 15).

Tabela 15. Índice de polaridade e temperatura de ebulição dos solventes estudados na extração de fipronil e imidacloprido do mel (Adaptado de Tabela de Miscibilidade de Solventes, 2014)

Solvente	Índice de polaridade	Temperatura de ebulição (°C)
Metanol	5,1	65
Acetona	5,1	56
Hexano	0,0	69
Isopropanol	3,9	82
Acetato de etila	4,4	77

Os resultados dos estudos de recuperação para a escolha do melhor solvente para a realização das extrações, feitas com o volume total de 9 mL, podem ser observados na Tabela 16.

Tabela 16. Recuperações médias dos testes para escolha do solvente, em cartucho C18, com calibração em matriz branca fortificada e padrão interno para os analitos fipronil, fipronil dessulfinil e fipronil sulfona e curva analítica em metanol para o imidacloprido.

	hexano-isopropanol (%)	Isopropanol (%)	metanol-isopropanol (%)	Metanol (%)
F. Dessulfinil	91	93	100	90
Fipronil	67	60	73	67
F. Sulfona	55	45	57	51
Imidacloprido	96	103	102	103

Fidente e colaboradores (2005) realizaram a extração de imidacloprido e outros inseticidas nicotinóides em mel com diclorometano, o que não é conveniente no presente estudo visto que os extratos também são analisados pelo detector de captura de elétrons, na determinação do fipronil. Kurz e colaboradores (2013) e Flores-Ramírez e colaboradores (2012) utilizaram acetona para a realização da extração de fipronil

assistida por ultrassom e com cartucho SPE C18, respectivamente. Entretanto, levando-se em consideração as condições do laboratório, este solvente foi evitado, visto a sua elevada volatilidade mesmo à temperatura ambiente.

Com os dados obtidos pode-se observar que as recuperações resultantes das eluições com os diversos solventes não variaram muito. Embora se possa notar que as recuperações com a combinação dos solventes metanol e isopropanol tenham sido um pouco melhores (em média 5 % mais elevadas), o solvente escolhido para a realização das eluições foi o metanol puro, considerando a pequena variação e a disponibilidade de metanol no laboratório. Além disso, o solvente utilizado nas análises instrumentais também foi metanol, o que torna conveniente o seu uso para a realização das extrações.

4.2. DETERMINAÇÃO DE FIPRONIL EM MEL

O fipronil e seus produtos de degradação aparentemente sofreram algum tipo de degradação durante a estocagem ou durante a análise cromatográfica, visto que nos cromatogramas dos padrões foram detectados picos adicionais aos dos analitos, como pode ser observado na Figura 12.

A confirmação da existência de produtos de degradação foi feita injetando-se cada padrão individualmente. Nos cromatogramas do fipronil dessulfenil, do fipronil e do fipronil sulfona, mais de um sinal cromatográfico foi detectado.

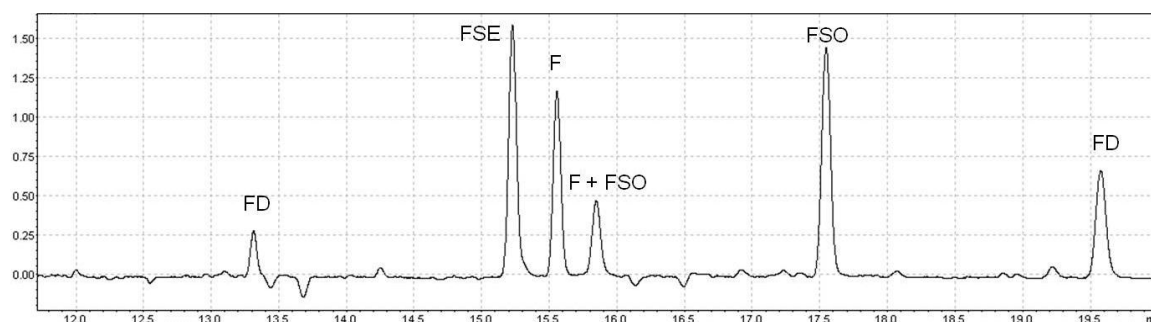


Figura 12. Cromatograma de solução de padrão de fipronil e seus produtos de degradação, onde F é fipronil, FD é fipronil dessulfenil, FSE é fipronil sulfeto e FSO é fipronil sulfona.

4.2.1. PADRÃO INTERNO

O padrão interno inicialmente utilizado na determinação do fipronil e dos seus produtos de degradação foi o triclosan (Figura 13), cuja nomenclatura IUPAC é 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol, na concentração de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, tal substância, ao ser injetada sucessivas vezes no CG-ECD, não apresentava boa repetitividade, e algumas vezes as curvas ficavam mais lineares levando-se em consideração somente as áreas dos sinais cromatográficos. Tal comportamento é ilustrado na Figura 14.

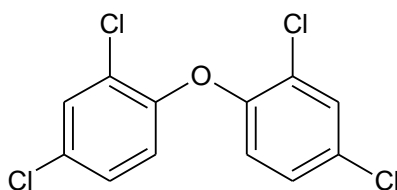


Figura 13. Estrutura química do triclosan.

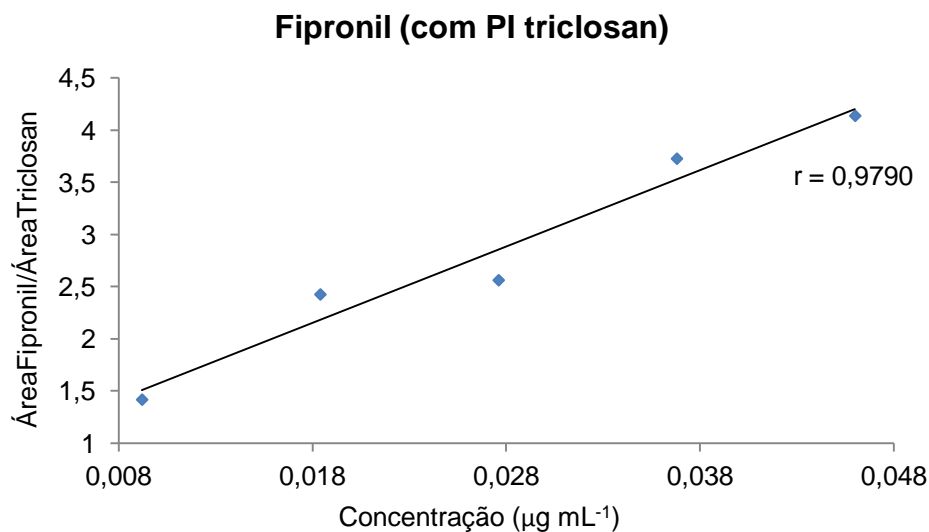


Figura 14. Curva analítica do fipronil em metanol levando-se em consideração o padrão interno (PI) triclosan.

Entretanto, a utilização de padrão interno foi fundamental para a determinação de fipronil e seus produtos de degradação em mel, visto que as injeções no CG-ECD foram feitas de forma manual e o detector de captura de elétrons, por ser muito sensível, pode apresentar variações consideráveis entre diferentes dias, resultando em curvas analíticas pouco lineares (Figura 14). Jiménez e colaboradores (2008) fizeram análises em mel por cromatografia gasosa empregando o PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenila) como PI, mas, devido à indisponibilidade deste padrão no laboratório, optou-se por empregar uma outra substância da mesma classe das bifenilas policloradas. Dessa forma, fez-se um teste com um novo padrão interno, o PCB 209 ou decaclorobifenila, também utilizado por Gan e colaboradores (2012) na determinação de fipronil em água. Este padrão interno, ilustrado na Figura 15, se apresentou bastante estável e com boa repetitividade nas injeções.

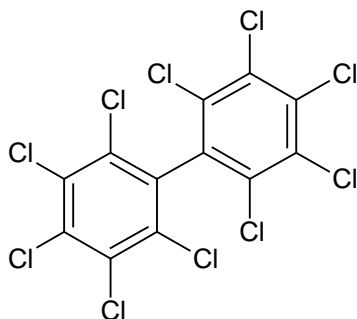


Figura 15. Estrutura química do PCB 209 (decaclorobifenila).

O PCB 209, ao ser injetado manualmente 24 vezes no GC-ECD, apresentou sinais cromatográficos com áreas reprodutíveis, com coeficiente de variação de 10 %. Este padrão foi, portanto, o padrão interno escolhido para a determinação de fipronil e seus produtos de degradação em mel por meio da cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons.

4.2.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE INSTRUMENTAL

As curvas analíticas feitas em metanol puro com seis pontos em quadruplicata e empregando decaclorobifenila como padrão interno não apresentaram boa linearidade

para todos os analitos em questão, com coeficiente de correlação abaixo de 0,99 para o fipronil sulfona e para o fipronil, conforme pode ser observado na Figura 16.

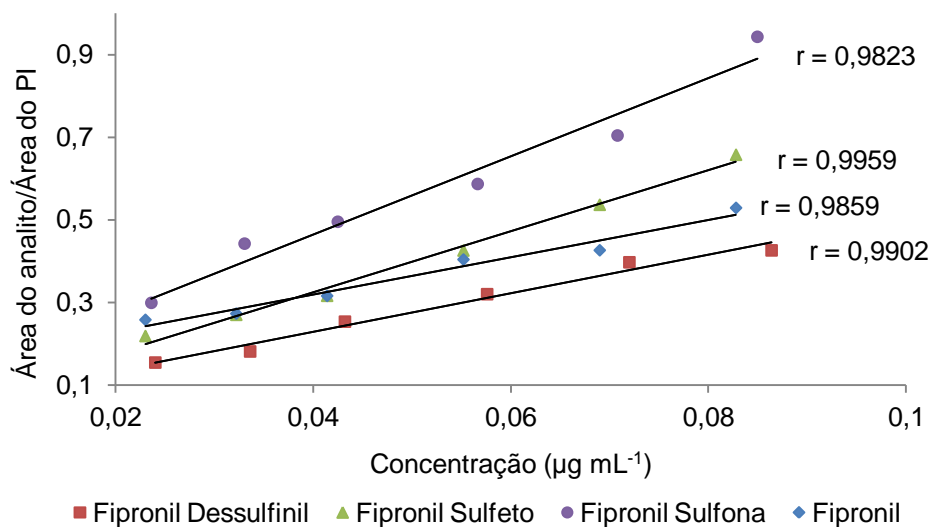


Figura 16. Curva analítica do fipronil, fipronil sulfeto, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona em metanol, com decaclorobifenila como padrão interno.

Uma alternativa encontrada para solucionar o problema da linearidade das curvas analíticas em metanol foi construir uma nova curva com o somatório das razões das intensidades dos sinais dos analitos pelas intensidades do padrão interno no eixo das abscissas (Figura 17), que apresentou maior linearidade em comparação com as curvas individuais. Este novo método pode ser considerado mais adequado por levar em consideração a formação de novos produtos de degradação ao calcular o somatório das áreas dos sinais cromatográficos.

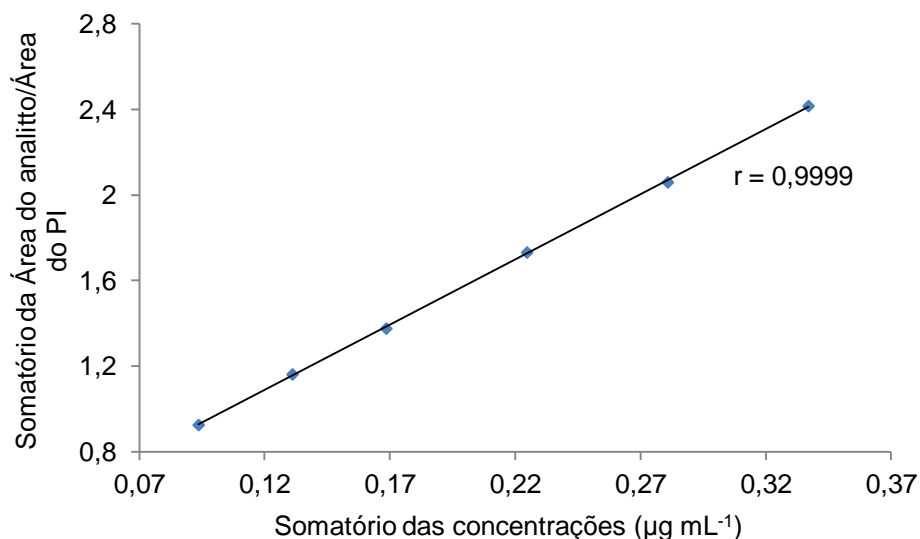


Figura 17. Curva analítica utilizando o somatório das intensidades relativas dos analitos fipronil, fipronil sulfona, fipronil sulfeto e fipronil dessulfínil (fipronil total) *versus* somatório das concentrações, em metanol.

Entretanto, a determinação do fipronil e dos seus produtos de degradação individualmente gera muito mais informações que a determinação de fipronil total. Dessa forma, a fim de se obter resultados individuais de cada analito, foram feitas novas curvas analíticas, agora em matriz branca fortificada. Comparando-se as curvas analíticas do fipronil em metanol com as curvas analíticas em extrato de mel, observa-se um forte efeito de matriz, afetando a sensibilidade do método, bem como a sua linearidade. Tal comportamento pode ser observado na Figura 18, para o fipronil. O mesmo comportamento foi observado para seus produtos de degradação.

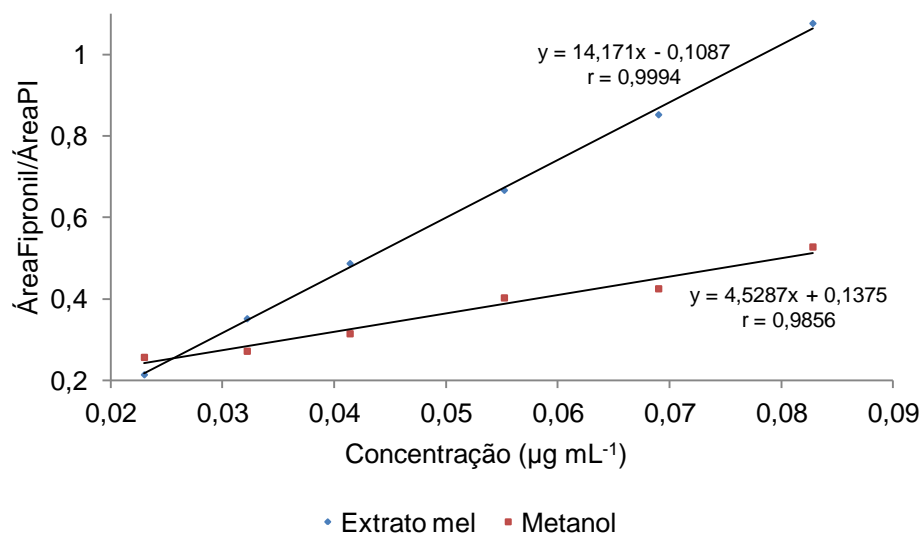


Figura 18. Comparação entre as curvas analíticas do fipronil em metanol e do fipronil em extrato de mel isento dos ingredientes ativos (Mel 3).

É possível notar que as curvas analíticas do fipronil e de seus produtos de degradação utilizando o extrato de mel apresentam melhora na sensibilidade, bem como na linearidade. Esse efeito é também observado por Sánchez-Brunete e colaboradores (2008) em análises de mel e por Flores-Ramírez e colaboradores (2012) em análises de solo. Com este efeito de matriz, ao se interpolar a área de um sinal cromatográfico de uma amostra na curva analítica em metanol, obteríamos um valor superestimado, indicando que o mel estaria contaminado com uma quantidade maior de agrotóxico do que a realidade.

Segundo Pinho e colaboradores (2009), o efeito de matriz é muito mais pronunciado em análises de amostras complexas, e os fatores que podem influenciá-lo são o injetor, a coluna cromatográfica, o detector, as propriedades e concentrações dos agrotóxicos, e as propriedades da matriz. Para a determinação de fipronil em mel por GC-ECD os fatores que mais podem ter contribuído para o efeito de matriz são o injetor, as propriedades da matriz e a baixa concentração dos agrotóxicos.

Quanto ao injetor, quando os padrões são preparados em solvente puro e analisados por cromatografia gasosa, os sítios ativos do *liner* (ou insertor), formados por grupos silanóis livres e metais, estão disponíveis para a retenção dos analitos, fazendo com que uma menor quantidade desses analitos seja transferida para a coluna e, conseqüentemente, para o detector. Todavia, quando as soluções padrão são feitas no próprio extrato da matriz, ocorre uma competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos do *liner*, possibilitando que uma maior quantidade do agrotóxico chegue à coluna cromatográfica e seja detectada (Figura 19). Dessa forma, quando a resposta do detector para as soluções em solvente puro e na matriz são comparadas, pode-se observar que esta gera sinais cromatográficos mais intensos, decorrentes de uma maior quantidade do analito que atingiu o detector (Pinho e colaboradores, 2009).

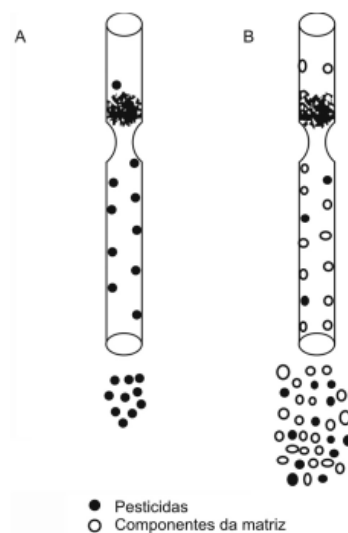


Figura 19. *Liner* do injetor de um GC demonstrando as possíveis adsorções dos analitos quando dissolvidos em solvente puro (A) e quando dissolvidos no extrato da matriz (B) (Pinho e colaboradores, 2009).

O efeito de matriz é mais acentuado quando o analito se encontra em pequenas concentrações, visto que, se presentes em concentrações elevadas, a porcentagem de analito que ficará retida nos sítios ativos do *liner* será bem menor e, portanto, o erro associado a cada injeção também será menos expressivo. Quanto às propriedades da

matriz, a natureza da amostra e o tipo de co-extrativos também podem influenciar a intensidade do efeito de matriz, dependendo do tamanho das moléculas, da estabilidade térmica, da polaridade, da volatilidade etc. Co-extrativos como lipídios, pigmentos e outros componentes de massa molar elevada, presentes no mel, podem permanecer solubilizados nos extratos, interferindo nas análises cromatográficas e promovendo o efeito de matriz (Pinho e colaboradores, 2009).

Pinho e colaboradores (2009) sugerem alguns métodos para minimizar o efeito de matriz, sendo eles alterações na forma de injeção, a utilização de analitos protetores, uma melhor limpeza dos extratos, a utilização de uma função de correção e a construção da curva analítica fortificando-se extratos da matriz. Esta última técnica mostrou-se mais favorável ao método, visto que inserir mais uma etapa de limpeza dos extratos demanda mais tempo e dinheiro, bem como a utilização de analitos protetores, ainda não muito conhecidos. A utilização de uma função de correção também pode não ser o ideal, visto que as respostas do detector variam significativamente, e essa função teria que ser atualizada com frequência. Dessa forma, pode-se concluir que é necessário que os padrões para a construção da curva analítica sejam preparados em matriz branca fortificada, para obtenção de resultados mais fidedignos.

4.2.2.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.2.2.1.1. LINEARIDADE

As curvas analíticas foram construídas injetando-se cada uma das 6 soluções padrão de fipronil, fipronil dessulfenil, fipronil sulfona e fipronil sulfeto em extrato de mel (Mel 3) em triplicata (Figura 20).

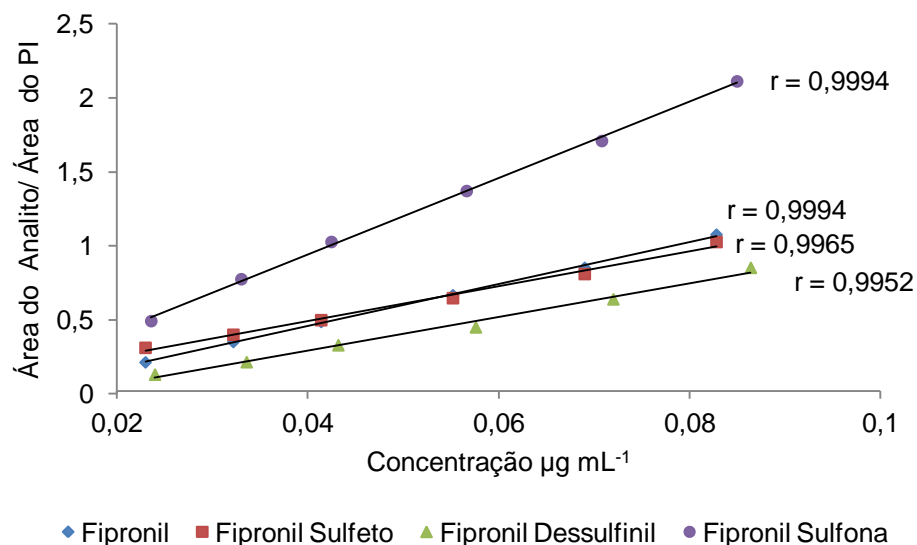


Figura 20. Curva analítica para fipronil, fipronil sulfeto, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona em matriz branca fortificada.

Nota-se que, pela Resolução-RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, deve as curvas são lineares na faixa analítica utilizada ($r > 0,99$), sendo que esta foi considerada suficiente para os baixos níveis de concentração esperados de fipronil e seus produtos de degradação no mel.

4.2.2.1.2. PRECISÃO

A precisão do método foi avaliada em níveis de repetitividade das extrações e injeções e de precisão intermediária das injeções. Para a precisão em nível de repetitividade, os valores calculados estão representados na Tabela 17, juntamente com os coeficientes de variação (CV) correspondentes.

Tabela 17. Precisão em nível de repetitividade das extrações e injeções para o fipronil dessulfenil, fipronil e fipronil sulfona.

	Precisão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
Fipronil Dessulfenil	0,00247	0,03952	6
Fipronil	0,00132	0,03068	4
Fipronil Sulfona	0,000926	0,03406	3

*Número de replicatas = 6

Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD (do inglês, *Relative Standard Deviation*) de até 20 %, dependendo da complexidade da amostra (Ribani e colaboradores, 2004). Os resultados obtidos para o fipronil, fipronil dessulfenil e fipronil sulfona foram bastante satisfatórios, não ultrapassando 7 %.

Já para a precisão intermediária, como não havia cartuchos suficientes, foi avaliada apenas a precisão das injeções ao longo de seis dias distintos, não necessariamente consecutivos, ao longo de duas semanas. Para isso, a precisão foi obtida conforme descrito anteriormente para a repetitividade, tendo em vista que cada extrato também foi injetado em triplicata. Os resultados estão representados na Tabela 18.

Tabela 18. Precisões intermediárias das injeções para o fipronil dessulfenil, fipronil e fipronil sulfona.

	Precisão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
Fipronil Dessulfenil	0,00338	0,03224	10
Fipronil	0,00229	0,02808	8
Fipronil Sulfona	0,00215	0,03235	7

*Número de replicatas = 6

Conforme o esperado, os valores obtidos para a precisão intermediária foram maiores que os valores da precisão em nível de repetitividade, já que as variações são bem mais significativas em dias distintos que em um mesmo dia. Para os analitos estudados, os coeficientes de variação apresentam-se dentro o limite esperado, todos até 10 %.

4.2.2.1.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o fipronil e para seus produtos de degradação são apresentados na Tabela 19. Os limites são expressos em relação à massa de mel, e foram calculados partindo-se da condição de que 1 mL de extrato foi feito a partir de 0,33 g de mel. Tais limites são próximos dos encontrados por Flores-Ramírez e colaboradores (2012), cujos LD das substâncias estudadas estiveram na faixa de 9,8 a 14,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e os LQ na faixa de 17,9 a 22,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, na determinação de fipronil e seus produtos de degradação em solo utilizando a mesma técnica cromatográfica que o presente trabalho. No entanto, os autores calcularam esse limite somando o valor do intercepto a 3 (para o LD) e 10 vezes (para o LQ) o desvio associado ao intercepto.

Tabela 19. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o fipronil, fipronil dessulfinil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona.

	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$ de mel)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$ de mel)
Fipronil	0,0138	0,069
Fipronil Dessulfinil	0,0101	0,072
Fipronil Sulfeto	0,0097	0,069
Fipronil Sulfona	0,0091	0,071

4.2.2.1.4. RECUPERAÇÃO

As recuperações dos analitos fipronil, fipronil dessulfinil e fipronil sulfona são mostradas na Tabela 20. As recuperações do fipronil sulfeto não foram determinadas, pois não havia solução do padrão suficiente para as fortificações.

Tabela 20. Recuperações das extrações de fipronil dessulfínil, fipronil e fipronil sulfona para os níveis de fortificação de 200 µL e de 400 µL.

	Concentração fortificada com 200 µL (µg g ⁻¹)	Concentração recuperada (µg g ⁻¹)	Recuperação para 200 µL	Concentração fortificada com 400 µL (µg g ⁻¹)	Concentração recuperada (µg g ⁻¹)	Recuperação para 400 µL
Fipronil	0,092	0,091	99 %	0,184	0,136	74 %
Fip. Dessulfínil	0,096	0,068	71 %	0,192	0,119	62 %
Fip. Sulfona	0,094	0,079	84 %	0,189	0,112	59 %

Kurz e colaboradores (2013) utilizaram cartuchos C18 (500 mg por 3 mL, Phenomenex) e acetona para extração de fipronil e seus produtos de degradação em água, e obtiveram recuperações entre 80 e 120 %. Entretanto, os níveis de fortificação variaram de 5 a 250 µg mL⁻¹, concentrações bem mais altas que as avaliadas no presente trabalho.

Embora os resultados de recuperação não estejam tão próximos dos esperados, deve-se levar em consideração que o objetivo deste trabalho é quantificar amostras comerciais e para isso os níveis de concentração trabalhados devem se aproximar o máximo do nível esperado nas amostras. Para isso, as concentrações dos ingredientes ativos foram muito inferiores em comparação com os métodos anteriormente desenvolvidos e provavelmente por isso as recuperações não foram tão satisfatórias como as dos trabalhos referenciados.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DE FIPRONIL NAS AMOSTRAS DE MEL

Em grande parte das amostras analisadas os cromatogramas apresentaram um sinal cromatográfico com o mesmo tempo de retenção do fipronil dessulfínil, indicando a presença desse agrotóxico nos méis em questão. Não havia sinais referentes aos demais produtos de degradação. Entretanto, em algumas dessas amostras, o sinal gerado permaneceu abaixo do LQ ou até mesmo do LD. Os resultados das análises estão na Tabela 21.

Tabela 21. Resultados das análises realizadas nas amostras de mel para o fipronil e seus produtos de degradação, interpolando-se os valores na curva analítica do analito em extrato de mel.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Mel 1 (Orgânico)	<LQ
Mel 2 (Orgânico)	<LQ
Mel 3	<LD
Mel 4	<LQ
Mel 5	<LQ
Mel 6	<LQ
Mel 7	0,155
Mel 8 (Orgânico)	0,134
Mel 9 (Orgânico)	<LQ
Mel 10 (Orgânico)	<LQ
Mel 11 (Orgânico)	0,097
Mel 12	0,094
Mel 13 (Orgânico)	<LQ
Mel 14	<LQ
Mel 15	<LQ
Mel 16	0,075
Mel 17	0,080
Mel 18	<LQ
Mel 19	<LQ
Mel 20	<LQ
Mel 21	0,081
Mel 22 (Orgânico)	0,079
Mel 23	0,075
Mel 24 (Orgânico)	<LQ
Mel 25	<LQ
Mel 26	0,129
Mel 27	0,076
Mel 28	<LQ

Pode-se observar na Tabela 21 que a presença e ausência do fipronil e dos seus produtos de degradação independem do tipo de mel analisado, se orgânico ou não. Isso ocorre pois as abelhas, por serem criadas de forma pouco restritiva, podem atingir áreas muito mais abrangentes que o esperado durante suas sucessivas viagens diárias. Dessa forma, embora o apicultor não utilize nenhum tipo de agrotóxico diretamente no tratamento da colmeia, as abelhas podem ser contaminadas em plantações tratadas com esses produtos.

Mesmo com as informações do presente estudo, não se pode concluir ao certo o nível de contaminação inicial de cada amostra estudada, pois se deve levar em consideração que estes ingredientes ativos podem sofrer degradação ao longo do tempo. Tal comportamento é estudado por Jiménez e colaboradores (2008), que fortificaram uma amostra de mel com $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ e observaram que após 52 dias a concentração remanescente havia decrescido 41 %. Dessa forma, é possível que amostras que apresentaram concentrações do agrotóxico abaixo do limite de detecção na verdade estivessem contaminadas com concentrações bem mais elevadas no momento da coleta, mas que com o passar do tempo foram sendo degradados até a presente concentração.

4.3. DETERMINAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO EM MEL

O desenvolvimento do método analítico para determinação de imidacloprido em mel envolveu a variação de alguns parâmetros, sendo eles: o solvente das soluções do ingrediente ativo, a composição e proporção da fase móvel, a coluna cromatográfica e a temperatura do forno da coluna cromatográfica.

4.3.1. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS

Primeiramente, foram avaliadas duas colunas cromatográficas com fase C18 (75 mm e 250 mm de comprimento). A coluna de 75 mm não forneceu bons resultados, pois o curto tempo de corrida gerava picos muito próximos uns dos outros e, conseqüentemente, a integração se tornava muito imprecisa. Ao se testar a coluna de 250 mm, a resolução cromatográfica se mostrou adequada.

Para o preparo das soluções padrão, o primeiro solvente testado foi acetona. Esses padrões ao serem injetados no HPLC resultavam em sobreposição dos sinais cromatográficos referentes ao analito e ao solvente. Novos padrões foram preparados em metanol, melhorando a resolução dos cromatogramas e solucionando o problema da sobreposição.

A temperatura da coluna cromatográfica pode influenciar nas separações durante as análises por HPLC. Entretanto, no presente estudo, a variação de temperatura (avaliada em isotermas de 25 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C) não afetou significativamente os resultados e, portanto, a temperatura escolhida foi 25 °C.

Por fim, com relação à fase móvel do HPLC, as misturas de solventes avaliadas foram: água-metanol (70:30) e água-acetonitrila (70:30). A última proporcionou uma linha base mais baixa e, conseqüentemente, menores limites de detecção do analito.

4.3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.3.2.1. LINEARIDADE

A faixa linear dinâmica do método foi testada por meio de injeções de padrões em concentrações crescentes, variando de 0,03 a 8,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em triplicata (Figura 21).

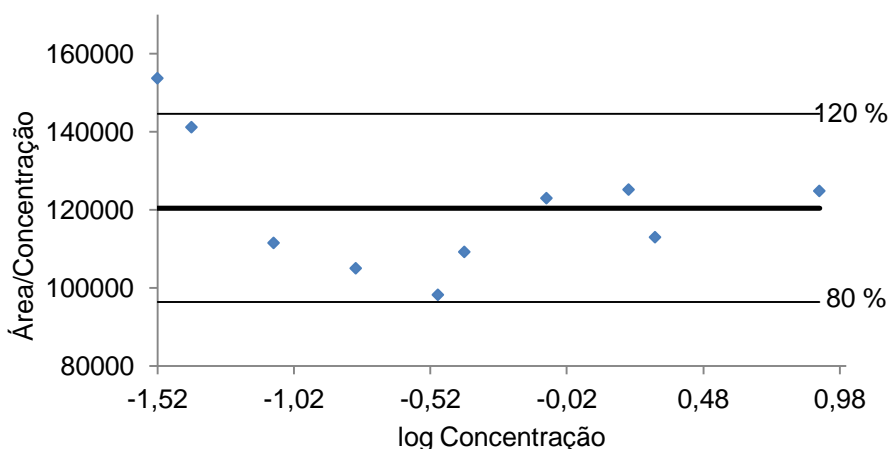


Figura 21. Estudo da faixa linear dinâmica para o método de determinação de imidacloprido em mel.

Pelo estudo realizado, pode-se notar que o primeiro ponto, referente à concentração de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ não apresenta linearidade com os demais pontos da curva analítica. Dessa forma, o método apresenta uma ampla faixa linear dinâmica, que vai de $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ até pelo menos $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que demonstra que este é aplicável para um grande intervalo de concentrações. Com base nesses resultados, as curvas analíticas partiam da menor concentração possível ($0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$), com o objetivo de se gerar um método capaz de quantificar imidacloprido em amostras de mel mesmo quando presente em baixas concentrações.

As curvas analíticas foram construídas injetando-se cada uma das 5 soluções padrão de imidacloprido em metanol em triplicata. Os sinais cromatográficos foram integrados de forma manual. A linearidade do método foi avaliada com base no coeficiente de correlação da curva, sendo obtidos excelentes coeficientes, sempre maiores que 0,999 (Figura 22).

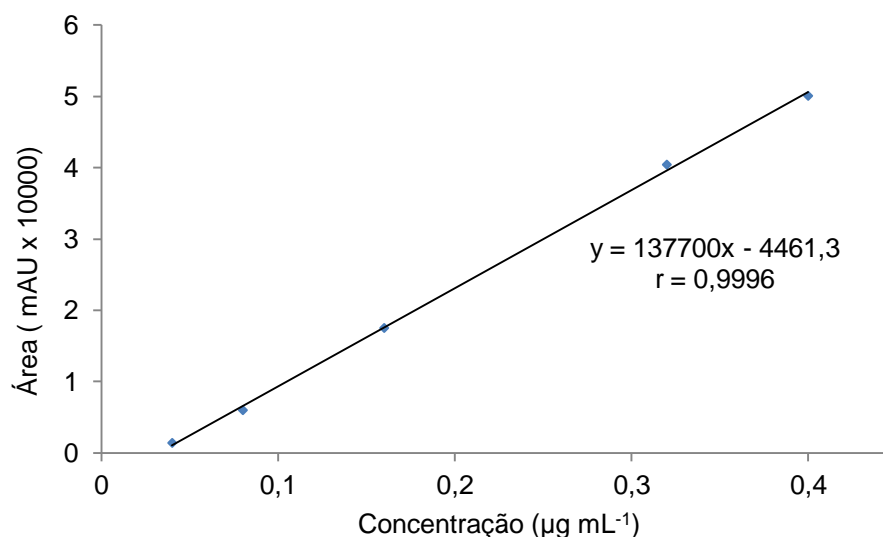


Figura 22. Curva analítica do imidacloprido realizada no HPLC.

4.3.2.2. PRECISÃO

A precisão do método foi avaliada em níveis de repetitividade e precisão intermediária das injeções. Para precisão em nível de repetitividade, o valor calculado está representado na Tabela 22, juntamente com o coeficiente de variação (CV).

Tabela 22. Repetitividade das injeções para o imidacloprido.

	Precisão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
Imidacloprido	0,01736	0,17518	10

*Número de replicatas = 6

Os resultados obtidos para a precisão em nível de repetitividade das injeções do imidacloprido são bastante satisfatórios, não ultrapassando 10 %. Fidente e colaboradores (2005) encontraram valores semelhantes na determinação de imidacloprido em mel (9,8 %), mas o teste foi realizado em extrato e as amostras analisadas por LC-MS.

Já para a precisão intermediária, os resultados estão representados na Tabela 23.

Tabela 23. Precisões intermediárias das injeções para o imidacloprido.

	Precisão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
Imidacloprido	0,02823	0,18356	15

*Número de replicatas = 6

Conforme o esperado, os valores para a precisão intermediária foram maiores que os mesmos para repetitividade, já que o detector DAD do HPLC sofria muitas variações de um dia para o outro e, como não foi utilizada a padronização interna, esses efeitos não foram corrigidos. Dessa forma, foi necessário que os padrões preparados para a curva analítica fossem reinjetados sempre que novas amostras fossem analisadas.

4.3.2.3. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o imidacloprido são apresentados na Tabela 24. Tais limites são menores que os encontrados por Fidente e colaboradores (2005) no desenvolvimento de método para quantificação de quatro

nicotinóides em mel por LC-MS, que foram de aproximadamente 0,5 µg mL⁻¹ para o LD e 1,5 µg mL⁻¹ para o LQ na determinação do imidacloprido, determinados em extrato de mel.

Tabela 24. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o imidacloprido.

	LD	LQ
	(µg mL ⁻¹ de metanol)	(µg mL ⁻¹ de metanol)
Imidacloprido	0,03	0,04

4.3.2.4. RECUPERAÇÃO

Os estudos de recuperação foram realizados com amostras do Mel 2, isento do ingrediente ativo. As recuperações para o imidacloprido são mostradas na Tabela 25.

Tabela 25. Recuperações das extrações de imidacloprido para os níveis de fortificação de 150 µL e de 400 µL.

	Concentração fortificada com 150 µL (µg g ⁻¹)	Concentração recuperada (µg g ⁻¹)	Recuperação para 150 µL	Concentração fortificada com 400 µL (µg g ⁻¹)	Concentração recuperada (µg g ⁻¹)	Recuperação para 400 µL
Imidacloprido	0,0655	0,0657	100 %	0,1745	0,1254	72 %

Pode-se observar que os estudos de recuperação realizados tanto para o fipronil e seus produtos de degradação quanto para o imidacloprido resultaram em recuperações menores para a maior fortificação em comparação com a menor fortificação. Na extração dos analitos do mel, há uma competição entre os interferentes e os analitos pela interação com os sítios ativos do cartucho SPE. Ao se aumentar a concentração dos analitos, pode ser que parte das moléculas não consiga interagir com os sítios ativos e, conseqüentemente, são descartadas juntamente com os resíduos da extração. Dessa forma, seria interessante que os resíduos fossem extraídos novamente, a fim de se obter melhores recuperações. Tal estudo não foi realizado por insuficiência de cartuchos SPE.

4.3.3. DETERMINAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO NAS AMOSTRAS DE MEL

Muitas amostras, ao serem analisadas no HPLC para quantificação do imidacloprido em mel, aparentemente estavam contaminadas com o agrotóxico, pois apresentavam picos de absorção com o mesmo tempo de retenção deste analito. Ao se observar o espectro de absorção completo do analito referente a este sinal, foi possível observar que o comprimento de onda máximo não foi 270 nm como o esperado, indicando que este não era o analito de interesse (Figura 23). Entretanto, não foi possível identificar o analito correspondente ao sinal cromatográfico, já que os sinais cromatográficos e o comprimento de onda máximo variavam significativamente de amostra para amostra. Esse mesmo comportamento não foi observado no desenvolvimento do método, pois a amostra utilizada para os testes foi o Mel 2, que não apresentava sinal interferente com o tempo de retenção do imidacloprido.

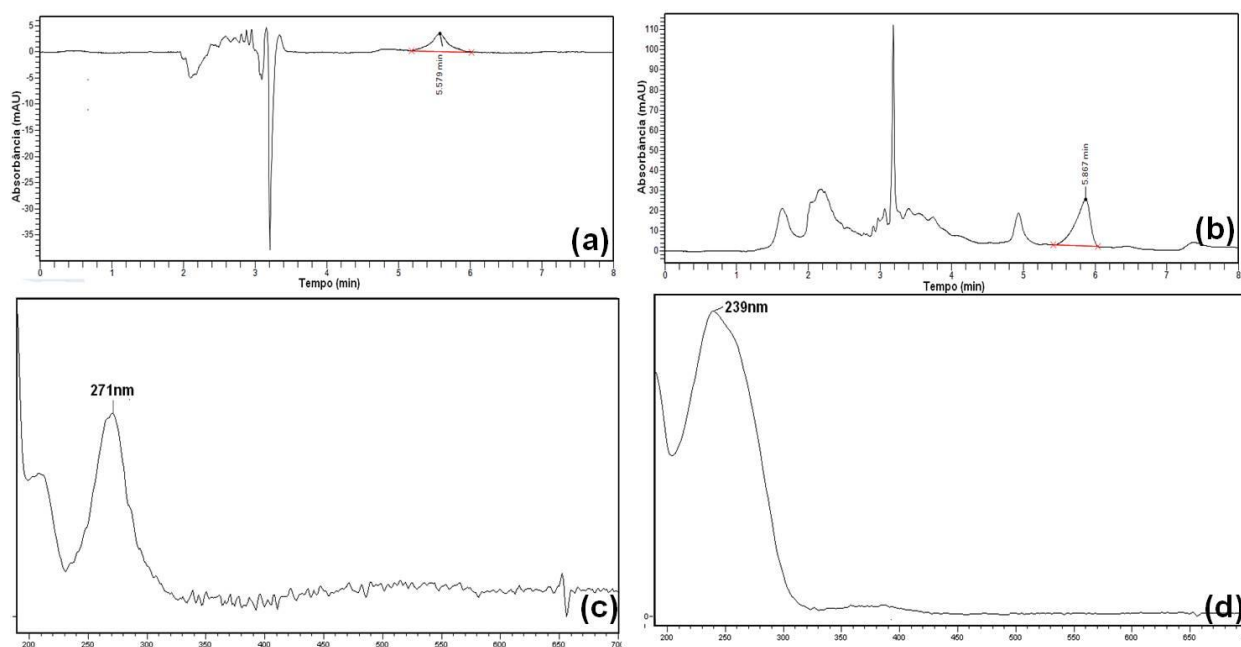


Figura 23. (a) Cromatograma de uma solução padrão de imidacloprido ($c = 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) em metanol comparado com (b) cromatograma de uma amostra de mel (Mel 10) também em metanol. Abaixo, (c) espectro de absorção do sinal cromatográfico do imidacloprido e (d) espectro de absorção do(s) analito(s) interferente.

Dessa forma, não foi possível determinar e quantificar imidacloprido em grande parte das amostras analisadas, pois o sinal cromatográfico do analito interferente apresentou intensidade muito superior até mesmo à intensidade dos padrões da curva analítica. Portanto, para se gerar dados satisfatórios a respeito dessas amostras, seria necessário inserir de mais uma etapa de *clean-up* após a extração, mas também por falta de tempo esta alternativa não foi testada.

Apesar da dificuldade de quantificar imidacloprido nas amostras de mel disponíveis, a aplicação deste método pode ser avaliada na determinação deste analito em outras matrizes melíferas, como própolis, geleia real e até mesmo abelhas.

Na Tabela 26 são apresentados os sinais analíticos com tempos de retenção próximos ao tempo do imidacloprido, juntamente com seus comprimentos de onda, confirmando que aquele sinal não é referente ao analito em questão. Algumas amostras não apresentaram nem sinal interferente nem sinal do imidacloprido (mel 2, 5, 6, 13 e 19).

Tabela 26. Resultados das análises realizadas nas amostras de mel para o imidacloprido.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Mel 1 (Orgânico)	*Int
Mel 2 (Orgânico)	<LD
Mel 3	*Int
Mel 4	*Int
Mel 5	<LD
Mel 6	<LD
Mel 7	*Int
Mel 8 (Orgânico)	*Int
Mel 9 (Orgânico)	*Int
Mel 10 (Orgânico)	*Int
Mel 11 (Orgânico)	*Int
Mel 12	*Int
Mel 13 (Orgânico)	<LD
Mel 14	*Int
Mel 15	*Int
Mel 16	*Int
Mel 17	*Int
Mel 18	*Int
Mel 19	<LD
Mel 20	*Int
Mel 21	*Int
Mel 22 (Orgânico)	*Int
Mel 23	*Int
Mel 24 (Orgânico)	*Int
Mel 25	*Int
Mel 26	*Int
Mel 27	*Int
Mel 28	*Int

*Int = Não foi possível determinar devido à presença de sinal interferente.

Chauzat e colaboradores (2006) fizeram um estudo na França, cujo uso de fipronil e imidacloprido era bastante intenso, para determinação de resíduos de 41 diferentes moléculas por análises individuais ou multirresíduo em pólen, sendo 34 ingredientes ativos de preparações comerciais e 7 produtos de degradação de alguns dos

ingredientes ativos estudados. Neste estudo, utilizando LC-MS-MS, os pesquisadores encontraram imidacloprido ou ácido 6-cloronicotínico (principal produto de degradação do imidacloprido) em 69 % das amostras analisadas na concentração média de $1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Com relação ao fipronil e seus produtos de degradação, as análises também foram feitas por LC-MS-MS, e Chauzat e colaboradores encontraram fipronil em 12 % das amostras na concentração média de $1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$, fipronil dessulfínico em 11 % das amostras na concentração média de $1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ e fipronil sulfona em 3,7 % das amostras com concentração média de $1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$, valores bastante inferiores aos encontrados no presente estudo de análises de mel.

Os estudos de determinação desses ingredientes ativos em outras amostras ambientais, como pólen, abelhas e néctar, juntamente com os dados gerados em amostras de mel fornecem informações capazes de subsidiar decisões acerca do uso desses agrotóxicos no Brasil, a fim de solucionar o problema do aumento expressivo da mortalidade das abelhas.

5. CONCLUSÕES

O método de determinação de fipronil e seus produtos de degradação em mel utilizando curva analítica em matriz branca fortificada mostrou-se bastante satisfatório e com etapas passíveis de serem reproduzidas. As figuras de mérito estiveram dentro dos limites esperados, levando-se em consideração o objetivo de se trabalhar com as menores concentrações possíveis. Coeficientes de correlação sempre superiores a 0,99, recuperação média de 75 %, LD e LQ médios de $0,011 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,070 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, e precisão com CV médio de 4,3 % em nível de repetitividade e 8,3 % em nível de precisão intermediária. O método se mostrou capaz de quantificar amostras comerciais e os resultados foram positivos para fipronil dessulfinil, o principal produto de degradação do fipronil em mel, em 11 amostras de um total de 28, com concentração média de $0,0978 \mu\text{g g}^{-1}$.

O estudo também permitiu observar que a presença e ausência do fipronil e dos seus produtos de degradação independem do tipo de mel analisado, se orgânico ou não. Além disso, também é importante ressaltar que não se pode concluir ao certo o nível de contaminação inicial de cada amostra estudada, pois se deve levar em consideração que estes ingredientes ativos podem sofrer degradação ao longo do tempo.

O método de determinação de imidacloprido em mel também resultou em figuras de mérito nos limites esperados para as concentrações trabalhadas. Coeficiente de correlação sempre superior a 0,999, recuperação média de 86 %, LD e LQ de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e precisão em nível de repetitividade com CV de 10 %. Entretanto, o método não se mostrou capaz de quantificar o analito na maioria das amostras de mel, pois um sinal interferente, com intensidade bastante superior à concentração do ingrediente ativo, apresentava o mesmo tempo de retenção do imidacloprido. Não foi possível identificar o interferente correspondente ao sinal cromatográfico, já que o tempo de retenção e o comprimento de onda máximo variavam significativamente de uma amostra para outra.

Para se determinar imidacloprido nas amostras de mel que apresentaram o sinal interferente era necessário que se inserisse mais uma etapa de *clean-up* previamente às análises no HPLC. No entanto, apesar da dificuldade de quantificar imidacloprido nas amostras de mel disponíveis, a aplicação deste método pode ser avaliada na determinação deste analito em outras matrizes melíferas, como própolis, geleia real e até mesmo abelhas, possibilitando a continuidade desse ramo de pesquisa. Os estudos de agrotóxicos em outras amostras ambientais juntamente com os dados gerados em amostras de mel fornecem informações capazes de subsidiar decisões acerca do uso desses agrotóxicos em todo o mundo, contribuindo para solucionar o problema do aumento da mortalidade das abelhas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGILENT, *Agilent's New Octadecylsilane (ODS) (C18) Solid-Phase Extraction Cartridges: SampliQ C18, Technical Note, 2008*. Disponível em <http://www.crawfordscientific.com/downloads/pdf_new/SampliQ/SampliQ_C18.PDF>. Acesso em 10 de janeiro de 2013.

AGILENT, *Agilent's New Polymer Solid-Phase Extraction Cartridges: SampliQ OPT, Technical Note, 2008*. Disponível em <<http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5989-8869EN.pdf>>. Acesso em 10 de janeiro de 2013.

ANVISA, *Resolução-RE nº 899 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, de 29 de maio de 2003*. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 12 de dezembro de 2013.

APACAME (ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE APICULTORES CRIADORES DE ABELHAS MELÍFICAS EUROPEÍAS), **2013**. Disponível em <<http://www.apacame.org.br/>>. Acesso em 24 de abril de 2013.

CARVALHO, S., ROAT, T., PEREIRA, A. M., SILVA-ZACARIN, E., NOCELLI, R. C. F., CARVALHO, C., MALASPINA, O. *Losses of Brazilian bees: an overview of factors that may affect these pollinators*. 11th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, Wageningen (The Netherlands), p. 2-4, **2011**.

CASIDA, J. E. *The Greening of Pesticide–Environment Interactions: Some Personal Observations*. Environmental Health Perspectives, Vol. 120, p. 487-493. **2012**.

CHAUZAT, M. P., FAUCON, J. P., MARTEL, A. C., LACHAIZE, J., COUGOULE, N., AUBERT, M. *A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in france*. Entomological Society of America, Vol. 99(2), p. 253-262, **2006**.

Conselho Nacional do Meio Ambiente/CONAMA, Resolução CONAMA nº 346, de 16 de agosto de 2004. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=448/>>. Acesso em 2 de janeiro de 2014.

DING, T., JACOBS, D., LAVINE, B. K. *Liquid chromatography-mass spectrometry identification of imidacloprid photolysis products*. Microchemical Journal, Vol. 99, p. 535–541, **2011**.

FIDENTE, P., SECCIA, S., VANNI, F., MORRICA, P. *Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-*

electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography A, Vol. 1094, p. 175-178, **2005**.

FLORES-RAMÍREZ, R., BATRES-ESQUIVEL, L. E., DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ, F., LÓPEZ-ACOSTA, I., ORTIZ-PÉREZ, M. D. *Development and validation of an analytical method to determine fipronil and its degradation products in soil samples*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 89, p. 744-750. **2012**.

FOSSEN, M. *Environmental Fate of Imidacloprid*, Environmental Monitoring Department, California Department of Pesticide Regulation, 1001 I Street, Sacramento, CA, , **2006**.

FREITAS, B. M., PINHEIRO, J. N. *Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo dos polinizadores dos agroecossistemas brasileiros*. Oecologia Australis, Vol. 14, p. 282-298, **2010**.

GAN, J., BONDARENKO, S., OKI, L., HAVER, D., LI, J. X. *Occurrence of Fipronil and Its Biologically Active Derivatives in Urban Residential Runoff*. Environmental Science & Technology, Vol. 46, p. 1489 – 1495, **2012**.

GUNASEKARA, A. S., TROUNG, T. *Environmental Fate of Fipronil*, Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, 1001 I Street, Sacramento, CA , **2007**.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. *Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil Uma abordagem ambiental*. 2009. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercia-lizacao-de-agrotoxicos-see-below-for-english-version>>. Acesso em 30 de Abril de 2013.

JIMÉNEZ, J. J., BERNAL, J. L. NOZAL, M. J., MARTÍN, M. T., MAYO, R. *Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, Vol. 1187, p. 40-45, **2008**.

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

KURZ, M. H. S., MARTEL, S., GONÇALVES, O. D., PRESTES, MARTINS. M. L., ZANELLA, R., ADAIME, M. B. *Development of a Fast Method for the Determination of the Insecticide Fipronil and its Metabolites in Environmental Waters by SPE and GC-ECD*. Journal of the Brazilian Chemical Society, Vol. 00, No. 00, p. 1-8, **2013**.

MARCHINI, L. C., MORETI, A. C. C. C., OTSUK, I. P. *Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por Apis mellifera L. no estado de São Paulo*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Vol. 25, p. 8-17, **2005**.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). *Manual de garantia da qualidade analítica – Resíduos e contaminantes em alimentos*. 2011.

PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R., SILVÉRIO, F. O. *Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa*. Química Nova, Vol. 32, No 4, p. 987 – 995, 2009.

PORTO, M. F., SOARES, W. L. *Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora*. Debate. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, Vol. 37, Nº 125, 2012.

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, Vol. 27, No 5, p. 771 – 780, 2004.

RISSATO, R. S., GALHIANE, M. S., KNOLL, F. R. N., ANDRADE, R. M. B., ALMEIDA, M. V. *Método muntirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador*. Química Nova, Vol. 29, No.5, p. 950-955, 2006.

ROSSI, S., SABATINI, A. G. CENCIARINI, R., GHINI, S., GIROTTI, S. *Use of high-performance liquid chromatography-UV and gas chromatography-mass spectrometry for determination of the imidacloprid content of honeybees, pollen, paper filters, grass, and flowers*. Chromatographia, Vol. 61, p. 189-195, 2005.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C., MIGUEL, E., ALBERO, B., TADEO, J. L. *Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography*. Spanish Journal of Agricultural Research, Vol. 6, p. 7-14, 2008.

Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em 2 de Maio de 2013.

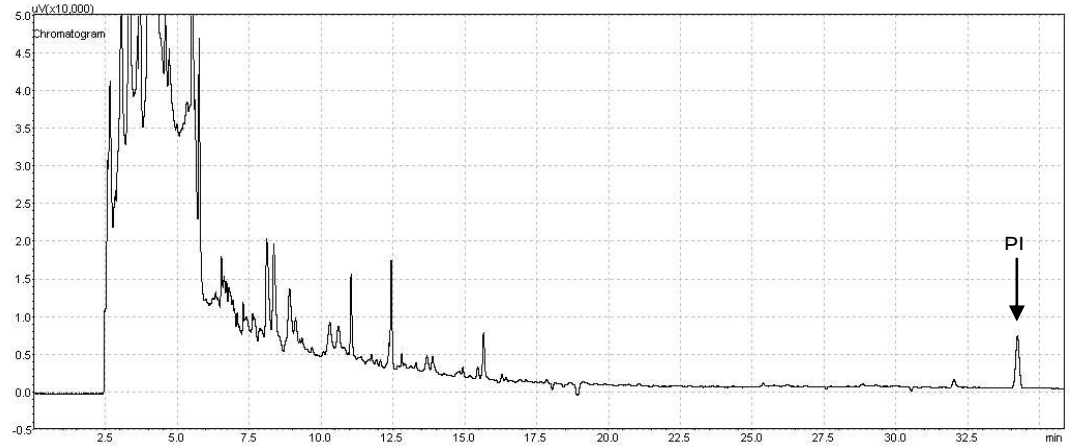
Tabela de Miscibilidade de Solventes. Disponível em <https://www.docstoc.com/pass?docId=31281223&download=1>. Acessado em 20 de dezembro de 2014.

VALDERRAMA, P., BRAGA, J. W. B., POPPI, R. J. *Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada*. Química Nova, Vol. 32, No 5, p. 1278 – 1287, 2009.

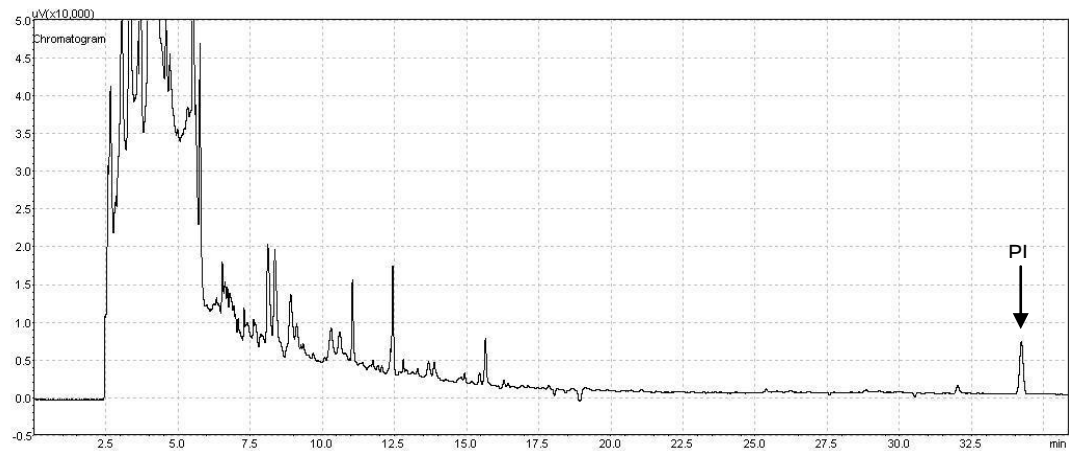
VILHENA, F., ALMEIDA-MURADIAN, L. B. *Análises físico-químicas de méis de São Paulo*. Mensagem Doce, Vol. 53, p. 17-19, 1999.

APÊNDICE A - CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS POR GC-ECD

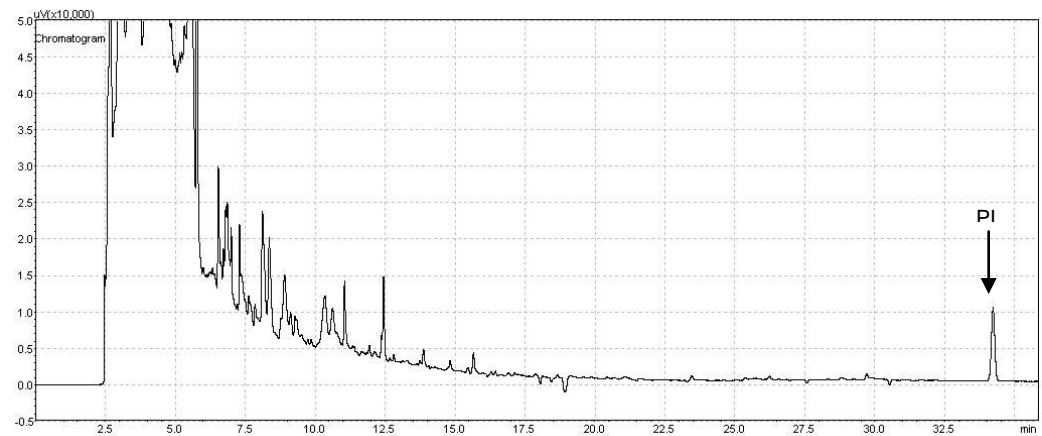
Mel 1



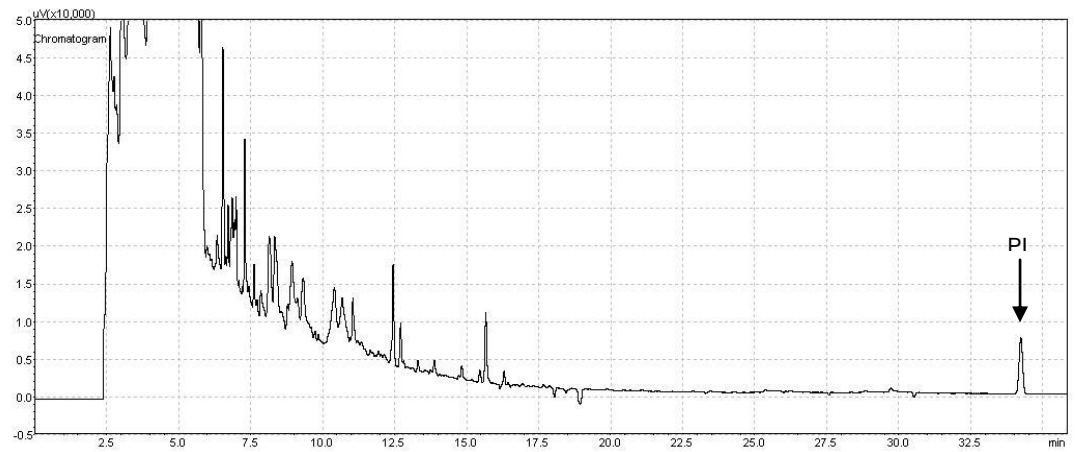
Mel 2



Mel 3



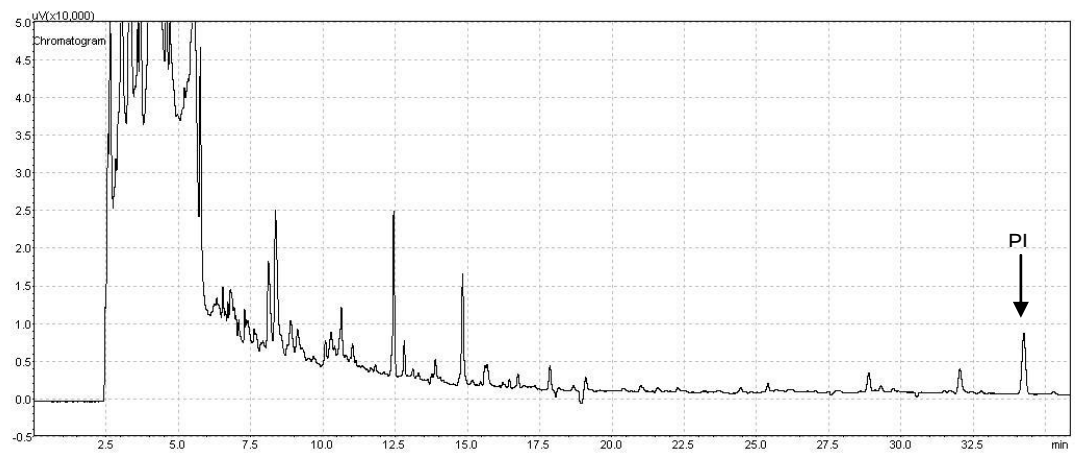
Mel 4



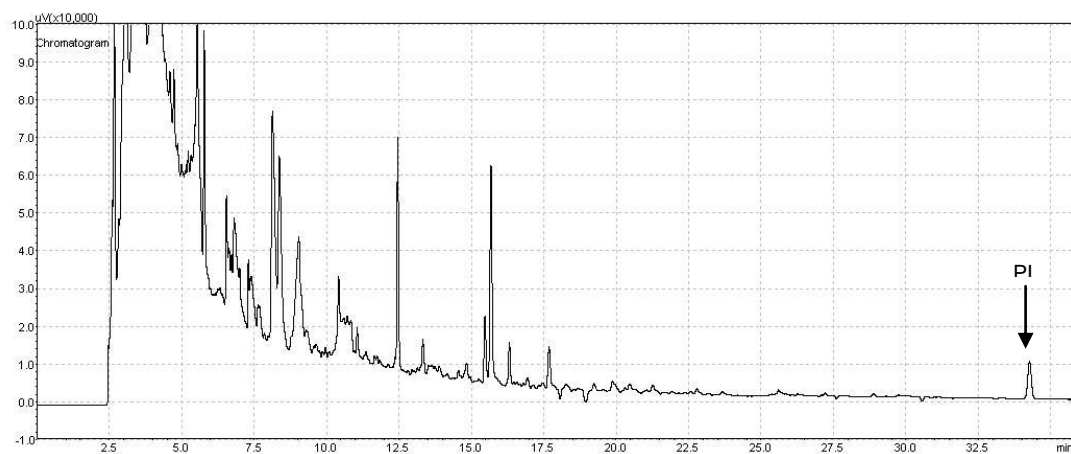
Mel 5



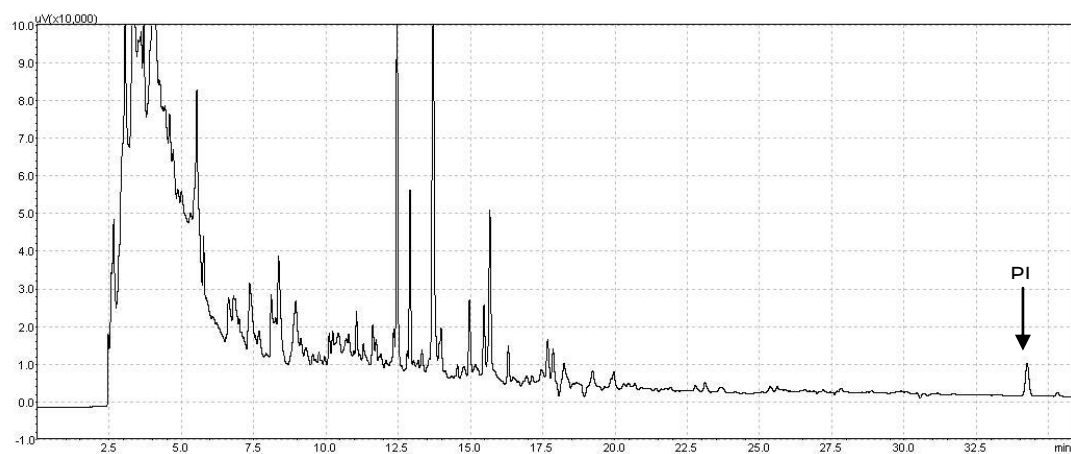
Mel 6



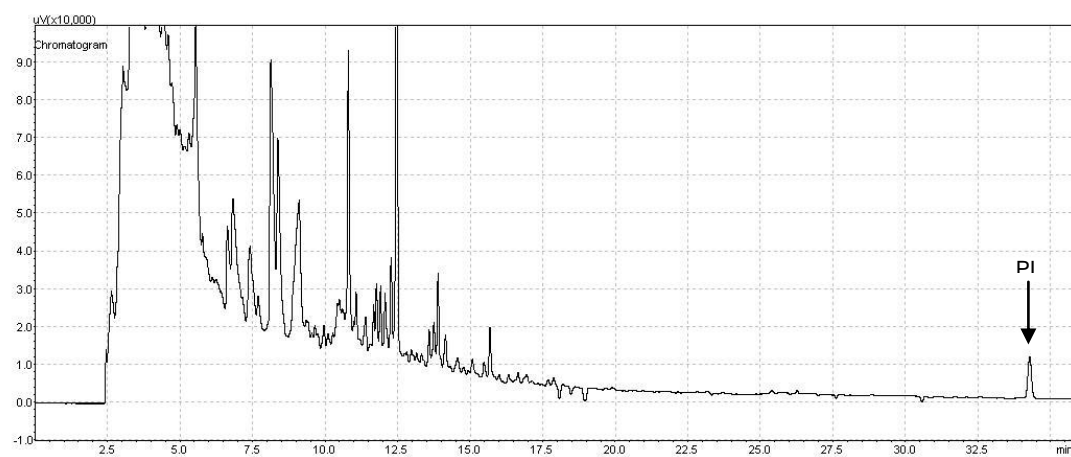
Mel 7



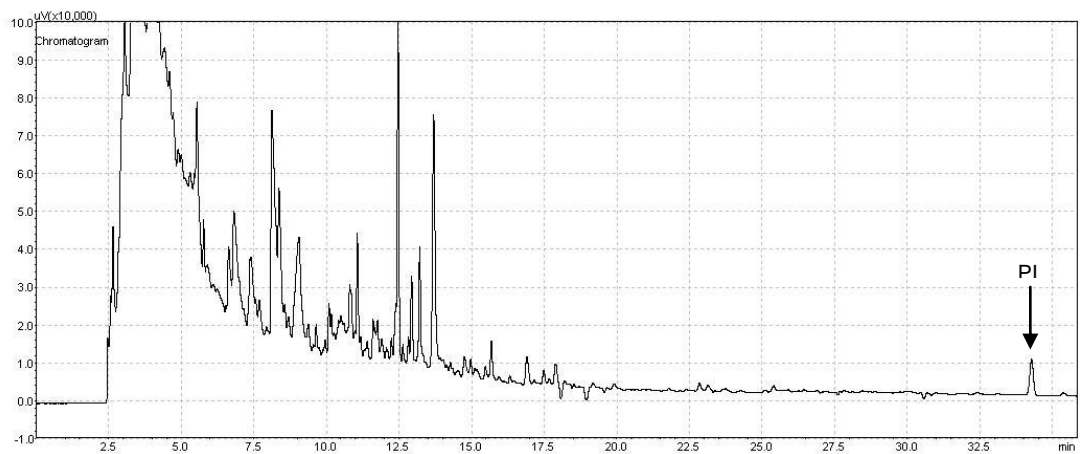
Mel 8



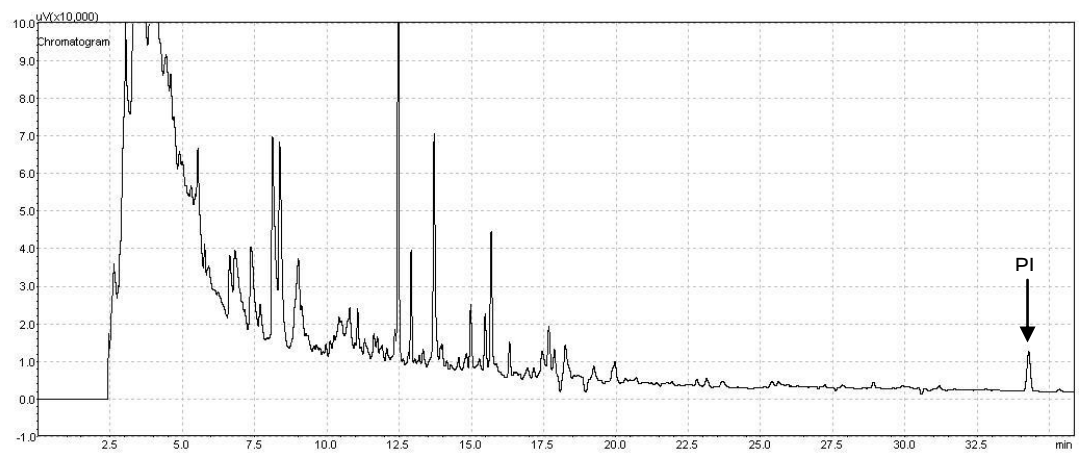
Mel 9



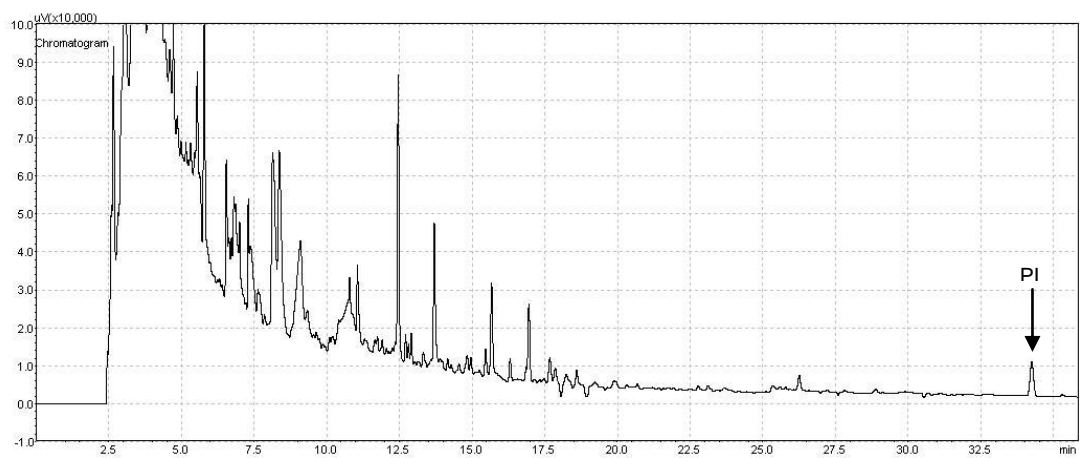
Mel 10



Mel 11



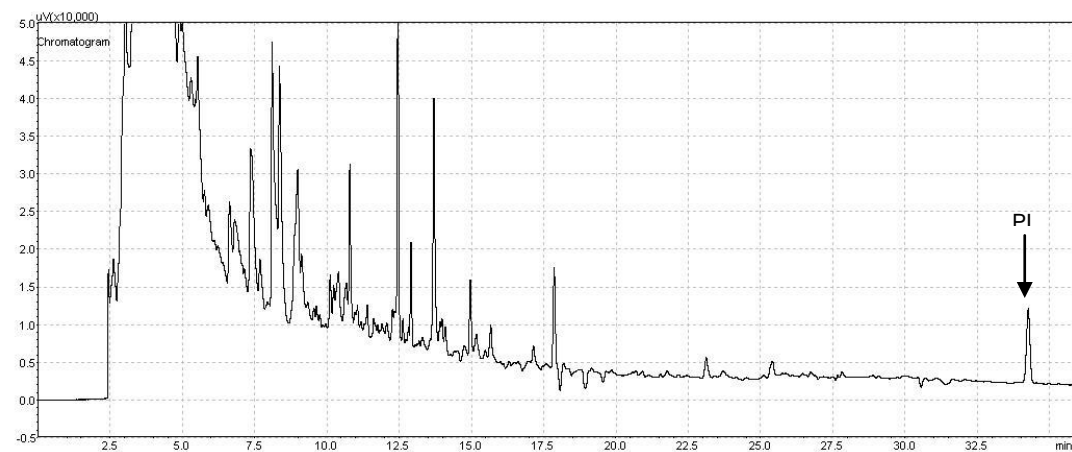
Mel 12



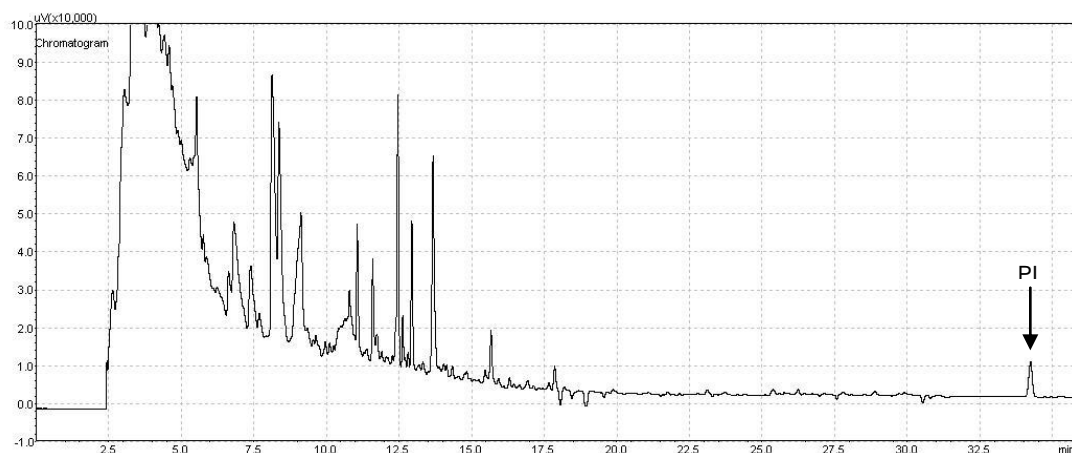
Mel 13



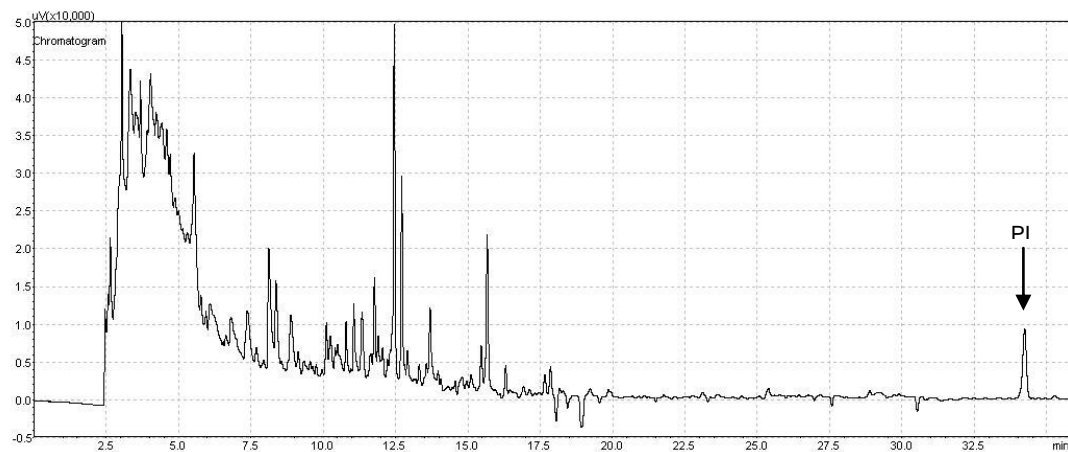
Mel 14



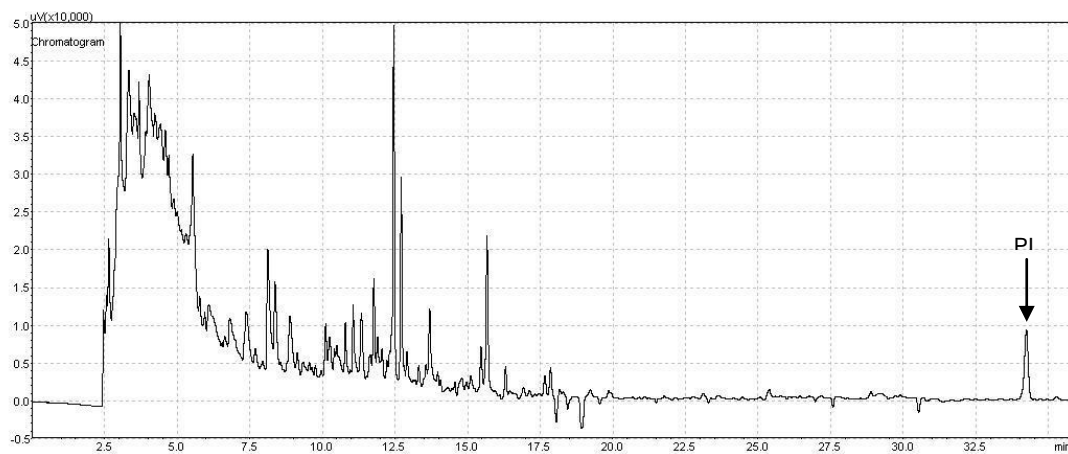
Mel 15



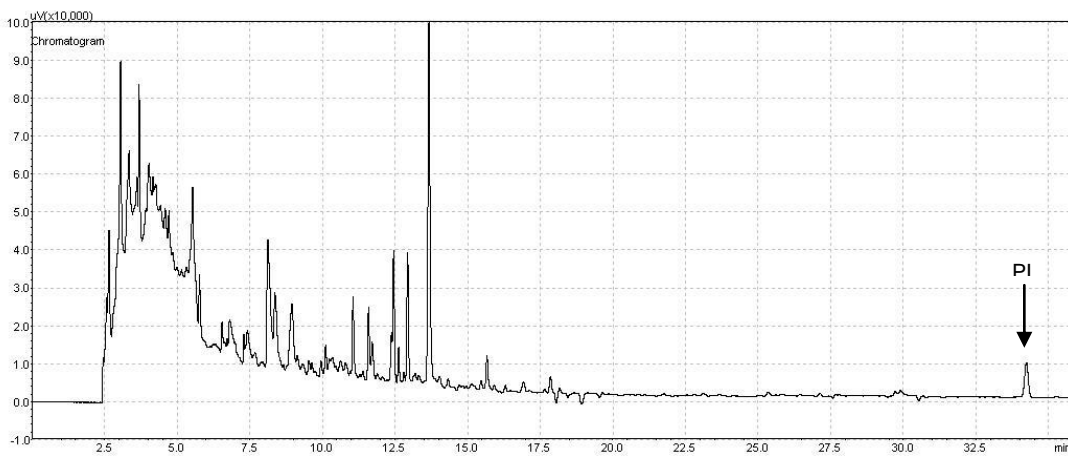
Mel 16



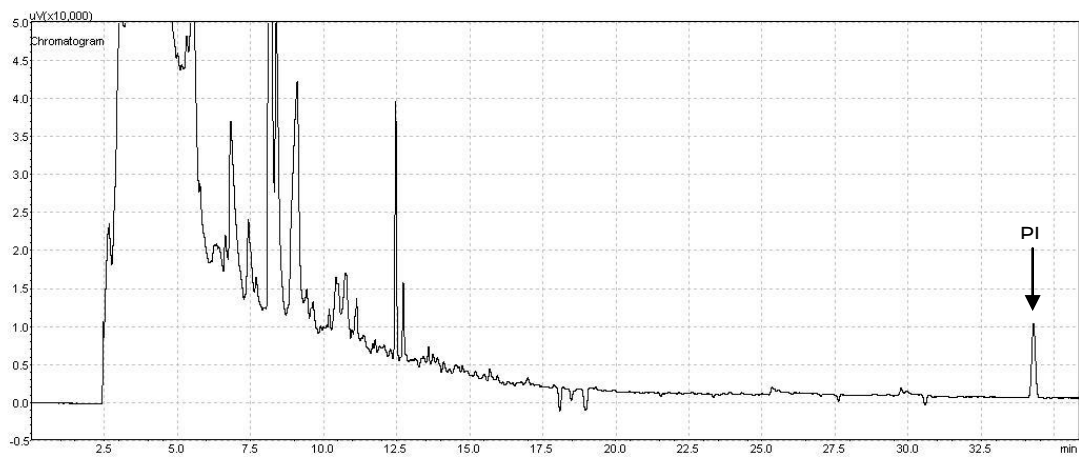
Mel 17



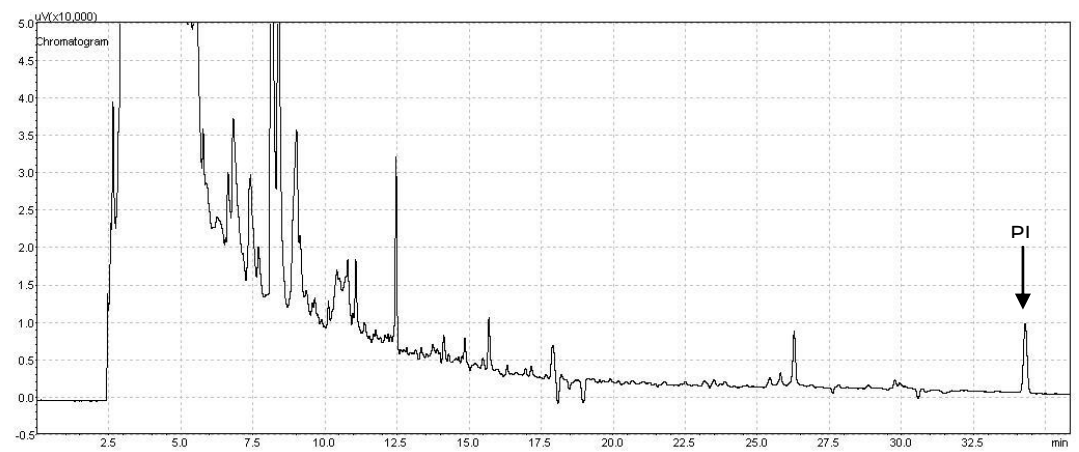
Mel 18



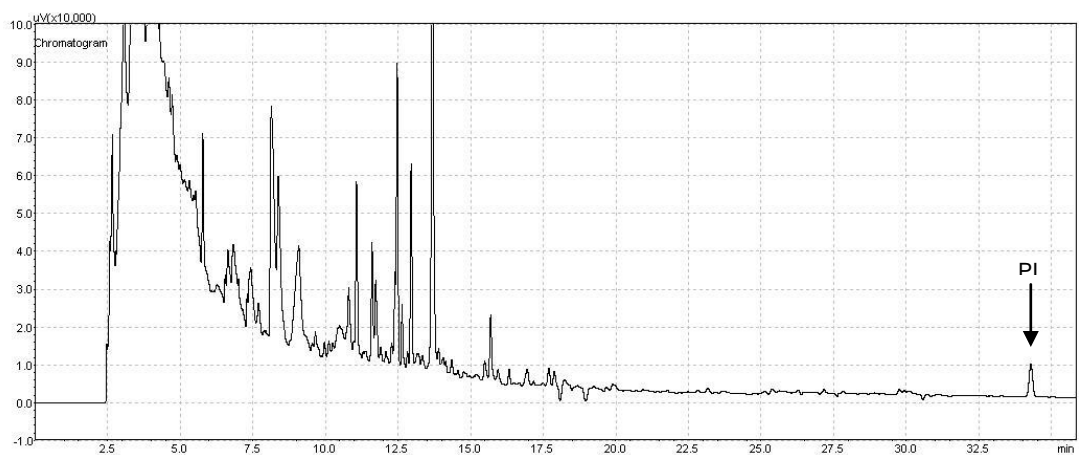
Mel 19



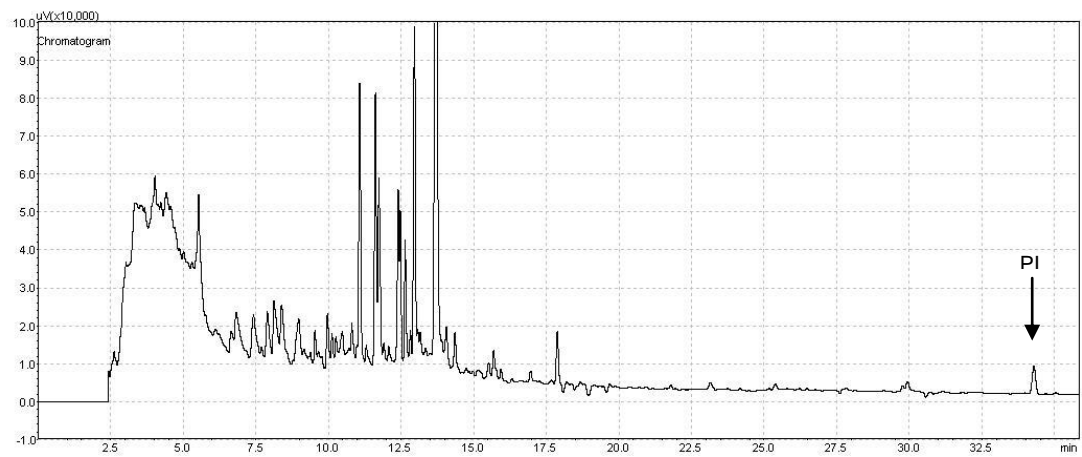
Mel 20



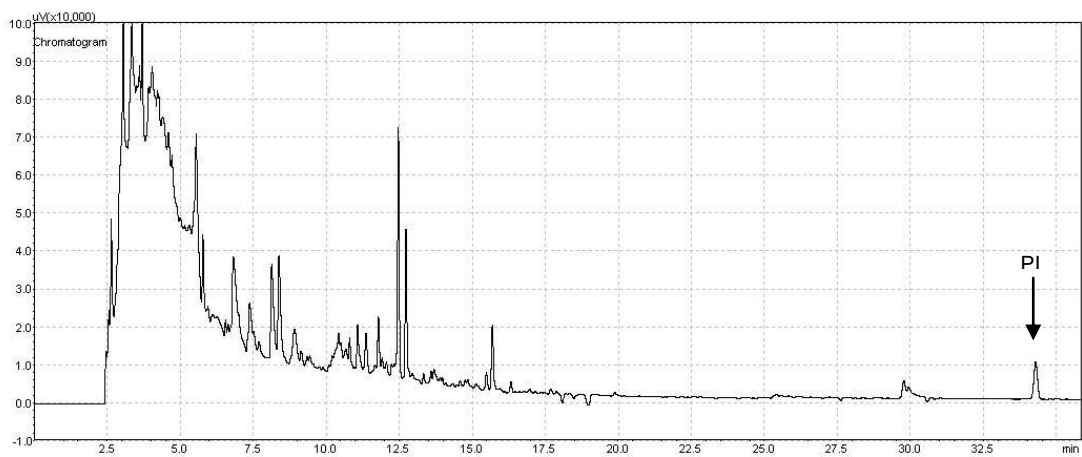
Mel 21



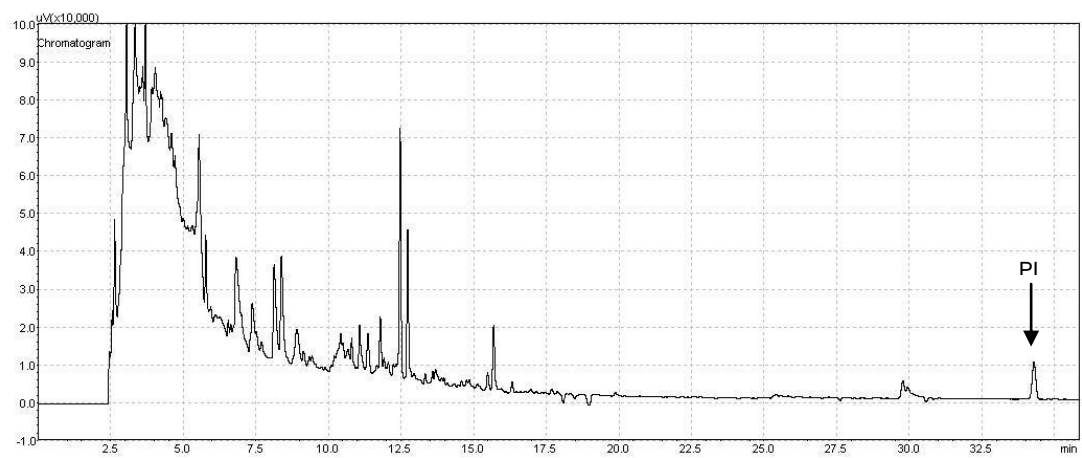
Mel 22



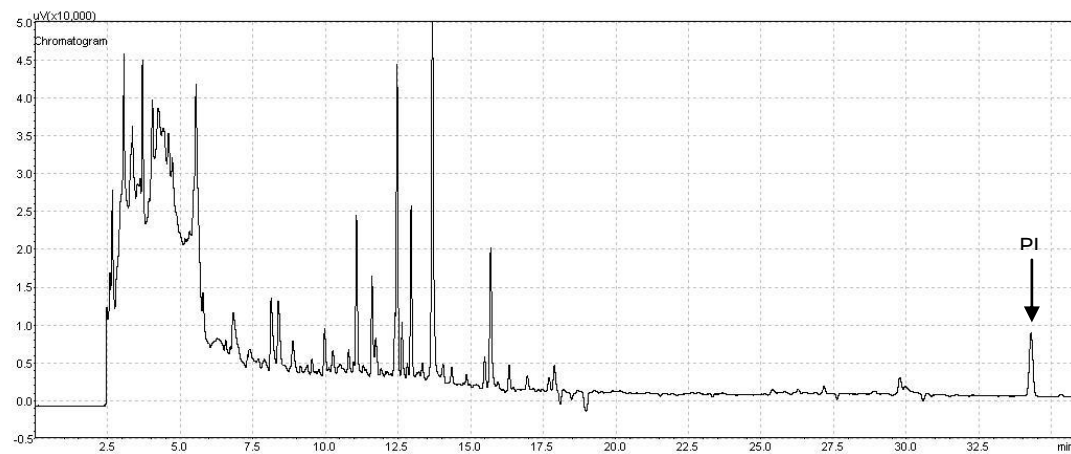
Mel 23



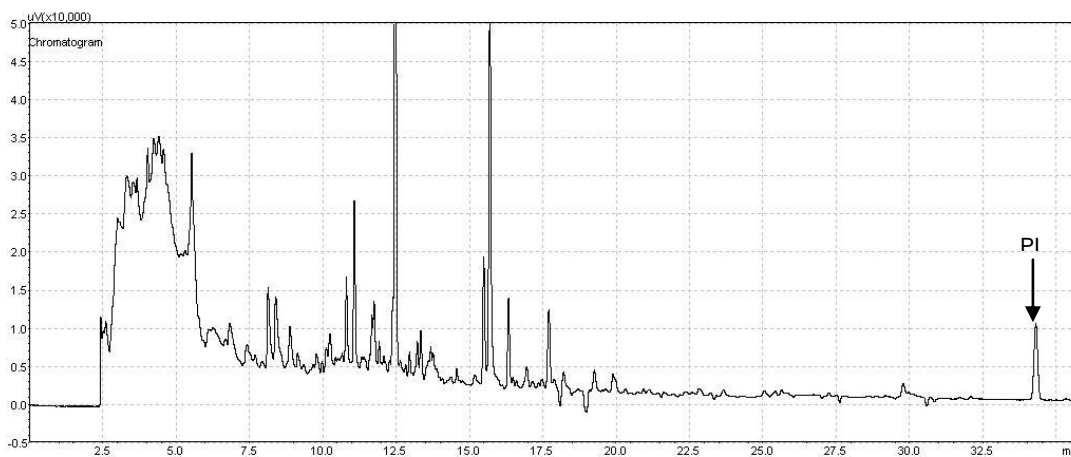
Mel 24



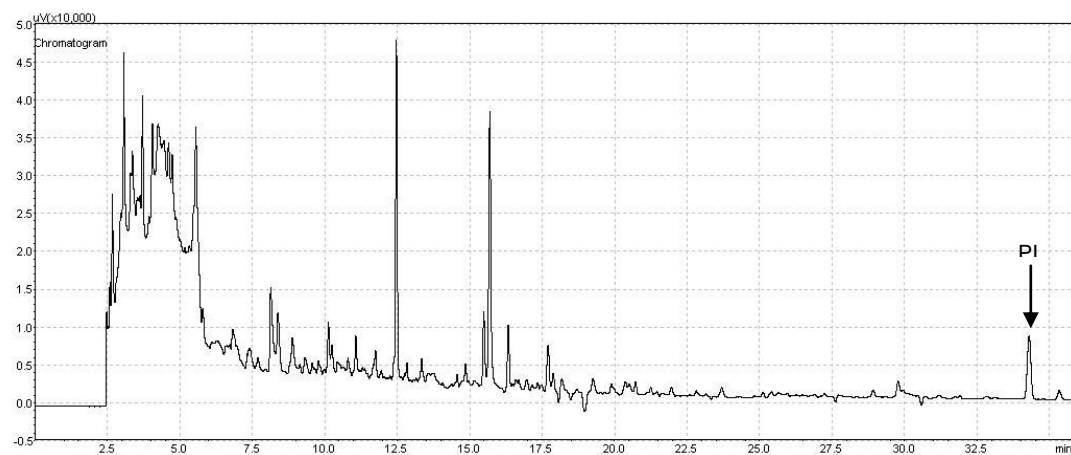
Mel 25



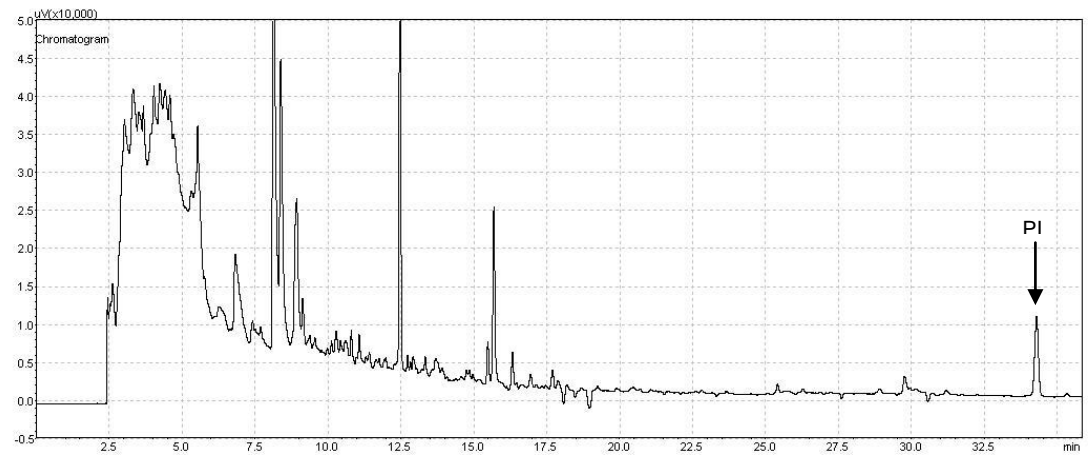
Mel 26



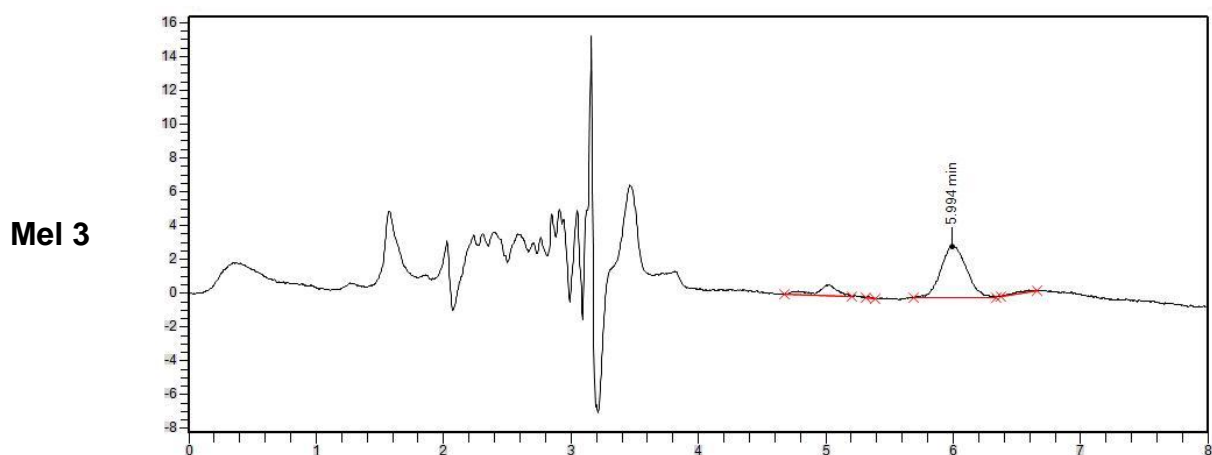
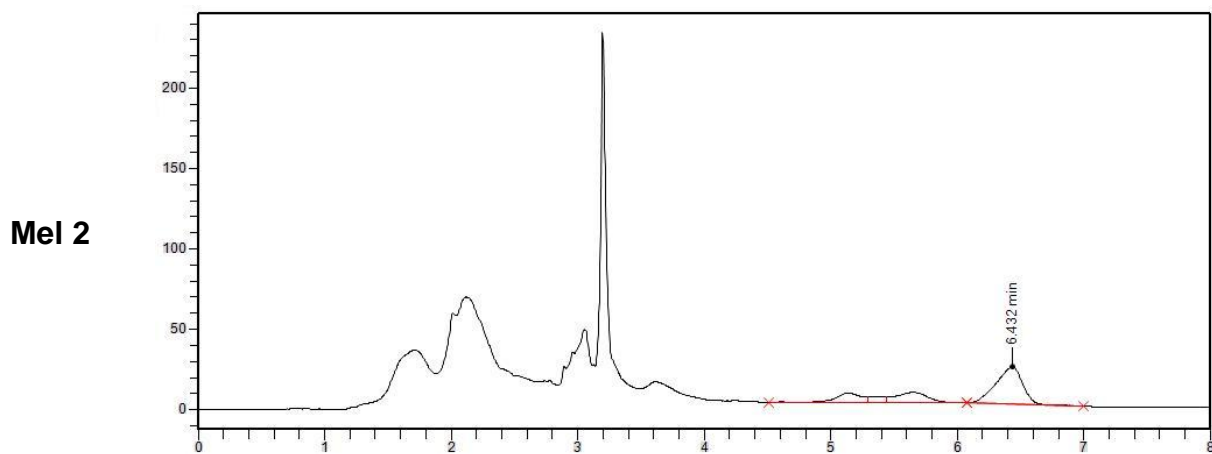
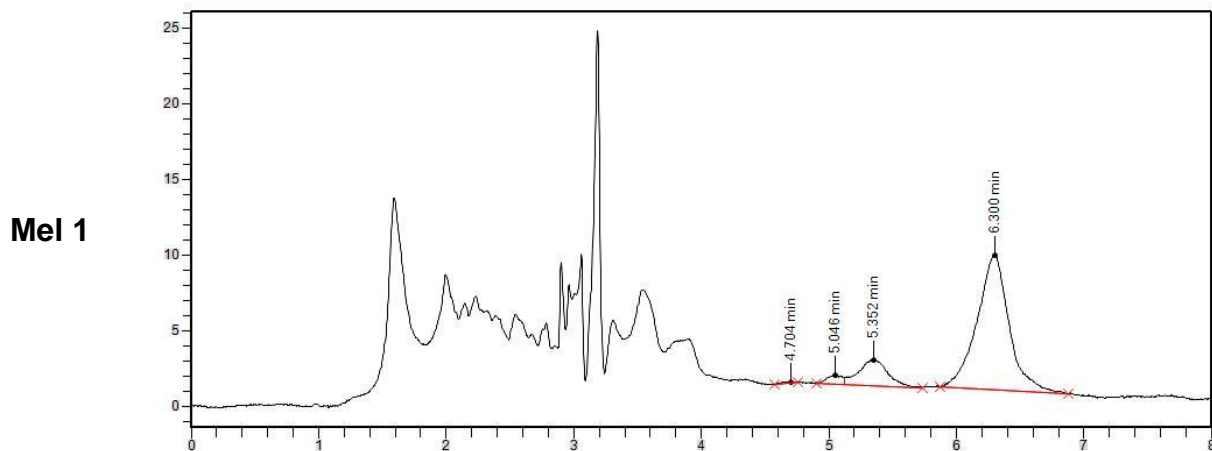
Mel 27



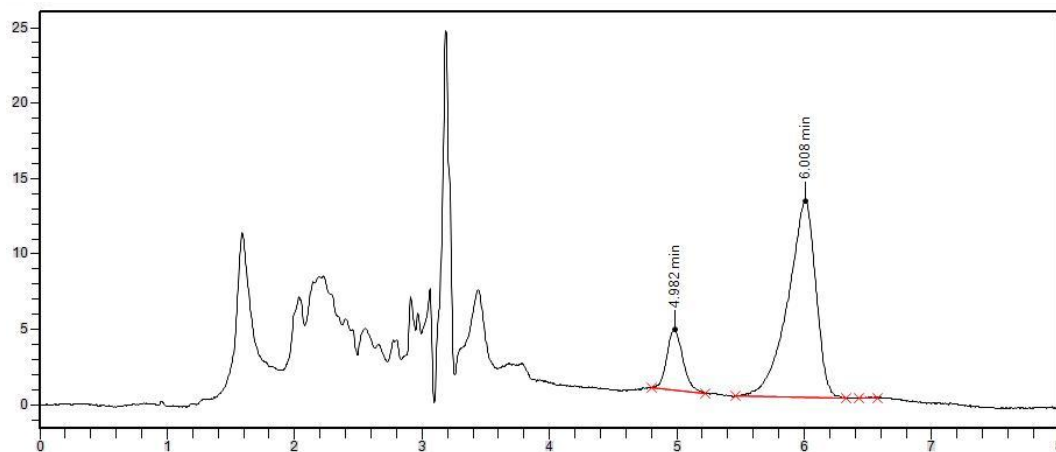
Mel 28



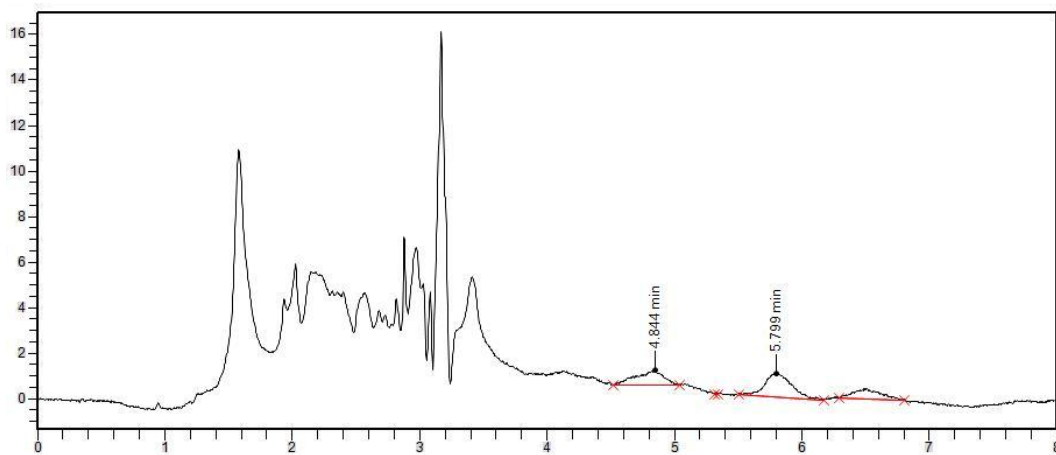
APÊNDICE B - CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS POR HPLC-DAD



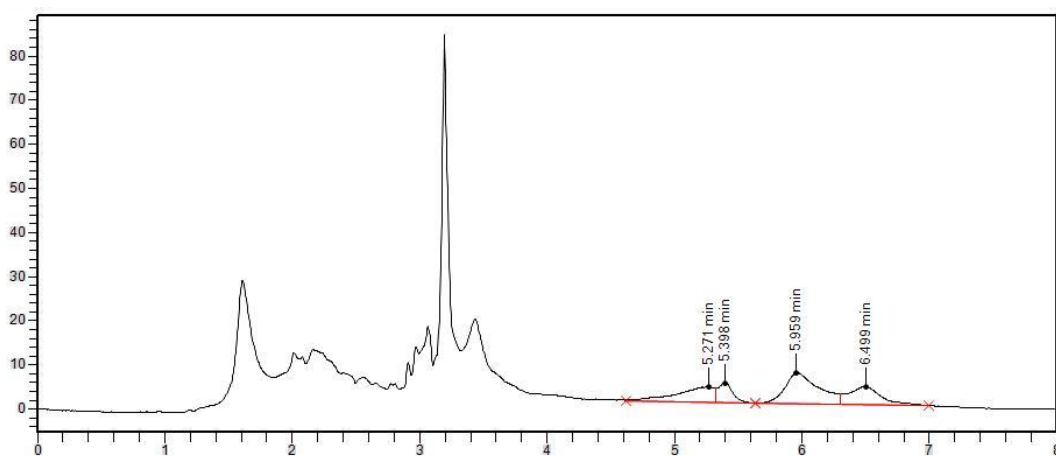
Mel 4



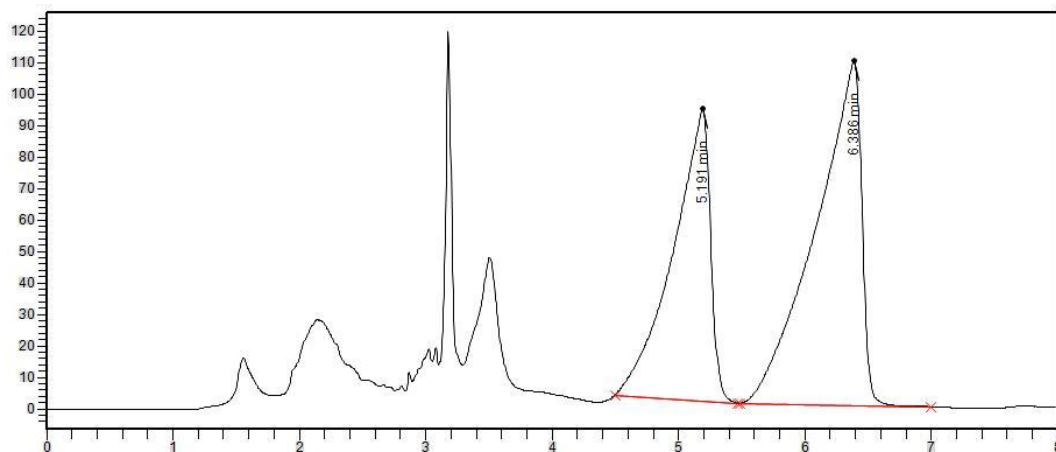
Mel 5



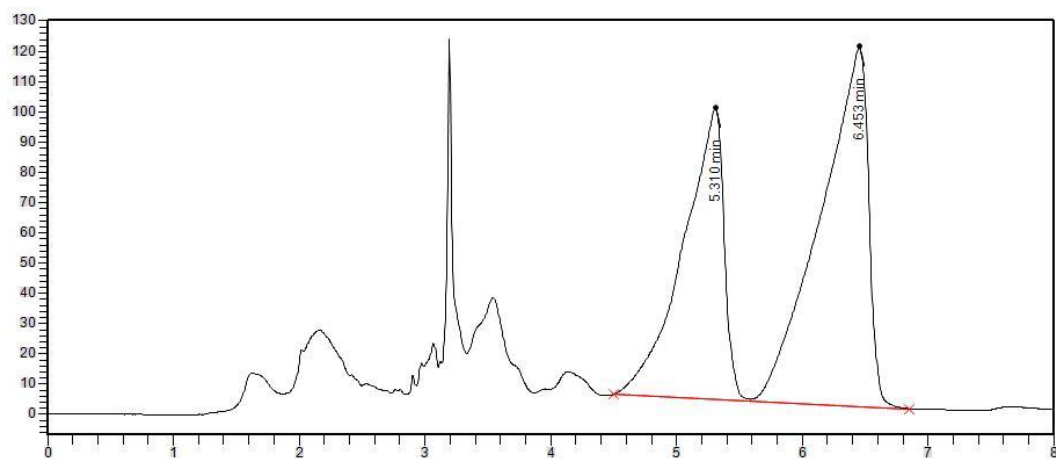
Mel 6



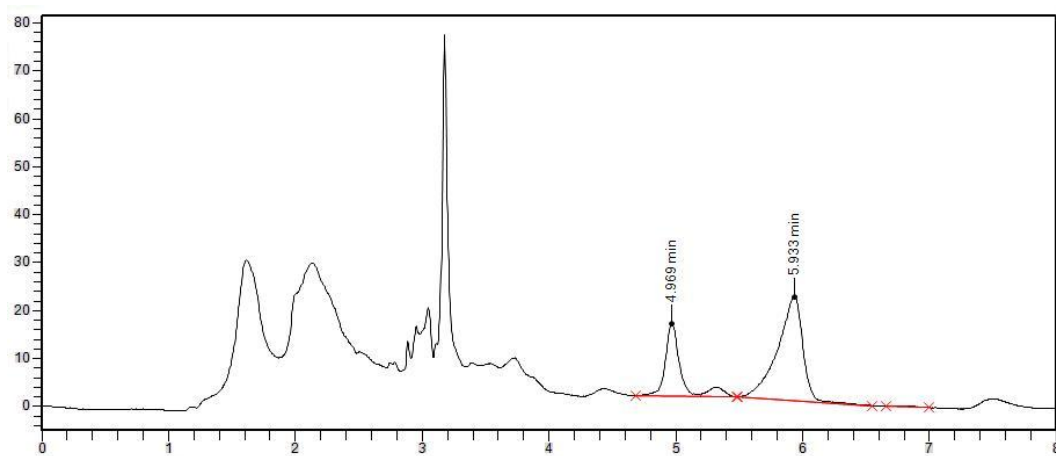
Mel 7



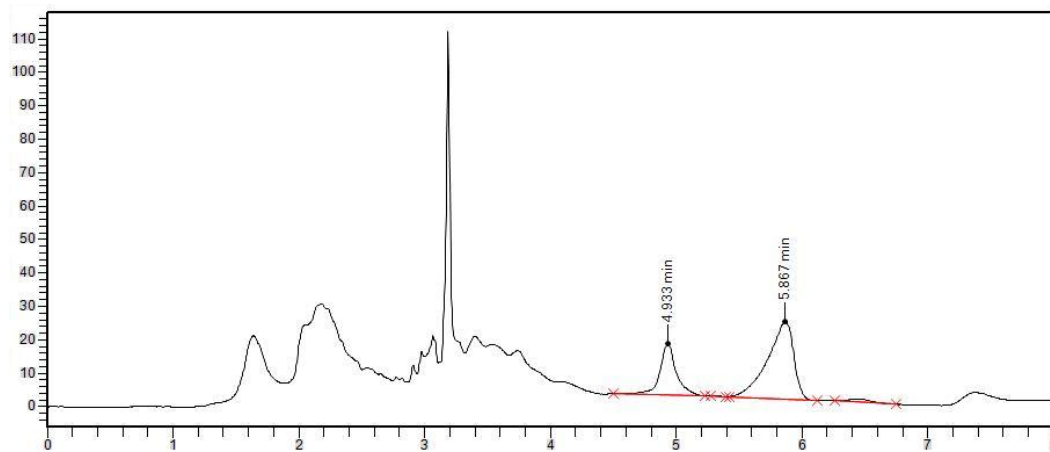
Mel 8



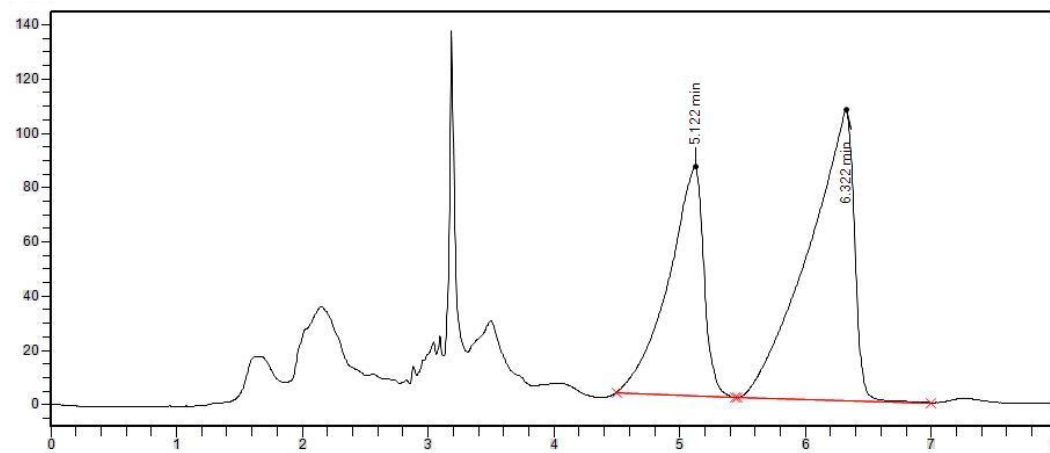
Mel 9



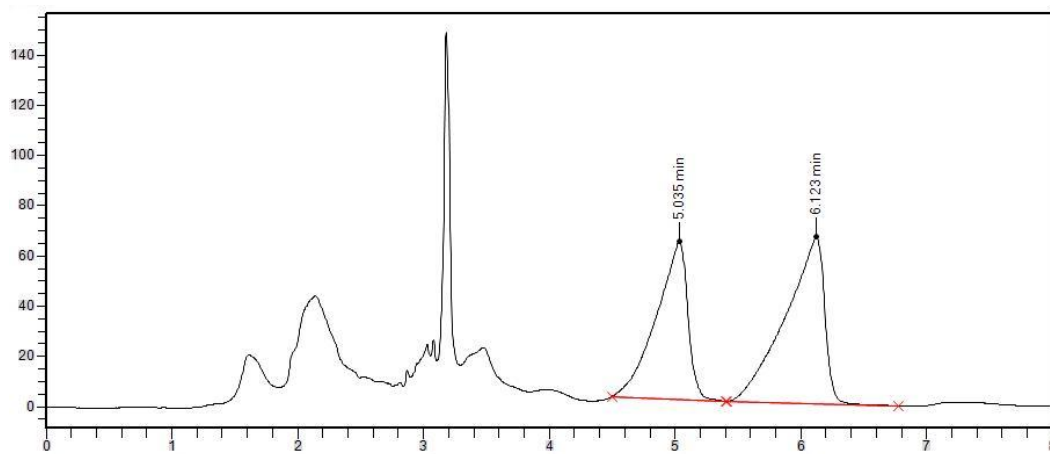
Mel 10



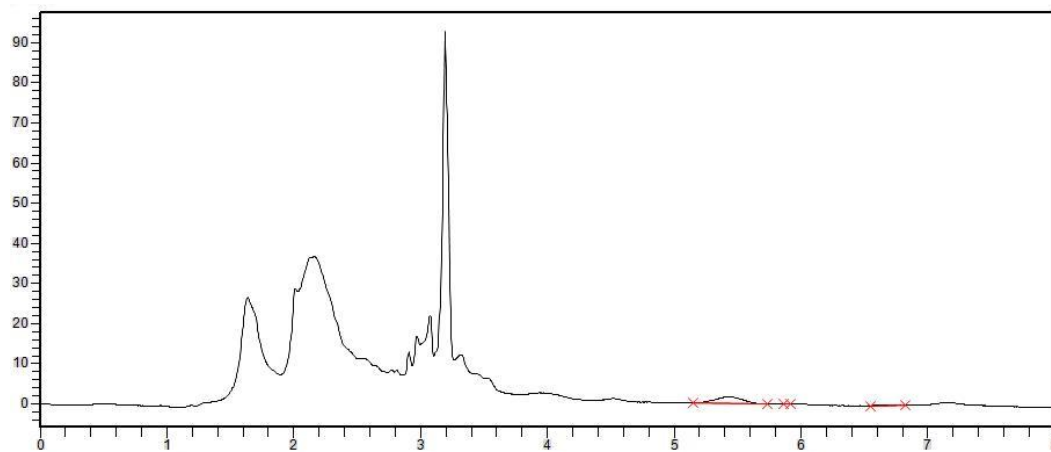
Mel 11



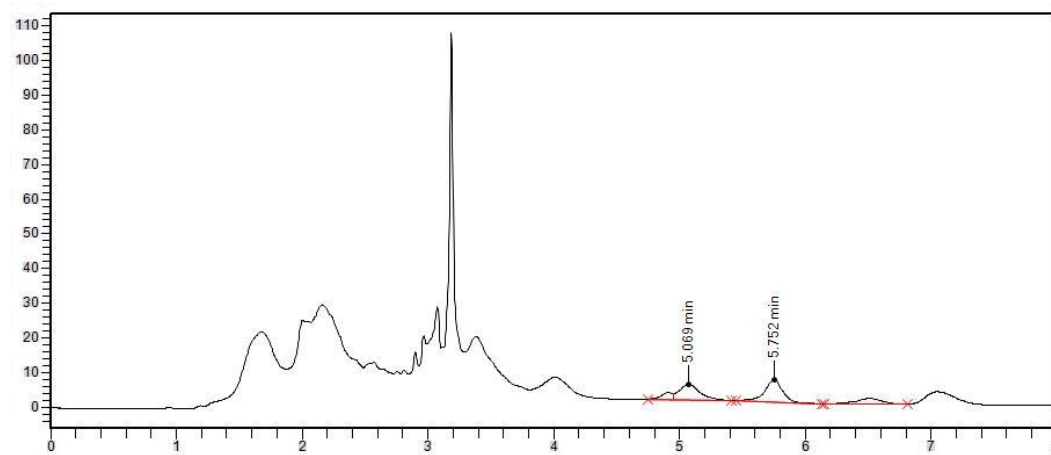
Mel 12



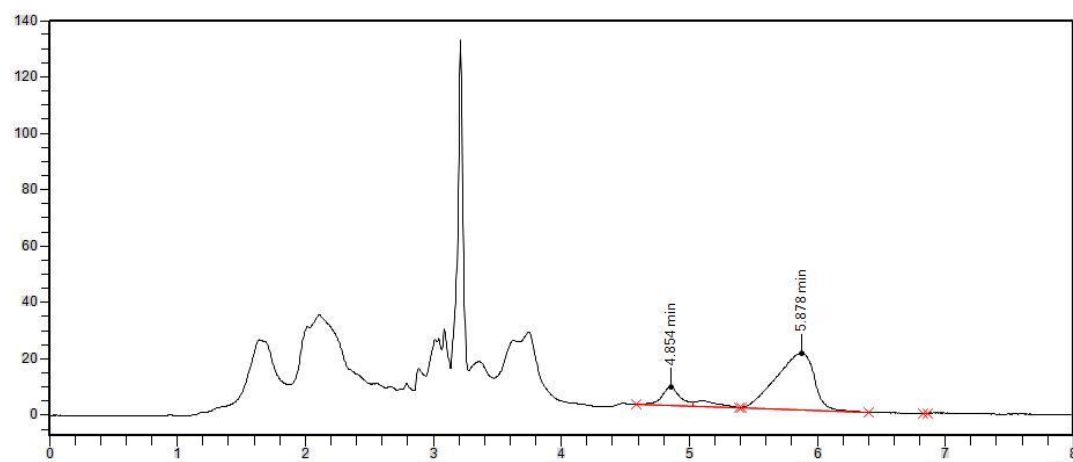
Mel 13



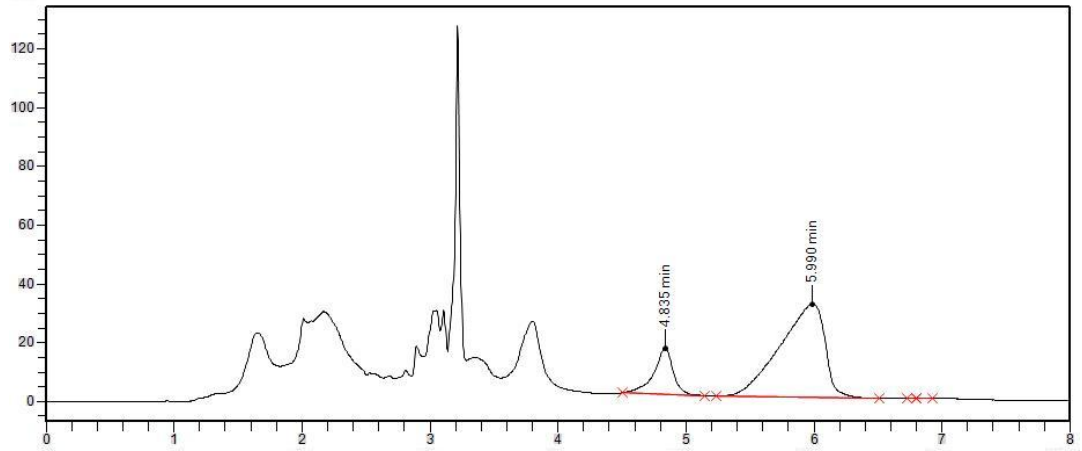
Mel 14



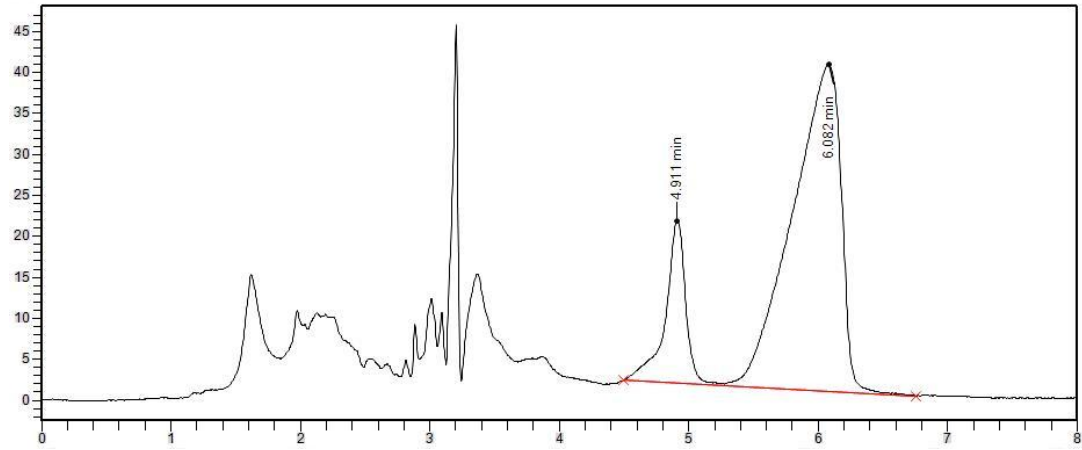
Mel 15



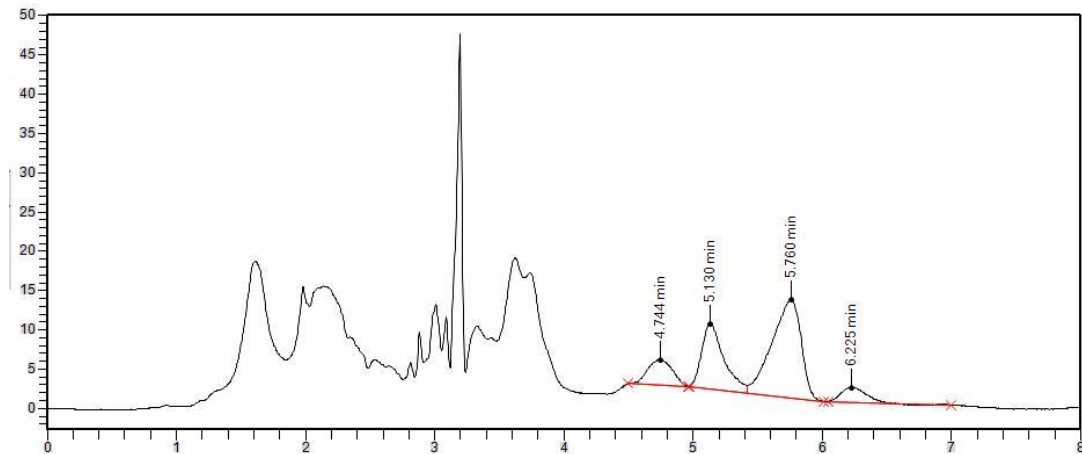
Mel 16



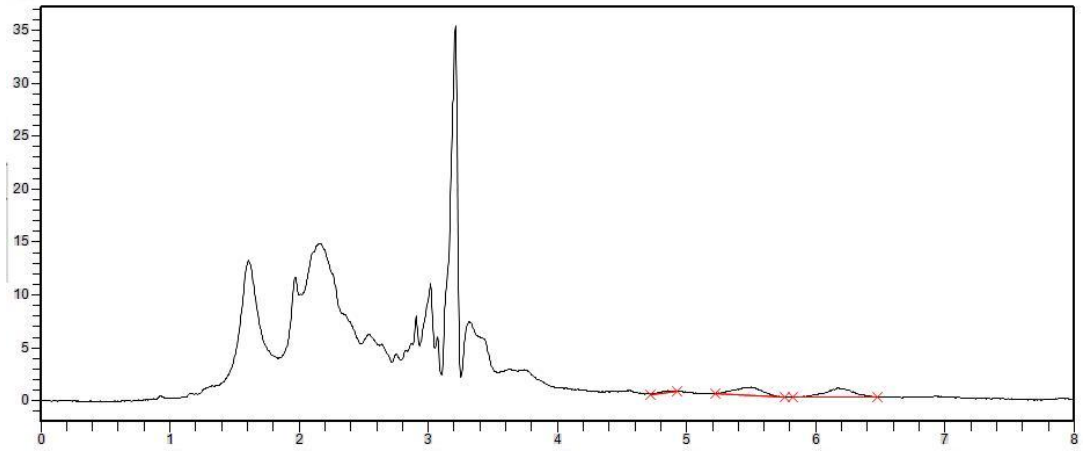
Mel 17



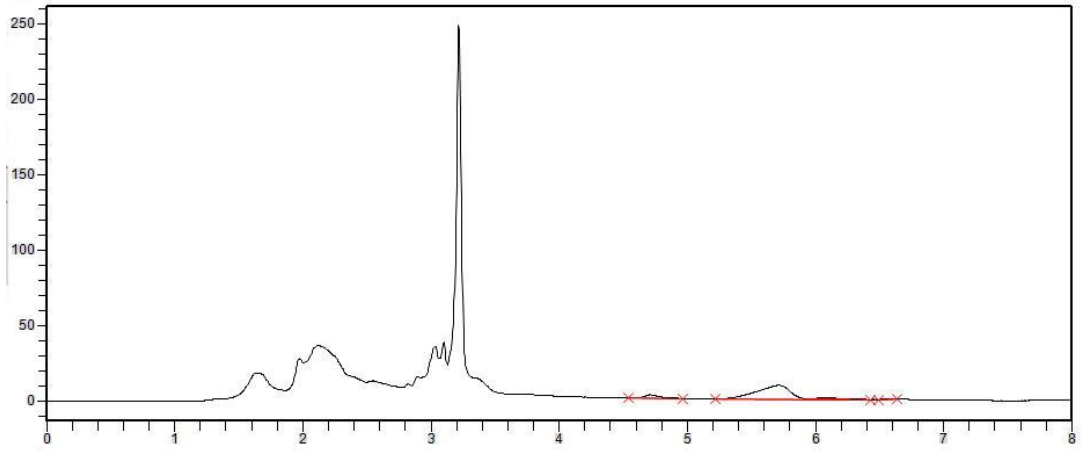
Mel 18



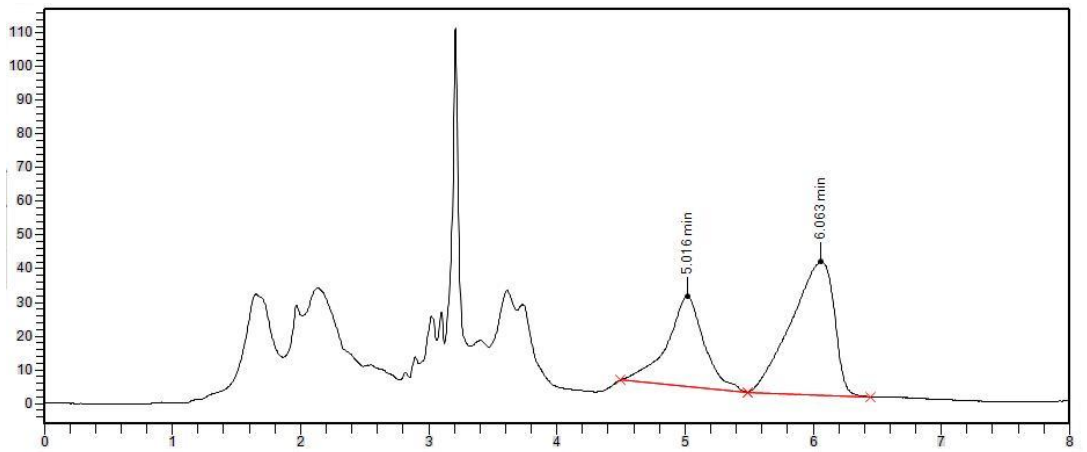
Mel 19



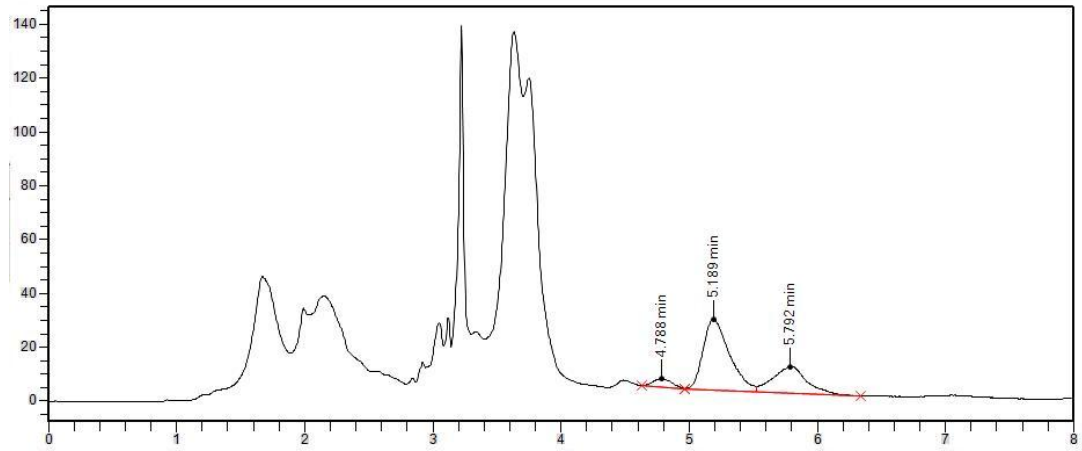
Mel 20



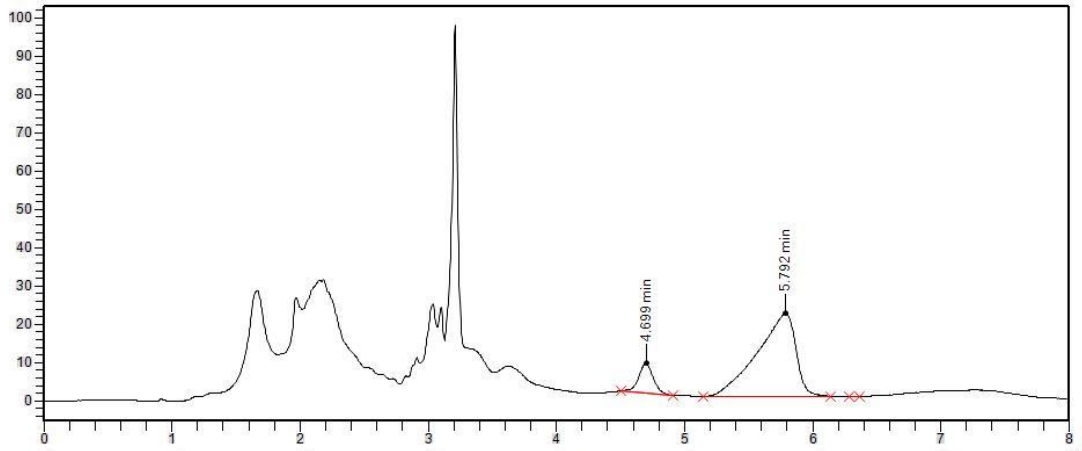
Mel 21



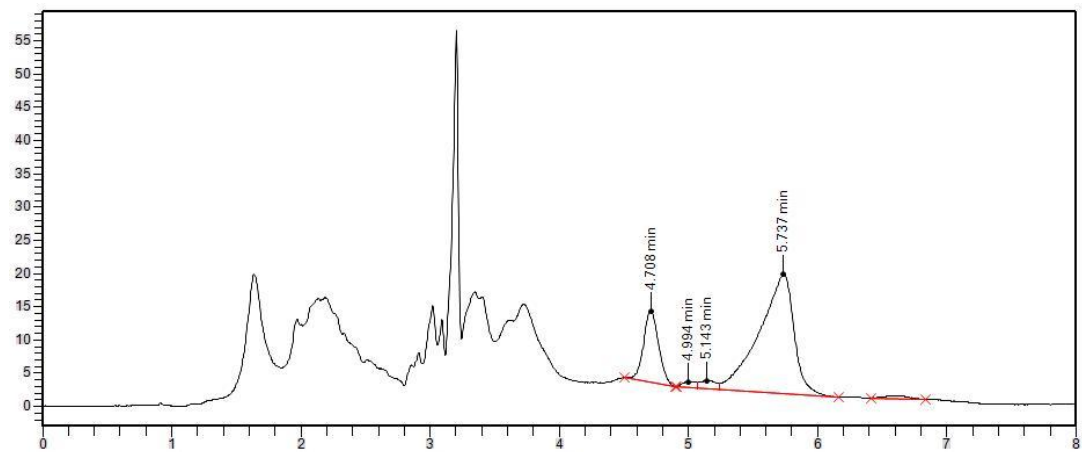
Mel 22



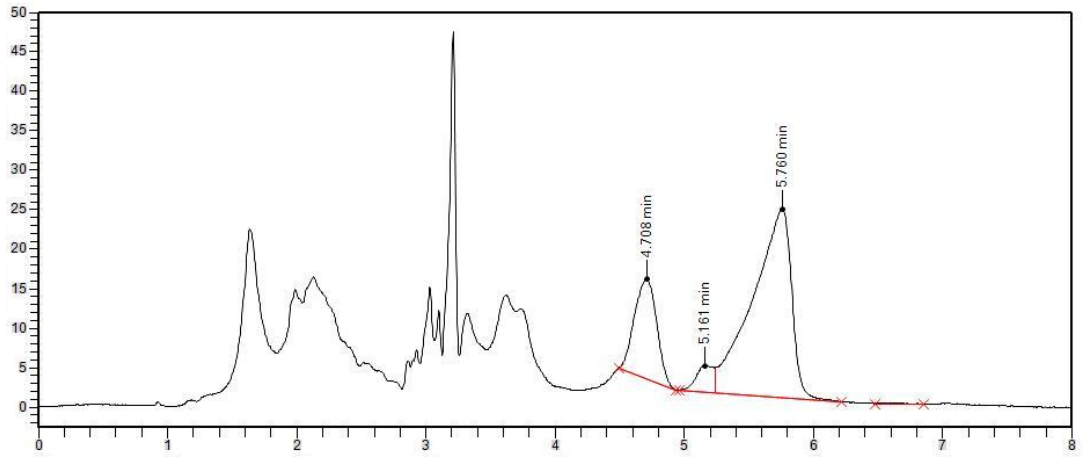
Mel 23



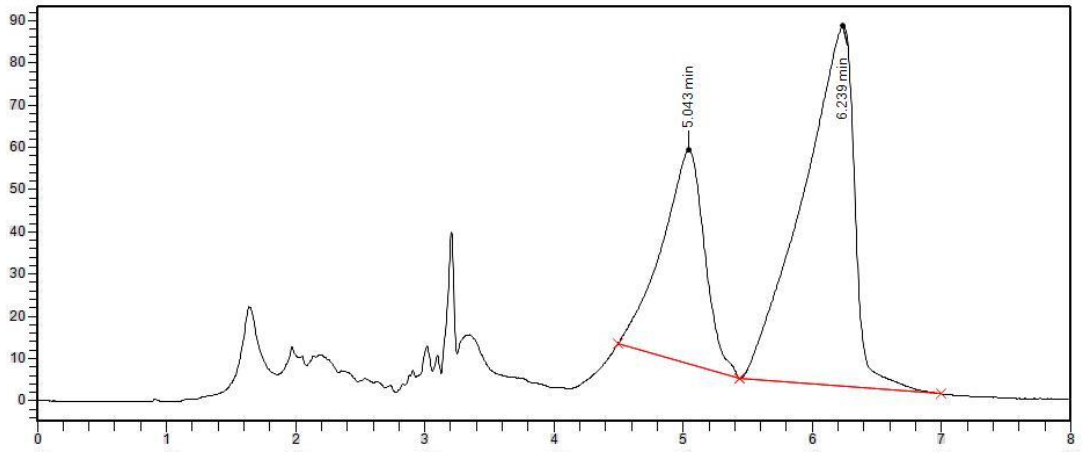
Mel 24



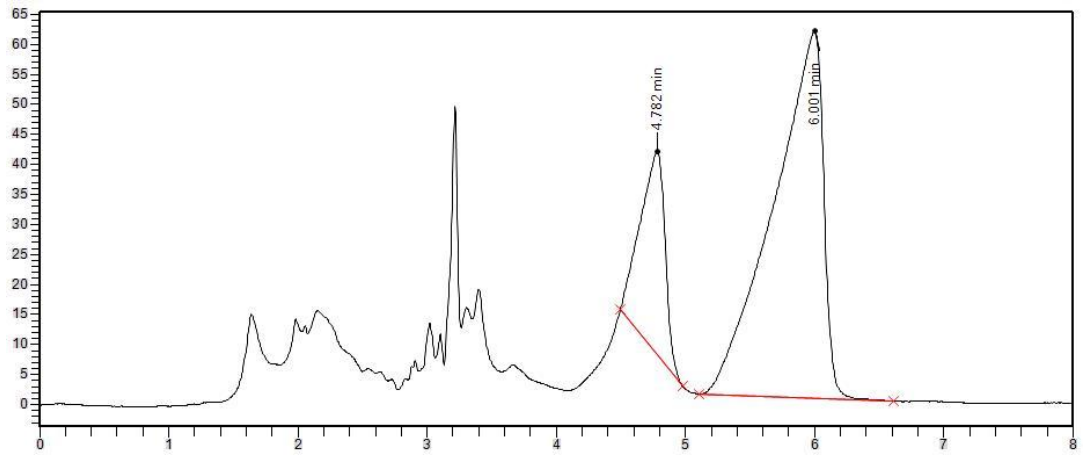
Mel 25



Mel 26



Mel 27



MeI 28

