

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCONIEL NETO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MULTIRESIDUAL PARA ANÁLISE DE
PESTICIDAS EM MEL, UTILIZANDO CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO COM
DETECTOR ESPECTROFOTOMÉTRICO COM ARRANJO DE DIODOS**

São Luís – MA

2009

MARCONIEL NETO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MULTIRESIDUAL PARA ANÁLISE DE
PESTICIDAS EM MEL, UTILIZANDO CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO COM
DETECTOR ESPECTROFOTOMÉTRICO COM ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco.

São Luís – MA

2009

Silva, Marconiel Neto da

Desenvolvimento de método multiresidual para análise de pesticidas em mel, utilizando cromatografia a líquido com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos / Marconiel Neto da Silva. – São Luís, 2009.

72 f.

Orientadora: Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco.

Impresso por computador (fotocopia)

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química. São Luis, 2009.

1. Mel – Resíduos – Pesticidas. 2. Pesticidas. 3. Extração fase sólida. I. Franco, Teresa Cristina Rodrigues dos Santos, orient. II. Título

CDU 638.16:632.95.028:543.54

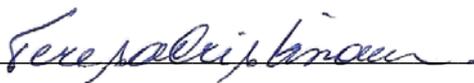
MARCONIEL NETO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MULTIRESIDUAL PARA ANÁLISE DE
PESTICIDAS EM MEL, UTILIZANDO CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO COM
DETECTOR ESPECTROFOTOMÉTRICO COM ARRANJO DE DIODOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, Área de concentração Química Analítica.

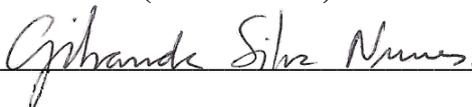
Aprovada em 30 de Janeiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA



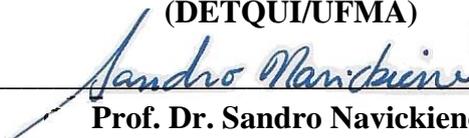
Prof^ª Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco

(Orientadora)



Prof^ª Dra. Gilvanda Silva Nunes

(DETQUI/UFMA)



Prof. Dr. Sandro Navickiene

(DQI/UFS)

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, único e verdadeiro líder em toda a história da humanidade, e que guia meus passos nessa jornada da vida.

Aos meus pais, Geraldo Neto da Silva e Maria Roza da Silva, pelo apoio, dedicação e pelos ensinamentos.

À minha madrinha e tia, Ivonete do Espírito Santo, e ao meu padrinho e tio, José Pereira de Mesquita, pelo apoio e força nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Francisco, Dorivan, Eraldo, Adão, Eva e Geraldo Filho, pelo apoio, companheirismo e incentivo em todos os momentos de minha vida.

À Profa. Dra. Teresa Cristina R. Santos Franco, pela orientação sempre firme, e pela paciência, valiosas informações científicas e dedicação.

À UFMA, por ter sido minha casa, novamente, durante minha pós-graduação, e ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, pelo apoio institucional e pela oportunidade oferecida.

Aos amigos integrantes do Laboratório NARP, pelo companheirismo.

Aos meus amigos, em especial Leandra Thais, Crediciomar, Gladson, Adilton, Marynalldo, Stelmo e Newton, aos quais agradeço pela lealdade e agradável convívio, pelas conversas e pelos momentos agradáveis compartilhados.

Em especial, a Girleane Porto Sousa, pelo apoio e força nos momentos difíceis, companheirismo e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Ao programa de Pós-graduação em Química/UFMA, pelas condições de trabalho.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão desse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

MUITO OBRIGADO!

“Só amando é que se vive.”

(Ivan Medeiros/Lucimar)

RESUMO

O mel é um produto de reconhecidas propriedades nutritivas e terapêuticas e, o qual pode atuar como um excelente bioindicador, dada à forma como as abelhas recolhem e processam a matéria-prima utilizada na sua elaboração. O monitoramento de resíduos de pesticidas no mel é importante, tanto para o controle de qualidade do produto nos mercados nacional e internacional, quanto na avaliação do potencial de contaminação em áreas próximas a cultivos agrícolas. Considerando tais fatos, foi desenvolvido um método para análise dos inseticidas carbamatos (carbaril e carbofurano), organoclorados (aldrin e dieldrin), organofosforados (dimetoato e parationa metílica) e piretróide (permetrina), além do herbicida do grupo das anilidas (propanil) e fenoxiácidos (2,4-D) em mel. Para tanto, neste trabalho foram estabelecidas condições analíticas para a adequada determinação dos resíduos dos citados pesticidas utilizando a técnica de extração em fase sólida e cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica com arranjo de diodos. O trabalho teve como objetivo comparar diferentes condições analíticas para a determinação dos pesticidas, buscando-se melhor separação, sensibilidade, precisão e exatidão na determinação de resíduos dos pesticidas em amostras de mel de abelhas. Soluções-padrão em concentrações variando de 1,0 a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram avaliadas em diferentes fases móveis, utilizando-se coluna C_{18} (250 x 4.6 mm d.i., 5 μm). A composição da fase móvel mais adequada foi acetonitrila:água em pH 3,0 (acidificada com ácido acético), em modo gradiente, monitorando-se os compostos em comprimento de onda de 220 nm. Nas condições estabelecidas, excetuando-se aldrin, dieldrin e dimetoato, foram observadas recuperações entre 75,26% a 113,58%, com coeficientes de variação entre 2,16% a 11,31%, para níveis de concentração entre 0,10 a 1,00 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (coeficientes de correlação entre 0,9978 e 0,9998). Recuperações inferiores a 50 % foram, entretanto, observadas para os citados inseticidas, utilizando-se solvente extrator acetato de etila e eluição com acetato de etila, sendo necessários novos estudos para obtenção de melhores recuperações para tais compostos.

Palavras-chaves: Pesticidas. Mel. HPLC-DAD. Extração em fase sólida, SPE.

ABSTRACT

Honey is a product of proven therapeutic and nutritional properties, and which may act as an excellent bioindicator, given the way the bees gather and process the raw material used in its preparation. The monitoring of pesticide residues in honey is important both to control product quality in domestic and international markets, and in assessing the potential for contamination in areas near agricultural crops. Considering these facts, we developed a method for analyzing carbamate insecticides (carbaryl and carbofuran), organochlorine (aldrin and dieldrin), organophosphates (dimethoate and parathion methyl) and pyrethroid (permethrin), and the group of anilides herbicide (propanil) and fenoxiácidos (2,4-D) in honey. Hence, in this work the analytical conditions were established for the proper determination of residues of pesticides cited using the technique of solid phase extraction and liquid chromatography with UV detection with a diode array. The study aimed to compare different analytical conditions for the determination of pesticides, looking for better separation, sensitivity, precision and accuracy in the determination of pesticide residues in samples of honey bees. Standard solutions at concentrations ranging from 1.0 to 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were evaluated in different mobile phases, using a C18 column (250 x 4.6 mm id, 5 μm). The mobile phase composition more suitable was acetonitrile: water at pH 3.0 (acidified with acetic acid) in gradient mode, for monitoring the compounds at a wavelength of 220 nm. In the established conditions, except for aldrin and dieldrin and dimeotate, it was observed recoveries between 75.26% and 113.58%, with variation Coefficients Between 2.16% and 11.31% for concentration levels raging from 0:10 to 1.00 $\mu\text{g g}^{-1}$ (correlation coefficients between 0.9978 and 0.9998). Recoveries lower than 50% to the cited insecticides were observed when using ethyl acetate solvent extractor and the solvent elution by ethyl acetate, in such a way new studies can be done to obtain better recoveries for these compounds.

Palavras-chaves: Pesticidas. Mel. HPLC-DAD. Extração em fase sólida, SPE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias de contaminação de mel por pesticidas (OTERO, 2007).....	22
Figura 2.	Fórmula estrutural do dimetoato.....	26
Figura 3.	Fórmula estrutural do parationa metílica.....	26
Figura 4.	Fórmula estrutural do carbaril.....	28
Figura 5.	Fórmula estrutural do carbofurano.....	28
Figura 6.	Fórmula estrutural da permetrina.....	30
Figura 7.	Fórmula estrutural do 2,4-D.....	31
Figura 8.	Fórmula estrutural do propanil.....	32
Figura 9.	Fórmula estrutural do aldrin.....	34
Figura 10.	Fórmula estrutural do dieldrin.....	34
Figura 11.	Etapas envolvidas na técnica de Extração em Fase Solida.....	41
Figura 12.	Fluxograma do procedimento de extração.....	52
Figura 13.	Gradiente da fase móvel: ACN:H ₂ O (acidificada com ácido acético, pH 3,0) Fluxo=1,0 mL min ⁻¹	55
Figura 14.	Cromatograma de identificação dos compostos em estudo. Condições cromatográficas: coluna Varian C-18, 5µm (250 x 4,6 mm d.i); Fase Móvel: ACN:H ₂ O modo gradiente, Fluxo=1,0 mL min ⁻¹ ; volume de injeção: 20 µL (solução padrão mistura dos pesticidas na concentração de 5 mg .L ⁻¹); detecção: 220 nm.....	55
Figura 15.	Espectro de máxima absorção na região do UV para o inseticida estudado.	56
Figura 16.	Curva analítica obtida para o dimetoato.....	57
Figura 17.	Curva analítica obtida para o Carbofurano.....	57
Figura 18.	Curva analítica obtida para o Carbaril.....	57
Figura 19.	Curva analítica obtida para o Propanil.....	57
Figura 20.	Curva analítica obtida para o Parationa Metílica.....	58
Figura 21.	Curva analítica obtida para o 2,4-D.....	58

Figura 22.	Curva analítica obtida para o Aldrin.....	58
Figura 23.	analítica obtida para o Permetrina.....	58
Figura 24.	Curva analítica obtida para o Dieldrin.....	58
Figura 25.	Cromatograma da amostra de mel sem fortificação, após EFS usando cartucho Strata [®] X.....	60
Figura 26.	Cromatograma obtido da injeção direta do solvente (acetato de etila).....	60
Figura 27.	Cromatograma de um extrato de mel sem fortificação (eluição com metanol).....	63
Figura 28.	Cromatograma de um extrato de mel fortificado (0,30 $\mu\text{g g}^{-1}$), após EFS usando cartucho Strata [®] X.....	63
Figura 29.	Cromatograma de um extrato de mel fortificada (0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$), após EFS usando cartucho Strata [®] X.....	64
Figura 30.	Cromatograma de um extrato de mel fortificada (1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$), após EFS usando cartucho Strata [®] X.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites Máximos de Resíduos (LMR) dos pesticidas em estudo para o mel.....	24
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo.....	37
Tabela 3. Composição básica do mel.....	39
Tabela 4. Principais parâmetros das metodologias na literatura para extração de pesticidas em mel.....	42
Tabela 5. Compostos utilizados, classe, fornecedor e pureza.....	49
Tabela 6. Parâmetros de validação obtidos para a análise cromatográfica dos compostos incluídos neste trabalho.....	58
Tabela 7. Valores de recuperação e precisão da metodologia para análise dos pesticidas amostras de mel fortificadas.....	61
Tabela 8. Recuperações e precisões de amostras de mel fortificadas (0,30, 0.50 e 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$) após SPE, utilizando cartuchos Strata X (retomada com metanol)...	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIFINA	Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionização Química à Pressão Atmosférica)</i>
C ₁₈	Grupo Octadecilsilano
CG/MS	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	Coefficiente de Variação
DAD	Detector Espectrofotométrico com Arranjo de Diodos
DDT	Diclorodifeniltricloro-etano
DL	Dose Letal
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido-Líquido
EPA	Agência de Proteção Ambiental
ES	Extração com solvente
EU	União Européia
FAO	<i>Food and Agricultural Organization (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)</i>
FM	Fase Móvel
GARP	Associação Nacional dos Especialistas em Resíduos, Contaminantes e Poluentes Orgânicos
ICH	<i>International Conference on Harmonization (Conferência Internacional de Harmonização)</i>
LC/EM	Cromatografia a Líquido acoplado ao Espectrômetro de Massas

LD	Limite de Detecção
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de Quantificação
MS	Ministério da Saúde
MSD	<i>Mass Spectrometry Detector (Detector Espectrofotométrico de Massa)</i>
ND	Não-Detectado
OCP's	<i>Organochlorine pesticides (Pesticidas Organoclorados)</i>
OMPA	<i>Octamethyl Pyrophosphoro Amidate</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONP'S	<i>Organonitrogen pesticides (Pesticidas Organonitrogenados)</i>
OP	Organofosforado
OPP's	<i>Organophosphorus pesticides (Pesticidas Organofosforados)</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNCR	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PTFE	Politetrafluoretileno
SFE	<i>Supercritical fluid extraction (Extração com Fluido Supercrítico)</i>
TEA	<i>Thermal Energy Analyzer (Analisador de Energia Térmica)</i>
THF	Tetraidrofurano
TSD	<i>Thermoionic-specific detector (Detector Termoiônico Específico)</i>
WHO	<i>World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Pesticidas.....	16
1.1.1 Origem.....	16
1.1.2 Definição	17
1.1.3 Uso e impactos causados pelos agrotóxicos.....	19
1.2 Bioindicadores.....	19
1.3 Justificativa.....	23
1.4 Legislação	23
1.5 Características dos Pesticidas Estudados Neste Trabalho	24
1.5.1 Organofosforados	25
1.5.1.1 Dimetoato	26
1.5.1.2 Parationa metílica	26
1.5.2 Carbamatos	27
1.5.2.1 Carbaril.....	28
1.5.2.2 Carbofurano	28
1.5.3 Piretróides	29
1.5.3.1 Permetrina.....	30
1.5.4 Herbicidas Fenoxiácidos.....	31
1.5.4.1 Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D)	31
1.5.5 Herbicida do grupo das anilidas	32
1.5.5.1 Propanil	32
1.5.6 Inseticidas Organoclorados	33
1.5.6.1 Aldrin	34
1.5.6.2 Dieldrin	34
1.6 Parâmetros Físico-químicos Importantes na Análise dos Agrotóxicos e na Biomagnificação nos Organismos Bioindicadores.....	35
1.6.1 Solubilidade em água	35
1.6.2 Coeficiente de Partição Água-Octanol	35
1.6.3 Constante de ionização ácido-base.....	36
1.6.4 Pressão de Vapor.....	36
1.6.5 Constante de Henry.....	37
1.7 Mel	38
1.7.1 Definição	38

1.7.2 Composição e Uso	38
2. ASPECTOS ANALÍTICOS	40
2.1 Métodos de Extração	40
2.1.1 Extração Líquido-Líquido (ELL)	40
2.1.2 Extração em fase sólida (EFS)	40
2.1.3 Revisão das Metodologias de Análise de Pesticidas em Mel	42
2.2 Validação do Método Analítico	45
2.2.1 Exatidão	45
2.2.2 Precisão	46
2.2.3 Limite de Detecção (LD)	46
2.2.4 Limite de Quantificação (LQ)	46
2.2.5 Linearidade e faixa linear	47
2.2.6 Robustez	47
3. OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo Geral	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4. PARTE EXPERIMENTAL	49
4.1 Região de coleta do mel	49
4.2 Pesticidas Seleccionados	49
4.3 Materiais	50
4.4 Equipamentos	50
4.5 Estudo das Condições Cromatográficas de Separação dos Pesticidas	50
4.5.1 Preparo da fase móvel	50
4.5.2 Preparo dos padrões de pesticidas	51
4.5.3 Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos pesticidas	51
4.5.4 Estudo da Extração em Fase Sólida dos Pesticidas	51
4.5.4.1 Procedimento de Extração Desenvolvido	51
4.6 Parâmetros Importantes no Estabelecimento da Metodologia de Análise de Pesticidas em Mel	53
4.6.1 Curva analítica	53
4.6.2 Dectabilidade	53
4.6.3 Recuperação	53
4.6.4 Precisão	54
4.6.5 Linearidade e faixa linear	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

5.1 Identificação dos compostos em estudo	55
5.2 Obtenção do Espectro de Absorção no UV dos compostos.....	56
5.3 Validação do Método de Determinação dos Pesticidas em mel.....	57
5.3.1 Curva analítica, detectabilidade e intervalo linear	57
5.4 Recuperação e Precisão	60
5.4.1 Estudo da Extração em Fase Sólida (EFS).....	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pesticidas

1.1.1 Origem

O uso de substâncias denominadas "pesticidas" ou "agrotóxicos" não é uma novidade. De fato, desde a década de 30, com o desenvolvimento do composto organoclorado diclorodifeniltricloro-etano (DDT), vários compostos têm sido regularmente e intensamente aplicados para diversos fins, seja em campos agrícolas, programas de saúde pública, áreas urbanas e industriais, dentre outros. Como consequência, a persistência e o modo de dispersão dos pesticidas tornaram-se um grande problema para o ambiente e para a saúde, levando-o a ser proibido comercialmente nos Estados Unidos, em 1972 (ETO, 1977), e nove anos depois, também proibido no Brasil.

Em 1897, o alemão Michaelis e o russo Arbuzov foram os primeiros a trabalhar com os clássicos ésteres contendo fósforo, mas o progresso dos pesticidas organofosforados deve-se aos trabalhos de Gerhard Schrader, iniciados na Alemanha, por volta de 1934. O mais conhecido foi o *Octamethyl Pyrophosphoric Amidate* (OMPA), primeiro inseticida de ação sistêmica, descoberto em 1941, que passou a ser chamado de "Scharadan", em homenagem ao seu descobridor. Devido à possibilidade do composto ser usado como arma química, os resultados destas pesquisas permaneceram secretos durante a II Guerra Mundial (ETO, 1977). A utilização de agrotóxicos teve início na década de 20, e durante a segunda guerra mundial foram utilizados até como armas químicas. Na guerra do Vietnã, por exemplo, o herbicida 2,4-D, conhecido como "Tordon" (agente laranja), foi utilizado como desfolhante, provocando a morte de centenas de pessoas e séria contaminação ambiental (AMARANTE Jr e RIBEIRO, 2005).

No Brasil, a década de 70 foi a época de grande expansão da produção e do uso de pesticidas, em razão dos incentivos para a produção agrícola e a política de exportação. Desde então, com a expansão no mundo agrícola, dirigido pelo aumento de níveis populacionais, a pesquisa de novos pesticidas tem crescido consideravelmente. Por exemplo, foram introduzidas novas famílias de produtos, tais como carbamatos e piretróides (LARA e BATISTA, 1992).

1.1.2 Definição

Um grande número de substâncias é utilizado no combate às pragas, às ervas daninhas e doenças das plantações. Para estas, várias denominações têm sido usadas: defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas, praguicidas e agrotóxicos.

A Resolução 12/74, da antiga Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde, definiu Pesticida como: “substância ou mistura de substâncias destinada a prevenir a ação, ou destruir direta ou indiretamente insetos, ácaros, roedores, fungos, nematóides, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à lavoura, à pecuária, aos seus produtos e outras matérias primas”. Incluem-se, na definição, os desfolhantes, os dessecantes, as substâncias reguladoras de crescimento vegetal, os esterilizantes de sementes e os feromônios; excluem-se as vacinas, medicamentos, os antibióticos de uso veterinário e os agentes de controle biológico (LARA e BATISTA, 1992).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define agrotóxicos e afins como “sendo produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (ANVISA, 2008).

No Brasil, o consumo de agrotóxicos cresceu bastante nas últimas décadas, transformando o país em um dos líderes mundiais no consumo de agrotóxicos. Entre 1972 e 1998, a quantidade de ingrediente ativo vendido cresceu 4,3 vezes, passando de 28.043 toneladas para 121.100 toneladas/ano. A importância econômica deste mercado é evidente: segundo a ABIFINA (Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades), o faturamento do segmento agroquímico saltou de 1,2 bilhões em 2002 para 4,4 bilhões em 2004. Em relação às classes de uso, em 2004, 40% dos produtos vendidos eram herbicidas, 31% fungicidas, 24% inseticidas e 5% outros (ABIFINA, 2008).

O consumo de agrotóxicos difere em várias regiões do país, nas quais se misturam práticas agrícolas intensivas e tradicionais, nestas últimas não sendo utilizados de forma intensiva. Os agrotóxicos têm sido mais usados nas regiões Sudeste (cerca de 38%), Sul (31%) e Centro-Oeste (23%). Na região Norte o consumo de agrotóxicos é,

comparativamente, muito pequeno (pouco mais de 1%), enquanto na região Nordeste (aproximadamente 6%) uma grande quantidade concentra-se, principalmente, nas áreas de agricultura irrigada. O consumo de agrotóxicos na região Centro-Oeste aumentou nas décadas de 70 e 80 devido à ocupação dos Cerrados. Tal uso vem crescendo e aumentando consideravelmente devido ao aumento da área plantada de soja e algodão na citada região. Os estados que mais se destacam quanto à utilização de agrotóxicos são: São Paulo (25%), Paraná (16%), Minas Gerais (12%), Rio Grande do Sul (12%), Mato Grosso (9%), Goiás (8%) e Mato Grosso do Sul (5%). Quanto ao consumo de agrotóxicos, por unidade de área cultivada, a média geral no Brasil passou de 0,8 kg de ingrediente ativo (i.a.) por hectare (ha^{-1}), em 1970, para 7,0 kg i.a. ha^{-1} , em 1998. Com relação à quantidade total de ingredientes ativos, as culturas agrícolas brasileiras nas quais mais se aplicam agrotóxicos são: soja, milho, citros e cana-de-açúcar, nesta ordem. Entretanto, com o atual crescimento das áreas com cultura de cana-de-açúcar, o consumo de agrotóxicos no Brasil vem se modificando rapidamente (AGROTOXICOS NO BRASIL, 2009).

Resíduos de pesticidas são definidos como sendo a quantidade de pesticida e/ou seus derivados remanescentes no ar, no solo, nos alimentos ou na água, decorrente do emprego do pesticida, e expresso em partes dos princípios ativos em milhão de partes do alimento, ppm. Os níveis de tolerância são as quantidades máximas de resíduos de pesticida tolerados nos alimentos ou na água, em decorrência de sua aplicação adequada, numa fase específica desde a sua produção até o consumo, geralmente expresso em mg/kg (GELMINI, 1991).

Todas as substâncias químicas são tóxicas em certas condições de exposição. No entanto, para toda substância deve haver alguma condição de exposição que seja segura no que se refere à saúde humana, com a possível exceção dos agentes carcinogênicos e mutagênicos. Ou seja, condições de exposição nas quais as substâncias químicas sejam mantidas abaixo do nível máximo permitido. E quando não for possível definir um limite máximo permitido (OGA, 2003).

1.1.3 Uso e impactos causados pelos agrotóxicos

Embora de difícil avaliação, os custos sociais e ambientais decorrentes do uso de agrotóxicos são altos (GARCIA, 2001). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, em todo mundo, mais de 500 milhões de pessoas exponham-se aos agrotóxicos pelo trabalho agrícola e que ocorram cerca de 3 milhões de intoxicações severas, incluindo 1 milhão de casos de intoxicações agudas não-intencionais, com 20.000 mortes ao ano, sendo 70% dos casos por exposição ocupacional. Estima-se, ainda, que os efeitos crônicos, mais difíceis de serem avaliados, incluem anualmente 25 mil casos de seqüelas neuro-comportamentais, 37 mil casos de câncer, principalmente em países em desenvolvimento, e 700 mil casos de dermatoses.

No Brasil, estima-se que cerca de 15 milhões de pessoas que trabalham na agricultura estejam potencialmente expostas aos agrotóxicos, em quantidades bastante significativas. Dentre os casos, estima-se que anualmente ocorram de 150 mil a 200 mil intoxicações agudas que não são propositais, com 3 mil a 4 mil óbitos (GARCIA, 2001).

1.2 Bioindicadores

Em um ecossistema, energia, matéria e organismos vivos (carreadores de informações) interagem em uma complexa rede de processos. Modificações em um compartimento necessariamente induzem a alterações em outros. A frequência das alterações no sistema, entre outros, é determinada pelo grau de adaptação e pela seleção de processos, em nível individual e populacional. A compreensão dos processos envolvidos é, na melhor das hipóteses, parcial, e as ferramentas que são utilizadas na compreensão do que acontece no ecossistema como um todo focam apenas poucos aspectos conhecidos. As dificuldades de avaliação aumentam pelo fato de que um problema ambiental pode surgir com significados diferentes, dependendo do ponto de vista e da perspectiva de avaliação. Conseqüentemente, a contribuição humana na solução do problema, incluindo os esforços científicos é, inevitavelmente, direcionada (LIMA, 2008).

Todo sistema biológico, independente se enquanto organismo, população ou comunidade, adaptou-se a um conjunto de complexos fatores ambientais ao longo da sua evolução. Na biosfera, ele conquistou um espaço e um nicho ecológico onde encontra as condições necessárias e favoráveis à sua manutenção e reprodução. Frente a fatores que

exercem influência sobre cada organismo, existe um nível específico de tolerância fisiológica, determinada geneticamente e adquirida filogeneticamente e que regula a capacidade de suportar esses fatores. Se o fator ocorre em intensidade baixa ou elevada demais, porém em nível suportável, o organismo encontra-se em um “péssimo fisiológico”. Somente em níveis limitados, nos quais o fator alcança intensidade especialmente favorável, o organismo atinge seu “ótimo fisiológico”. A tolerância fisiológica, por regra, não está presente em todas as fases de desenvolvimento de um organismo, como também não se apresenta, nos mesmos níveis, para todos os indivíduos de uma população (LIMA, 2008).

Quanto à amplitude do nível de tolerância, conceituam-se os euripotentes como organismos que apresentam elevada amplitude e os estenopotentes como aqueles que apresentam estreita amplitude. O desenvolvimento de um organismo depende, com frequência, do fator que ocorre na amplitude mais elevada ou mais estreita, ou seja, no seu péssimo fisiológico. A alteração desse fator para um estágio ótimo provoca os melhores efeitos ecológicos, embora o desenvolvimento, como um todo, resulte da ação combinada de todos fatores atuantes. Fatores isolados podem ser substituídos entre si até uma determinada dimensão. A combinação de fatores diferentes pode resultar em um mesmo efeito, sem que haja, contudo, uma substituição absoluta de fatores específicos. Cada sistema biológico (organismo, população, comunidade) é capaz de indicar o efeito de fatores ambientais, sejam eles naturais, antrópicos ou modificados antropicamente. A indicação dos fatores ambientais bióticos ou abióticos através de sistemas biológicos é chamada, frequentemente, de “bioindicação” (LIMA, 2008).

Bioindicadores são organismos ou comunidades, cujas funções vitais correlacionam-se tão estreitamente com determinados fatores ambientais, que podem ser empregados como indicadores na avaliação de uma dada área. Esta definição inclui, conscientemente, a indicação de comportamentos naturais. Por exemplo, na agricultura, pode-se inferir sobre características de uma região apenas pela presença ou ausência de determinadas espécies vegetais (LIMA, 2008).

Bioindicadores são definidos como organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental, alterando suas funções vitais ou acumulando toxinas. Os processos bioquímicos básicos são os mesmos em muitos organismos e, por isso, parece razoável utilizar organismos como bioindicadores, que reagem mais rapidamente do que o homem, frente a toxinas ambientais. Estes organismos podem ser usados para detectar alterações ambientais provocadas pelas atividades humanas, as quais podem ser perigosas para o próprio homem. A bioindicação envolve a decodificação de informações de biosistemas com o

propósito de avaliar uma dada área ou domínio. Esta definição falha na menção do fator tempo e da possibilidade de se usar organismos testes. A compreensão das interações e estruturas dos ecossistemas é a base da prática do uso de bioindicadores e biomonitores. A bioacumulação é o processo através do qual os seres vivos absorvem e retêm substâncias químicas no seu organismo; pode ser de uma forma direta, através do ambiente que os envolve (bioconcentração), e indireta, a partir da alimentação (biomagnificação). Este processo implica várias etapas na cadeia alimentar e diferentes tipos de alimentação (LIMA, 2008).

As abelhas, na busca pelo alimento, executam a tarefa vital de polinização de plantas, sendo importantes para a produção do mel e de outros produtos apícolas. A cada dia, de 10 mil a 25 mil abelhas operárias fazem uma média de 10 viagens para explorar aproximadamente 7 km² nas áreas que cercam seu *habitat*, recolhendo o néctar, a água e o pólen das flores. Durante este processo, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados por estes insetos, ficando retidos em seus pelos superficiais, ou sendo inalados e unidos em seu aparelho respiratório. Neste processo, muitas substâncias vão sendo transformadas pelas abelhas, porém outras substâncias estranhas e de difícil transformação para seu organismo podem ser, gradativamente, acumuladas em seu organismo, sendo ainda transferidas para seus produtos como, no caso, o mel (RISSATO, 2007).

Devido aos fatores citados, as abelhas podem ser usadas como bioindicadores para monitoramento de impacto ambiental causado por fatores biológicos, químicos e físicos, tais como parasitas, contaminantes industriais ou agrotóxicos (WINSTON, 1987; *EUROPEAN COMMUNITY*, 1990). Além disso, quase todos os setores ambientais (solo, vegetação, água, ar) são explorados pelas abelhas produtoras de mel, fornecendo numerosos indicadores para avaliação da contaminação dos mesmos (WINSTON, 1987).

As duas rotas principais da contaminação do mel com agrotóxicos são mostradas na Figura 1. Uma possibilidade de contaminação, por exemplo, é o uso de acaricidas como o amitraz, o ciamizol, o bromopropilato, o coumafós, a flumetrina ou, ainda, o fluvalinato, usados para controlar o *varroa* e o *ascosphaeria* nas colméias. O uso destes compostos no interior das colméias implica em um risco de contaminação direta do mel e dos outros produtos da colméia (KORTA, 2001; FERNÁNDEZ, 1995). A consequência do uso intensivo de agrotóxicos pode ser o colapso total da colônia, fato já relatado em algumas áreas geográficas (EUROPEAN PARLIAMENT, 2003).

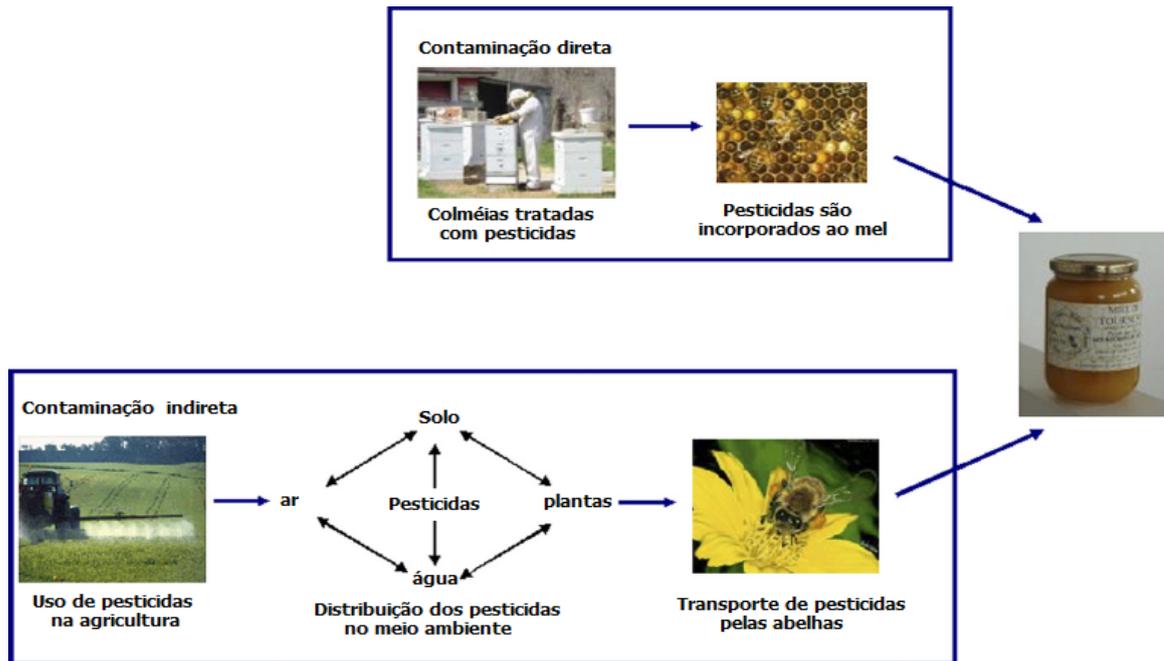


Figura 1. Vias de contaminação de mel por pesticidas (OTERO, 2007).

A produção de mel oriundo de floradas silvestres está se tornando cada vez mais escassa no Brasil e no mundo. Por esse motivo, atualmente o desenvolvimento da apicultura está cada vez mais dependente das culturas agrícolas e florestais nas quais, em alguns casos, são utilizados pesticidas de maneira inadequada (RISSATO, 2006). O monitoramento de resíduos de pesticidas no mel auxiliará na avaliação do potencial de risco destes produtos à saúde do consumidor e fornecerá informações sobre o uso de pesticidas nos campos de colheita e em suas vizinhanças.

A concentração máxima de resíduos de pesticidas permitida legalmente no mel foi estabelecida por órgãos regulamentadores de diferentes países. Até agora, os limites máximos de resíduos de pesticidas no mel não foram incluídos no *Codex Alimentarius*. A legislação da União Européia (EU) regulou os Limites máximos de resíduos para três acaricidas, amitraz, coumafós e ciamizol, em 0,2, 0,1, e 1,0 mg kg⁻¹, respectivamente, e a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos estabeleceu os LMR para os compostos amitraz (1 mg kg⁻¹), coumafós (0,1 mg kg⁻¹) e fluvalinato (0,05 mg kg⁻¹) (RISSATO, 2007).

Os programas de determinação de resíduos dos pesticidas para monitoramento de mel em geral são focados na determinação dos resíduos de acaricidas que são usados para controlar o *Varroa jacobsoni*, um ácaro parasítico que afeta as colônias da abelha doméstica (RISSATO, 2007). No entanto, para outros pesticidas, espera-se a ausência total de resíduos em mel, visto que os limites que são estabelecidos por normas devem valer para produtos de uso permitido em uma dada cultura agrícola ou produto alimentício.

1.3 Justificativa

Existe um grande número de registros de pesticidas por cultura e também muitos produtos comerciais no mercado (MACIEL, 2005). Geralmente os agricultores aplicam vários pesticidas em uma mesma cultura. Em função disso, é economicamente inviável e operacionalmente pouco prático utilizar métodos analíticos individuais com o objetivo de quantificar os resíduos de vários pesticidas nos alimentos. Por isto, é necessário desenvolver e validar métodos que tenham a capacidade de identificar e quantificar uma quantidade razoável de compostos ao mesmo tempo (método multirresíduo).

O Brasil é um país cuja economia é fortemente baseada em atividades agrícolas e no que se refere ao comércio internacional de alimentos, é imprescindível atender às exigências do país importador, o que implica na necessidade de se usar métodos validados que avaliem eficazmente diversos princípios ativos.

Uma dessas barreiras têm se mostrado através da exportação de mel brasileiro. A falta de controle quanto à presença de resíduos de pesticidas nos méis para exportação tem gerado desconfiança nos compradores internacionais. Isto é mostrado no embargo do mel brasileiro no ano de 2006 - Decisão (2006/208/CE) Banimento das Exportações de Mel. (SEBRAE - Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia – Série Mercado — Brasília, 2006).

Tendo em vista o embargo aos méis de origem brasileira, buscam-se meios alternativos para a determinação dos resíduos de agrotóxicos e outros contaminantes, portanto agregando maior valor e qualidade a estes méis, sendo que estas análises também servem em termos de monitoramento da contaminação ambiental de uma dada área em estudo (bioindicadores).

1.4 Legislação

Os Limites Máximos de Resíduos (LMR) de agrotóxicos, bem como a padronização internacional aplicada aos alimentos, são determinados pela Comissão *Codex Alimentarius* (CODEX). Um excesso de resíduos, segundo os padrões do CODEX, indica dois aspectos: primeiro, que os agrotóxicos foram aplicados de maneira inadequada na produção, processamento ou armazenagem do produto e, em segundo lugar, que há risco em potencial à saúde do consumidor (BULL e HATHAWAY, 1986).

A avaliação dos dados toxicológicos dos agrotóxicos, a recomendação da Ingestão Diária Aceitável (IDA) e os cálculos do Limite Máximo de Resíduo (LMR) são estabelecidos por órgãos subordinados às Nações Unidas, tais como o *Food and Agricultural Organization* (FAO), *World Health Organization* (WHO) e o *CODEX Alimentarius Mundial*, por meio do Comitê de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (CCPR).

A Tabela 1 apresenta a tolerância e o intervalo de segurança para os pesticidas estudados neste trabalho, para controle de mel, segundo o Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCR/2007), os seguintes valores são descritos para o mel.

Tabela 1. Limite Máximo de Resíduos dos pesticidas em estudo para o mel.

Grupo Químico	Pesticida	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*
Organoclorado	Aldrin	10
Organoclorado	Dieldrin	-*
Organofosforado	Dimetoato	20
Carbamatos	Carbofurano	82
Carbamatos	Carbaril	37
Organofosforado	Parationa Metílica	36,9
Anilida	Propanil	-*
Piretróides	Permetrina	64,6
Fenoxiácidos	2,4 - D	-*

* Não há LMR dos referidos pesticidas estabelecidos.

Fonte: Instrução Normativa Nº 9, de 30 de março de 2007 (Anexo Quadro VII).

1.5 Características dos Pesticidas Estudados Neste Trabalho

A seleção dos pesticidas baseou-se na frequência e na quantidade aplicada na cultura de arroz, acerola, controle de vegetação urbana, controle da dengue os seguintes pesticidas foram selecionados: dimetoato, 2,4-D, parationa metílica, permetrina, propanil, carbaril, carbofurano, aldrin e dieldrin.

1.5.1 Organofosforados

Desenvolvidos na década de 40, foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência. Possuem uma ampla gama de produtos agrícolas e sanitários, desde os extremamente tóxicos até aqueles com baixa toxicidade, como o temefós, que tem seu uso permitido em água potável. Na área da Saúde têm sido bastante usados, dada a sua eficiência. No entanto, este grupo é responsável por grande número de intoxicações e mortes no país.

Estrutura Molecular:

São ésteres, amidas ou derivados tiol dos ácidos de fósforo (ácido fosfórico, ácido tiofosfórico, ácido ditiofosfórico e outros), contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio. Os organofosforados possuem vários grupos, segundo sua estrutura, estando entre os mais numerosos os fosfatos (diclorvos), fosforotioatos (fenitrothion, temefós) e fosforoditioatos (malationa, dimetoato). São biodegradáveis, portanto sua persistência é curta no solo.

Persistência / Degradação:

A degradação de 50 % dos organofosforados ocorrem entre 1 e 3 meses. O principal meio de degradação no ambiente parece ser a hidrólise sob condições de alcalinidade. Muitos inseticidas organofosforados são instáveis em pH menor que 2, sendo a maioria mais estável na faixa de pH do ambiente (pH 3-6). É importante que estes compostos sejam estáveis em pH neutro, por causa de suas formulações em óleos concentrados, solventes miscíveis em água, grânulos inertes, para aplicação direta ou após dispersão em água. Em algumas circunstâncias do processo de oxidação de fosforotioatos, por serem mais voláteis e tóxicos, podem transformar-se em fosfatos, resultando em compostos potencialmente perigosos. Isto pode ocorrer quando os agrotóxicos são armazenados sob altas temperaturas.

Modo de Ação:

O modo de ação dos organofosforados é por contato e ingestão. Agem como inibidores das enzimas colinesterases, causando o aumento dos impulsos nervosos, podendo assim ocasionar a morte.

1.5.1.1 Dimetoato

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** DIMETOATO (*dimethoate*)
 b) **Sinonímia:** -
 c) **N° CAS:** 60-51-5
 d) **Nome químico:** *O,O-dimethyl S-methylcarbamoymethyl phosphorodithioate*
 e) **Fórmula bruta:** C₅H₁₂NO₃PS₂
 f) **Fórmula estrutural:**

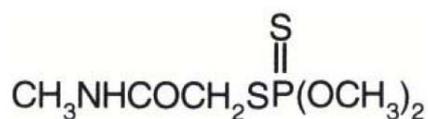


Figura 2. Fórmula estrutural do Dimetoato.

- g) **Grupo químico:** Organofosforado
 h) **Classe:** Inseticida e acaricida
 i) **Classificação toxicológica:** *Classe II*
 j) **Uso agrícola:** autorizado conforme indicado.
 k) **Modalidade de emprego:** aplicação foliar e no solo nas culturas de algodão, citros, maçã, rosa, tomate e trigo.

1.5.1.2 Parationa metílica

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** PARATION METÁLICO (*parathion methyl*)
 b) **Sinonímia:** E 601
 c) **N° CAS:** 298-00-0
 d) **Nome químico:** *O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate*
 e) **Fórmula bruta:** C₈H₁₀NO₅PS
 f) **Fórmula estrutural:**

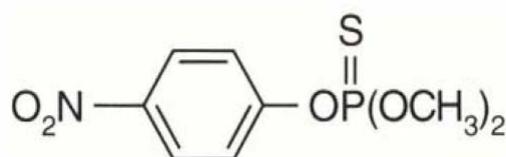


Figura 3. Fórmula estrutural do Parationa Metílica.

g) **Grupo químico:** *Organofosforado*

h) **Classe:** Inseticida e acaricida

i) **Classificação toxicológica:** *Classe I*

j) **Uso agrícola:** autorizado conforme indicado.

k) **Modalidade de emprego:** aplicação foliar nas culturas de algodão, alho, arroz, batata, cebola, feijão, milho, soja e trigo.

1.5.2 Carbamatos

Os primeiros carbamatos foram colocados no mercado por volta de 1950. Apresentam um pequeno espectro de atividade inseticida.

Estrutura Molecular:

São agrotóxicos orgânicos derivados do ácido carbâmico. Três classes de carbamatos são conhecidos: carbamatos inseticidas (e nematicidas), carbamatos herbicidas e carbamatos fungicidas. Os carbamatos usados como inseticidas (e nematicidas) são derivados do éster de ácido carbâmico.

Persistência / Degradação:

Em geral, são compostos instáveis. Muitos fatores influenciam a degradação dos carbamatos, como a umidade, a temperatura, a luz, a volatilidade. Carbamatos são metabolizados por microrganismos, plantas e animais ou degradados na água e no solo, especialmente em meio alcalino. Ocorre decomposição com a formação de amônia, amina, dióxido de carbono, fenol e alcoóis.

Modo de Ação:

Com ação de contato e ingestão, são igualmente inibidores das enzimas colinesterases, embora por mecanismo diferente dos organofosforados.

1.5.2.1 Carbaril

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** CARBARIL (*carbaryl*)
 b) **Sinonímia:** NAC
 c) **Nº CAS:** 63-25-2
 d) **Nome químico:** *1-naphthyl methylcarbamate*
 e) **Fórmula bruta:** C₁₂H₁₁NO₂
 f) **Fórmula estrutural:**

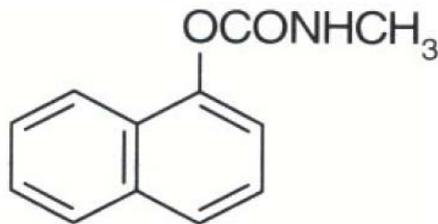


Figura 4. Fórmula estrutural do Carbaril.

- g) **Grupo químico:** Metilcarbamato de naftila
 h) **Classe:** Inseticida
 i) **Classificação toxicológica:** *Classe II*
 j) **Uso agrícola:** autorizado conforme indicado.
 k) **Modalidade de emprego:** aplicação foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, algodão, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pastagens, pepino, repolho e tomate.

1.5.2.2 Carbofurano

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** CARBOFURANO (*carbofuran*)
 b) **Sinonímia:** -
 c) **Nº CAS:** 1563-66-2
 d) **Nome químico:** *2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ylmethylcarbamate*
 e) **Fórmula bruta:** C₁₂H₁₅NO₃
 f) **Fórmula estrutural:**

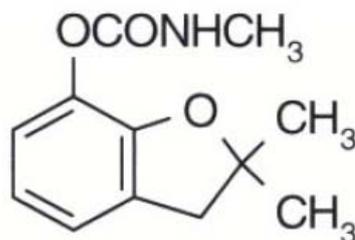


Figura 5. Fórmula estrutural do Carbofurano.

g) **Grupo químico:** *Metilcarbamato de benzofuranila*

h) **Classe:** Inseticida, cupinicida, acaricida e nematicida

i) **Classificação toxicológica:** *Classe I*

j) **Uso agrícola:** autorizado conforme indicado.

k) Modalidade de emprego: aplicação no solo nas culturas de algodão, amendoim, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, feijão, fumo, milho, repolho, tomate e trigo. Aplicação em sementes de algodão, arroz, feijão, milho e trigo.

1.5.3 Piretróides

Os piretróides foram descobertos a partir de estudos que procuravam modificar a estrutura química das piretrinas naturais, e, uma vez que apresentavam maior capacidade letal para os insetos, propriedades físicas e químicas muito superiores, maior estabilidade à luz e calor e menor volatilidade, despertaram o interesse dos cientistas.

Foram introduzidos no mercado em 1976 e ainda que sejam mais caros por unidade de peso em relação aos outros praguicidas, os piretróides têm sido bastante empregados na área da Saúde e na Agricultura. Isto ocorre devido à sua alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação durante as aplicações. Com isso, vêm tomando rapidamente o lugar dos organofosforados. Outra vantagem destes praguicidas é que eles admitem a sinergia, ou seja, a potencialização pela adição de um sinergista, dando lugar a um aumento da eficácia. Geralmente seguros para mamíferos, algumas substâncias tem alto “*knockdown*”, com boa mortalidade.

Estrutura Molecular:

São compostos sintéticos análogos aos componentes obtidos a partir dos piretros, extraídos do crisântemo.

Persistência / Degradação:

Os piretróides sintéticos têm boa estabilidade sob luz e temperatura ambiente. Degradam-se por hidrólise e oxidação, sendo caracterizados também pela rápida degradação por microrganismos do ambiente, não se registrando acumulação de resíduos ou esta alcança níveis não detectáveis.

Modo de Ação:

São os compostos de mais rápida ação na interferência da transmissão de impulsos nervosos. Podem possuir efeito repelente, espantando os insetos ao invés de eliminá-los.

1.5.3.1 Permetrina

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** PERMETRINA (*permethrin*)
- b) **Sinonímia:** MP 79; NIA-33297; WL 43479; PP557
- c) **Nº CAS:** 52645-53-1
- d) **Nome químico:** *3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate*
- e) **Fórmula bruta:** C₂₁H₂₀Cl₂O₃
- f) **Fórmula estrutural:**

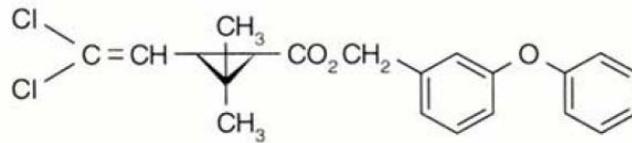


Figura 6. Fórmula estrutural da Permetrina.

- g) **Grupo químico:** Piretróide
- h) **Classe:** Inseticida e formicida
- i) **Classificação toxicológica:** *Classe III*
- j) **Uso agrícola:** autorizado conforme indicado.
- k) **Modalidade de emprego:** aplicação foliar nas culturas de algodão, arroz, café, couve, couve-flor, fumo, milho, repolho, soja, tomate e trigo. Aplicação em arroz, fumo, milho e trigo armazenado. Aplicação no controle de formigas, conforme aprovação em rótulo e bula.

1.5.4 Herbicidas Fenoxiácidos

Esta classe de pesticidas tem dois representantes principais: o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T).

O 2,4-D é amplamente utilizado no país, principalmente em pastagens e plantações de cana-de-açúcar, para combate a ervas de folhas largas. É bem absorvido pela pele, por ingestão e inalação, podendo produzir neurite periférica e diabetes transitória no período da exposição.

O 2,4,5-T tem uso semelhante ao anterior, apresentando uma dioxina (tetraclorodibenzodioxina) como impureza, responsável pelo aparecimento de cloroacnes, abortamentos e efeitos teratogênico e carcinogênico. A mistura do 2,4-D com o 2,4,5-T representa o principal componente do agente laranja, utilizado como agente desfolhante na Guerra do Vietnã, responsável pelo aparecimento de cânceres, entre eles linfomas, nos veteranos de guerra, e de mal-formações congênitas em seus filhos. O nome comercial dessa mistura é Tordon.

1.5.4.1 Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D)

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** 2,4-D (2,4-D)
- b) **Sinonímia:** 2,4-D LV6; DMA; DMA 4; BH 2,4-D; U-46; U-5043
- c) **Nº CAS:** 94-75-7
- d) **Nome químico:** *2,4-dichlorophenoxy acetic acid*
- e) **Fórmula bruta:** $C_8H_6Cl_2O_3$
- f) **Fórmula estrutural:**

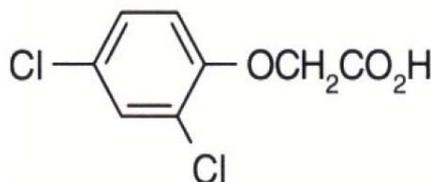


Figura 7. Fórmula estrutural do 2,4-D.

- g) **Grupo químico:** Ácido ariloxialcanóico
- h) **Classe:** Herbicida
- i) **Classificação toxicológica:** *Classe I*
- j) **Uso agrícola:** autorizado conforme indicado.

k) **Modalidade de emprego:** aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milho, pastagens, soja, sorgo e trigo.

1.5.5 Herbicida do grupo das anilidas

O principal representante deste grupo de compostos é o propanil.

1.5.5.1 Propanil

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** PROPANIL (*propanil*)
- b) **Sinonímia:** FW-734; S 10145
- c) **Nº CAS:** 709-98-8
- d) **Nome químico:** 3',4'-dichloropropionanilide
- e) **Fórmula bruta:** C₉H₉Cl₂NO
- f) **Fórmula estrutural:**

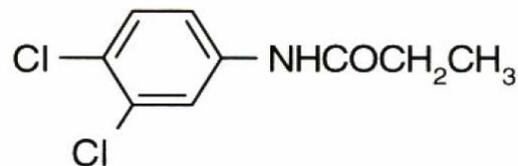


Figura 8. Fórmula estrutural do Propanil.

- g) **Grupo químico:** *Anilida*
- h) **Classe:** Herbicida
- i) **Classificação toxicológica:** *Classe III*
- j) **Uso agrícola:** autorizado conforme indicado.
- k) **Modalidade de emprego:** aplicação em pós-emergência das plantas infestantes na cultura de arroz.

1.5.6 Inseticidas Organoclorados

Constituem o grupo pioneiro dos praguicidas sintéticos. De largo uso agrícola e domiciliar, os organoclorados desempenharam papel marcante no combate a organismos nocivos ao homem, com repercussões sociais e econômicas importantes. Foram desenvolvidos durante a 2ª Guerra Mundial, para proteção contra malária, tifo exantemático e outras enfermidades transmitidas por insetos, bem como para o controle de enorme quantidade de espécies prejudiciais à lavoura, sendo considerados na época uma panacéia.

Com o advento de legislações restritivas em muitos países, por sua persistência ambiental, tendência a acúmulo no organismo e o aumento da resistência dos insetos, diminuiu-se a sua utilização. No Brasil, o uso dos organoclorados é proibido para o uso agrícola, sendo somente autorizado para órgãos públicos responsáveis pelas Campanhas de Saúde (Portaria n.º 329 de 2/9/85 do Ministério da Agricultura), embora atualmente esteja também em desuso por estes últimos.

Estrutura Molecular:

Corresponde a dos hidrocarbonetos clorados, ainda que, além do cloro, alguns deles possuam oxigênio. São derivados do clorobenzeno, do ciclohexano ou do ciclodieno.

Persistência / Degradação:

Organoclorados têm, já há bastante tempo, uso restrito devido à sua longa persistência no ambiente (até 30 anos no solo) e a acumulação nas cadeias alimentares. Devido à notável resistência ao ataque de microrganismos e à alta estabilidade de grande parte dos organoclorados à ação da luz solar e temperatura ambiente, não são degradados facilmente, o que leva à contaminação do meio, quebrando o equilíbrio biológico.

Modo de Ação:

Atuam por ingestão e contato, bloqueando a transmissão dos impulsos nervosos.

1.5.6.1 Aldrin

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** ALDRIN (*aldrine*)
- b) **Sinonímia:** -
- c) **N° CAS:** 309-00-2
- d) **Nome químico:** (1*R*,4*S*,4*aS*,5*S*,8*R*,8*aR*)-1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4*a*,5,8,8*a*,hexahydro-1,4:5,8-dimethanonaphthalene
- e) **Fórmula bruta:** C₁₂H₈Cl₆
- f) **Fórmula estrutural:**

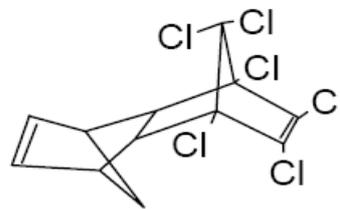


Figura 9. Fórmula estrutural do Aldrin.

- g) **Grupo químico:** Organoclorado
- h) **Classe:** Inseticida
- i) **Classificação toxicológica:** *Classe I*
- j) **Uso agrícola:** não autorizado.

1.5.6.2 Dieldrin

- a) **Ingrediente ativo ou nome comum:** DIELDRLIN (*dieldrine*)
- b) **Sinonímia:** -
- c) **N° CAS:** 60-57-1
- d) **Nome químico:** (1*R*,4*S*,4*aS*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,8*aR*)-1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4*a*,5,6,7,8,8*a*,octahydro-6,7-epoxy-1-4:5,8-dimethanonaphthalene
- e) **Fórmula bruta:** C₁₂H₈Cl₆O
- f) **Fórmula estrutural:**

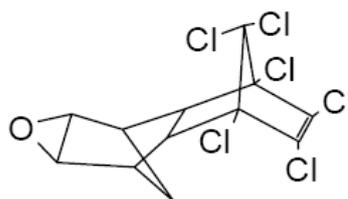


Figura 10. Fórmula estrutural do Dieldrin.

- g) **Grupo químico:** Organoclorado
- h) **Classe:** Inseticida
- i) **Classificação toxicológica:** *Classe I*
- j) **Uso agrícola:** não autorizado.

1.6 Parâmetros Físico-químicos Importantes na Análise dos Agrotóxicos e na Biomagnificação nos Organismos Bioindicadores

O conhecimento dos parâmetros físico-químicos e das interações ocorrentes entre eles é fundamental para o entendimento das rotas de transferência, acúmulo e degradação dos pesticidas no meio estudado. Os principais parâmetros são: solubilidade em água, coeficiente de partição água-octanol, constante de ionização ácido-base e pressão de vapor.

1.6.1 Solubilidade em água

A solubilidade em água é uma propriedade química definida como a concentração de um elemento ou composto dissolvida em água, em equilíbrio químico, com total contato entre as duas fases. Geralmente é expresso em mg L^{-1} , convenientemente tomadas na faixa de 20-25 °C. Indica a tendência do agrotóxico ser preferencialmente mantido ou transferido para meio aquoso, podendo ainda indicar carreamento ou lixiviação através do solo.

Este parâmetro por si só não pode ser utilizado para prever o comportamento de um agrotóxico nos compartimentos ambientais. A distribuição do agrotóxico no meio ambiente é condicionada pelo coeficiente de partição na água, que mostra a correlação com a solubilidade em água. Em geral, compostos com baixa solubilidade em água tendem a ser adsorvidos pelo solo ou bioconcentrados (MARQUES, 2002).

1.6.2 Coeficiente de Partição Água-Octanol

É geralmente expresso em logaritmo, $\text{Log } K_{ow}$ ou $\text{Log } P_{ow}$. É definido como a razão do equilíbrio de concentração entre as fases do sistema água-octanol. Este sistema simula, de forma rudimentar, a partição de moléculas de um dado composto entre a água e os lipídios, podendo indicar sua tendência em acumular-se no interior de membranas biológicas

dos organismos vivos, sendo fortemente correlacionado com a polaridade da molécula (BARCELÓ, 1997).

De um modo geral, pode-se dizer que analitos com valores de $\text{Log } K_{ow}$ entre 4-5 são apolares, e entre 1-1,5 são polares. Os compostos que possuírem coeficientes entre valores serão considerados moderadamente polares. Compostos com coeficiente de partição água-octanol relativamente alto possuem alto poder de bioconcentração (MARQUES, 2002).

1.6.3 Constante de ionização ácido-base

Agrotóxicos com características iônicas têm comportamentos distintos daqueles de características não-iônicas. O importante é saber qual agrotóxico poderá apresentar características de ionização dentro da faixa normal de pH de um solo ou água, os compostos com pK_a próximos – ou inferiores - às faixas de pH comumente encontrados no solo e água podem estar preferencialmente na forma ionizada nestes compartimentos ambientais. Solos com características aniônicas podem lixiviar compostos aniônicos e reter catiônicos (BARCELÓ, 1997).

Em se tratando de processos de extração de compostos para posterior análise, agrotóxicos não-iônicos são preferencialmente extraídos visto que os solventes utilizados têm, em geral, propriedades iônicas pouco acentuadas. Neste caso, um simples ajuste de pH pode ajudar na extração e na recuperação.

A constante de ionização ácido-base é expressa em termos de pK_a ou pK_b . Agrotóxicos de características ácidas, com pK_a entre 3-5, serão mais facilmente removíveis que agrotóxicos básicos, que ficam retidos no solo. Entretanto, os produtos obtidos da degradação de outros compostos sofrem alterações significativas nas suas propriedades ácido-base (MARQUES, 2002).

1.6.4 Pressão de Vapor

Este parâmetro é definido como a pressão parcial do composto, na fase gasosa, em equilíbrio com uma fase sólida ou líquida pura, sendo fator governante na distribuição do mesmo nestas fases. É expresso em Pa (20-25 °C). Agrotóxicos com pressão de vapor baixa tendem a dissipar-se lentamente em água (MARQUES, 2002).

1.6.5 Constante de Henry

A constante de Henry, H ou K_H , é definida como a relação da taxa da concentração de um composto químico no ar e a sua concentração no equilíbrio com a água. Este parâmetro é importante em diversos aspectos. A tendência dos agrotóxicos de volatilizarem da água no ar é determinada pelos seus valores de H ou K_H ; um valor elevado favorece a volatilização. Estudos das partições ar-água são importantes nos de estudos dos pesticidas com suas associações. Considera-se geralmente que os compostos com valores $K_H < 10^{-5} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$ têm pouca tendência a volatilizar (BARCELÓ, 1997).

As principais propriedades físico-químicas dos princípios ativos estudados estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo.

<i>Compostos</i>	<i>Solubilidade em H₂O (mg L⁻¹) a 20-25 °C</i>	<i>log K_{ow}</i>	<i>DT₅₀ (pH 7,0) solo</i>	<i>K_{oc} (cm³ g⁻¹)</i>	<i>V.p. (Pa)</i>	<i>K_H (Pa m³ mol⁻¹)</i>
Aldrin	0,027	-	1 a	5000	3,6E ⁻²	91,2
Carbaril	120,0	1,59	14 d	124,0	4,1E ⁻⁵	1,3E ⁻⁴
Carbofurano	320,0	1,52	50 d	22,0	3,1E ⁻⁵	5,1E ⁻⁴
2,4-D	311 (pH 1)	2,6- 2,8	8 d	39 (pH 5)	1,1E ⁻²	0,55
Dimetoato	23,0	0,70	7 d	20,0	1,1E ⁻³	1,1E ⁻⁴
Dieldrin	0,2	4,3- 5,4	-	-	-	1,12
Parationa Metílica	55,0	3,0	18,5 d	236,0	2,0E ⁻⁴	2,1E ⁻³
Propanil	130,0	3,3	1 a	149,0	2,6E ⁻⁵	3,6E ⁻³
Permetrina	0,2	6.1	30 d	100000	4,5E ⁻⁵	-

Fonte: Barceló, 1997. a = anos; d = dias.

1.7 Mel

1.7.1 Definição

Segundo a ANVISA (Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 D.O. de 24/07/1978), mel é o produto natural elaborado por abelhas a partir de néctar de flores e/ou exsudatos sacarínicos de plantas.

O mel é basicamente uma mistura complexa de açúcares altamente concentrada. Sua composição química foi objeto de revisões bibliográficas, como a realizada por CAMPOS e SERRANO *et al.*, (citado por VILHENA e MURANDIAN,1999), que sugeriram ser a composição do mel dependente de muitos fatores, tais como: espécies colhidas, natureza do solo, espécie de abelhas, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel, condições meteorológicas, etc. Sabe-se, no entanto, que o mel de abelhas nativas (meliponíneo) é pouco conhecido em termo de composição, muitas vezes, sendo associado às características do mel das abelhas africanizadas.

1.7.2 Composição e Uso

Além de ser utilizado como adoçante, o mel sempre foi reconhecido devido às suas propriedades terapêuticas. De um modo geral, o mel é constituído, na sua maior parte (cerca de 75%) por hidratos de carbono, nomeadamente por açúcares simples (glicose e frutose). O mel é também composto por água (cerca de 20%), minerais (cálcio, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio, entre outros), por cerca de metade dos aminoácidos existentes, também por ácidos orgânicos (ácido acético, ácido cítrico, entre outros), vitaminas do complexo B, e vitaminas C, D e E. O mel possui, ainda, um teor considerável de antioxidantes (flavonóides e compostos fenólicos) (MUNOZ, 2007).

Os vários tipos de méis variam em função das plantas de onde é extraído, do néctar, da localização geográfica dessas plantas e dos tipos das abelhas produtoras. Por esta razão, o mel pode apresentar consistências e cores diferentes. Devido ao seu teor de açúcares simples, de assimilação rápida, o mel é altamente calórico (cerca de 3,4 kcal/g), sendo útil como fonte de energia. Segundo CAMPOS (1987), a composição média do mel, em termos esquemáticos, pode ser resumida em três componentes principais: açúcares, água e diversos. Por detrás dessa aparente simplicidade, esconde-se um dos produtos biológicos mais complexos. A Tabela 3 apresenta a composição básica do mel.

Tabela 3. Composição básica do mel.

<i>Composição Básica do mel</i>			
<i>Componentes</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Variação</i>
Água (%)	17,2	1,46	13,4 - 22,9
Frutose (%)	38,19	2,07	27,25 - 44,26
Glicose (%)	31,28	3,03	22,03 - 40,75
Sacarose (%)	1,31	0,95	0,25 - 7,57
Maltose (%)	7,31	2,09	2,74 - 15,98
Açúcares Totais (%)	1,50	1,03	0,13 - 8,49
Outros (%)	3,10	1,97	0,0 - 13,2
pH	3,91	-	3,42 - 6,10
Acidez livre (meq kg ⁻¹)	22,03	8,22	6,75 - 47,19
Lactose (meq kg ⁻¹)	7,11	3,52	0,0 - 0,950
Acidez total (meq kg ⁻¹)	29,12	10,33	8,68 - 59,49
Lactose/Acidez livre	0,335	0,135	0,0 - 0,950
Cinzas (%)	0,169	0,15	0,02 - 1,028
Nitrogênio (%)	0,041	0,026	0,0 - 0,133
Diastase	20,80	9,76	2,1 - 61,2

Fonte: CAMPOS (1987).

O mel é também usado externamente, devido às suas propriedades antimicrobianas e antissépticas. Assim, o mel ajuda a cicatrizar e a prevenir infecções em feridas ou queimaduras superficiais. O mel é também utilizado largamente na cosmética (cremes, máscaras de limpeza facial, tônicos, etc.), devido às suas qualidades adstringentes e suavizantes.

Juntamente com o mel, as abelhas produzem outros importantes produtos: a cera, a geléia real, e própolis. A própolis, por exemplo, é obtida pelas abelhas a partir de resinas retiradas principalmente de secreções de árvores, quando destas se quebra algum galho. Dessa forma, a árvore se protege com um produto natural com poder bactericida e a abelha reprocessa essa seiva originando a própolis. Esta é utilizada pelas abelhas com duas finalidades principais: vedar a colméia de maneira a não entrar água, vento ou outro animal; e serve também para mumificar outros insetos que penetrem na colméia e são eventualmente mortos. A própolis é bastante útil ao ser humano que a usa como auxiliar medicamentoso uma vez que possui poder bactericida (PEÑA, 2008).

2. ASPECTOS ANALÍTICOS

Parâmetros analíticos a serem considerados para a metodologia selecionada para a determinação de pesticidas.

2.1 Métodos de Extração

A análise de resíduos de pesticidas nos alimentos é um procedimento que envolve elevados custos, devido à necessidade de extrair e pré-concentrar o analito de interesse, removendo-o de uma complexa matriz orgânica, eliminando-se também possíveis interferências. Em geral, devido à detecção do pesticida em baixas concentrações, há necessidade de se utilizar técnicas analíticas que garantam elevada sensibilidade, requerem o uso de reagentes e materiais de pureza e qualidade adequadas encarecendo, assim, todo o procedimento de extração e análise dos compostos em estudo (RIBEIRO, 2008).

2.1.1 Extração Líquido-Líquido (ELL)

Empregar um solvente não completamente miscível com a solução da mistura, mas capaz de dissolver seletivamente os analitos é uma técnica analítica clássica. Na ELL a seletividade é conseguida escolhendo um solvente extrator no qual os analitos se estabilizem mais, devido à maior interação intermolecular (SANTOS, 2000).

A desvantagem em se utilizar a ELL está no custo elevado, grande quantidade de solvente descartado e longo tempo de operação, tendo também a possibilidade de formações de emulsões (LISKA, 1989).

2.1.2 Extração em fase sólida (EFS)

Como etapas do desenvolvimento do método de extração em fase sólida, o analista tem que primeiramente selecionar o tipo de sorvente que vai ser utilizado na análise em questão, de acordo com as características físico-químicas dos analitos de interesse, sendo que por muitos anos o octadecilsilano (C_{18}) foi considerado o sorvente universal (HENNION, 1999).

Os princípios relacionados com as técnicas de EFS e ELL são semelhantes entre si e envolvem a partição dos compostos de interesse entre duas fases. Na EFS, o analito de

interesse, para ser extraído, é dividido entre a fase líquida, a qual está contida na fase sólida (sorvente) e o solvente de eluição, como se fosse entre dois líquidos imiscíveis similares ao que ocorre na ELL. O analito de interesse na amostra terá menor ou maior afinidade pela fase líquida do sorvente, determinando assim o grau de retenção deste analito. Posteriormente este analito é extraído por um solvente orgânico no qual ele tenha maior afinidade que na fase líquida do sorvente (SANTOS, 2000).

Os mecanismos de retenção e eluição dos analitos pela fase sólida ocorrem através de forças intermoleculares entre o analito e a superfície da fase sólida, envolvendo interações tipo *Van der Waals*, tipo eletrostáticas, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, íon-dipolo, íon-íon e ligação de hidrogênio.

A fase líquida é eluída sob pressão ou vácuo e o processo consiste de cinco etapas: A) Ativação do sorvente através da passagem de um solvente (orgânico e água desionizada) que condicione a superfície do sólido, removendo quaisquer substâncias que estejam presas, seguida da remoção do solvente responsável pela ativação; B) Aplicação da amostra: i) O analito de interesse e os interferentes ficam retidos na fase sólida, ii) O analito de interesse fica retido e parte dos interferentes passam pela fase sólida, iii) O analito de interesse passa pelo sólido e os interferentes ficam retidos na fase sólida; neste caso a fração de interesse é imediatamente coletada; C) A fase sólida é lavada com um solvente apropriado, retirando os interferentes da matriz ou parte delas, sem eliminar os analitos de interesse (no caso B (i)), no caso B (ii) a fase sólida não precisa ser lavada com um solvente apropriado para a remoção dos interferente; D) Eluição do analito de interesse do sorvente com um solvente apropriado (Figura 11).

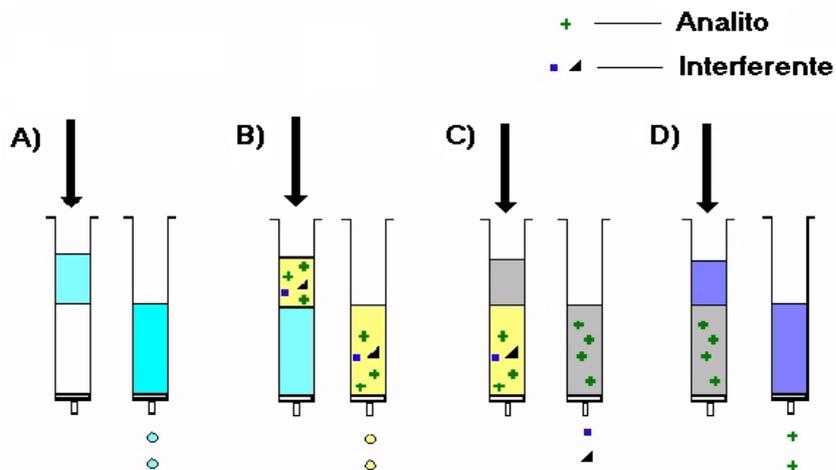


Figura 11. Etapas envolvidas na técnica de Extração em Fase Sólida.

2.1.3 Revisão das Metodologias de Análise de Pesticidas em Mel

Na tabela 4 é apresentada uma revisão dos métodos de análise dos agrotóxicos estudados em mel, sendo citado o modo de extração, a técnica utilizada na quantificação e a qualidade dos parâmetros analíticos.

Tabela 4. Principais parâmetros das metodologias na literatura para extração de pesticidas em mel.

<i>Compostos/Procedimento de Extração</i>	<i>Técnica</i>	<i>Comentários</i>	<i>Qualidade Parâmetros/Referência</i>
Dimethoato / ES. 20 g de mel diluído com 20 mL de água extraído com 100 mL de acetato de etila em presença de 30 g de sulfato de sódio. <i>Clean-up</i> coluna de permeação em gel S-X3 com acetato de etila:hexano (1:1)	CG- ECD (300 C); CG-TSD (300 C); CG-PFDD (275 C)	Coluna CP-Sil 8CB (25m x 0,32 mm d.i., 0,25 µm); Coluna CP-Sil 19CB (25m x 0,32 mm d.i., 0,20 µm)	Rec.: 79 -95 %, C.V.< 17% (JANSSON, 2000)
13 OCP's, 30 OPP's, 5 ONP's / ES. 15-20 g de mel são diluídos com 200 mL de água-metanol (1:1) foram extraídos com 10 mL de diclorometano, 3 mL de solução saturada de NaCl e 50 mL de água. Re-extraindo com 2x 10 mL de diclorometano. <i>Clean-up</i> com coluna com 0,5 g de sílica gel, 5 g de sílica gel/carbono ativado (1:15) e 1 g de NaSO ₄	OCPs CG-ECD (280 C), injetor splitless a 270 C; 30 OPPs e 5 ONPs CG-NPD (280 C), injetor split a 250 C	Coluna Ultra-2 (25m x 0,32 mm d.i., 0,1 µm); Coluna BP-5 (25m x 0,32 mm d.i., 0,5 µm).	Rec.: 87-105 %. LD: < 0,01 mg L ⁻¹ Rec.: 79-85 %. LD: < 0,05 mg L ⁻¹ (AL-RIFAI, 1997)
32 Pesticidas / EFS. 5g de mel + 3 g H ₂ O + 2 g de celulose em pó foram congelados e liofilizados. Extração com CO ₂ e 10% de acetonitrila modificador orgânico. Condições: 400 bar, câmara de extração a 90 C, tempo de extração 20 min.. Os pesticidas foram coletados em cartuchos de florisil on-line a 10 C e eluidos com 5 mL de diclorometano:n-hexano (80:20) e 5 mL de n-hexano:acetona (60:40)	CG- ECD (300 C), injetor splitless a 250 C; Com confirmação por CG-MSD impacto de elétrons (potencial de ionização 70 eV, linha de transferência 280 °C	Coluna HP-608 (30m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm); Coluna LM-5 (35m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm);	Rec.: 88-98 % C.V.< 6%. LD: 0,01 mg kg ⁻¹ (RISSATO, 2004)
18 OCs / EFS. 5g de mel foram diluídos em 25 mL de metanol e 21 mL de H ₂ O (pH 2) foram passados em cartuchos C-18 e os pesticidas foram eluidos com 10 mL de hexano.	CG- ECD , injetor splitless a 250 C,	Coluna DB-1 (30m x 0,32 mm d.i., 0,25 µm); Coluna DB-5 (30m x 0,32 mm d.i., 0,25 µm);	Rec.: 48-125 % C.V.< 13%. LD: 0,02 µg kg ⁻¹ (TSIPI, 1999)

<p>4 Acaricidas / EFS. 5 g de mel foram diluídos com 15 mL de metanol:água (1:1) foram passados em cartuchos C-18 a estes lavados com 5 mL metanol:água (1:1). Sendo extraídos com 5 mL de hexano.</p>	HPLC- DAD	<p>Coluna ODS-2 (150 mm x 0,32 mm d.i., 5 µm) Fase móvel: MeOH:H₂O (90:10), fluxo 5 µL/min.</p>	<p>Rec.: 81-95 % C.V.< 11%. LD: 0,74 µg kg⁻¹ (GOMIS, 1996)</p>
<p>9 Acaricidas / EFS. 0,5 g de mel diluídos com 5 mL de solução tampão (1 M, pH 6) foram levados em ultrassom durante 5 min. 4 mL desta solução foi passada em cartuchos C-18. Estes foram lavados com 1 mL de THF-tampão aquoso (1 M, pH6) (90:10) e pesticidas foram eluídos com 1 mL THF</p>	HPLC- DAD	<p>Coluna C-18 (150 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Fase móvel: ACN:0,01 M TEA (pH 6,1 com 0,75 M H₃PO₄), em modo gradiente com fluxo de 1 mL/min.</p>	<p>Rec.: 63-100 % C.V.< 8%. LD: 0,2 mg kg⁻¹ (KORTA, 2001)</p>
<p>22 OP'Ps / EFS. 5 g de mel diluídos com 50 mL de água foram passados em cartuchos C-18. Os pesticidas foram eluídos com 10 mL de acetato de etila, 4 mL de metanol e 1 mL de dicloro metano.</p>	<p>LC-APCI-MSD em modos negativos e positivos (vaporizados 350 C, gás secante 350 C, voltagem capilar 4000 V, e corrente de descarga 4 µA no modo positivo e 25 µA no modo negativo .</p>	<p>Coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Fase móvel: MeOH:H₂O, em modo gradiente com fluxo 1 mL/min.</p>	<p>Rec.: 63-100 % C.V.< 17%. LD: 0,24 mg kg⁻¹ (FERNÁNDEZ, 2002)</p>
<p>42 CARBAMATOS, OCP's e OPP's / EFS. 5 g de mel diluídos com 50 mL de água foram passados em cartuchos C-18. Os pesticidas foram eluídos com 10 mL de acetato de etila, 4 mL de metanol e 1 mL de diclorometano.</p>	<p>LC-APCI-MSD em modo negativo (vaporizado 400 C, gás secante 350 C, voltagem capilar 4000 V, e corrente de descarga 25 µA.</p>	<p>Coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Fase móvel: MeOH:H₂O, em modo gradiente com fluxo 0,8 mL/min.</p>	<p>Rec.: 73-98 % C.V.< 19%. LD: 0,1 mg kg⁻¹ (BLASCO, 2003)</p>
<p>51 Pesticidas (inseticidas, fungicidas, acaricidas e herbicidas / EFS. 10 g de mel diluídos com 10 mL de metanol:água (30:70) foram passados em cartucho C-18. Foram lavados com mL de metanol:água (30:70) e os pesticidas foram eluídos com 10 mL de hexano:acetato de etila (50:50).</p>	<p>CG-MSD com impacto eletrônico (com potencial de ionização de 70 eV, a 230 C na fonte de íon, 150 C no analisador), injetor splitless a 280 C</p>	<p>Coluna ZB-5MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 mm)</p>	<p>Rec.: 86-101 % C.V.< 10%. LD< 0,006 mg kg⁻¹ (ALBERO, 2004)</p>
<p>9 OCP's / ES. 5 g de mel foram diluídos com 50 mL de solução aquosa 4 % de sulfato de sódio e extraídos com 3 parcelas de acetato etila (20, 15, e 15 ml). Sendo que a emulsão foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. A fase orgânica foi filtrada retirando o sulfato de sódio anidro, e concentrada sob fluxo de nitrogênio a 2,5 mL para a análise.</p>	<p>GC-ECD, e confirmação por CG-MS Injetor a 220 C, detector a 280 C, 150 °C e com rampa de temperatura</p>	<p>Coluna capilar (30 m x 0,25mm x 0,25µm) com fase DB-5</p>	<p>Rec.: 86-126 % (BLASCO, 2004)</p>

48 compostos de diferentes classes, OCP's, OPP's, Piretroides, Carbamatos / EFS. 10 g de mel, a qual foi adicionado 5 mL de água, em seguida, 50 mL de acetato de etila e a mostra foi submetida à agitação constante, por 20 min. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 2500 rpm, por 10 min, e então coletada. A amostra foi re-extraída com 40 mL de acetato de etila e o procedimento foi repetido.

Os extratos obtidos foram combinados e concentrados e secos sob fluxo de N₂. Retomando em 5 mL de acetato de etila, filtrado em PTFE 0,50 µm e submetido à etapa de limpeza com cartuchos de Florisil, os quais foram condicionados com 5 mL de acetona. A eluição foi realizada por gravidade com duas porções de 10 mL de hexano/acetato de etila (50:50, v/v). O extrato obtido foi submetido à concentração sob fluxo de nitrogênio, retomando em 1 mL de acetato de etila.

GC/MS, operado em modo íon seletivo (SIM), impacto de elétrons a 70 eV, temperatura da fonte 250 °C, linha de transferência 290 °C, eletromultiplicador a 1200 V, velocidade de varredura 1,5 scan/s, no intervalo de massa 40-600 *m/z*.

Coluna LM-5 (35m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm) e o gás de arraste foi He, com fluxo 1,0 mL/min.

Rec.: > 76 %
C.V. < 7 %.
LD: 0,8 a 8 µg kg⁻¹
(RISSATO, 2007)

2.2 Validação do Método Analítico

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que o método e o sistema são adequados para o uso desejado (RIBANI, 2004).

No Brasil existem duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (RIBANI, 2004).

Em 1987, o FDA, através do “*Guideline for Submitting Samples and Analytical Data*” para validação de método, reconheceu as especificações descritas a seguir, como as principais fases da validação de métodos. Esses termos também são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico ou figuras analíticas de mérito (SWARTZ, 1996).

2.2.1 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A exatidão é expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida, geralmente padrões certificados.

Para avaliar a exatidão, as diretrizes da ICH (*International Conference on Harmonization*) em metodologia recomendam a coleta de dados referentes a um mínimo de nove determinações sobre um mínimo de três diferentes concentrações cobrindo a variação especificada (por exemplo, três concentrações, análise em triplicata de cada). Os dados obtidos devem ser registrados como o percentual de resposta da quantidade conhecida adicionada ou como a diferença entre a média e o valor teórico com os respectivos intervalos de confiança (FARIA, 2004).

2.2.2 Precisão

A precisão representa o grau de repetitividade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. Normalmente é expressa através do coeficiente de variação (CV) em um número estatisticamente significativo de amostras.

De acordo com a ICH, a precisão deve ser medida em três diferentes níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade corresponde aos resultados obtidos através de várias repetições de um método, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo (precisão entre ensaios). Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a 100% do teste ou a concentração teórica. A composição teórica é definida como a concentração do composto de interesse descrita no método.

A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do próprio laboratório devido a eventos como diferentes dias de análise, analistas, equipamentos, etc. A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios (FARIA, 2004).

2.2.3 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, normalmente três vezes, e o método baseado em *parâmetros da curva analítica* (FARIA, 2004).

2.2.4 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. O LQ assim como o LD também pode ser calculado

de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, normalmente dez vezes, e o método baseado em parâmetros da curva analítica (FARIA, 2004).

2.2.5 Linearidade e faixa linear

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação. A linearidade está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão. A faixa linear corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda os requisitos de precisão, exatidão e linearidade através do método. A faixa de variação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método em questão (FARIA, 2004).

2.2.6 Robustez

A robustez corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena modificação em seus parâmetros. A robustez do método é avaliada através de parâmetros modificados como a composição da fase móvel, pH, força iônica, temperatura, etc., e a respectiva determinação do seu efeito (FARIA, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver uma metodologia para determinação de resíduos de pesticidas de diferentes classes em mel, utilizando cromatografia a líquido com detecção espectrofotométrica com arranjo de fotodiodos.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar um levantamento dos métodos analíticos para determinação de pesticidas em matriz mel;
- Desenvolver uma metodologia analítica para determinar diferentes classes (carbamatos, piretróides, organoclorados, fenoxiácidos e organofosforados) de pesticidas em mel de abelhas (*Apis mellifera*);
- Validar o método desenvolvido, analisando as seguintes figuras de mérito: precisão, recuperação, curva analítica, linearidade e sensibilidade (limites de detecção e de quantificação);

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Região de coleta do mel

O município de Santa Luzia do Paruá, considerado a capital maranhense do mel, situa-se na Pré-Amazônia, na região conhecida como Alto Turi, no Estado do Maranhão, ficando às margens da BR 316, principal via de acesso do Maranhão às Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do País.

Geograficamente, o município de Santa Luzia do Paruá integra a região do Estado pertencente à Amazônia Legal. Em virtude desta localização, as condições climáticas da região favorecem a ocorrência de uma vasta e variada floresta, característica do trópico úmido, com espécimes vegetais nativas e abundantes, com grandes floradas o ano inteiro, sendo 60% de florestas equatoriais e 40% de cerrados, matas de transição, cocais, manguezais, campos e restingas. A pluviosidade anual varia entre mil e 2 mil mm, a temperatura média situa-se entre 26 °C e 27 °C e há, na região, um considerável número de rios perenes, abundantes e extensos. As amostras foram coletadas *in locu*, dos próprios apicultores da cidade, sendo estas armazenadas em frascos de vidro (envolvidos em papel alumínio) e estocados a temperatura ambiente dentro de caixas de papelão.

4.2 Pesticidas Seleccionados

Os pesticidas seleccionados neste trabalho estão listados na Tabela 5, grau de pureza e grupo químico e fornecedor.

Tabela 5. Pesticidas utilizados, grupo químico e pureza.

<i>Composto</i>	<i>Grupo Químico</i>	<i>Fornecedor</i>	<i>Pureza</i>
Carbaril	Carbamatos	Chem Service	99 %
Carbofurano	Carbamatos	Dr. Hrenstorfer	99,1 %
Propanil	Anilida	Dr. Hrenstorfer	99 %
Parationa metílica	Organofosforado	Dr.Hrenstorfer	99 %
Permetrina	Piretróide	Riedel de Haenag	98 %
2,4 - D	Fenoxiácidos	Riedel de Haenag	99 %
Dimetoato	Organofosforado	-	98,7 %
Aldrin	Organoclorados	Dr. hrenstorfer	99,2 %
Dieldrin	Organoclorados	Quality Grade	99 %

4.3 Materiais

O gás utilizado para secagem das amostras de mel foi nitrogênio (99,99% de pureza), obtido da White Martins. Coluna cromatográfica Varian C-18 (250mm x 4,6mm d.i., 5 µm). Os solventes utilizados (metanol, acetato de etila) foram adquiridos da Merck, todos de grau HPLC, água desionizada em sistema xxxx .

Na fase de extração dos analitos, foram utilizados cartuchos de 6,0 mL, tipo seringa, (Strata[®] X) da Phenomenex, contendo 500 mg de fase reversa (polimérica), apropriado para compostos polares e apolares.

4.4 Equipamentos

Foi utilizado, para as análises cromatográficas, o sistema cromatográfico a líquido (marca Varian), composto por: duas bombas de alta pressão, tipo pistão simples (Varian modelo Pro Star 210); detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, caminho ótico de 10 mm, (Varian modelo Pro Star 335); injeção manual, contendo software Galaxie, instalado para aquisição e tratamento dos dados cromatográficos; Para a realização das extrações em fase sólida, foram utilizados uma bomba à vácuo (Marconi, modelo MA 058) e um manifold de extração (Varian, modelo Visiprep[™]).

Para degaseificação dos solventes, foi empregado um banho ultrassônico (Uniqui, modelo Ultrasonic Cleaner). Para evaporação dos extratos, foi utilizado um evaporador rotativo (Fisaton Equipamentos Científicos Ltda, modelo 802), para a centrifugação das amostra foi utilizado centrifuga (Sigma Laboratory Centrifuges, modelo 4K15).

4.5 Estudo das Condições Cromatográficas de Separação dos Pesticidas

4.5.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi filtrada em kit de filtração MILLIPORE, com filtros de fibra de vidro de porosidade 0,45 µm e diâmetro de 47 mm para solventes orgânicos e com filtros de acetato de celulose de porosidade 0,45 µm e diâmetro de 47 mm água acidificada e permaneceu por 10 min no ultra-som para que fossem retirados todos os gases dissolvidos. As soluções foram armazenadas em recipientes próprios para solventes, sendo feitas diariamente

antes de iniciar os trabalhos. Para realizar a separação dos pesticidas estudados foi utilizada fase móvel ACN: H₂O, pH 3,0, ajustado com ácido acético (Figura 13).

4.5.2 Preparo dos padrões de pesticidas

Os padrões foram preparados individualmente em metanol, na concentração de 500 mg L⁻¹ (solução-estoque). As soluções-estoque foram guardadas em frasco âmbar, a 4°C, para evitar degradação do princípio ativo.

Pesou-se, com precisão, 5,0 mg, de cada pesticida e transferiu-se quantitativamente com metanol para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume final. Após total dissolução, transferiu-se para um frasco âmbar com tampa de rosca para ser estocado.

As soluções de trabalho foram preparadas, individualmente, a partir de diluições da solução estoque, em concentrações de 1,0, 10,0 e 50,0 mg L⁻¹.

4.5.3 Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos pesticidas

Para se obter os espectros de absorção na região do ultravioleta, injetou-se uma mistura dos pesticidas (20 µL) no cromatógrafo a líquido acoplado a um detector por arranjo de diodos. Com este detector, também foi avaliada a pureza do pico pela comparação dos espectros de UV em três regiões do pico, no início, no meio e no fim. Se os espectros obtidos fossem coincidentes, este era considerado puro.

4.5.4 Estudo da Extração em Fase Sólida dos Pesticidas

4.5.4.1 Procedimento de Extração Desenvolvido

Em 10,0 g de mel, foi adicionado um volume de 5,0 mL de água. Em seguida, foi adicionado 50,0 mL de acetato de etila e a amostra foi submetida à agitação constante, por 20 min. A fase orgânica foi separada por centrifugação a 2500 rpm por 10 min e então coletada. A amostra foi re-extraída com 40 mL de acetato de etila e o procedimento foi repetido.

Os extratos obtidos foram combinados, concentrados e secos sob fluxo de N₂. Em seguida os resíduos foram retomados em 5,0 mL de acetato de etila, e o extrato filtrado em PTFE (0,50 µm de diâmetro), e submetido à etapa de pré-concentração com cartuchos de

Strata X, os quais foram condicionados com 5,0 mL de metanol e 5,0 mL de água. A eluição foi realizada por gravidade com 5,0 mL de acetato de etila. O extrato obtido foi submetido à concentração sob fluxo de nitrogênio, retomando em 1,0 mL de acetato de etila. A Figura 12 resume as etapas de extração/pré-concentração.

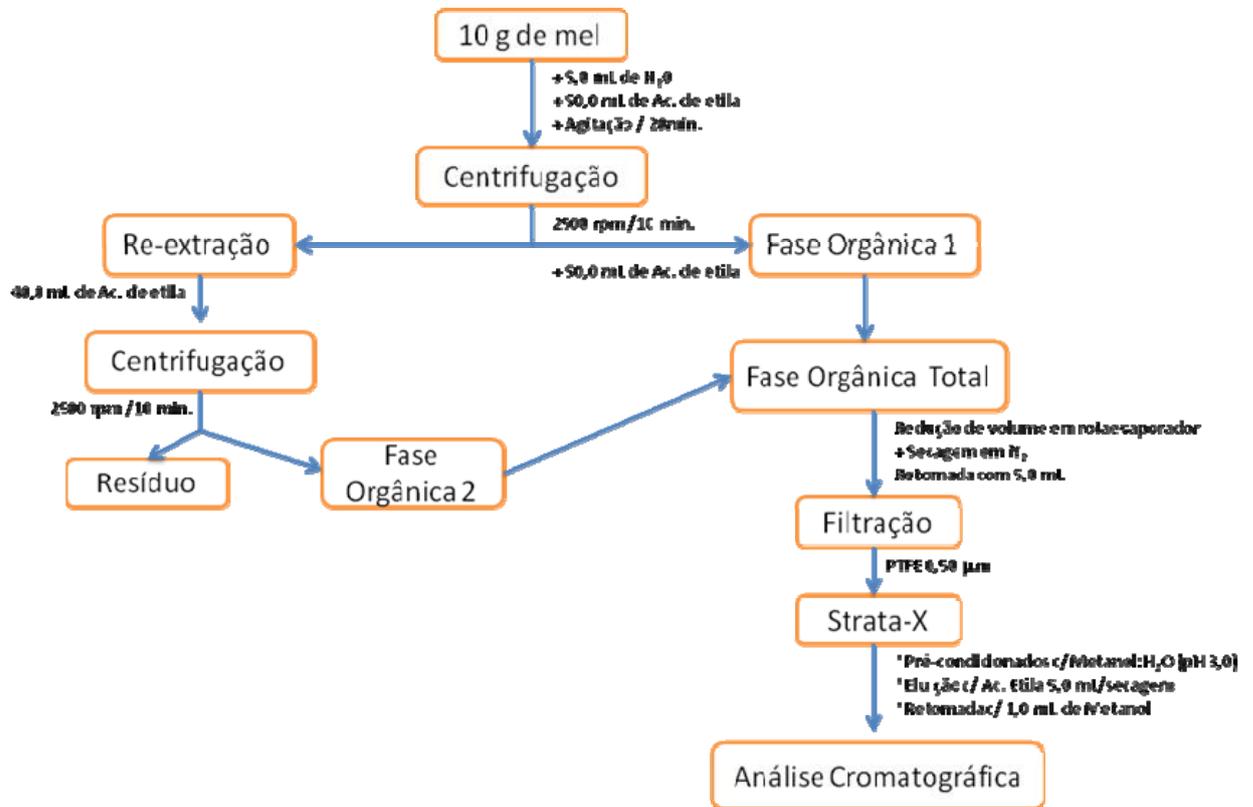


Figura 12. Fluxograma do procedimento de extração.

4.6 Parâmetros Importantes no Estabelecimento da Metodologia de Análise de Pesticidas em Mel

4.6.1 Curva analítica

As curvas analíticas dos pesticidas foram obtidas para concentrações entre 1,0 a 20,0 mg L⁻¹, injetando-se 20 µL da mistura dos compostos de cada concentração, em triplicata, representando-se graficamente Concentração dos pesticidas *versus* Área do pico.

A partir das curvas analíticas foram obtidos os coeficientes de correlação, os coeficientes angulares e lineares e as respectivas estimativas de desvio padrão.

4.6.2 Dectabilidade

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do instrumento, foram construídas as curvas analíticas com soluções nas concentrações de 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, e 15,0 mg L⁻¹, e obtiveram-se as equações das retas. As Equações 1 e 2 e foram empregadas nos cálculos dos limites de detecção e quantificação do instrumento.

$$LD = 3,3 \times SD/a \quad (\text{Eq. 1})$$

$$LQ = 10 \times SD/a \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: SD = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear
a = coeficiente angular

4.6.3 Recuperação

As amostras de mel fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração e os valores de recuperação foram obtidos pelo método de padronização externa, sendo cada experimento realizado em triplicata.

A recuperação (R) foi calculada através da Equação 3:

$$R = \text{área do pico da amostra} \times 100 / \text{área do pico do padrão} \quad (\text{Eq. 3})$$

4.6.4 Precisão

Foram obtidas as medidas de repetitividade e de precisão intermediária. As determinações foram feitas a partir de um mínimo de três níveis de fortificação, com três repetições para cada nível.

4.6.5 Linearidade e faixa linear

A faixa linear foi obtida traçando-se a curva analítica (Concentração *versus* Área do pico) e quando a reta começou a sofrer um desvio de linearidade, este valor de concentração foi tomado como sendo o valor máximo a ser determinado, o valor mínimo da faixa correspondeu ao limite de quantificação de cada método.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos compostos em estudo

Para obtenção dos cromatogramas de separação e identificação dos compostos, foram testadas diversas fases móveis: metanol:água, metanol:água acidificada com ácido acético, acetonitrila:água e acetonitrila:água acidificada com ácido acético. A melhor resolução dos picos dos compostos em estudo foi obtida para a fase móvel acetonitrila:água acidificada (pH 3,0) em modo gradiente. As Figuras 13 e 14 apresentam a programação de gradiente utilizada na análise cromatográfica e a separação dos compostos estudados.

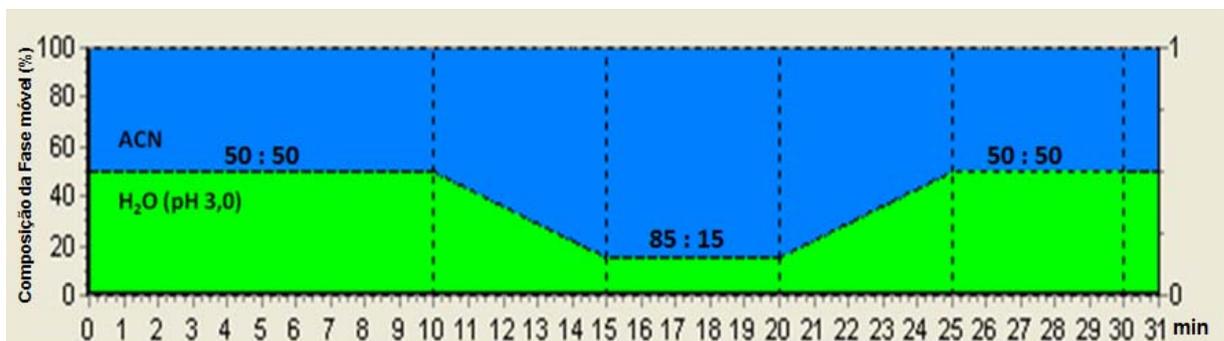


Figura 13. Gradiente da fase móvel: ACN:H₂O (acidificada com ácido acético, pH 3,0) Fluxo=1,0 mL min⁻¹.

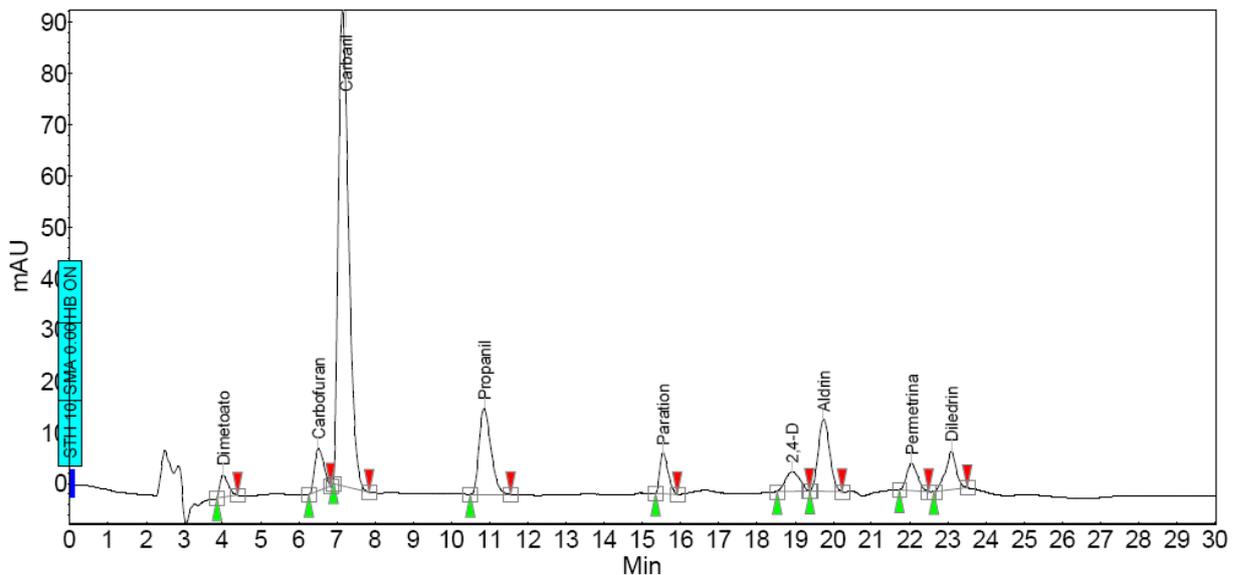


Figura 14. Cromatograma de identificação dos compostos em estudo. Condições cromatográficas: coluna Varian C-18, 5 μ m (250 x 4,6 mm d.i); Fase Móvel: ACN:H₂O (acidificada em pH 3,0) modo gradiente, Fluxo=1,0 mL min⁻¹; volume de injeção: 20 μ L (solução padrão mistura dos pesticidas na concentração de 5 mg .L⁻¹); detecção: 220 nm.

5.2 Obtenção do Espectro de Absorção no UV dos compostos

Na Figura 15 é apresentado o espectro de absorção em 3D na região do UV e o comprimento de onda de máxima absorção, obtidos na faixa de 200 a 260 nm para os compostos estudados, utilizando para tal fim um detector espectrofotométrico com arranjo de diodos.

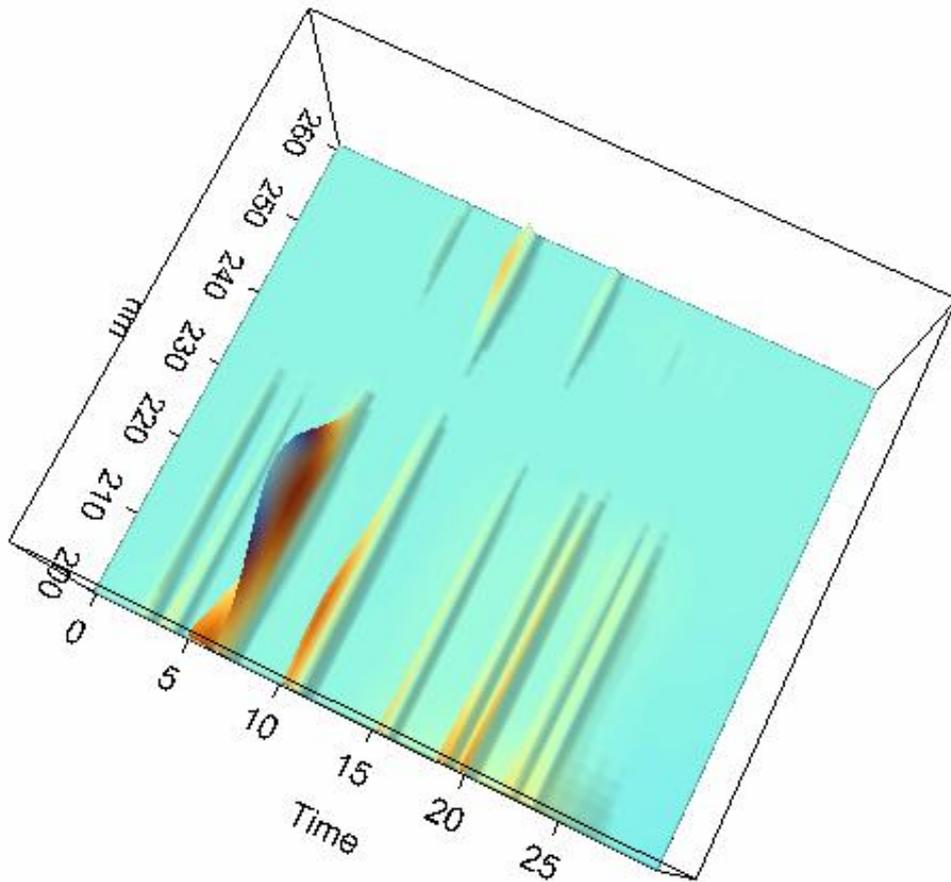


Figura 15. Espectro de máxima absorção na região do UV para os pesticidas estudados.

Para obtenção de resultados mais sensíveis, estes podem ser obtidos quanto mais próximos os comprimentos de onda selecionados estiverem da região de máxima absorção da espécie (analito). Analisando o espectro de absorção, fixou-se o comprimento de onda em 220 nm visto obter-se cromatograma com menos ruído, já que em outros comprimentos de onda estudados, p. ex., 230 nm, observou-se considerável variação na linha de base.

5.3 Validação do Método de Determinação dos Pesticidas em mel

5.3.1 Curva analítica, detectabilidade e intervalo linear

Observando-se os resultados nas Figuras 16 a 24, é possível verificar que as curvas analíticas para os compostos em estudo apresentaram boa linearidade na faixa estudada, com coeficientes de correlação superiores a 0,99.

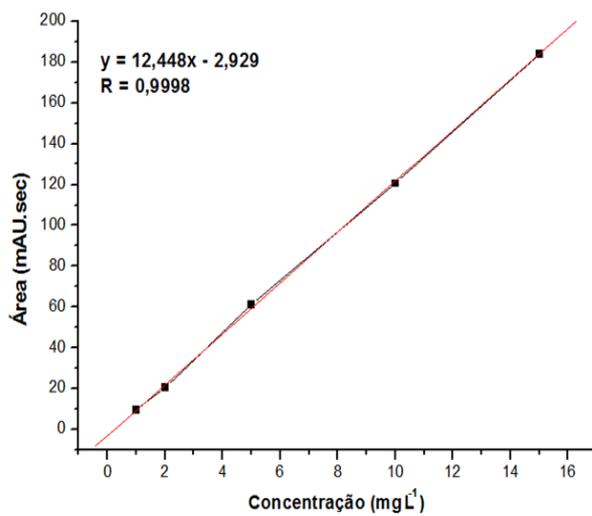


Figura 16. Curva analítica obtida para o dimetoato.

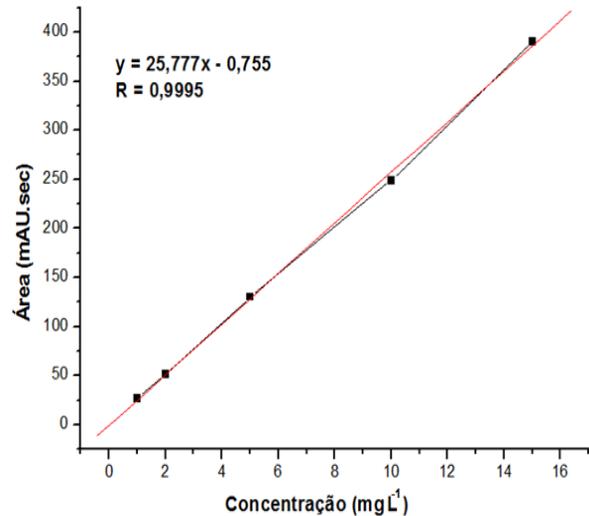


Figura 17. Curva analítica obtida para o Carbofuran.

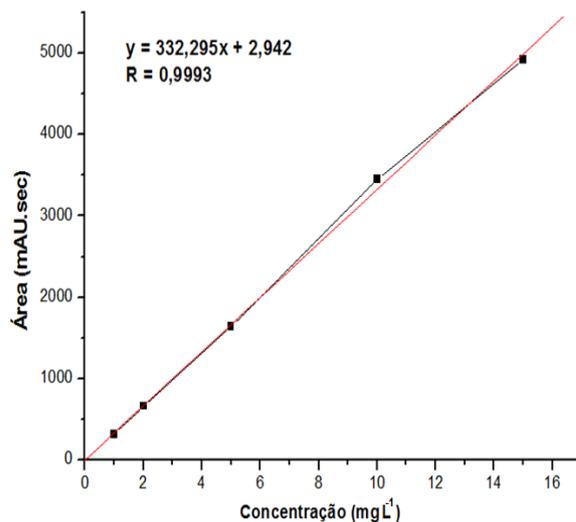


Figura 18. Curva analítica obtida para o Carbaril.

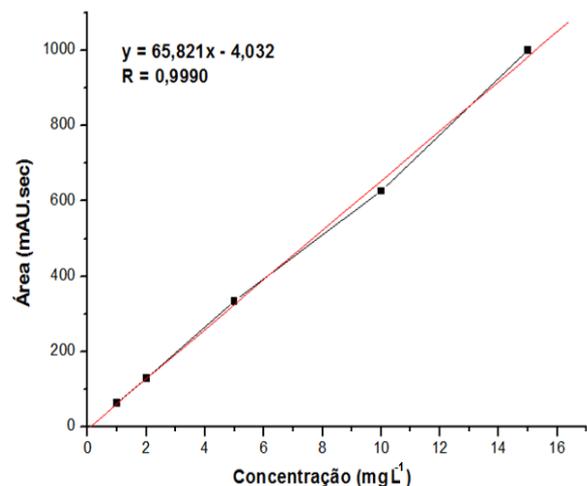


Figura 19. Curva analítica obtida para o Propanil.

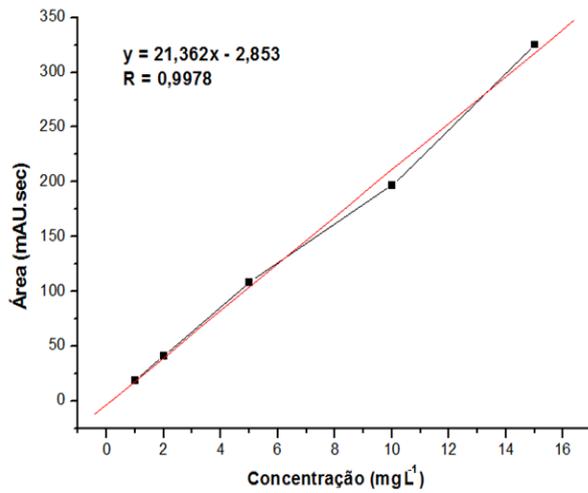


Figura 20. Curva analítica obtida para o Parationa Metilica

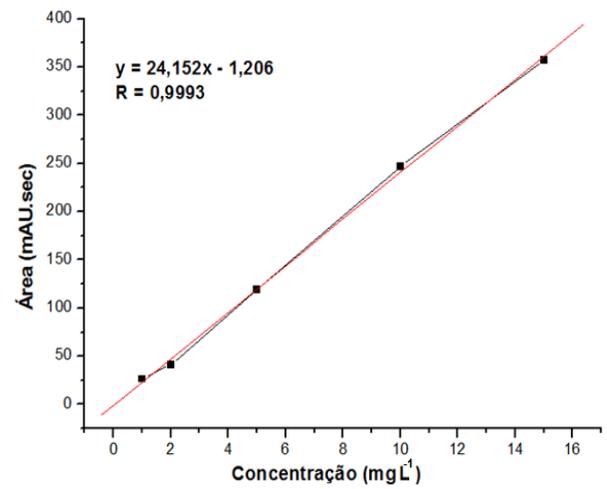


Figura 21. Curva analítica obtida para o 2,4-D.

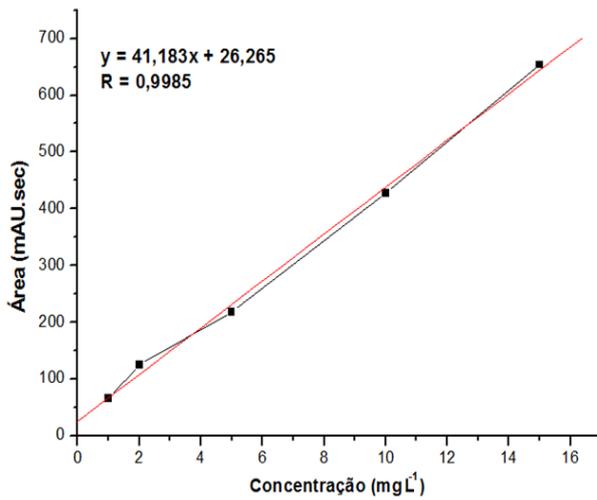


Figura 22. Curva analítica obtida para o Aldrin.

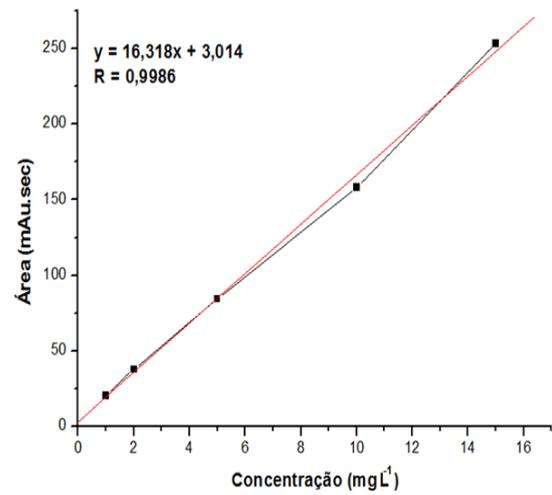


Figura 23. Curva analítica obtida para a Permetrina.

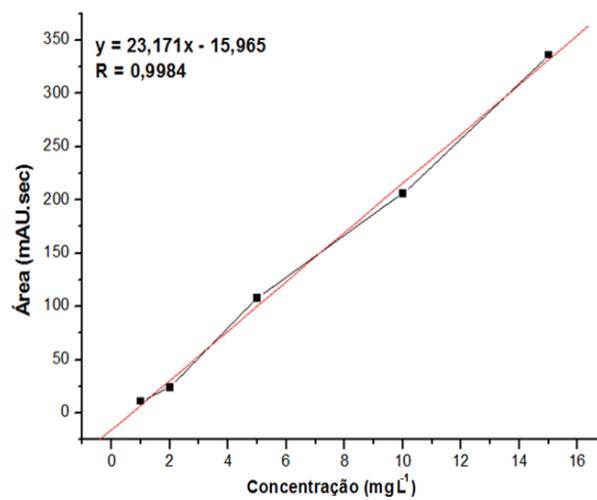


Figura 24. Curva analítica obtida para o Dieldrin.

A Tabela 6 apresenta os resultados de validação do método desenvolvido neste trabalho.

Tabela 6. Parâmetros de validação para a análise cromatográfica dos compostos incluídos neste estudo.

<i>Composto</i>	<i>Interv. Linear (mg L⁻¹)</i>	<i>T_r (min.)</i>	<i>LD (mg L⁻¹)</i>	<i>LQ (mg L⁻¹)</i>	<i>r</i>
Dimetoato	1,0 - 20,0	4,03	0,077	0,233	0,9998
Carbaril	1,0 - 20,0	6,53	0,198	0,600	0,9995
Carbofurano	1,0 - 20,0	7,16	0,142	0,430	0,9993
Propanil	1,0 - 20,0	10,88	0,123	0,372	0,9990
Parationa Metílico	1,0 - 20,0	15,56	0,236	0,715	0,9978
2,4-D	1,0 - 20,0	18,85	0,093	0,281	0,9993
Aldrin	1,0 - 20,0	19,69	0,178	0,536	0,9985
Permetrina	1,0 - 20,0	22,00	0,221	0,669	0,9986
Dieldrin	1,0 - 20,0	23,11	0,268	0,811	0,9984

Existem diversas técnicas e metodologias para determinação de pesticidas em mel (Tabela 4). JIN Zhen et al. (2006) obtiveram resultados de LD para dimetoato, carbofurano, carbaril, parationa e permetrina de 6,30; 1,20; 8,70; 5,90 e 1,0 mg kg⁻¹, respectivamente, por CG-EI/MS SIM. Também usando cromatografia gasosa e detecção por espectroscopia de massa, RISSATO (2007) obteve valores de LD de 0,002 e 0,001 mg L⁻¹, para os pesticidas aldrin e parationa metílico, respectivamente. Para determinação de pesticidas organoclorados em mel, valores de LD de 0,1 mg Kg⁻¹ foram obtidos para análise de aldrin e dieldrin respectivamente, por CG-ECD (TSIPI, 1999).

5.4 Recuperação e Precisão

5.4.1 Estudo da Extração em Fase Sólida (EFS)

A Figura 25 apresenta um cromatograma de um extrato de mel não fortificado, obtido da EFS com cartuchos Strata[®] X. Observou-se um pico com elevado sinal compreendido entre 4-5 min, proveniente da matriz (interferente) ou devido ao solvente usado na extração. Para confirmação, injetou-se o solvente (puro), obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 26.

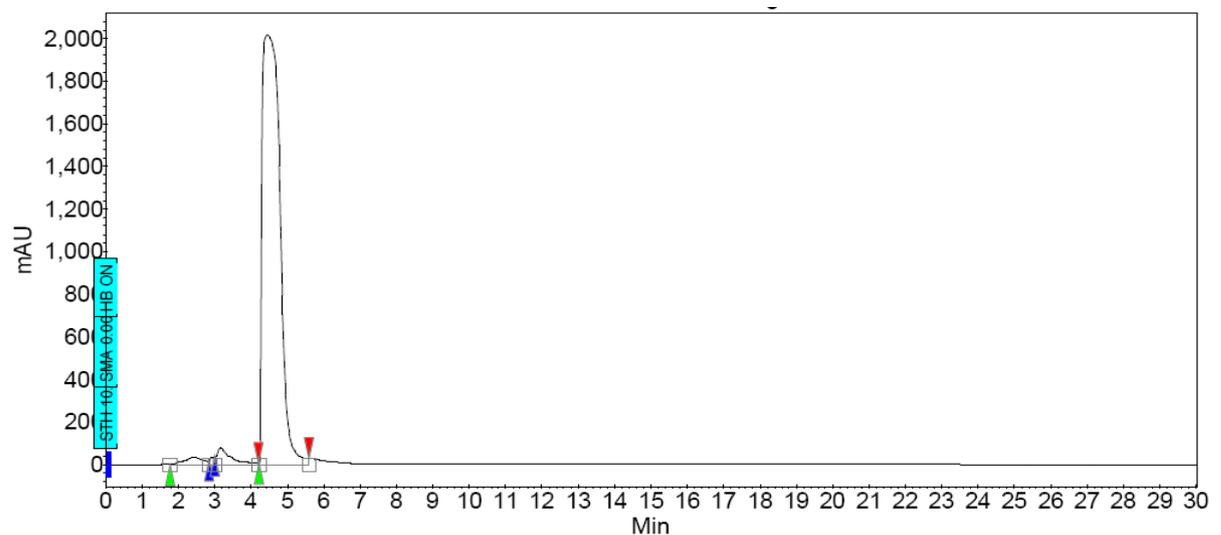


Figura 25. Cromatograma da amostra de mel sem fortificação, após EFS usando cartucho Strata[®] X.

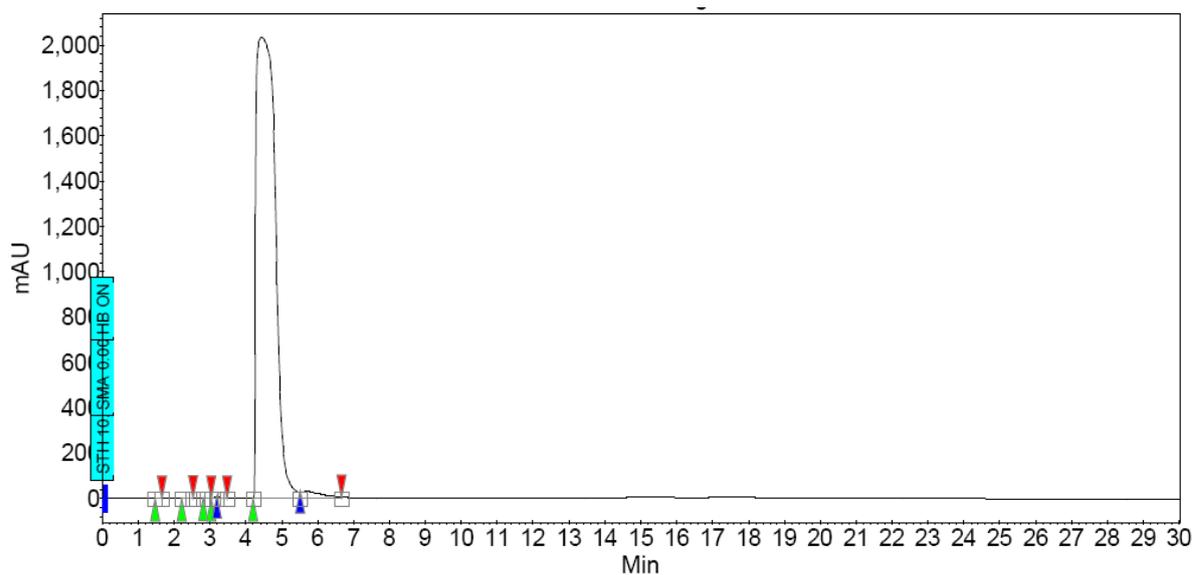


Figura 26. Cromatograma obtido da injeção direta do solvente (acetato de etila).

A Tabela 7 apresenta os valores de recuperação e precisão intermediária (repetitividade) obtidos para os compostos em estudo, utilizando-se extração em fase sólida em cartuchos de Strata® X.

Tabela 7. Recuperações e precisões da metodologia para análise dos pesticidas nas amostras de mel fortificadas.

<i>Pesticida</i>	<i>Nível de Fortificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	<i>Recuperação Média (%)^(*)</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Dimetoato</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	40,56	9,15
	<i>0,40</i>	45,56	2,28
<i>Carbaril</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	95,12	3,25
	<i>0,40</i>	101,79	4,02
<i>Carbofurano</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	86,88	2,41
	<i>0,40</i>	96,88	2,16
<i>Propanil</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	97,74	3,61
	<i>0,40</i>	95,74	2,62
<i>Parationa Metílica</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	89,89	6,29
	<i>0,40</i>	96,56	3,25
<i>2,4-D</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	88,30	8,54
	<i>0,40</i>	98,29	2,25
<i>Aldrin</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	ND	-
	<i>0,40</i>	48,28	8,58
<i>Permetrina</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	ND	-
	<i>0,40</i>	ND	-
<i>Dieldrin</i>	<i>0,10</i>	ND	-
	<i>0,30</i>	38,06	11,31
	<i>0,40</i>	43,72	3,47

ND – Não Detectado. n = 3.

(*) EFS com cartuchos Strata® X (resíduos retomados com acetato de etila).

As porcentagens de recuperação dos analitos foram expressivas sendo consideradas satisfatórias, de acordo com os valores sugeridos pelo GARP, dentro da faixa de 70 -120 % (GARP, 2008). Porém, não houve recuperações para o menor nível de fortificação para o método de extração.

Os coeficientes de variação, obtidos nos três níveis de concentração para as amostras de mel fortificadas variaram entre 2,1 a 11,3%, mostrando uma precisão intermediária satisfatória, em termos de repetitividade, uma vez que são admitidos coeficientes de variação de até 20%. Deve-se ressaltar, entretanto que, dependendo da complexidade analítica e da amostra, recuperações de 50 a 120% e coeficientes de variação de até 15% seriam ainda aceitáveis (Resolução n° 899/2003, ANVISA.).

Para a amostra de mel fortificada com os compostos em estudo não foi possível detecção dos compostos no menor nível de fortificação, sendo que, para a permetrina não houve recuperação em nenhum dos níveis fortificados. Para os compostos carbaril, carbofurano, propanil, parationa metílica e 2,4-D, nos níveis de fortificação de 0,3 e 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, os percentuais de recuperações variaram de 86 a 101%, com coeficientes de variação entre 2,1 e 8,5%. Estes resultados demonstraram satisfatória condição de recuperação e precisão relativa para estes compostos usando o cartucho Strata X.

Assim, dos 9 pesticidas analisados, foram obtidas valores de recuperação satisfatórias para os pesticidas: carbaril, carbofurano, propanil, parationa metílica e 2,4-D, obtendo-se valores superiores a 80 % na matriz mel. Alguns pesticidas como dimetoato, aldrin e dieldrin tiveram valores de recuperação inferiores a 50 %.

Para minimizar o efeito dos interferentes e melhorar o sinal dos compostos, na última etapa do processo de extração, utilizou-se como solvente de retomada o metanol (Figura 27). Na repetição dos ensaios de recuperação com cartuchos Strata[®] X, observou-se um pico com sinal compreendido entre 4-5 min, mas de menor intensidade quando comparado com o da Figura 25. Deste modo otimizou-se a etapa final da metodologia analítica, com a retomada do resíduo final com o solvente metanol.

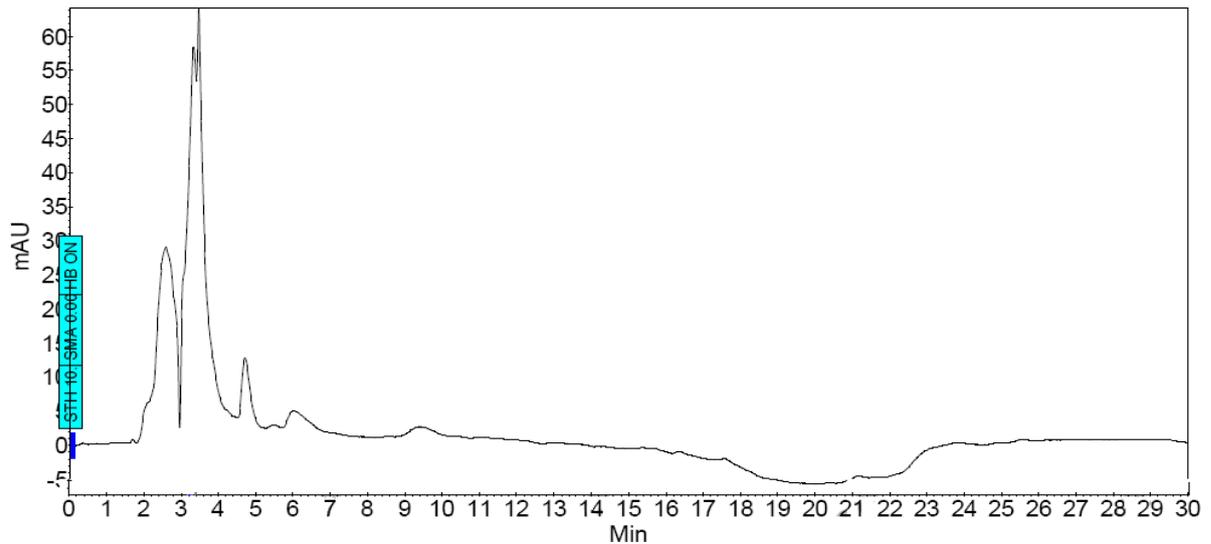


Figura 27. Cromatograma de um extrato de mel sem fortificação - controle/testemunha (eluição com metanol).

Na Figura 28, observa-se para os ensaios de recuperação com cartuchos Strata[®] X, no nível de fortificação $0,30 \mu\text{g g}^{-1}$ (quantidade injetada $0,08 \mu\text{g}$), que houve valores expressivos de recuperação, porém, mais uma vez, observou-se um pico com sinal compreendido entre 4-5 min (sem identificação).

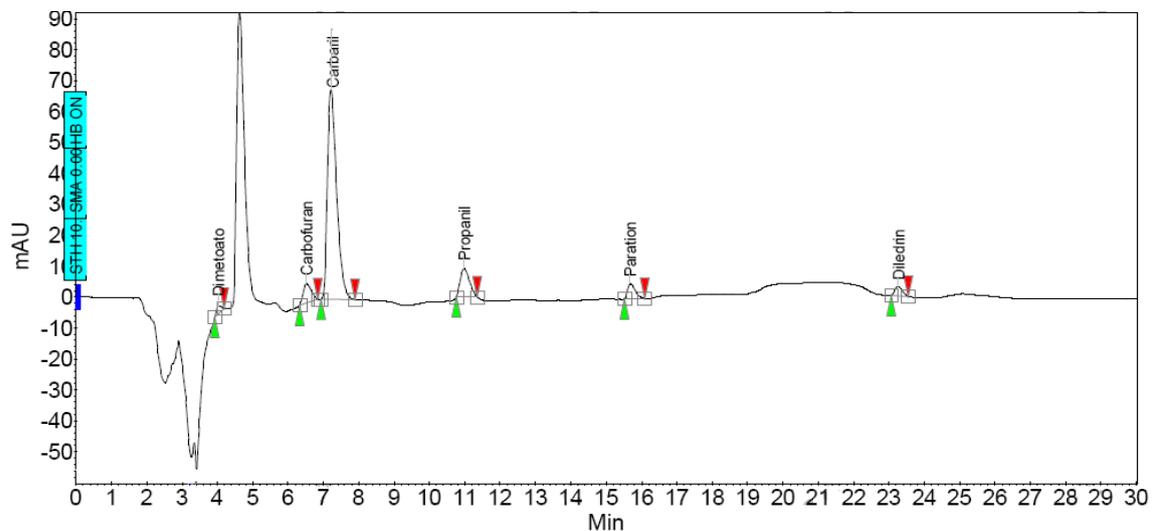


Figura 28. Cromatograma de um extrato de mel fortificado ($0,30 \mu\text{g g}^{-1}$), após EFS usando cartucho Strata[®] X.

A princípio, o “pico fantasma” poderia ser considerado um interferente do próprio material de adsorção; porém, observando-se as Figuras 29 e 30 (ensaios de recuperação com cartuchos Strata® X no nível de fortificação 0,50 e 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$; quantidade injetada 0,20 e 0,40 μg respectivamente), verifica-se que não houve a existência do pico entre 4-5 min, mostrando que o mesmo pode ter sido originado de algum interferente proveniente da matriz mel em análise. Como o tempo de retenção (t_R) do pico interferente não coincidir com t_R de nenhum dos pesticidas, não houve problema, por ocasião da quantificação dos analitos.

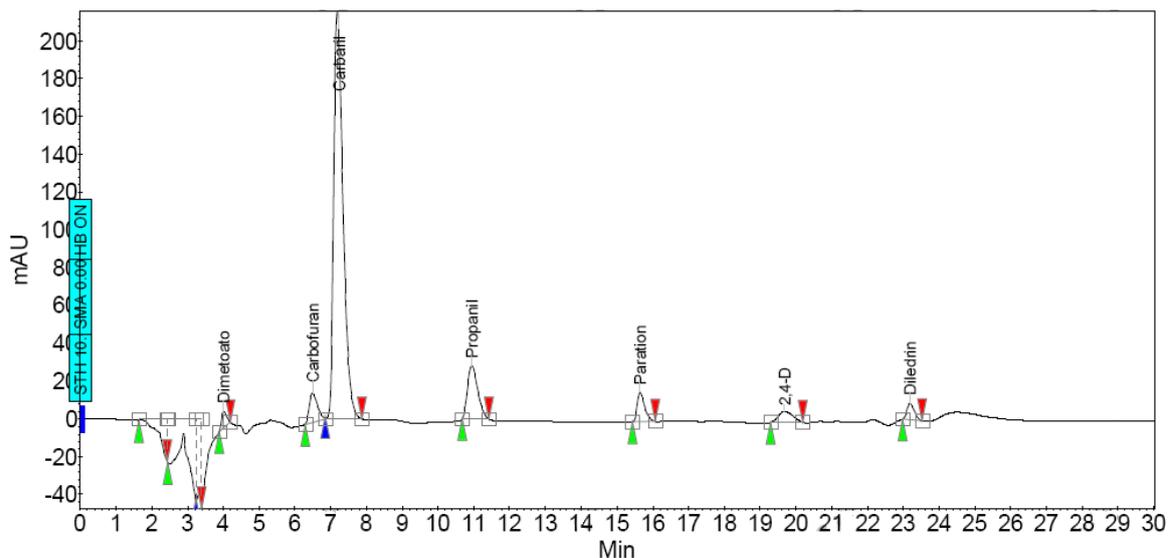


Figura 29. Cromatograma de um extrato de mel fortificado (0,50 $\mu\text{g g}^{-1}$), após EFS usando cartucho Strata® X.

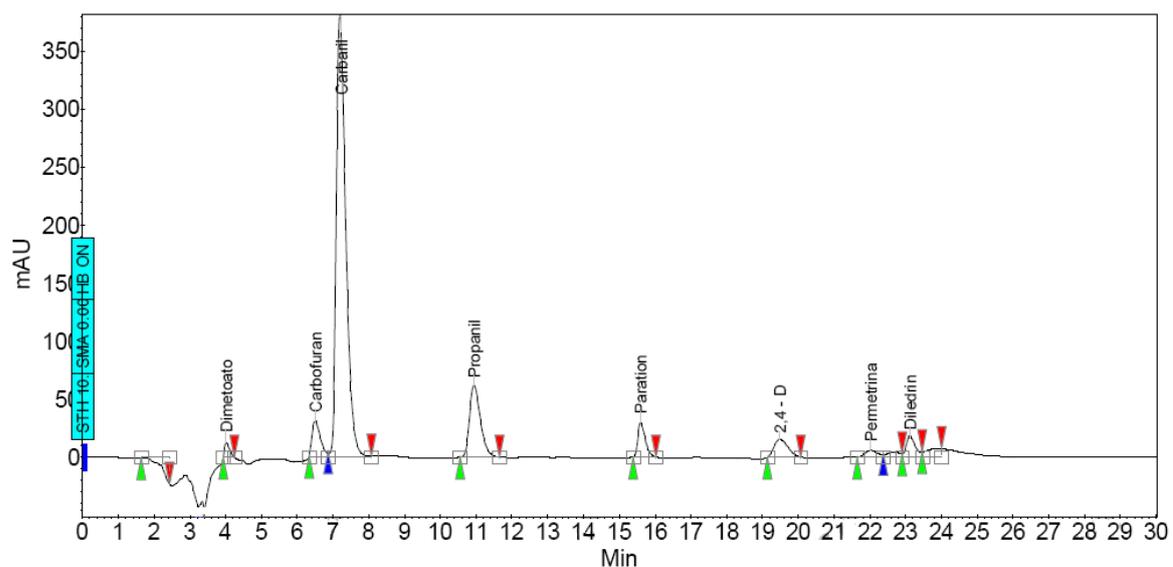


Figura 30. Cromatograma de um extrato de mel fortificado (1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$), após EFS usando cartucho Strata® X.

A Tabela 8 apresenta os valores de recuperação e precisão intermediária (repetitividade) obtidos para os compostos em estudo, submetidos à EFS utilizando cartuchos de Strata® X.

Tabela 8. Recuperações e precisões de amostras de mel fortificadas (0,30, 0,50 e 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$) após EFS, utilizando cartuchos Strata X (retomada com metanol).

<i>Pesticida</i>	<i>Nível de Fortificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	<i>Recuperação Média (%)^(*)</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Dimetoato</i>	<i>0,30</i>	61,10	5,88
	<i>0,50</i>	68,29	8,57
	<i>1,00</i>	58,38	5,22
<i>Carbaril</i>	<i>0,30</i>	97,68	4,87
	<i>0,50</i>	101,58	4,85
	<i>1,00</i>	102,53	4,38
<i>Carbofurano</i>	<i>0,30</i>	92,26	7,25
	<i>0,50</i>	96,89	4,25
	<i>1,00</i>	95,99	6,39
<i>Propanil</i>	<i>0,30</i>	64,44	3,65
	<i>0,50</i>	96,59	7,34
	<i>1,00</i>	102,53	5,35
<i>Parationa Metílica</i>	<i>0,30</i>	93,54	4,92
	<i>0,50</i>	113,58	8,28
	<i>1,00</i>	96,32	2,54
<i>2,4-D</i>	<i>0,30</i>	ND	-
	<i>0,50</i>	78,74	3,46
	<i>1,00</i>	85,82	4,91
<i>Aldrin</i>	<i>0,30</i>	ND	-
	<i>0,50</i>	ND	-
	<i>1,00</i>	ND	-
<i>Permetrina</i>	<i>0,30</i>	ND	-
	<i>0,50</i>	ND	-
	<i>1,00</i>	47,90	5,42
<i>Dieldrin</i>	<i>0,30</i>	98,85	4,82
	<i>0,50</i>	111,87	9,67
	<i>1,00</i>	75,27	5,32

ND – Não Detectado. (*) n = 3.

Pelos dados contidos na Tabela 8 verifica-se que as porcentagens de recuperação foram expressivas para determinados compostos, sendo consideradas satisfatórias de acordo com os valores sugeridos pelo GARP.

Para a amostra de mel fortificada no menor nível de fortificação ($0,30 \mu\text{g g}^{-1}$), não foi possível detectar o composto 2,4-D; para a permetrina, só houve recuperação no maior nível de fortificação (recuperação 47%). Para os compostos dimetoato, carbaril, carbofurano, propanil, parationa metílica, 2,4-D e dieldrin ($0,50$ e $1,00 \mu\text{g g}^{-1}$), as recuperações médias variaram de 58 a 113%, com coeficientes de variação entre 2,5 e 9,6%.

A metodologia proposta para extração dos pesticidas em amostra de mel por EFS apresentou recuperações médias satisfatórias para todos os níveis de fortificação em estudo.

Os valores de recuperação foram considerados satisfatórios para o composto dieldrin, quando comparado com a Tabela 7, isso se deve ao fato de que provavelmente, ter ocorrido degradação do composto aldrin que não foi detectado em nenhum dos níveis de fortificação. Por este motivo, somando as áreas dos dois compostos aldrin (degradado) com o composto dieldrin (fortificado), foram obtidos valores de recuperação superiores aos da Tabela 7.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os limites de detecção e quantificação obtidos para o método de determinação dos pesticidas dimetoato, carbaril, carbofurano, propanil, parationa metílica, 2,4-D, aldrin, permetrina e dieldrin, foram superiores aos limites descritos pela literatura para análise de resíduos de pesticidas em mel, utilizando a técnica CG-MS.

As análises cromatográficas mostraram que o método analítico desenvolvido para os pesticidas dimetoato, carbaril, carbofurano, propanil, parationa metílica, 2,4-D, aldrin, permetrina e dieldrin apresentou boa linearidade na faixa de concentração estudada, com coeficientes de correlação superiores a 0,99 obtidos nas determinações dos compostos estudados.

O método de extração dos pesticidas em amostras de méis, utilizando o adsorvente Strata[®] X, apresentou desempenho satisfatório para os compostos carbaril, carbofurano, propanil, parationa metílico e 2,4-D, podendo ser utilizado para a validação do método e conseqüente aplicação na determinação destes pesticidas em amostras de méis. Para os inseticidas organoclorados aldrin e dieldrin e o inseticida organofosforado dimetoato as recuperações foram inferiores a 50 %, utilizando-se como solvente extrator acetato de etila e eluição com acetato de etila.

O método de extração de pesticidas em amostras de méis utilizando o adsorvente Strata[®] X apresentou boa eficiência para os compostos dimetoato, carbaril, carbofuran, propanil, paration metílico, 2,4-D e dieldrin (aldrin + dieldrin), podendo ser utilizado para a validação do método e conseqüente aplicação na determinação de pesticidas em amostras de méis, utilizando-se como solvente extrator o acetato de etila, seguida de EFS eluição com metanol.

O método multirresíduo para determinação dos 9 pesticidas de diferentes classes apresentou níveis de recuperação acima de 70% para a maioria dos compostos em estudos, na amostra de mel utilizada com repetibilidade satisfatória e coeficientes de variação inferiores a 15%. Nos compostos com recuperações inferiores a 70 % embora possam ser analisados pelo método selecionando, não poderão ser devidamente determinados devido as baixas recuperações nas condições de extração,

7. REFERÊNCIAS

ABIFINA - Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades. Disponível em: < <http://www.abifina.org.br> >, Acessado em 10 jul. 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: <http://cepheus.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html>. Acessado em 20 mai. 2007.

AGUILAR C., F. Borrull, R. M. Marcé, LC-GC, 14 (1996) 1048.

ALBERO, B., Consuelo Sanchez-brunete, Tadeo, J. L. Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 5828-5835.

AL-RIFAI, J. N. Akeel, J. Apicult. Res. 36 (1997) 155.

AMARANTE JÚNIOR, O.P. de; RIBEIRO, M.L. Desenvolvimento de método simples para a determinação de resíduos de diuron por cromatografia a líquido em amostras de laranja. Pesticidas: Rev. *Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v.15, p. 15-20, 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>, Acessado em 05 de jun.2004.

ARIAS, A. R. L., VIANA, T. A. P., INÁCIO, A. F. Utilização de Bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. Trace determination of pesticides and their degradation products in water. 1997. *Techniques and Instrumentation in analytical chemistry*. v-19.

BIZIUK M., A. Przużajny, J. Czerwinski, M. Wiergowiski, J. Chromatogr. A, 754 (1996) 103.

BLASCO, C., C.M. Lino,, Y. Picó, A. Penaa, G. Fontb, M.I.N. Silveira. Journal of Chromatography A, 1049 (2004) 155–160.

BLASCO, C., M. Fernández, A. Pena, C. Lino, M.I. Silveira, G. Font, Y. Picó, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 8132.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 9, de 30 de Março de 2007.

BRITO et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: *Rev. Ecotoxicol. E Meio Ambiente*, v.13, p. 129-146, 2003.

BULL, D.; HATHAWAY, D. Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo. Petrópolis: Ed. Vozes, 1986. 235p.

CAMPOS, R. G. M. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra, vol.11, n.2, p.17-47, 1987.

ETO, M. Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry, Cleveland, Ohio: CRC, 1977. 387p.

EUROPEAN COMMUNITY; Brussels (1990) EC Council Directive 90/642/EEC of November 27, 1990, *Official Journal of European Communities*, L350, 0071.

EUROPEAN PARLIAMENT. Resolución proposal B5-0410/2003 de 1 de Outubro de 2003.

FARIA, L. J. S., Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

FERNÁNDEZ, M. A., Sancho, M. T., Muniategui, S., Huidobro, J. F., Simal, J., J. Food Protect. 58 (1995) 449.

FERNÁNDEZ, M. Y. Picó, J. Mañes, *Chromatographia* 56 (2002) 577.

GARCIA, E.G. Pesticide control experiences in Brazil. *Pesticide Safety News*, v.2, Sep. p.5, 1997. 68

GARCIA, E.G. Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos. São Paulo: Fundacentro; 2001. p.16.

GARCIA, E.G.; ALMEIDA, W. F. Exposição de trabalhadores rurais aos agrotóxicos no Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. v.19, n.72, p.7-11, 1991.

GARP – Associação Nacional dos Especialistas em Resíduos, Contaminantes e Poluentes Orgânicos. Disponível em: <<http://www.garp.org.br>> , acessado em 21 de setembro de 2008.

GELMINI, G. A. Agrotóxico: legislação básica. São Paulo: Fundação Cargill, 1991. v.1-2.

GOMIS, D.B. J.J. Mangas, A. Castaño, M.D. Guti´errez, Anal. Chem. 68 (1996) 3867.

HENNION M. C.; J. Chromatogr. A, 856 (1999) 5.

IBÁÑEZ M., Y. Picó, J. Mães, J. Chromatogr. A, 728 (1996) 325.

JANSSON, C. J. AOAC Int. 83 (2000) 714.

JIN Zhen, LIN Zhuguang, CHEN Meiyu, MA Yu, TAN Jun, FAN Yulan, WEN Jiachen, CHEN Zhaobin, TU Fengzhang. Chin J Chromatogr, 2006, 24(5): 440–446.

KORTA, E., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo B., F. Vicente, J. Chromatogr. A 930 (2001) 21.

LARA, W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. Química Nova, v. 2, n.15, p. 161-165, 1992.

LIMA, Josanidia Santana. Bioindicação em Ecossistemas Terrestres. Disponível em <http://www.herbario.com.br/dataherb06/1112bioindicad.htm>, acessado em 25 de abril de 2008.

LISKA, I. et al. The use of solid sorbents for direct accumulation of organic compounds from water matrices: a review of solid-phase extraction techniques. Journal High Resolution Chromatography. V.12. p.577-590, 1989.

MACIEL, Edson. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multiresíduos para quantificação de resíduos de pesticidas em manga (*Mangifera indica*). Piracicaba, 2005. 70 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

MARQUES, P. R. B. de O., Metodologias analíticas envolvendo cromatografia gasosa e biossensores enzimáticos para controle de resíduos de pesticidas em amostras ambientais. 2002. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

MUNOZ, Orlando et al . Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. Quím. Nova, São Paulo, v. 30, n. 4, ago. 2007.

NUNES, G. S., Análise de inseticidas N-metil carbamatos em amostras vegetais, empregando técnicas cromatográficas, imunoenaios (ELISA) e biossensores amperométricos. 1999. 2004 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

OGA, S. (Ed.) - Fundamentos de Toxicologia. Atheneu: São Paulo, 2ª. edição, 2003

OTERO, R. R. et al. *Talanta* 71 (2007) 503–514.

PEÑA, R.C. 2008. Propolis standardization: a chemical and biological review. *Cien. Inv.*

RIBANI, M., Bottoli C. B. G., Collins C. H., Jardim I. C. S., Melo L. F. C., *Química Nova*, 27 (2004) 771.

RIBEIRO, Arine da Graça Soares. Determinação de Resíduos de Pesticidas em Acerola. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

RISSATO, S. R., Galhiane, M. S., Almeida, M. V. de, Gerenutti, M., Benhard, M. *Apon. Food Chemistry* 101 (2007) 1719–1726

RISSATO, S.R., M.S. Galhiane, F.R.N. Knoll, B.M. Apon, *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 153.

RISSATO, S. R. et al. Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. *Quím. Nova* [online]. 2006, vol.29, n.5, pp. 950-955

SANTOS, T. C. R., Estudo da degradação do herbicida propanil em campos de cultivo de arroz. 1999. 168 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SANTOS, T. C. R., Pré-Concentração De Compostos Orgânicos Em Amostras Ambientais. Dept. Tecnologia Química – UFMA, São Luís – MA, 2000.

SHERIDAN, R. Análise multiresidual de pesticidas em alimentos com alto teor de açúcar utilizando a técnica de extração em fase sólida sem condicionamento. *Revista Analytica* – Agosto/Setembro 2005, n 18. Pag. 82.

SWARTZ, M. E, Krull, I. S, *Pharmaceut. Technol.*, (1996) 12.

TOMLIN, C. *The Pesticide Manual*. Surrey: The Royal Society of Chemistry, 1995. 1341 p.

TSIPI D., Triantafyllou M., Hiskia A., *Analyst* 124 (1999) 473.

VAN DER WERF H.M.G.; *Agric., Ecosyst. Environ.*; 60 (1996) 81.

WINSTON, M. L.; *The Biology of the Honey Bee*, Harvard University Press: Cambridge, Mass., 1987.