



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

RENATA CABRERA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO PÓLEN APÍCOLA
COMO BIOINDICADOR DE CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL POR AGROTÓXICOS**

CAMPINAS, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

OL4a Oliveira, Renata Cabrera de, 1984-
Avaliação do potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos / Renata Cabrera de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Susanne Rath.

Coorientador: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Bioindicador. 2. Agrotóxicos. 3. Pólen apícola. 4. GC-MS/MS. I. Rath, Susanne. II. Queiroz, Sonia Claudia do Nascimento. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of potencial use of bee pollen as bioindicator of environmental pesticide contamination

Palavras-chave em inglês:

Bioindicator

Pesticides

Bee pollen

GC-MS/MS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Susanne Rath [Orientador]

Ademilson Espencer Egea Soares

Jonas Augusto Rizzato Paschoal

Ivo Milton Raimundo Junior

Helena Teixeira Godoy

Data de defesa: 08-08-2014

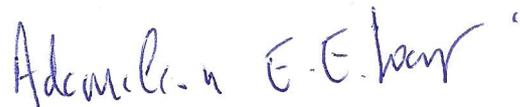
Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Susanne Rath (Orientadora)



Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares (FMRP-USP)



Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal (FCFRP-USP)



Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior (IQ-UNICAMP)



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy (FEA-UNICAMP)



Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **RENATA CABRERA DE OLIVEIRA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de Agosto de 2014.



Profa. Dra. Susanne Rath
(Presidente da Banca)

*Pois onde estiver o seu tesouro, aí
também estará o seu coração.*

Mateus 6:21

Dedicatória

A Deus, o autor da minha história!

Agradecimentos

A Deus, por seu amor incondicional. Eternamente grata!

À minha orientadora, Susi, pelo amor com que nos conduz e por ser um exemplo como pesquisadora e como ser humano.

À minha coorientadora, Sônia, pela amizade e carinho de sempre.

Ao Dr. Ricardo Camargo, da Embrapa, por todo o apoio com o apiário e as coletas de pólen no Campo Experimental.

Aos pesquisadores do Campo Experimental, da Embrapa, pelo apoio na coleta de informações no campo e nas propriedades vizinhas.

Ao Prof. Ademilson Espencer, por nos introduzir ao maravilhoso mundo das abelhas no início deste trabalho, e por nos enviar gentilmente amostras de pólen apícola coletadas em Ribeirão Preto.

A toda a banca examinadora por contribuírem com sua experiência e conhecimento.

À minha mãe, Eliane, por seu amor, incentivo e apoio, e por me ensinar a não desistir dos meus sonhos.

Ao Thiago, meu esposo, amigo e porto seguro, por seu apoio, paciência, compreensão e amor incomparáveis.

Aos meus irmãos, Fernanda, Ana Luiza e Henrique, meus grandes amores.

Aos meus tios Denise e Telinho e ao Caio por me acolherem em sua casa e por me apoiarem e serem exemplo em todos os aspectos.

À minha tia Cris, por seu amor e amizade, e por nossas longas conversas e orações.

A toda a minha família, por serem a base da minha formação.

Aos meus queridos amigos do grupo Paracelsus: Cyntia, Ricardo, Andreza, Mônica, Lívia, Leonardo, Rafael, Fabrício, Tamires, Natália, Daiane, pela amizade e pelos deliciosos momentos que temos vivido juntos.

Aos amigos do Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa, Débora, Marley, Márcia Godoy, Márcia Assalin, Geane, Maria, Vera Ferracini por toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Neusa, D. Nenê, Lí Alves, Mara Mendes e Miriam Marion pelos deliciosos almoços que mais eram sessões de terapia.

À minha grande amiga, Dani Nieri, por todo apoio, força e risadas deliciosas.

As minhas amigas e mães postizas, Eliana e Sarita, e tantas outras amigas que Deus me deu nos últimos anos, por trazerem mais alegria a minha vida.

Às agências CAPES e FAPESP pela concessão das bolsas de estudo e auxílio financeiro.

À UNICAMP, em especial ao Instituto de Química, por me conceder o privilégio de ser aluna neste curso.

À Comissão de Pós Graduação, em especial à Bel, por sua competência e atenção com cada aluno.

À Embrapa, por toda sua infraestrutura colocada a disposição durante a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo (IBt-SP) pelo uso das instalações e equipamentos do laboratório do Núcleo de Pesquisa em Palinologia (NPP) para a preparação do material polínico e, em especial à Dra. Cynthia Fernandes Pinto da Luz, pesquisadora científica do NPP, pelas identificações e análises polínicas.

A tantas outras pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A todos, meu sincero agradecimento!

Curriculum Vitae

Renata Cabrera de Oliveira

renata29269@hotmail.com

Formação acadêmica

- 2009-2014** Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP
Título: Avaliação do potencial do pólen apícola como bioindicador da contaminação ambiental por agrotóxicos
Doutorado em Química.
- 2007 - 2009** Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP
Título: Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para a Determinação de Resíduos de Estreptomicina e Diidroestreptomicina em Leite (ELISA, LC-APCI/MS-MS QToF), Ano de obtenção: 2009
Mestrado em Ciência de Alimentos.
- 2002 - 2006** Universidade Estadual de Maringá, UEM
Graduação em Farmácia e Análises Clínicas.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, PASCHOAL, Jonas, REYES, Felix. Streptomycin and dihydrostreptomycin residues in bovine milk from the Brazilian retail market. Food Additives & Contaminants. Part B. Surveillance Communications. v.3, p.156 - 162, 2010.
2. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, PASCHOAL, J. A. R., SISMOTTO, M., AIROLDI, F. P. S., REYES, F. G. R. Development and validation of an LC-APCI-MS/MS QToF analytical method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk. Journal of Chromatographic Science. v.47, p.756 - 761, 2009.
3. BANDO, Erika, OLIVEIRA, Renata Cabrera de, FERREIRA, Gabrielle Marconi Zago, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the state of Parana, Brazil. Journal of Food Protection. v.72, p.911 - 914, 2009.
4. CALDAS, Glória Maria Menezes, OLIVEIRA, Renata Cabrera de, TESSMANN, D. J., MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Ocorrência de patulina em uva fina (*Vitis vinifera* L. cv. "Rubi") com sinais de podridão ácida. Ciência Rural (UFSC. Impresso). v.38, p.14 - 18, 2008.
5. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, BANDO, Erika, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Intralaboratory Optimization and Validation of a Method for Patulin Determination in Grapes by Thin-Layer Chromatography. Brazilian Journal of Microbiology (Impresso). v.38, p.304 - 308, 2007.
6. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, BANDO, Erika, MACHINSKI JUNIOR, Miguel.

Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Health Sciences (Online)*. v.29, p.59 - 62, 2007.

Trabalhos publicados em eventos científicos (resumo expandido)

1. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, MACHINSKI JUNIOR, Miguel, BANDO, Erika. Otimização e validação de método para a determinação de cloranfenicol em leite por ensaio imunoenzimático (ELISA) In: XV Encontro Anual de Iniciação Científica e VI Encontro de Pesquisa da UEPG, 2006, Ponta Grossa. **Anais do XV Encontro Anual de Iniciação Científica e VI Encontro de Pesquisa da UEPG**, 2006.

2. FERREIRA, Gabrielle Marconi Zago, OLIVEIRA, Renata Cabrera de, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Estudo exploratório das intoxicações por medicamentos atendidas pelo Centro de Controle de Intoxicações de Maringá em 2002 e 2003. In: I Congresso Internacional de Saúde, 2005, Maringá. **Anais do I Congresso Internacional de Saúde**, 2005.

3. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, MACHINSKI JUNIOR, Miguel, CALDAS, Glória Maria Menezes. Otimização e validação de método para a determinação de patulina em uva por cromatografia em camada delgada-Parte2 In: I Congresso Internacional de Saúde, 2005, Maringá. **Anais do I Congresso Internacional de Saúde**, 2005.

Trabalhos publicados em eventos científicos (resumo)

OLIVEIRA, Renata Cabrera de, RATH, S., Queiroz, S. C. N. Desenvolvimento e Validação de Método Multirresíduos para Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Pólen Apícola por GC-MS/MS *Ion Trap*. In: Congresso Latino Americano de Cromatografia - COLACRO, 2012, Florianópolis. **Anais do Congresso Latino Americano de Cromatografia – COLACRO**, 2012.

2. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, PASCHOAL, J. A. R., SISMOTTO, M., AIROLDI, F. P. S., REYES, F. G. R. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico Quantitativo para Determinação de Resíduos de Estreptomicina e Diidroestreptomicina em Leite Pasteurizado por LC-APCI-MS/MS QToF In: Congresso Latino Americano de Cromatografia - COLACRO, 2008, Florianópolis. **Anais do Congresso Latino Americano de Cromatografia – COLACRO**, 2008.

3. BANDO, Erika, FERREIRA, Gabrielle Marconi Zago, **OLIVEIRA, Renata Cabrera de**, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná, Brasil In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2007, Búzios. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v.20, p.144 – 144, 2007.

4. AMARAL, Kassia Ayumi Segawa Do, SEKIYAMA, Beatriz Leiko, NASCIMENTO, Gabriel Bassaga, OLIVEIRA, Renata Cabrera de, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Aflatoxinas em produtos brasileiro a base de milho: Ocorrência e avaliação de risco. In: XIV ENAAL-Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 2005, Goiânia. **Anais do XIV ENAAL-Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**. p.344 – 344, 2005.

5. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Otimização e validação

intralaboratorial de método para a determinação de patulina em uva por cromatografia em camada delgada In: XIV Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC, 2005, Guarapuava. **Anais do XIV Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC**, 2005.

6. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, CALDAS, Glória Maria Menezes, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Otimização intralaboratorial de método para a determinação de patulina em uva por cromatografia em camada delgada-Parte 1. In: XIV ENAAL-Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 2005, Goiânia. **Anais do XIV ENAAL-Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**. p.119 - 119, 2005.

7. SILVA, Pamelli Maria de Souza, OLIVEIRA, Renata Cabrera de, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Intoxicações Causadas por Drogas de Abuso em Maringá e Região em 2002 In: II Mostra Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2004, Maringá. **Anais da II Mostra Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Maringá: EDUEM, 2004.

8. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, NISHIYAMA, Paula, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Modificação de método rápido para a determinação de salicilatos na urina de pacientes intoxicados In: XIII Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC, 2004, Londrina. **Anais do XIII Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC**, 2004.

9. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, SILVA, Pamelli Maria de Souza, MARGONATO, Fabiana Burdini, NISHIYAMA, Paula, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Perfil Epidemiológico das Intoxicações Atendidas pelo CCI-Maringá em 2002 In: VI Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 2004, Recife. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Epidemiologia - Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. especial, 2004.

10. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, SILVA, Pamelli Maria de Souza, MARGONATO, Fabiana Burdini, NISHIYAMA, Paula, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Perfil Epidemiológico das Intoxicações por Medicamentos Atendidos pelo CCI - Maringá em 2002 In: 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas, 2004, Cascavel - PR. **Anais do 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas**. Cascavel: UNIOESTE. p.170 - 170, 2004.

11. OLIVEIRA, Renata Cabrera de, MARGONATO, Fabiana Burdini, NEVES, Fernando Tozze Alves, SILVA, Pamelli Maria de Souza, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Análise de Técnicas Quanto à Sensibilidade e Especificidade aos Imipramínicos na Urina de Pacientes Intoxicados In: XVII Semana da Integração de Farmácia, 2003, Maringá. **Anais da XVII Semana da Integração de Farmácia**. Maringá: EDUEM, 2003.

12. MARGONATO, Fabiana Burdini, NEVES, Fernando Tozze Alves, SILVA, Pamelli Maria de Souza, OLIVEIRA, Renata Cabrera de, MACHINSKI JUNIOR, Miguel. Métodos Rápidos Para a Identificação e Quantificação de Benzodiazepínicos na Urina de Pacientes Intoxicados In: IV Seminário Científico Do Centro de Ciências da Saúde - A Saúde do Homem na Perspectiva do Novo Milênio, 2003, Maringá-PR. **Anais do IV Seminário Científico do Centro de Ciências da Saúde**. Maringá: EDUEM, 2003.

Formação complementar

2005 - 2005 Risco e Vulnerabilidade.
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil.

- 2005 - 2005** Qualificações/Certificações-Laboratório de Análises Clínicas
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil.
- 2003 - 2004** Prevenção, Preparação e Resposta para desastres.
Organização Pan Americana da Saúde Representação Brasil, OPAS-
BRASIL, Brasil.
- 2003 - 2003** Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica.
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil.
- 2003 - 2003** Conhecendo a Farmácia.
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil.
- 2002 - 2002** Estágio em Práticas de Laboratório.
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil.

RESUMO

O uso frequente e indiscriminado de produtos químicos na agricultura tem acarretado a presença de resíduos tóxicos nos alimentos e contaminação ambiental, principalmente em países com grande produção agrícola, como o Brasil. As abelhas e os produtos apícolas têm sido apontados como potenciais bioindicadores da presença de contaminantes no ambiente, monitorando grandes áreas devido às longas distâncias percorridas. Assim sendo, o potencial do uso do pólen apícola como bioindicador da contaminação ambiental por agrotóxicos foi avaliado neste trabalho. Para isso, dois métodos analíticos para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em pólen apícola, utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas sequencial (GC-MS/MS) foram desenvolvidos e validados de acordo com as recomendações do Guia SANCO da União Europeia. O preparo de amostras por QuEChERS garantiu seletividade adequada ao método analítico, que foi validado para a determinação de 26 agrotóxicos de diferentes classes. Um segundo método empregando partição com acetonitrila e determinação por GC-MS/MS foi validado para a determinação de 19 agrotóxicos. Os agrotóxicos avaliados apresentaram forte sorção no pólen apícola. Foram realizados estudos de sorção para o aldrin e malation no pólen apícola e os coeficientes de sorção de *Freundlich* foram de 2,946 e 0,934 ($\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$), respectivamente. Nas amostras provenientes do apiário experimental na Embrapa em Jaguariúna/SP (10 colmeias, 145 amostras coletadas no período de maio de 2012 a maio de 2013) não foram encontrados níveis quantificáveis dos agrotóxicos pesquisados. No entanto, foi identificada a presença de bioletrina em 4 amostras e pendimetalina em 18 amostras, todos abaixo do limite de quantificação do método analítico ($0,025 \mu\text{g g}^{-1}$). A presença dos agrotóxicos alacloro, aldrin, bioletrina, endossulfan alfa, fempropatrim, permetrina e trifluralina em 7 das 21 amostras fornecidas por apicultores de Ribeirão Preto confirmou a eficiência do método analítico e a necessidade do monitoramento ambiental quanto à presença de resíduos de agrotóxicos. Os resultados demonstraram potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos.

ABSTRACT

The extensive use of pesticides in agricultural crop has led to the presence of toxic residues in food and environmental contamination, especially in countries with great agricultural potential, such as Brazil. Honeybees and bee products have been mentioned as potential biomarkers for the presence of contaminants in the environment, monitoring large areas due to long distances travelled. Therefore, the potential use of bee pollen as a bioindicator of environmental contamination by pesticides has been evaluated in this work. Thus, two analytical methods for the multiresidue determination of pesticides in pollen, by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) were developed and validated in accordance with the recommendations of SANCO Guide of the European Union. The sample preparation by QuEChERS ensured adequate selectivity to the analytical method, which was validated for the determination of 26 pesticides. A second method using partition with acetonitrile and GC-MS/MS quantitation was validated for the determination of 19 pesticides. The evaluated pesticides showed strong affinity to the bee pollen. Sorption studies were carried out with aldrin and malathion and Freundlich sorption coefficients of 2.946 and 0.934 ($\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$) were obtained, respectively. No quantifiable levels of pesticides were found in the 145 samples collected from the experimental apiary in Embrapa, Jaguariúna/SP (10 beehives). Nonetheless, bioallethrin and pendimethalin were identified (below the LOQ of the method, $0.025 \mu\text{g g}^{-1}$) in 4 and 18 samples, respectively. The presence of pesticides residues in 7 samples (33 %) provided by apiaries from Ribeirão Preto/SP confirmed the efficiency of the analytical method and the need for environmental monitoring for the presence of pesticide residues. The results demonstrated the potential of bee pollen as a bioindicator of environmental contamination by pesticides.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxi
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	25
I.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
I.1.1. AGROTÓXICOS	26
I.1.1.1. ORGANOCLORADOS	27
I.1.1.2. ORGANOFOSFORADOS	28
I.1.1.3. PIRETROIDES	29
I.1.1.4. CARBAMATOS	29
I.1.2. USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL	29
I.1.3. EFEITOS NOCIVOS DOS AGROTÓXICOS	31
I.1.3. MONITORAMENTO DA QUALIDADE AMBIENTAL	33
I.1.3.1. AMOSTRADORES PASSIVOS	34
I.1.3.2. BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	35
I.1.3.2.1. ABELHAS COMO BIOINDICADORES	36
I.1.3.2.1.1. <i>Metais pesados</i>	36
I.1.3.2.1.2. <i>Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)</i>	37
I.1.3.2.1.3. <i>Agrotóxicos</i>	38
I.1.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA	42
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	46
CAPÍTULO III. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO MULTIRRESÍDUOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA	48
III.1. INTRODUÇÃO	49
III.2. PARTE EXPERIMENTAL	49
III.2.1. MATERIAL	49
III.2.1.1. <i>Equipamentos e coluna cromatográfica</i>	49
III.2.1.2. <i>Solventes e reagentes</i>	50
III.2.1.3. <i>Amostras de pólen apícola</i>	51
III.2.1.4. <i>Amostras de PUF</i>	51
III.2.2. MÉTODOS	51
III.2.2.1. <i>PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO</i>	51

III.2.2.1.1. <i>Soluções Estoque</i>	51
III.2.2.1.2. <i>Soluções Intermediárias</i>	52
III.2.2.1.3. <i>Soluções de Trabalho</i>	52
III.2.2.2. PREPARO DE AMOSTRAS E EXTRATOS FORTIFICADOS.....	53
III.2.2.2.1. <i>Preparo de amostra branco de pólen fortificada</i>	53
III.2.2.2.2. <i>Preparo de extrato de amostra branco de pólen fortificado</i>	54
III.2.2.2.3. <i>Preparo de amostra branco de PUF fortificada</i>	54
III.2.2.2.4. <i>Preparo de extrato de amostra branco de PUF</i>	54
III.2.2.3. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA.....	55
III.2.2.3.1. <i>DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS (GC-MS/MS Ion trap)</i>	55
III.2.2.3.1. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA.....	57
III.2.2.3.1.1. <i>Otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS</i>	57
III.2.2.3.1.2. <i>Otimização do preparo de amostras de pólen apícola por partição com ACN</i>	60
III.2.2.4. VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	61
III.2.2.5. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ESPONJAS DE POLIURETANO (PUF)	63
III.2.2.5.1. CONDIÇÕES ANALÍTICAS (GC-MS/MS ION TRAP)	63
III.2.2.5.2. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PUF	63
III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
III.3.1. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA	64
III.3.1.1. PADRONIZAÇÃO INTERNA	65
III.3.1.2. DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS (GC-MS/MS ION TRAP)	65
III.3.1.3. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA POR QUECHERS	81
III.3.1.4. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA POR PARTIÇÃO COM ACN	88
III.3.1.5. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA.....	91
III.3.2. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ESPONJAS DE POLIURETANO (PUF).....	106
CAPÍTULO IV. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO PÓLEN APÍCOLA COMO BIOINDICADOR DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	108
IV.1. INTRODUÇÃO.....	109
IV.2. MATERIAL.....	110
IV.2.1. EQUIPAMENTOS E COLUNA CROMATOGRÁFICA	110
IV.2.2. SOLVENTES E REAGENTES	110
IV.3. MÉTODOS	111
IV.3.1. PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO	111
IV.3.1.1. <i>Soluções Estoque</i>	111

IV.3.1.2. <i>Soluções Intermediárias</i>	111
IV.3.1.3. <i>Soluções de Trabalho</i>	111
IV.3.2. PREPARO DE AMOSTRAS E EXTRATOS FORTIFICADOS	112
IV.3.2.1. <i>Preparo de amostras branco de pólen apícola fortificadas</i>	112
IV.3.2.2. <i>Preparo de extrato da amostra branco de pólen fortificado</i>	113
IV.3.2.3. <i>Preparo de amostra branco de PUF fortificadas</i>	113
IV.3.3. LEVANTAMENTO DOS AGROTÓXICOS A SEREM INCLUÍDOS NO ESTUDO	113
IV.3.4. ESTUDOS DE SORÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA	114
IV.3.4.1. SORÇÃO DOS AGROTÓXICOS NO FRASCO	114
IV.3.4.2. AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS SORVIDOS EM PÓLEN	115
IV.3.4.2.1. <i>Quantificação indireta em solução</i>	115
IV.3.4.2.2. <i>Quantificação direta no pólen</i>	116
IV.3.4.3. CINÉTICAS DE SORÇÃO	116
IV.3.4.4. ISOTERMAS DE SORÇÃO DE ALDRIN E MALATION EM PÓLEN APÍCOLA.....	118
IV.3.5. MONITORAMENTO AMBIENTAL ATRAVÉS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PARA DETERMINAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS.....	119
IV.3.5.1. LOCAL DE ESTUDO	119
IV.3.5.2. COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	120
IV.3.5.3. AMOSTRAGEM PASSIVA.....	123
IV.3.5.3.1. <i>Esponjas de poliuretano (PUF) – Preparo e limpeza.</i>	124
IV.3.5.3.2. <i>Dispositivos de amostragem passiva</i>	124
IV.3.5.3.3. <i>Coleta e análise das amostras de PUF</i>	125
IV.3.6. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PROVENIENTES DE APIÁRIOS COMERCIAIS DE RIBEIRÃO PRETO .	126
IV.3.6.1. COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	126
IV.3.6.2. ANÁLISE POLÍNICA DE AMOSTRAS COLETADAS EM RIBEIRÃO PRETO	126
IV.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	128
IV.4.1 LEVANTAMENTO DOS AGROTÓXICOS A SEREM INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	128
IV.4.2. ESTUDOS DE SORÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA	140
IV.4.2.1. SORÇÃO NO FRASCO.....	140
IV.4.2.2. AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS SORVIDOS.....	141
IV.4.2.3. RAZÃO PÓLEN/ÁGUA.....	142
IV.4.2.4. CINÉTICAS DE SORÇÃO PARA OS ANALITOS.....	143
IV.4.2.5. ISOTERMAS DE SORÇÃO	145
IV.4.3. MONITORAMENTO AMBIENTAL PARA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR AGROTÓXICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA.....	148

IV.4.3.1. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS.....	148
IV.4.3.1.1. <i>Coleta e processamento das amostras de pólen apícola provenientes do campo experimental</i>	148
IV.4.3.1.2. <i>Análise das amostras de pólen apícola para determinação de agrotóxicos</i>	149
IV.4.3.2. Coleta e análise de amostras de PUF para determinação de agrotóxicos.....	150
IV.4.4. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PROVENIENTES DE APIÁRIOS COMERCIAIS.....	150
IV.4.4.1. AMOSTRAS COLETADAS EM APIÁRIOS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, SP.....	150
IV.4.4.2. ANÁLISE POLÍNICA DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS COLETADAS EM RIBEIRÃO PRETO.....	151
IV.4.4.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS.....	152
CAPÍTULO V. CONCLUSÕES FINAIS	158
CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
CAPÍTULO VII. ANEXOS	174
ANEXO I. GRÁFICOS DE RESÍDUOS E CURVAS ANALÍTICAS PREPARADAS NA AMOSTRA BRANCO FORTIFICADA COM OS ANALITOS, OBTIDAS UTILIZANDO O PREPARO DE AMOSTRAS POR QUECHERS.	175
ANEXO II. GRÁFICOS DE RESÍDUOS E CURVAS ANALÍTICAS, PREPARADAS NA AMOSTRA BRANCO FORTIFICADA COM OS ANALITOS, OBTIDAS UTILIZANDO O PREPARO DE AMOSTRAS POR PARTIÇÃO COM ACN.....	188
ANEXO III. QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA ENTREVISTA AOS AGRICULTORES DE PROPRIEDADES VIZINHAS DO CAMPO EXPERIMENTAL DO CNPMA, EMBRAPA, JAGUARIÚNA, SP.	199

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AMD: Desenvolvimento Automático de Método (do inglês: *Automated Method Development*)

C : Concentração da substância

C_0 : Concentração inicial da substância

C_p^{ads} : Concentração de agrotóxico sorvido no pólen

C_{aq}^{ads} : Concentração de agrotóxico na fase aquosa

CAS: Registro no *Chemical Abstracts Service*

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CNPMA: Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente

DDD: Dicloro-Difenil-Dicloroetano

DDE: Dicloro-Difenil-Dicloroetileno

DDT: Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DL₅₀: Dose letal 50%

DPR: Desvio Padrão Relativo

DSPE: Extração em Fase Sólida Dispersiva (do inglês: *Dispersive Solid Phase Extraction*)

DTC: Ditiocarbamatos

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês: *US Environment Protection Agency*)

EUA: Estados Unidos da América

GCB: Carbono Grafítizado (do inglês: *Graphitized Carbono Black*)

GC-ECD: Cromatografia a Gás com Detecção por Captura de Elétrons (do inglês: *Gas Chromatography with Electron Capture Detector*)

GC-MS/MS: Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (do inglês: *Gas Chromatography with tandem Mass Spectrometry*)

GC-MS: Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês: *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*)

GC-NP: Cromatografia a Gás com Detector de Nitrogênio e Fósforo (do inglês: *Gas Chromatography with Nitrogen–phosphorus detector*)

HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*)

IBGE/SIDRA: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística / Sistema IBGE de Recuperação Automática

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

K : Constante de primeira ordem

K_D : Coeficiente de sorção de *Freundlich*

K_D : Coeficiente de distribuição

K_{ow} : Coeficiente de partição octanol-água

k_1 : Constante de pseudo-primeira ordem

k_2 : Constante de pseudo-segunda-ordem

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida Associada à Espectrometria de Massas Sequencial (do inglês: *Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry*)

LMR: Limite Máximo de Resíduos

LOD: Limite de Detecção (do inglês: *Limit of Detection*)

LOQ: Limite de Quantificação (do inglês: *Limit of Quantification*)

LRC: Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Meio Ambiente

m/z : Razão massa/carga (do inglês: *Mass-to-Charge Ratio*)

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês: *Organisation for Economic Co-operation and Development*)

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PIC: Procedimento de Consentimento Prévio Informado (do inglês: *Prior Informed Consent*)

PLE: Extração Líquida Pressurizada (do inglês: *Pressurized Liquid Extraction*)

PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PSA: Amina Primária e Secundária (do inglês: *Primary Secondary Amine*)

PUF: Espumas de Poliuretano (do inglês: *Polyurethane Foam*)

QuEChERS: Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro (do inglês: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Ruge and Safe*)

q_e : Concentração máxima sorvida no equilíbrio

q_{fast} : Quantidade sorvida durante a etapa rápida

q_t : Concentração de agrotóxicos sorvido no tempo t

r : Coeficiente de correlação linear

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SANCO: Diretoria Geral para Saúde e Proteção ao Consumidor da União Europeia (do inglês: *Directorate General for Health and Consumers*)

SIM: Monitoramento de Íon Seleccionado (do inglês: *Single Ion Monitoring*)

SINDIVEG: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

SPE: Extração em fase sólida (do inglês: *Solid Phase Extraction*)

SPMD: Dispositivos de Membrana Semipermeável (do inglês: *Semipermeable Membrane Device*)

t : Tempo

UE: União Europeia

UFPR: Universidade Federal do Paraná

UV/VIS: Ultravioleta/Visível

V: Volt

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão dos métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de agrotóxicos em produtos apícolas com ênfase no pólen apícola.	44
Tabela 2. Programação de temperatura utilizada para separação cromatográfica dos analitos em coluna Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm).....	55
Tabela 3. Variáveis estudadas e níveis avaliados no delineamento composto central 2 ³ para otimização das condições de extração e limpeza de amostras de pólen apícola por QuEChERS.	58
Tabela 4. Matriz do planejamento experimental (2 ³) contendo os valores estudados das variáveis, volume de ACN, tempo de ultrassom e massa de PSA, nos 17 ensaios.....	59
Tabela 5. Tempos de retenção, íon precursor, formas de onda e energias de fragmentação aplicadas para dissociação de cada substância analisada no Programa de monitoramento de íons I.	73
Tabela 6. Tempos de retenção, íon precursor, formas de onda e energias de fragmentação aplicadas para dissociação de cada substância analisada no Programa de monitoramento de íons II.	77
Tabela 7. Programa de monitoramento de íons I. Íons monitorados para quantificação e confirmação de identidade de cada substância.....	80
Tabela 8. Programa de monitoramento de íons II. Íons monitorados para quantificação e confirmação de identidade de cada substância.....	81
Tabela 9. Valores de eficiência de extração, obtidos para amostras fortificadas com os analitos (0,200 µg g ⁻¹), nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS.	87
Tabela 10. Valores de eficiência de extração, obtidos para amostras fortificadas com os analitos (0,200 µg g ⁻¹), nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por partição com ACN.....	90
Tabela 11. . Valores de efeito matriz, obtidos para cada nível de fortificação nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS e por partição com ACN.	94
Tabela 12. Valores de faixa linear (µg g ⁻¹) e linearidade (r) dos métodos analíticos, obtidos para cada agrotóxico, utilizando os dois métodos de preparo de amostras por QuEChERS e por partição com ACN.	98
Tabela 13. Valores de precisão (DPR, %) obtidos para cada nível de fortificação nos testes de validação dos métodos analíticos utilizando os métodos QuEChERS e partição com ACN de preparo de amostras de pólen apícola.....	100
Tabela 14. Valores de exatidão (%) obtidos para cada nível de fortificação nos testes de validação dos métodos analíticos utilizando os métodos QuEChERS e partição com ACN de preparo de amostras de pólen apícola.....	102
Tabela 15. Valores de Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) do método para cada analito.	104
Tabela 16. Informações sobre as atividades agrícolas e substâncias utilizadas em três das propriedades vizinhas do campo experimental, obtidas durante as entrevistas.	129

Tabela 17. Substâncias incluídas nos estudos para avaliação do potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos. Classificação e programas de monitoramento oficiais no qual estão inseridas.	132
Tabela 18. Propriedades físico-químicas das 26 substâncias incluídos no estudo de avaliação do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos.....	134
Tabela 19. Porcentagem de concentração de aldrin e malation em solução aquosa ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) sorvidos nos tubos de vidro e de plástico no tempo inicial e após 20 horas de agitação.	141
Tabela 20. Resultados de precisão dos métodos para determinação de aldrin e malation em pólen por partição com ACN e em solução aquosa por partição com acetato de etila. Concentração inicial dos analitos igual a $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$	142
Tabela 21. Parâmetros cinéticos de sorção para aldrin e malation.....	145
Tabela 22. Coeficiente de sorção de <i>Freundlich</i> (K_F), sensibilidade ($1/n$), coeficiente de correlação (r) para aldrin e malation.....	147
Tabela 23. Resultados obtidos na análise de amostras de pólen apícola coletadas em Ribeirão Preto para determinação de agrotóxicos.	153

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estimativa de vendas (US\$ bilhões) de agrotóxicos no Brasil entre os anos 2009 e 2013. Adaptado de SINDIVEG, 2014.....30
- Figura 2. Cromatograma do Mistura 1A de solução padrão (1,0 µg mL⁻¹) dos analitos: 1- Acetocloro (23,5 min), 2-Alacloro (23,9 min), 3-Aldrin (25,6 min), 4-Bentazona (26,6 min), 5-Desconhecido, 6-Carbofenotion (31,9 min), 7-Cialotrina I (35,6 min), 8- Cialotrina II (36,0 min), 9- Azinfós Etil (36,6 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.68
- Figura 3. Cromatograma do Mistura 1B de solução padrão (1,0 µg mL⁻¹) dos analitos: 1- Dimetoato (18,6 min), 2-Clorotalonil (21,0 min), 3-Clorpirifós metil (23,5 min), 4- Clorpirifós Etil (25,7 min), 5-Clorfenvifós (27,6 min), 6-Desconhecido, 7- Clorobenzilato (30,7 min), 8- Desconhecido, 9 a 12-Cipermetrina (41,1, 41,6, 41,8, 42,0 min), 13- Deltametrina (47,1 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.67
- Figura 4. Cromatograma do Mistura 1C de solução padrão (1,0 µg mL⁻¹) dos analitos: 1- Dissulfoton (21,6 min), 2-Etrinifós (22,1 min), 3-Fipronil (27,4 min), 4-Fenamifós (29,1 min), 5-Endrin (30,3 min), 6-Fluazifope (30,6 min), 7- Endrin aldeído (31,2 min), 8- Endrin Cetona (30,6 min), 9 e 10-Esfenvalerato (44,9 e 45,6 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.....67
- Figura 5. Cromatograma do Mistura 1D de solução padrão (1,0 µg mL⁻¹) dos analitos: 1- Forato (17,2 min), 2-Lindano (20,0 min), 3-Folpete (27,9 min), 4-Hexazinona (32,4 min), 5-Fosmet (33,7 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.68
- Figura 6. Cromatograma do Mistura 1E de solução padrão (1,0 µg mL⁻¹) dos analitos: 1- Pentaclorofenol (19,5 min), 2-Paration Etil (26,1 min), 3-Pendimetalina (27,1 min), 4- Profenofós (29,5 min), 5-Oxifluorfem (30,0 min), 6-Metoxiclor (34,1 min), 7 e 8- Permetrina (38,0 e 38,5 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.68
- Figura 7. Cromatograma do Mistura 1F de solução padrão (1,0 µg mL⁻¹) dos analitos: 1- Trifluralina (16,3 min), 2-Terbufós (20,5 min), 3-Vinclozin (23,8 min), 4-Triazofós (31,6 min), 5-Propargito (32,9 min), 6-Tetradifon (34,8 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.....69
- Figura 8. Cromatograma do Mistura 2A de solução padrão (1,0 µg mL⁻¹) dos analitos: 1- Clomazona (19,8 min), 2-Captana (27,2 min), 3-Bioaletrina (27,9 min), 4-Captafol (32,9 min), 5-Carbossulfan (33,6 min), 6-Bifentrin (34,0 min), 7-10-Ciflutrina (39,9, 40,3, 40,5 e 40,7 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura

descrita na Tabela 2I. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.....	69
Figura 9. Cromatograma do Mistura 2B de solução padrão (1,0 µg mL ⁻¹) dos analitos: 1-Diazinon (21,3 min), 2-Heptacloro (24,0 min), 3-Endossulfan alfa (28,6 min), 4-Fludioxonil (29,3 min), 5-Endossulfan beta (30,7 min), 6-Fempropatrim (34,3 min), 7-Fosalone (35,1 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2I. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.	70
Figura 10. Cromatograma do Mistura 2C de solução padrão (1,0 µg mL ⁻¹) dos analitos: 1-Hexacorobenzeno (17,5 min), 2-Paration metil (23,8 min), 3-Metalaxil (24,3 min), 4-Heptacloro Epóxido (27,2 min), 5-Metidation (28,9 min), 6-Mirex (35,8 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2I. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.....	70
Figura 11. Cromatograma do Mistura 2D de solução padrão (1,0 µg mL ⁻¹) dos analitos: 1-Simazina (19,4 min), 2-Picloran (23,0 min), 3-Propanil (23,4 min), 4-Pirimifós Etil (25,1 min), 5-Triadimenon (26,2 min), 6-Pirimifós Metil (26,8 min), 7 a 9-DDT (31,1, 31,7 e 32,3 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2I. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap, modo full scan.....	71
Figura 12. Cromatograma de amostra branco fortificada com a mistura I dos analitos (0,200 µg mL ⁻¹) e o padrão interno (0,200 µg mL ⁻¹). 1-Trifluralina (15,7 min), 2-Lindano (20,0 min), 3-Dissulfoton (21,5 min), 4-Clorpirifós Metil (23,7 min), 5-Paration Metil (24,1 min), 6-Metalaxil (24,6 min), 7-Aldrin (25,9 min), 8-Paration Etil (26,7 min), 9-Pendimetalina (27,9 min), 10-Bioaletrina (28,6 min), 11-Endossulfan alfa (29,6 min), 12-Oxifluorfem (31,4 min), 13-Endossulfan beta (32,1 min), 14 e 15- DDT (32,7 e 34,1 min), 16-Propargito (35,3 min), 17-Bifentrin (36,0 min), 18-Fempropatrim (36,4 min), 19-Tetradifom (37,0 min), 20-Mirex (38,1 min). Método de preparo de amostras: QuEChERS. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap. Programa de monitoramento de íons I.....	84
Figura 13. Cromatograma de amostra branco de pólen apícola fortificada com o padrão interno (0,200 µg mL ⁻¹). 1-Lindano (20,0 min). Método de preparo de amostras: QuEChERS. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap. Programa de monitoramento de íons I.....	85
Figura 14. Cromatograma de amostra branco fortificada com a mistura II dos analitos (0,200 µg mL ⁻¹) e o padrão interno (0,200 µg mL ⁻¹). 1-Hexaclorobenzeno (17,0 min), 2-Lindano (19,7 min), 3-Terbufós (20,2 min), 4-Etrinifós (22,1 min), 5-Acetocloro (23,8 min), 6-Alacloro (24,2 min), 7-Malation (26,1 min), 8-Pirimifós Etil (27,6 min), 9-Heptacloro Epóxido (28,0 min), 10-Fentoato (28,6 min), 11-Fluazifope (32,1 min), 12-Metoxiclor (36,3 min), 13-Fosalone (37,4 min), 14 e 15-Permetrina (40,3 e 40,8 min). Método de preparo de amostras: QuEChERS. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap. Programa de monitoramento de íons II.....	85

Figura 15. Cromatograma de amostra branco de pólen apícola fortificada com o padrão interno (0,200 µg mL ⁻¹). 1-Lindano (20,0 min). Método de preparo de amostras: QuEChERS. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap. Programa de monitoramento de íons II.....	86
Figura 16. Cromatograma de amostra branco fortificada com a mistura I dos analitos (0,200 µg mL ⁻¹) e o padrão interno (0,200 µg mL ⁻¹). 1-Trifluralina (14,9 min), 2-Lindano (18,9 min), 3-Dissulfoton (20,8 min), 4-Clorpirifós Metil (23,1 min), 5-Paration Metil (23,5 min), 6-Metalaxil (24,1 min), 7-Aldrin (25,4 min), 8-Paration Etil (26,2 min), 9-Pendimetalina (27,4 min), 10-Bioaletrina (28,4 min), 11-Endossulfan alfa (29,1 min), 12-Oxifluorfem (31,0 min), 13-Endossulfan beta (31,7 min), 14 e 15-DDT (32,1 e 33,6 min), 16-Propargito (34,4 min), 17-Desconhecido, 18-Bifentrin (35,6 min), 19-Fempropatrim (35,9 min), 20-Tetradifom (36,5 min), 21-Desconhecido, 22-Mirex (38,6 min). Método de preparo de amostras: Partição com ACN. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap. Programa de monitoramento de íons I.....	88
Figura 17. Cromatograma de amostra branco fortificada com a mistura II dos analitos (0,200 µg mL ⁻¹) e o padrão interno (0,200 µg mL ⁻¹). 1-Hexaclorobenzeno (16,0 min), 2-Lindano (18,9 min), 3-Terbufós (19,5 min), 4- Diazinon (20,5 min), 5-Etrinifós (21,5 min), 6-Acetocloro (23,1 min), 7-Alacloro (23,6 min), 8-Malation (25,6 min), 9-Pirimifós Etil (27,1 min), 10-Heptacloro Epóxido (27,5 min), 11-Fentoato (28,2 min), 12-Metidation (28,7 min), 13-Fluazifope (31,7 min), 14-Metoxiclor (35,8 min), 15-Fosalone (36,8 min), 16 e 17-Permetrina (39,5 e 39,9 min). Método de preparo de amostras: Partição com ACN. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 µL. Analisador de massas Ion trap. Programa de monitoramento de íons II.	89
Figura 18. Valores de eficiência de extração, obtidos para amostras fortificadas com os analitos (0,200 µg g ⁻¹), nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS e por partição com ACN. *Soma dos isômeros.....	91
Figura 19. Valores de efeito matriz, obtidos para cada nível de fortificação nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS e por partição com ACN. * soma dos isômeros.....	96
Figura 20. Apiário instalado em região de vegetação nativa localizada na área de reserva legal no Campo Experimental do Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente (CNPMA) - Embrapa Meio Ambiente.	120
Figura 21. Coletor de pólen de alvado (frontal).	121
Figura 22. Abelhas forrageiras carregando as grãos de pólen, entrando na colmeia através das trampas coletoras no coletor de pólen de alvado.....	121
Figura 23. Etapas do procedimento analítico para determinação de agrotóxicos em amostras de pólen apícola.....	123
Figura 24. Dispositivo de amostragem passiva com disco de esponja de poliuretano PUF. a. bacias de inox com eixo central em inox; b. disco e esponja de poliuretano instalada no centro do dispositivo, fixada ao eixo central com o auxílio de porcas e arruelas em	

inox; c. instalação da bacia inferior, com os furos para drenagem da água; d. dispositivo instalado no campo.	125
Figura 25. Imagem de satélite Campo Experimental da Embrapa Meio Ambiente. Fonte: Google Maps. 1 a 7 – propriedades rurais ao redor do local onde o apiário foi instalado no campo experimental. ■ – local de instalação do apiário experimental.....	128
Figura 26. Perfil de sorção dos analitos aldrin e malation em pólen apícola em relação ao tempo. Concentração inicial dos analitos igual a 1,000 $\mu\text{g g}^{-1}$	144
Figura 27. Isotermas de sorção para os agrotóxicos aldrin (■) e malation (◆) em pólen apícola, ajustadas à forma logarítmica da Equação de Freundlich.	146
Figura 28. Valores médios de massa (g) das amostras de pólen apícola coletadas entre março de 2012 e maio de 2013, por colmeia do apiário experimental.	148

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1.1. AGROTÓXICOS

O crescimento da população mundial e a demanda por alimentos têm exigido um sistema complexo de cultivo, transporte, estocagem e processamento de produtos agrícolas. Para maior produtividade, uma quantidade considerável de agrotóxicos é empregada no tratamento prévio das sementes, durante o cultivo ou após a colheita.

Segundo a Lei brasileira nº 7.802/1989, são chamados agrotóxicos, os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (1998), agrotóxico é qualquer substância utilizada para prevenir, destruir, atacar, repelir ou controlar pragas, incluindo espécies de plantas ou animais que não devem estar presentes durante a produção, estocagem, transporte, distribuição ou processamento de alimentos, cereais e ração animal, ou substância que deve ser administrada a animais para o controle de ectoparasitas.

Estes produtos, dependendo do fim a que se destinam, podem ser chamados de praguicidas, biocidas, venenos, fitossanitários, defensivos agrícolas ou remédios. Para os trabalhadores rurais, os agrotóxicos são comumente chamados de “veneno”, devido aos efeitos nocivos dessas substâncias à saúde humana e animal (PERES *et al.*, 2003).

Constituindo uma grande variedade de produtos químicos destinados a prevenir, eliminar ou controlar pragas, os agrotóxicos diferem entre si quanto ao modo de ação, absorção, metabolismo e toxicidade e podem ser classificados de diversas maneiras.

Segundo Araújo (2011), os agrotóxicos podem ser classificados quanto à sua utilização como inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas, formicidas, larvicidas, ovicidas, acaricidas; quanto ao modo de ação e penetração, como sistêmicos, que são transportados pela seiva do vegetal em quantidade letal para o inseto e não sistêmicos; como orgânicos e inorgânicos; e segundo a sua classe química.

Em relação ao modo de ação, as três principais classes mais consumidas são os inseticidas, fungicidas e herbicidas (MARTINELLI, 2003), sendo que os inseticidas representaram aproximadamente metade dos agrotóxicos comercializados entre 2013 e 2014 (SINDIVEG, 2014). Entre os inseticidas mais comuns se destacam os organoclorados, organofosforados, piretroides e carbamatos.

I.1.1.1. ORGANOCLORADOS

Os organoclorados, que contém em sua molécula pelo menos um átomo de carbono e um de cloro, acompanhados ou não de átomos de hidrogênio e oxigênio, foram os primeiros agrotóxicos a serem sintetizados e podem ser subdivididos em grupos distintos, como diclorodifeniletanos, por exemplo, o DDT; os ciclodienos, por exemplo, aldrin e dieldrin; e os cicloexanos clorinados, como o lindano. Suas principais características são a baixa volatilidade, elevada estabilidade química e lipossolubilidade, assim como lentas taxas de degradação e biotransformação, responsáveis por sua persistência no meio ambiente.

Esses compostos são muito persistentes, ou seja, resistem no ambiente durante longos períodos; são bioacumuláveis, o que significa que se acumulam nos tecidos gordurosos dos seres vivos, sendo altamente nocivos para a saúde humana; são tóxicos, mesmo em baixas concentrações; e tem alta mobilidade, ou

seja, alta capacidade de percorrer longas distâncias, até milhares de quilômetros de sua fonte de origem, propagando-se pelo ar, pela água e pelas espécies migratórias e acumulando-se nos ecossistemas terrestres e aquáticos (ARAÚJO, 2011; RANGEL, 2008). Devido a essas características, a maioria dos compostos organoclorados teve seu uso proibido na Convenção de Estocolmo, um tratado internacional para garantir a eliminação segura desses poluentes e limitar sua produção e uso (ONU, 2001).

No Brasil, os organoclorados foram proibidos por meio da Lei n. 7.802 (BRASIL, 1989). Entretanto, alguns organoclorados, como o DDT, ainda são fabricados em diversos países, por ter baixo custo e alta eficiência, mantendo o ciclo de contaminação dos recursos naturais nos locais onde são utilizados. Portanto, seu estudo, principalmente no que diz respeito à contaminação ambiental e aos seus efeitos tóxicos de longo prazo em mamíferos, aves e peixes, continua sendo objeto de grande relevância (RIGHI *et al.*, 2008).

1.1.1.2. ORGANOFOSFORADOS

Os organofosforados, que apresentam principalmente átomos de C e P em sua estrutura, normalmente são derivados dos ácidos fosfórico, ditiofosfórico e tiofosfórico. Assim como os organoclorados, os organofosforados são lipossolúveis, porém se degradam em poucos dias ou semanas e, por isso, raramente são encontrados na cadeia alimentar. Contudo, estas substâncias apresentam toxicidade aguda mais elevada para humanos e outros mamíferos do que os organoclorados, pois inibem a enzima colinesterase, causando acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas, interrompendo a transmissão de novos impulsos e gerando danos ao organismo humano, como convulsões, parada respiratória e coma.

Apesar de sua elevada toxicidade, por serem pouco persistentes no meio ambiente, os níveis encontrados nos produtos alimentares geralmente não representam uma exposição capaz de desencadear efeitos tóxicos nos seres humanos (ARAÚJO, 2011; MARASCHIN, 2003; RANGEL, 2008).

I.1.1.3. PIRETROIDES

Os piretroides são compostos sintéticos que apresentam estrutura semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthemum (pyrethrum) cinenariaefolium*. Podendo atuar nos sistemas nervoso central e periférico, estas substâncias são capazes de produzir convulsões ou paralisias nos seres humanos, além de desencadear frequentemente episódios de asma ou bronquite em crianças. Contudo, os piretroides são os inseticidas mais utilizados em ambientes domésticos por serem muito pouco persistentes no ambiente, tóxicos para os insetos e menos tóxicos para os mamíferos do que os organofosforados e carbamatos (ARAÚJO, 2011; RANGEL, 2008).

I.1.1.4. CARBAMATOS

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico e estão diretamente relacionados com os inseticidas organofosforados quanto à sua ação biológica (inibição da colinesterase) e baixa persistência no meio ambiente. Os carbamatos são frequentemente utilizados no controle de insetos resistentes aos compostos organofosforados. Popularmente conhecido no Brasil como “chumbinho”, o aldicarb é um exemplo de carbamato proibido e muito utilizado ilegalmente em ambientes domésticos como raticida (ARAÚJO, 2011; MARASCHIN, 2003; RANGEL, 2008).

I.1.2. USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL

O uso dos agrotóxicos na produção agrícola brasileira é crescente. Desde 2008, o Brasil é o maior mercado mundial de agrotóxicos, ocupando a posição anteriormente ocupada pelos Estados Unidos.

De acordo com o levantamento realizado pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG, 2014), o mercado nacional atingiu em 2013 a cifra de US\$ 11,45 bilhões, 18% acima dos US\$ 9,71 bilhões de 2012 e muito além dos US\$ 8 bilhões movimentados nos EUA no mesmo ano. Em

volume, foram vendidas 902,41 mil toneladas de agroquímicos aos produtores do Brasil no ano passado, crescimento de 9,6% em relação a 2012.

A Figura 1 apresenta a evolução do setor no Brasil, entre os anos 2009 e 2013, período em que houve um aumento acima de 70% nas vendas de agrotóxicos.

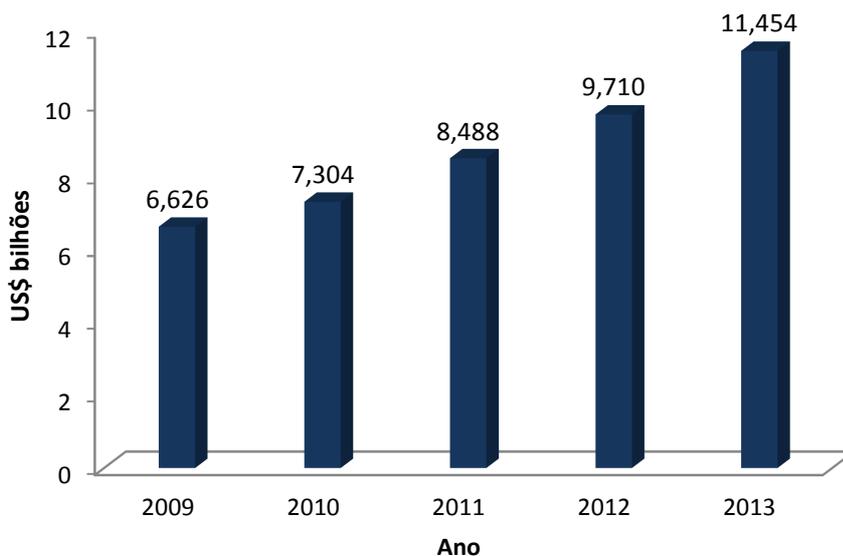


Figura 1. Estimativa de vendas (US\$ bilhões) de agrotóxicos no Brasil entre os anos 2009 e 2013. Adaptado de SINDIVEG, 2014.

Os inseticidas, cujas vendas aumentaram de US\$ 3,606 bilhões para US\$ 4,553 bilhões entre 2012 e 2013, correspondem a 40% do total de agrotóxicos comercializados no ano passado, seguidos pelos herbicidas e fungicidas, que correspondem a 33 e 23% do total, respectivamente (SINDIVEG, 2014). Até 2012, os herbicidas eram os principais agrotóxicos consumidos (45%), seguidos pelos fungicidas (14%) e inseticidas (12%) (ANVISA & UFPR, 2012). De acordo com o SINDIVEG (2014), essa alteração do perfil de consumo de agrotóxicos no Brasil se deve ao recente aparecimento de novas pragas, como a lagarta *Helicoverpa* spp., que ataca soja, milho e algodão e o ressurgimento da mosca branca (*Bemisia tabaci*) e da lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*).

As lavouras de soja, cana-de-açúcar, milho e algodão representam 80% do total das vendas do setor agrícola (SINDIVEG, 2014). Há muitos anos, a cultura de

soja lidera o consumo de agrotóxicos, tendo sido responsável por 51% das vendas em 2013, movimentando um total de US\$ 5,866 bilhões, 28,4% acima dos US\$ 4,566 bilhões registrados do ano anterior.

Na safra de 2011, 853 milhões de litros de agrotóxicos foram pulverizados nos 71 milhões de hectares de lavoura brasileira. Esse valor corresponde a uma média de uso de 12 litros/hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante (IBGE/SIDRA, 2012). Em 2013, esse valores subiram, tendo sido consumidos 1 bilhão de litros de agrotóxicos no País, o que significa uma cota de 5 litros por habitante.

I.1.3 EFEITOS NOCIVOS DOS AGROTÓXICOS

O uso dos agrotóxicos traz benefícios inquestionáveis para a agricultura, garantindo o controle de pragas e o conseqüente aumento da produtividade e redução dos custos de produção (VEIGA, 2007). Entretanto, aplicações constantes e irregulares de agrotóxicos representam riscos à saúde humana, expondo toda a população à contaminação dos alimentos e do meio ambiente, através da presença de resíduos na água, no solo, no ar, nos animais e nas plantas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; TOMITA e BEYRUTH, 2002, KOIFMAN e KOIFMAN; KOIFMAN e HATAGIMA, 2003).

Os efeitos dos agrotóxicos sobre a saúde humana podem ser divididos em agudos e crônicos, diretamente relacionados ao nível e período de exposição. Os efeitos agudos, muito comuns em trabalhadores rurais, ocorrem logo após o contato com o agrotóxico e apresentam características marcantes, como espasmos musculares, convulsões, náuseas, desmaios, vômitos, diarreias e dificuldades respiratórias. Os efeitos crônicos, associados à exposição prolongada a baixos níveis de concentração, são geralmente de difícil relação causa:efeito, devido ao fato de se tratar de efeitos identificados após semanas, meses ou anos do contato com essas substâncias. Entretanto, diversos estudos já comprovaram a relação entre a exposição crônica aos agrotóxicos e inúmeras doenças, entre as

quais se destacam a leucemia (MA, 2002; MENEGAUX, 2005; MONGE, 2007), linfomas (LEISS, 1995), sarcomas de tecidos moles (RUDANT, 2007), e câncer nos rins (TSAI, 2006; COONEY, 2007), cérebro (NIELSEN, 2005), mal de *Parkinson* (BALTAZAR *et al.*, 2014), além de defeitos do desenvolvimento, toxicidade neurológica aguda, disparidade no desenvolvimento neurológico, disfunções nos sistemas imunológico, reprodutivo e endócrino (BOLOGNESI e MERLO, 2011; FORTES e APREA, 2011). Um estudo feito pelo governo da Argentina, por exemplo, constatou que os casos de câncer em crianças triplicaram e o número de nascimentos de bebês com malformações quadruplicou entre 1999 e 2009, em zonas de uso intensivo de agrotóxicos no país, principalmente o glifosato, o endossulfam, o metamidofós, o picloran e o clorpirifós (ARANDA, 2010).

Para o meio ambiente, o uso indiscriminado de agrotóxicos tem levado a diversas consequências negativas, como o desaparecimento de insetos úteis e consequente surgimento de novas pragas. Além disso, muitas espécies de insetos tornaram-se resistentes a certos inseticidas com a constante necessidade de novos produtos com maior seletividade ou o uso de doses maiores do que as recomendadas, o que é ainda mais preocupante.

Como exemplo de insetos úteis, destacam-se as abelhas que, embora não sejam o alvo dos agrotóxicos, são altamente vulneráveis à contaminação por forragear áreas agrícolas contaminadas. Além dos casos de toxicidade aguda, em que as abelhas morrem rapidamente logo após a aplicação do agrotóxico, a exposição a doses sub-letais de agrotóxicos pode prejudicar o comportamento de forrageamento (WILLIAMSON e WRIGHT, 2013), causando perda de orientação e dificuldade para retornar ao ninho, além de alterar o desenvolvimento da população da colônia como um todo (JOHNSON *et al.*, 2010); causar redução da qualidade dos produtos apícolas; alterar a expressão gênica nas larvas (GREGORC *et al.*, 2012); enfraquecer o sistema imunológico das abelhas (DI PRISCO *et al.*, 2013); e aumentar a susceptibilidade ao fungo *Nosema* (PETTIS *et al.*, 2012), um dos principais patógenos que afetam as colmeias.

As abelhas são responsáveis pela polinização de aproximadamente 90% de todas as espécies vegetais existentes no mundo, sendo responsáveis não só pela manutenção de plantas nativas, mas também pelo aumento da produtividade agrícola. De acordo com os dados do Ministério do Meio Ambiente, a cada ano os polinizadores naturais geram uma economia superior a R\$ 483 bilhões, no caso das culturas beneficiadas pela polinização por insetos, e R\$ 2,435 trilhões quando se trata dos cultivos totalmente dependentes da ação dos polinizadores. Estima-se que as abelhas *Apis mellífera* sejam responsáveis por 40% desses valores (MMA, 2014).

Os relatos de declínio da quantidade de insetos polinizadores tem causado preocupação em países do mundo todo, devido ao risco elevado de redução da produção agrícola abaixo do necessário para o consumo global atual.

Diversos casos de intoxicação de abelhas por pulverização de agrotóxicos têm sido relatados nos EUA (BURKLE *et al.*, 2013; PETTIS e DELAPLANE, 2010; TYLIANAKIS, 2013a; TYLIANAKIS, 2013b) e na Europa (BACANDRITSOS *et al.*, 2010), geralmente relacionados ao uso abusivo destas substâncias que resultam em contaminação de néctar, pólen e água.

No Brasil, desde 2007 há relatos de apicultores sobre a mortalidade súbita de abelhas no Piauí, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo, atribuída à exposição aos agrotóxicos em plantações de laranja, cana-de-açúcar e soja. Entre dezembro de 2013 e fevereiro de 2014, 4 milhões de abelhas morreram em Gavião Peixoto, na região central do estado de São Paulo, devido à intoxicação com glifosato e clorpirifós (TOMAZELA, 2014).. Em 2011, um terço das 300 mil colmeias em Santa Catarina morreu por causas ainda desconhecidas (CASTILHO, 2013). .

I.1.3. MONITORAMENTO DA QUALIDADE AMBIENTAL

Com o crescente aumento do uso de agrotóxicos no Brasil e no mundo, a necessidade do controle da presença destas substâncias no ambiente cresce a cada dia.

Embora a atmosfera seja o maior compartimento ambiental, a contaminação do ar por agrotóxicos é menos documentada do que a presença desses contaminantes na água e nos alimentos, em parte, devido às baixas concentrações encontradas e falta de legislação específica.

Durante e após a aplicação, os agrotóxicos entram na atmosfera por volatilização ou pela ação do vento que transporta partículas em que estas substâncias podem estar sorvidas. Devido a sua grande mobilidade, o ar pode transportar os agrotóxicos e outros contaminantes a partir de seu ponto de aplicação e depositá-los em ecossistemas aquáticos e terrestres distantes do seu ponto de utilização, contaminando todo o ambiente (DE ROSSI *et al.*, 2010).

I.1.3.1. AMOSTRADORES PASSIVOS

Para monitoramento da qualidade do ar atmosférico, os amostradores passivos podem ser utilizados para fornecer informações sobre a concentração média de compostos gasosos durante um longo período. Além de serem simples de montar e operar, estes dispositivos possuem custo reduzido, por não necessitarem de fontes de energia e bombas de amostragem, e não dependem de calibrações contínuas.

Inicialmente utilizados em monitoramentos de contaminantes em ambientes fechados de trabalho, os amostradores passivos já são utilizados para monitorar gases e vapores em baixas concentrações em ambientes abertos.

Enquanto os amostradores ativos utilizam um mecanismo de aspiração para forçar o ar a passar pelo amostrador, nos amostradores passivos o ar flui livremente através do sorvente, que captura poluentes durante o período de amostragem e a coleta das moléculas do gás de interesse é governada pelo fenômeno de difusão e/ou permeação molecular. A difusão molecular é resultante do movimento aleatório das moléculas, que ocorre no meio onde o gás se encontra. Como consequência deste movimento molecular, existe uma tendência natural dos gases ocuparem o sorvente com a mesma concentração em que se encontram no ambiente. A permeação molecular ocorre quando moléculas

gasosas em contato com uma superfície tendem a se interpenetrar para o seu interior, através de seus poros (MELCHERT e CARDOSO, 2006).

Os discos de espuma de poliuretano (PUF, *polyurethane foam*) são conhecidos como amostradores passivos para poluentes orgânicos persistentes com taxa diária de amostragem de poucos metros cúbicos de ar a menos que amostradores ativos (SHOEIB e HARNER, 2002). Em associação com métodos analíticos adequados, o uso de esponjas de poliuretano permite o monitoramento de muitas classes de poluentes (POZO *et al.*, 2011), tais como organofosforados, organoclorados e bifenilas policloradas (ARMSTRONG *et al.*, 2014; LING *et al.*, 2011; CHAEMFA *et al.*, 2008). Esses amostradores são particularmente interessantes porque apresentam baixo custo, facilidade de manuseio e possibilidade de uso em amostragem de ar durante longos períodos.

Além dos discos de PUF, outros dispositivos de amostragem passivos com alta capacidade de retenção dos poluentes orgânicos persistentes têm sido utilizados, como os dispositivos de membrana semipermeável (*semi permeable membrane devices* - SPMD) e resinas adsorventes *Amberlite XAD* (WANIA *et al.*, 2003).

I.1.3.2. BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Bioindicadores são organismos vivos utilizados para a obtenção de informações sobre determinadas características do ambiente. Informações relevantes geralmente são obtidas a partir de alterações no comportamento do organismo ou a partir da concentração de determinadas substâncias nos tecidos do organismo monitorado (WOLTERBEEK, 2002). As principais vantagens do biomonitoramento estão relacionadas à ocorrência permanente e comum do organismo em campo e facilidade de coleta. Entretanto, a seleção de um organismo adequado como bioindicador representa um passo fundamental para garantir a eficiência do biomonitoramento.

I.1.3.2.1. ABELHAS COMO BIOINDICADORES

As abelhas (*Apis mellifera*) são insetos que vivem em contato direto com a natureza, polinizando colheitas agrícolas e as espécies nativas, importantes para a produção comercial de mel e produtos apícolas; e coletando néctar, pólen e água, que são fundamentais para a manutenção da colônia. O néctar fornece os carboidratos às abelhas, enquanto o pólen é a principal fonte de proteínas e lipídios para a colônia.

Diariamente, entre 10.000 e 25.000 abelhas operárias por colmeia fazem, em média, 10 viagens explorando aproximadamente 7 km² nas áreas que cercam seu habitat. Durante esse processo, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados, podendo ficar retidos nos pelos superficiais de seu corpo, ser inalados pelas abelhas ou armazenados em sua vesícula melífera e transportados para a colmeia, (RISSATO *et al.*, 2004).

Devido a esse comportamento, o uso das abelhas como bioindicadores da contaminação ambiental tem sido muito estudado nos últimos anos. Os diversos trabalhos na literatura relatam o uso de matrizes apícolas como o mel, a cera, o pólen ou a abelha propriamente dita, fornecendo informações valiosas sobre a presença de contaminantes, como metais pesados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e agrotóxicos no ambiente (REIS, 2003 e CHAUZAT *et al.*, 2006). A presença de contaminantes na superfície e no interior de seus corpos fornece informações de contaminação pontual, enquanto o mel e os outros produtos apícolas podem ser utilizados para se obter um valor médio em relação a uma área extensa, porque provêm de coletas de diversos locais e dias diferentes (PORRINI *et al.*, 2003).

I.1.3.2.1.1. *Metais pesados*

Em relação aos metais pesados, as abelhas e seus produtos podem fornecer informações valiosas para o monitoramento constante de emissões a partir de fontes pontuais (ACHUDUME e NWAFOR, 2010; VAN DER STEEN *et al.*, 2011). O uso do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por metais

pesados foi empregado pelo grupo de Morgano (2010). No trabalho, um total de 43 amostras foi coletado na região sudeste do Brasil entre 2007 e 2008. De maneira geral, os níveis mais altos de todos os contaminantes estudados foram observados em amostras provenientes de locais urbanos, em relação às amostras coletadas no ambiente rural, demonstrando o potencial do pólen apícola como bioindicador da contaminação por metais pesados.

Resultados semelhantes foram encontrados na Itália, no trabalho realizado pelo grupo de Perugini (2011), em que diversas amostras de abelhas (*Apis mellifera*) foram analisadas para determinação do nível de metais pesados (Hg, Cr, Cd e Pb). Os resultados mostraram a presença de chumbo, cromo e cádmio e a ausência de mercúrio nas amostras coletadas em vários locais no centro da Itália, incluindo áreas poluídas e áreas silvestres. Os níveis de Pb demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre as colmeias localizadas em áreas urbanas e aquelas nas reservas naturais, com maiores valores encontrados em abelhas coletadas nas colmeias localizadas na área Ciampino (Roma), ao lado do aeroporto.

Um estudo realizado por Lambert et al. (2012) demonstrou que a análise de amostras de abelhas é mais sensível em relação às amostras de pólen e mel para o monitoramento da contaminação ambiental por chumbo (LAMBERT, *et al.*, 2012a). O grupo analisou amostras de abelhas, mel e pólen apícola coletadas em diversas regiões da França para determinação dos níveis de chumbo. Todas as amostras apresentaram a presença de chumbo, porém níveis mais elevados foram encontrados no corpo das abelhas.

1.1.3.2.1.2. *Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos* (HPA)

Embora ainda existam poucos trabalhos sobre o uso de produtos apícolas como bioindicadores de contaminação ambiental por HPA, resultados promissores recentemente têm sido obtidos.

No trabalho desenvolvido pelo grupo de Perugini (2009) na Itália, a fim de avaliar o potencial do uso de abelhas e mel como bioindicadores da contaminação

ambiental por HPA, diversas amostras, coletadas em oito diferentes pontos no país, foram analisadas. Na análise das amostras de abelhas, foi observada grande capacidade dessa matriz em refletir concentrações muito baixas de HPA, entre 0,18 e 9,24 ng g⁻¹, e fornecer informações sobre pequenas mudanças nas condições ambientais, mesmo quando a colmeia está distante de qualquer fonte de contaminação, podendo ser utilizadas como bioindicadores para avaliar alterações antrópicas durante longos períodos. Os níveis relatados no mel foram inferiores em relação aos resultados da análise das abelhas e não foi encontrada correlação positiva entre as concentrações médias e os compostos detectados nas duas matrizes. Embora os menores níveis de HPA tenham sido detectados em amostras de mel e abelhas provenientes dos seis pontos de amostragem considerados não contaminados, não foi observada diferença significativa dos resultados em relação aos obtidos na análise de amostras provenientes de regiões conhecidamente contaminadas, provavelmente devido à ampla distribuição dos HPA no meio ambiente e grande mobilidade dessas substâncias no ar atmosférico.

Na França, três diferentes matrizes apícolas - pólen, abelhas e mel - foram coletadas em quatro períodos diferentes em 2008 e 2009, para determinação de quatro HPA (benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno). Em geral, as amostras de mel apresentaram níveis menores de contaminação dos quatro HPA, com concentração média igual a 0,82 µg kg⁻¹, em relação às amostras de abelha e pólen, que apresentaram níveis mais elevados, com concentração média igual a 7,03 µg kg⁻¹ e 7,10 µg kg⁻¹, respectivamente. Entretanto, as concentrações de HPA detectadas em todas as matrizes foram significativamente influenciadas pelo local de coleta (LAMBERT *et al.*, 2012b)

1.1.3.2.1.3. Agrotóxicos

Para avaliação do uso dos produtos apícolas como bioindicadores de contaminação ambiental por agrotóxicos, diversos estudos têm sido feitos para determinação do nível de contaminação das colmeias por agrotóxicos, bem como

a acumulação e distribuição destas substâncias nas diversas matrizes das colmeias em relação ao seu ambiente e período de exposição (HALM *et al.*, 2006; CHAUZAT *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado nos EUA e Canadá, entre os anos de 2007 e 2008, um total de 121 substâncias foram quantificadas em 887 amostras de cera, pólen e abelhas. Pelo menos duas substâncias foram detectadas em 92% das amostras analisadas. A quantidade média de substâncias presentes foi igual a sete substâncias em cada amostra de pólen, 8 substâncias em cada amostra de cera e 2,5 substâncias em cada amostra de abelha. Os piretroides foram os agrotóxicos predominantes em todas as amostras, e pelo menos um agrotóxico sistêmico foi encontrado em 49,9% delas. Nas amostras de pólen foram encontrados, ainda, altos níveis de fungicidas, geralmente em associação com um agrotóxico sistêmico, implicando possíveis efeitos sinérgicos de toxicidade para as abelhas (MULLIN *et al.*, 2010).

Na Itália, foi realizado um trabalho a fim de elucidar e relacionar a contaminação do mel e suas possíveis fontes (PANSERI *et al.*, 2014). Um total de 72 amostras de mel foram analisadas para determinação de agrotóxicos utilizados na cultura intensiva da macieira e a maioria delas (94%) continha pelo menos um dos agrotóxicos, mesmo que em níveis abaixo do limite máximo de resíduos (LMR). Os agrotóxicos DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), DDD (Dicloro-Difenil-Dicloroetano) e DDE (Dicloro-Difenil-Dicloroetileno) foram os compostos isolados com maior frequência nas amostras de mel coletadas em uma região industrializada. Nas amostras provenientes de área de pomar de maçã, o clorpirifós e quinoxifeno foram os resíduos mais frequentes. Nenhum resíduo foi encontrado nas amostras de mel provenientes da área montanhosa destinada à produção orgânica. Os resultados demonstraram a estreita relação entre a contaminação do mel por agrotóxicos e a fonte de contaminação e comprovaram a viabilidade do mel como bioindicador da contaminação específica de um determinado ambiente.

Resultados semelhantes foram obtidos em um trabalho realizado na Grécia, que demonstrou a capacidade do mel em fornecer informações sobre a ocorrência

e a distribuição dos resíduos de agrotóxicos em áreas agrícolas com apicultura desenvolvida. Para investigar a contaminação por inseticidas em seis regiões do país, amostras de mel coletadas aleatoriamente de apiários localizados nessas áreas foram analisadas para determinação de resíduos de compostos organofosforados, que são amplamente utilizados nas principais culturas das áreas monitoradas (laranja, algodão e girassol). Entre as 50 amostras analisadas, foram detectados resíduos de clorfenvinfós em 5 amostras, clorpirifós em 11 amostras e forato em 12 amostras, em níveis que variaram entre 0,70 e 0,89 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (BALAYIANNIS e BALAYIANNIS, 2008). O cumafós, utilizado para o controle do ácaro *Varroa*, foi encontrado em níveis entre 0,10 e 4,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ nas amostras provenientes de colmeias tratadas.

No Brasil, a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel produzido em Bauru foi investigada entre 1999 e 2004. As amostras foram analisadas para a determinação de 48 agrotóxicos. Altos níveis de concentração de malation, entre 51 e 209 $\mu\text{g kg}^{-1}$, foram encontrados em quase todas as amostras, tendo sido detectadas ainda outras substâncias, principalmente do grupo dos organoalogenados e organonitrogenados. Os resultados obtidos foram comparados com informações sobre os agrotóxicos utilizados durante o período de monitoramento, em um raio de 3 km, tendo sido observada uma relação direta entre esses dados e os tipos de agrotóxicos detectados e os níveis de concentração encontrados nas amostras de mel analisadas (RISSATO *et al.*, 2006).

Embora ainda existam poucos trabalhos na literatura, o pólen apícola tem sido indicado como a melhor matriz apícola para avaliar a presença de resíduos de agrotóxicos no meio ambiente devido à sua facilidade de coleta e maior frequência de contaminação em relação aos demais produtos apícolas (CHAUZAT *et al.*, 2011).

Em trabalho realizado entre 2002 e 2005, na França, diversas amostras de abelhas, cera, mel e pólen, provenientes de 24 apiários localizados em cinco regiões distintas no país, foram analisadas para determinação de 44 agrotóxicos.

As amostras de pólen e cera de abelha tiveram a maior frequência de ocorrência de agrotóxicos entre as matrizes apícolas, enquanto as amostras de mel apresentaram menor frequência. As amostras de pólen apícola forneceram, ainda, informações sobre a variação sazonal da presença dos resíduos identificados. Em 2006, o mesmo grupo havia relatado a relação direta entre a presença de resíduos do inseticida fipronil e seus metabólitos no pólen apícola e sua utilização nas culturas ao redor dos apiários (CHAUZAT *et al.*, 2006; CHAUZAT *et al.*, 2011).

O grupo de JONSSON e KREUGER (2013) também demonstrou a relação direta entre o número de substâncias e o nível de concentração encontrado nas amostras de pólen apícola com a intensidade da produção agrícola na região da colmeia. Durante o trabalho, amostras de abelhas operárias e pólen apícola foram coletadas em 14 colmeias distribuídas em 8 diferentes regiões no sul da Suécia. Utilizando um método analítico para determinação de 99 agrotóxicos de diversas classes, os pesquisadores detectaram 21 substâncias diferentes nas amostras de abelhas e 26 nas amostras de pólen, sendo que uma amostra de pólen continha resíduos de 16 agrotóxicos diferentes. De maneira geral, os níveis de resíduos encontrados no pólen, entre 0,33 e 407,0 ng g⁻¹, foram superiores aos encontrados nas amostras de abelhas, entre 0,17 e 42,0 ng g⁻¹, sendo que para algumas substâncias, como azoxistrobina e procloraz, foram detectadas concentrações 10 vezes maiores no pólen (309,0 e 407,0 ng g⁻¹ para azoxistrobina e procloraz, respectivamente), corroborando as vantagens do uso do pólen apícola como bioindicador da contaminação ambiental por agrotóxicos em relação aos outros produtos apícolas.

No Brasil, 59 amostras de pólen apícola coletadas nas cinco regiões brasileiras foram analisadas para determinação da presença de inseticidas organofosforados, organoclorados e piretroides. Diversas substâncias foram encontradas nas amostras, inclusive os agrotóxicos proibidos zolone, aldrin, dieldrin, endrin aldeído, heptacloro epóxido, endrin, p',p'-DDE e p',p'-DDT. Através do estudo, foi possível verificar a diversidade de substâncias utilizadas nas diferentes regiões do país, porém não foi estabelecida a relação entre a

concentração dos resíduos encontrados e a intensidade de produção agrícola (SANTOS e FUNARI, 2005).

Na literatura são encontrados, ainda, diversos estudos que relatam a presença de agrotóxicos em amostras de abelhas, mel, cera e pólen apícola, geralmente relacionados à morte de abelhas (KASIOTIS *et al.*, 2014; LOZOWICKA, 2013; WIEST *et al.*, 2011; GARCIA-CHAO *et al.*, 2010) ou controle de qualidade alimentar (BERRADA *et al.*, 2010; FARAJZADEH *et al.*, 2014).

I.1.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA

Para viabilizar o uso do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com sensibilidade e seletividade para quantificar resíduos dessas substâncias. Considerando a complexidade dessa matriz, uma etapa de preparo de amostras se faz necessária antes do procedimento analítico de identificação e quantificação.

Um método de extração amplamente utilizado para determinação de agrotóxicos em matrizes complexas é o método QuEChERS, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Ruge and Safe*. Este método consiste em dois passos, a extração líquido-líquido e purificação por extração em fase sólida dispersiva (DSPE). Introduzido pela primeira vez por Anastassiades e colaboradores, em 2003, o QuEChERS originalmente foi desenvolvido para extrair agrotóxicos de frutas e legumes. Esse procedimento, que envolve a extração com ACN e simultânea partição líquido-líquido, promovida pela adição de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, tem sido muito utilizado nos métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes orgânicas, apresentando bons resultados como a obtenção de extratos limpos e recuperação adequada dos analitos.

Em relação às técnicas analíticas, a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida associada à

espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) são as técnicas mais comumente utilizadas para a determinação de agrotóxicos devido a necessidade de análise de multirresíduos em baixos limites de detecção.

Em 2010, Mullin *et al.* (2010) adaptaram o uso do QuEChERS para o preparo de amostras de cera, pólen e abelhas. Após a extração, os extratos de pólen apícola ainda foram purificados por extração em fase sólida (SPE), usando um cartucho que continha PSA (amina primária-secundária) e carbono grafitizado (*Graphitized Carbono Black*, GCB). Utilizando LC-MS/MS e GC-MS para análise, o grupo encontrou 121 substâncias, entre agrotóxicos e metabólitos, em amostras de cera, pólen e abelhas.

Para eliminação de lipídios que poderiam interferir na análise por espectrometria de massas, Wiest *et al.* (2011) adaptaram o método QuEChERS para o preparo de amostras de pólen apícola adicionando uma pequena fração de hexano à etapa de extração. Utilizando as técnicas LC-MS/MS e GC-ToF, o grupo desenvolveu um método analítico para determinação de 80 contaminantes ambientais de diversas classes, como organoalogenados, organofosforados, piretroides e carbamatos em amostras de mel, abelhas e pólen.

Recentemente, o grupo de Kasiotis *et al.* (2014) desenvolveu um método, empregando o QuEChERS modificado com hexano para o preparo de amostras de pólen apícola, abelhas e mel, que possibilitou a determinação de 115 agrotóxicos de diferentes classes químicas, como neonicotinóides, organofosforados, carbamatos, triazóis, dicarboximidas e dinitroanilinas por LC-MS/MS. Os limites de quantificação para o pólen variaram entre 0,2 e 77,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Um resumo sobre alguns métodos analíticos para a determinação de agrotóxicos em produtos apícolas com ênfase no pólen apícola, descritos na literatura nos últimos 10 anos é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Revisão dos métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de agrotóxicos em produtos apícolas com ênfase no pólen apícola.

Referência	País	Matrizes	Preparo de amostras	Análise	Substâncias	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Santos e Funari, 2005	Brasil	Pólen	Partição líquido-líquido/ Coluna preparativa	GC-ECD	29 agrotóxicos entre organofosforados, organoclorados e piretroides	1,0
			SPE (Amberlite XAD-4)	LC-MS/MS	Fipronil	0,3
Chauzat <i>et al.</i> , 2006	Brasil	Abelhas, cera, mel e pólen	Partição líquido-líquido	GC-ECD GC-NP	36 agrotóxicos entre organofosforados, organoclorados, piretroides, carbamatos e fungicidas triazóis	0,1 a 57,0
Mullin <i>et al.</i> , 2010	EUA e Canadá	Cera, pólen e abelhas	QuEChERS	LC/MS-MS GC/MS	200 agrotóxicos, entre inseticidas, fungicidas e herbicidas, e metabólitos	0,1 a 50,0
García-Chao <i>et al.</i> , 2010	Espanha	Mel e pólen	SPE (Florisil)	LC-MS/MS	fipronil e seus metabólitos, tiametoxam e imidaclopride	0,41 a 2,33*
Wiest <i>et al.</i> , 2011	França	Abelhas, mel e pólen	QuEChERS modificado com hexano	LC/MS-MS GC/MS	80 substâncias entre agrotóxicos e fármacos veterinários	0,03 a 46,3
Berrada <i>et al.</i> , 2013	Espanha	Pólen	PLE (C18)	GC-MS	17 agrotóxicos	5,0 a 15,0

Jonsson e Kreuger, 2013	2013	Suécia	Abelhas e pólen	QuEChERS modificado	LC/MS-MS GC/MS	99 agrotóxicos entre fungicidas, herbicidas, inseticidas e produtos de degradação	0,01 a 2,00
Kasiotis <i>et al.</i> , 2014	2014	Grécia	Abelhas, mel e pólen	QuEChERS modificado com hexano	LC-MS/MS	115 agrotóxicos entre neonicotinoides, organofosforados, triazois, carbamatos, dicarboximides and dinitroanilines	0,03 a 23,30

LOD: Limite de detecção

GC-ECD: Cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons

SPE: Extração em fase sólida

LC-MS/MS: Cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial

GC-NP: Cromatografia a gás com detector de nitrogênio e fósforo

GC-MS: Cromatografia a gás associada a espectrometria de massas

QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Ruge and Safe.

PLE: Extração líquida pressurizada

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o uso de pólen apícola como bioindicador da contaminação ambiental por agrotóxicos.

Os objetivos específicos compreenderam:

- Levantamento dos agrotóxicos utilizados na região do entorno do campo experimental da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP;
- Instalação do apiário e dos dispositivos de amostragem passiva no campo experimental da Embrapa, Jaguariúna;
- Desenvolvimento e validação de métodos analíticos multirresíduos para análise de amostras de pólen apícola e espumas de poliuretano (PUF) através de GC-MS/MS-*Ion Trap*;
- Realização de testes de sorção de determinados agrotóxicos em pólen apícola para determinar a afinidade das substâncias por esta matriz;
- Análise de amostras de pólen apícola e espumas de poliuretano (PUF) provenientes do campo experimental da Embrapa, Jaguariúna;
- Análise de amostras de pólen apícola coletadas em apiários comerciais.

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO MULTIRRESÍDUOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA

III.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos que permitissem a determinação de agrotóxicos em amostras de pólen apícola e esponjas de poliuretano (PUF) foi essencial para viabilização da etapa de avaliação do potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos. Conforme detalhado a seguir, no Capítulo IV, nessa etapa foram analisadas amostras de pólen apícola provenientes de um apiário experimental instalado no Campo Experimental da Embrapa, em Jaguariúna, e de apiários comerciais, localizados em Ribeirão Preto. Os discos de esponjas de poliuretano (PUF) foram utilizados como dispositivos de amostragem passiva na região do Campo Experimental durante todo o período de monitoramento ambiental e sua análise foi realizada para o controle da presença de agrotóxicos no ar durante o período de coletas.

Como critério para a seleção das substâncias a serem determinadas nas amostras coletadas durante o monitoramento ambiental foram incluídos no estudo, agrotóxicos aplicados na região selecionada para o estudo, além de substâncias monitoradas pelo Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), do Ministério da Agricultura (MAPA) e no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e substâncias proibidas. Através do levantamento destas informações, detalhado no Capítulo IV (Item IV.3.3), um total de 69 substâncias foram inicialmente incluídas no estudo.

III.2. PARTE EXPERIMENTAL

III.2.1. MATERIAL

III.2.1.1. *Equipamentos e coluna cromatográfica*

No decorrer deste trabalho foi utilizado um equipamento de cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas sequencial, GC-MS/MS *Ion Trap* 3900/Saturn 2100 T, Varian (EUA), alocado na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. Os dados foram adquiridos e processados no *software MS Workstation* versão 6.5, Varian (EUA).

Todos os testes foram realizados com a coluna analítica Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm), Restek (EUA).

Foram utilizadas, ainda, balança analítica modelo CP 225D (Sartorius, Alemanha) e balança semi-analítica, modelo SA 210 (Scientech, Índia). Para o preparo de amostras foi empregado um *Misturaer* modelo Lab Dancer (Ika, Brasil), banho de ultra-som modelo *Transsonic* 660/H (Elma, Alemanha) e centrífuga modelo *Heraeus Multifuge* 3L-R (Thermo, EUA). As amostras de pólen apícola foram desidratadas em estufa de secagem com circulação de ar modelo MA035/1 (Marconi, Brasil).

III.2.1.2. Solventes e reagentes

Foram utilizados os reagentes sulfato de magnésio (MgSO₄), cloreto de sódio (NaCl), citrato de sódio diidratado (C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O); citrato de sódio sesquidratado, todos grau analítico, da marca J. T. Baker (EUA). O sorvente PSA (amina primária secundária) utilizado foi da marca Varian (EUA). Foram utilizados, ainda, ACN (ACN) grau HPLC, diclorometano e acetona grau analítico, todos Tedia (Brasil). Os padrões analíticos de Acetocloro, Alacloro, Azinfós Etil, Bentazona, Captafol, Captana, Carbossulfan, Cialotrina, Ciflutrina, Cipermetrina, Clomazona, Clorfenvinfós, Clorobenzilato, Deltametrina, Diazinon, Dimetoato, Dissulfoton, Endossulfan alfa, Endossulfan beta, Endrin, Esfenvalerato, Etrinfós, Fempropatrim, Fenamifós, Fipronil, Fludioxonil, Folpete, Forato, Fosalone, Fosmet, Heptacloro Epóxido, Hexaclorobenzeno, Metidation, Oxifluorfem, Paration Etil, Paration Metil, Pendimetalina, Pentaclorofenol, Picloram, Profenofós, Simazina, Terbufós, Tetradifon, Triadimefon, Triadimenol e Triazofós, foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha), os padrões analíticos Aldrin, Bifentrin, Bioaletrina, Carbaril, Carbofenotion, Clorotalonil, Clorpirifós, Clorpirifós Metil, DDT (Dicloro-Difenil-Dicloroetano), Fentoato, Fluazifope, Hexazinona, Lindano, Malation, Metalaxil, Metoxiclor, Mirex, Permetrina, Pirimifós Etil, Pirimifós metil, Propanil, Propargito, Trifluralina e Vinclozin da Fluka (EUA), todos com teor mínimo de pureza de 98%.

III.2.1.3. Amostras de pólen apícola

As amostras de pólen apícola utilizadas para desenvolvimento e validação do método analítico foram adquiridas comercialmente em lojas de produtos apícolas, em Campinas, SP. Todas as amostras foram moídas e homogeneizadas em processador e armazenadas em frascos de vidro em local fresco e arejado.

III.2.1.4. Amostras de PUF

Discos de PUF com dimensões iguais a 14 cm de diâmetro e 1,2 cm de espessura e densidade 18 kg m^{-3} foram adquiridos comercialmente em Campinas, SP. Previamente às análises, todos os discos foram submetidos à limpeza por extrações sucessivas por *Soxhlet* com diclorometano e acetona, com quatro ciclos por hora, durante 8 horas com cada solvente, para eliminar a presença de possíveis contaminantes e/ou interferentes. Após a limpeza, cada disco foi retirado do extrator com pinça e seco em capela de exaustão.

III.2.2. MÉTODOS

III.2.2.1. PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO

III.2.2.1.1. Soluções Estoque

A partir dos padrões comerciais dos agrotóxicos, foram preparadas soluções estoques individuais dos agrotóxicos na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, através da diluição de 10 mg de cada padrão em 10 mL do solvente adequado para cada substância. Os agrotóxicos acetocloro, alacloro, aldrin, bifentrin, bioaletrina, clorpirifós metil, etrinfós, fluazifope, fosalone, heptacloro epóxido, malation, oxifluorfen, pendimetalina, terbufós, trifluralina, captafol, captana, carbofenotion, carbossulfan, cialotrina, cipermetrina, clomazona, clorfenvinfós, clorobenzilato, clorotalonil, deltametrina, diazinon, endrin, esfenvalerato, fenamifós, fipronil, fludioxonil, folpete, forato, metidation, metoxiclor, picloram, pirimifós metil, profenofós, propanil, propargito, simazina, tetradifon e vinclozin foram diluídos em acetona; DDT, dissulfoton,

endossulfan alfa, endossulfan beta, fentoato, paration etil, paration metil, permetrina, pirimifós etil e fempropatrim, em hexano; bentazona, carbaril, dimetoato, fosmet, hexazinona, metalaxil, pentaclorofenol, triadimenol e triazofós, em metanol; azinfós etil, ciflutrina, clorpirifós e triadimefon, em tolueno; e hexaclorobenzeno e mirex, em clorofórmio.

Conforme testes previamente realizados no Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa Meio Ambiente (LRC), as soluções foram armazenadas e permaneceram estáveis em frascos de vidro, mantidas em freezer (-16 °C) e utilizadas por um período máximo de doze meses.

III.2.2.1.2. *Soluções Intermediárias*

Foram preparadas soluções intermediárias dos padrões dos analitos e do padrão interno, lindano, nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, através da diluição de 0,1 mL de cada solução estoque em 10 mL de ACN. Essas soluções foram armazenadas em frascos de vidro e permaneceram estáveis armazenadas durante um mês em freezer (-16 °C).

III.2.2.1.3. *Soluções de Trabalho*

As soluções de trabalho dos analitos em concentrações iguais a 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300; 0,500 e 0,700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e padrão interno (0,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,700 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas diariamente, mediante diluição das soluções intermediárias em ACN.

Para dinamização do procedimento, diversas substâncias foram diluídas em uma mesma solução de trabalho, tendo sido preparadas inicialmente dez misturas denominadas 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B, 2C, 2D para otimização das condições analíticas e estudos de detectabilidade. A solução 1A continha os agrotóxicos acetocloro, alacloro, aldrin, bentazona, carbofenotion, cialotrina, cialotrina e azinfós Etil; 1B continha dimetoato, clorotalonil, clorpirifós metil, clorpirifós etil, clorfenvifós, clorobenzilato, cipermetrina e deltametrina; 1C continha dissulfoton, etrinfós, fipronil, fenamifós, endrin, fluazifope e esfenvalerato; 1D continha forato, lindano, folpete,

hexazinona e fosmet; 1E continha pentaclorofenol, paration etil, pendimetalina, profenofós, oxifluorfem, metoxiclor e permetrina; 1F continha trifluralina, terbufós, vinclozin, triazofós, propargito e tetradifon; 2A continha clomazona, captana, bioaletrina, captafol, carbossulfan, bifentrin e ciflutrina; 2B continha diazinon, heptacoloro, endossulfan alfa, fludioxonil, endossulfan beta, fempropatrim e fosalone; 2C continha hexaclorobenzeno, paration metil, metalaxil, heptacoloro epóxido, metidation e mirex; e 2D continha simazina, picloran, propanil, pirimifós etil, triadimenon, pirimifós metil e DDT.

Na otimização e validação do procedimento de preparo de amostras, foram preparadas duas outras misturas, I e II, contendo os analitos determinados pelo método de monitoramento I e II, respectivamente. A mistura I continha as 18 substâncias determinadas pelo método de monitoramento I, que são: aldrin, bifentrin, bioaletrina, clorpirifós metil, dissulfoton, endossulfan alfa, endossulfan beta, fempropatrim, metalaxil, mirex, o´p´DDT, oxifluorfem, paration etil, paration metil, pendimetalina, propargito, tetradifon e trifluralina, além do padrão interno, lindano. A mistura II continha as 15 substâncias determinadas pelo método de monitoramento II, que são: acetocloro, alacloro, diazinon, etrinfós, fentoato, fluazifope, fosalone, heptacoloro epóxido, hexaclorobenzeno, malation, metoxiclor, permetrina, pirimifós etil e terbufós, e o padrão interno, lindano.

A solução intermediária do padrão interno lindano foi diluída nas soluções de trabalho em concentração final igual a $0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

III.2.2.2. PREPARO DE AMOSTRAS E EXTRATOS FORTIFICADOS

III.2.2.2.1. *Preparo de amostras branco de pólen fortificadas*

Amostras de pólen apícola, adquiridas comercialmente, foram moídas e fortificadas com as soluções padrão intermediárias dos analitos em níveis de concentração iguais a 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300; 0,500 e 0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$ e do padrão interno em concentração igual a $0,200 \mu\text{g g}^{-1}$.

Da mesma forma como descrito para as soluções padrão de trabalho, diversas substâncias foram diluídas em uma mesma amostra, tendo sido preparados amostras fortificadas com duas misturas diferentes, denominadas I e II. Todas as amostras de pólen foram fortificadas com pelo menos 15 horas de antecedência às análises para maximizar a incorporação dos agrotóxicos na matriz. As amostras foram previamente analisadas pelo método desenvolvido para confirmação da ausência (abaixo do limite de detecção do método) de agrotóxicos.

III.2.2.2.2. *Preparo de extrato de amostra branco de pólen fortificado*

Amostras branco de pólen apícola foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra estabelecido. Ao final do processo, os extratos foram ressuspensos com 1 mL das misturas de soluções padrão de trabalho I e II, em níveis de concentração iguais a 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300; 0,500 e 0,700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e do padrão interno em concentração igual a 0,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

III.2.2.2.3. *Preparo de amostra branco de PUF fortificada*

Após o procedimento de limpeza, as amostras branco de PUF foram fortificadas com soluções padrão intermediárias dos analitos em concentração final igual a 0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$ e do padrão interno em concentração igual a 0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$.

III.2.2.2.4. *Preparo de extrato de amostra branco de PUF*

Após o procedimento de limpeza, os discos de PUF foram submetidos ao procedimento de preparo de amostra estabelecido. Ao final do processo, os extratos secos foram ressuspensos em 1 mL de soluções padrão dos analitos em nível de concentração igual a 0,700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e do padrão interno em concentração igual a 0,700 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

III.2.2.3. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA

III.2.2.3.1. DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS (GC-MS/MS *Ion trap*)

Inicialmente foram definidas as condições analíticas de separação, detecção e quantificação de 69 agrotóxicos por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas sequencial com detector *Ion trap*. Para tanto, foram realizadas análises das misturas de soluções padrão intermediárias 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B, 2C e 2D (10 µg mL⁻¹). Os estudos para definição dos agrotóxicos incluídos neste trabalho serão apresentados no Capítulo IV.

Durante todas as análises, as temperaturas do *trap*, *manifold* e *transferline* foram mantidas em 220 °C, 60 °C e 280 °C, respectivamente. O injetor automático foi programado com temperatura igual a 250 °C, no modo *splitless*, e volume de injeção igual a 1 µL. O fluxo constante de gás hélio foi igual a 1 mL min⁻¹.

Várias programações de temperatura foram testadas e a mais satisfatória para a separação dos agrotóxicos em coluna analítica Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm) está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Programação de temperatura utilizada para separação cromatográfica dos analitos em coluna Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm).

Temperatura (°C)	Taxa (°C/min)	Tempo de manutenção (min)	Tempo total (min)
100		2	2
150	10	10	17
250	5	6	43

A definição dos íons precursores para cada analito foi realizada através da análise de soluções padrão no modo *full scan*, em que o equipamento foi programado para fazer uma varredura, detectando todos os íons na faixa de razões massa/carga (*m/z*) entre 70 e 600 *m/z*.

Com o auxílio da função “*Automated Method Development*” (AMD) do *software MS Workstation*, foram definidas a forma de onda, ressonante ou não ressonante, e a

energia de colisão adequadas para cada íon precursor. Esta ferramenta auxilia o analista a definir a energia mínima necessária para colisão do íon em fragmentos de interesse, pois submete os íons precursores a diferentes energias de colisão na mesma corrida.

A forma de onda e energia de colisão definidas para cada analito devem fragmentar a molécula em pelo menos três íons, com intensidade de sinal superior ao íon precursor sem eliminá-lo completamente (SANCO, 2009). As principais diferenças entre a forma de onda “ressonante”, de alta frequência (~200 kHz), e “não ressonante”, de baixa frequência (~500 Hz), são que na forma de onda não ressonante, a energia de colisão afeta os fragmentos, além do íon precursor, causando o efeito cascata ou dissociação dos íons fragmentos. Na forma ressonante, esse efeito não ocorre porque apenas os íons precursores são excitados e a energia necessária para a colisão na forma de onda ressonante é muito menor em relação a não ressonante. Geralmente a dissociação induzida por colisão na forma ressonante requer uma forma de onda com amplitude inferior a 1,0 V, enquanto a não ressonante requer até 100 V. Sempre que possível foi escolhida a forma de onda ressonante para evitar o efeito cascata.

Para a quantificação dos agrotóxicos, o analisador de massas foi utilizado no modo SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*), atribuindo a cada analito o fragmento mais abundante para ser usado como íon de quantificação e outros três íons para confirmação da identidade. Os tempos de retenção e as abundâncias relativas dos íons de quantificação e identificação foram utilizados como critérios de identificação.

A detectabilidade do equipamento para os agrotóxicos foi definida através da análise das soluções padrão de trabalho em concentrações decrescentes de cada analito (10,000; 5,000; 1,000; 0,500 e 0,100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Considerando a possível ocorrência de compostos interferentes na análise da matriz no tempo de retenção dos analitos e no ruído de linha de base, a detectabilidade do método analítico para os agrotóxicos foi considerada adequada quando foi obtida razão sinal/ruído igual ou superior a 30, valor 10 vezes maior que o estabelecido pelo Guia SANCO para definição do limite de detecção dos analitos na matriz.

III.2.2.3.1. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA

Para definição das condições ótimas de preparo de amostras de pólen apícola para determinação de agrotóxicos, dois métodos analíticos foram otimizados utilizando o método QuEChERS de preparo de amostras e um método de partição com ACN sem as etapas de limpeza.

O método QuEChERS foi avaliado por ser conhecido por fornecer extratos mais limpos e maior recuperação dos analitos; e o método por partição com ACN sem as etapas de limpeza, por sua simplicidade e rapidez.

O desempenho dos dois métodos analíticos foi avaliado e comparado através dos resultados dos parâmetros de validação analítica.

III.2.2.3.1.1. *Otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS*

Para o desenvolvimento e otimização do método QuEChERS de preparo de amostras, foram realizados ensaios com amostras fortificadas com as misturas dos analitos para definir as melhores condições de extração e limpeza. Todos os extratos obtidos foram analisados por GC-MS/MS *Ion trap*, utilizando os dois métodos de monitoramento de íons estabelecidos. Os níveis de concentração dos analitos foram calculados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, através de curvas analíticas preparadas em extratos fortificados (0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300 $\mu\text{g g}^{-1}$). Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de eficiência de extração, que é a razão entre o resultado obtido e o nível de concentração adicionada de cada substância.

Inicialmente, foi avaliado o Procedimento I previamente estabelecido e validado no laboratório de resíduos e contaminantes da Embrapa Meio Ambiente para o preparo de diversas outras matrizes para determinação de agrotóxicos.

Neste procedimento (Procedimento I), 5 gramas de amostra são pesados em tubos Falcon e a cada tubo são adicionados 15 mL de ACN. Após agitação em vortex durante 1 minuto, são adicionados 4,0 g de MgSO_4 , 1,0 g de NaCl, 1,0 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Após serem novamente agitados em vortex (1 minuto), os tubos permanecem em banho de ultrassom durante 15 min e são centrifugados por 5 min (13440 g/ 5 °C). Ao sobrenadante, transferido para outro tubo,

são adicionados 60 mg de PSA e 750 mg de MgSO₄. Os tubos são agitados em vortex (1 minuto) e ultrassom (15 min) e, em seguida, submetidos à centrifugação (10 min/13440 g/ 5 °C). O sobrenadante é evaporado em rotaevaporador (40 °C), ressuspendido em 1 mL de ACN e filtrado em membrana (0,22 µm).

A quantidade de pólen apícola adequada para extração foi definida através do preparo de 1, 2 ou 5 gramas de amostras fortificadas com 0,200 µg g⁻¹ de cada analito e 0,200 µg g⁻¹ de padrão interno, utilizando os parâmetros de extração e limpeza do Procedimento I.

Para otimização dos parâmetros volume de ACN (A), tempo de ultrassom (B) e massa de PSA (C), foi realizado um planejamento experimental do tipo composto central 2³, totalizando 17 ensaios, sendo 8 ensaios para a investigação de um modelo linear, 3 pontos centrais e mais 6 ensaios distribuídos rotacionalmente (pontos axiais) a uma distância α do ponto central ($\alpha = 1,68$), para investigação de um modelo quadrático.

Os níveis estudados de cada variável estão detalhados na Tabela 3. As condições utilizadas no Procedimento I foram definidas como ponto central do planejamento experimental.

Tabela 3. Variáveis estudadas e níveis avaliados no delineamento composto central 2³ para otimização das condições de extração e limpeza de amostras de pólen apícola por QuEChERS.

Variáveis estudadas	Níveis avaliados				
	- α	-1	0	+1	+ α
A - (x ₁) Volume de ACN (mL)	6,6	10,0	15,0	20,0	23,4
B - (x ₂) Tempo no banho de ultrassom (min.)	3,2	8,0	15,0	22,0	26,8
C - (x ₃) Massa de PSA (mg)	26,4	40,0	60,0	80,0	93,6

Amostras branco fortificadas (0,200 µg g⁻¹ de cada analito e 0,200 µg g⁻¹ de PI) foram submetidas a diferentes procedimentos de extração utilizando os parâmetros descritos na matriz do planejamento experimental (Tabela 4), com os valores das variáveis definidos para cada um dos 17 ensaios. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e de forma aleatória.

Tabela 4. Matriz do planejamento experimental (2³) contendo os valores estudados das variáveis, volume de ACN, tempo de ultrassom e massa de PSA, nos 17 ensaios.

Ensaio	Variáveis estudadas		
	(x1) Volume de ACN (mL)	(x2) Tempo de ultrassom (min)	(x3) Massa de PSA (mg)
1	10	8	40
2	10	8	80
3	10	22	40
4	10	22	80
5	20	8	40
6	20	8	80
7	20	22	40
8	20	22	80
9	6,6	15	60
10	23,4	15	60
11	15	3,2	60
12	15	26,8	60
13	15	15	26,8
14	15	15	93,6
15	15	15	60
16	15	15	60
17	15	15	60

A avaliação dos resultados foi feita através da análise dos cromatogramas obtidos, observando a seletividade dos picos nos cromatogramas, principalmente nos tempos de retenção dos analitos, bem como através dos resultados de eficiência de extração. A análise dos dados foi feita com o auxílio do *software* Design Expert 6.0.4 (Minneapolis, USA).

Após a definição das condições ótimas, o procedimento de extração e limpeza por QuEChERS (Procedimento II) foi realizado da seguinte maneira: foram pesados 2,0 gramas de amostra em tubos Falcon e a cada tubo foram adicionados 15 mL de ACN. Após agitação em vortex durante 1 minuto, foram adicionados a cada tubo 4,0 g de MgSO₄, 1,0 g de NaCl, 1,0 g de C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O e 0,5 g de C₆H₅Na₃O₇ · 6H₂O. Após serem novamente agitados em vortex (1 min), os tubos permaneceram em banho de ultrassom durante 15 min e foram centrifugados durante 5 min (13440 g/ 5 °C). Ao sobrenadante, transferido para outro tubo, foram adicionados 95 mg de PSA e 750 mg de MgSO₄. Os tubos foram agitados em vortex (1 min) e ultrassom (15 min) e, em seguida, submetidos à centrifugação (10 min/13440 g/ 5 °C). O sobrenadante foi evaporado em rotaevaporador (40 °C), ressuspendido em 1 mL de ACN e filtrado em membrana (0,22 µm).

III.2.2.3.1.2. Otimização do preparo de amostras de pólen apícola por partição com ACN

Para avaliação do preparo de amostras utilizando o método de partição com ACN, foram realizados ensaios com amostras fortificadas (0,200 µg g⁻¹) com as misturas dos analitos. Todos os extratos obtidos foram analisados por GC-MS/MS *Ion trap*, utilizando os dois métodos de monitoramento de íons estabelecidos. Os níveis de concentração dos analitos foram calculados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, através de curvas analíticas preparadas em extratos fortificados (0,010; 0,025; 0,050; 0,060; 0,100; 0,200; 0,300; 0,500 e 0,700 µg g⁻¹). Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de eficiência de extração, que é a razão entre o resultado obtido e o nível de concentração adicionada de cada substância.

Os parâmetros ótimos estabelecidos para o método QuEChERS de preparo de amostras foram utilizados no desenvolvimento do método por partição com ACN (Procedimento III): Pesou-se 2 gramas de amostra em tubos *Falcon* e a cada tubo foram adicionados 15 mL de ACN. Após agitação em vortex durante 1 min, os tubos permaneceram em banho de ultrassom durante 15 min e foram centrifugados durante 10 min (13440 g/ 5 °C). O sobrenadante foi evaporado em rotaevaporador (40 °C), ressuspendido em 1 mL de ACN e filtrado em membrana (0,22 µm).

III.2.2.4. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação dos métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em amostras de pólen apícola foi realizada de acordo com as recomendações do Guia SANCO 10684/2009 (SANCO, 2009), oficialmente utilizado na União Europeia, para validação de métodos analíticos empregados no monitoramento de resíduos de agrotóxicos em matrizes alimentares.

Todas as curvas analíticas preparadas em solução padrão amostras fortificadas ou extratos fortificados foram analisadas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários utilizando o software Excel[®].

Os seguintes parâmetros foram avaliados para validação:

- Seletividade: a seletividade foi obtida a partir da análise de seis diferentes amostras branco de pólen, verificando interferências no tempo de eluição dos analitos. Na análise dos cromatogramas foi verificado se: (i) a presença de interferentes poderia levar a uma identificação falsa; (ii) a identificação do analito alvo seria prejudicada pela presença de algum interferente; ou (iii) a quantificação seria influenciada pela presença de um ou mais interferentes.

- Efeito Matriz: para a avaliação do efeito matriz, o Guia SANCO (2009), recomenda a análise de extratos de amostras branco de pólen apícola fortificados. Para isso, após o procedimento de extração, os extratos secos obtidos foram ressuspensos com 1,0 mL das misturas I e II de soluções padrão de trabalho (0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300 $\mu\text{g g}^{-1}$ para QuEChERS e 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300; 0,500 e 0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$ para partição com ACN) e o padrão interno, lindano, na concentração de 0,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados obtidos para cada analito foram quantificados a partir de curvas analíticas preparadas com a solução padrão em solvente nas mesmas concentrações. O efeito matriz, expresso em porcentagem, foi calculado como a razão entre o resultado obtido na amostra fortificada e na solução padrão. Para garantir a correlação adequada, os resíduos individuais devem apresentar desvios inferiores à +/- 20%.

- Linearidade e Faixa Linear: para verificação da linearidade e da faixa linear, o ajuste das curvas analíticas deve ser analisado, observando a ocorrência de tendência e por construção de gráficos de resíduos, evitando assim a dependência de coeficientes de correlação para garantir que o ajuste seja satisfatório para os resíduos detectados. Para avaliação desse parâmetro, curvas analíticas foram preparadas através da fortificação de amostras branco de pólen com os analitos (0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300 $\mu\text{g g}^{-1}$ para QuEChERS e 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300; 0,500 e 0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$ para partição com ACN), e o padrão interno (0,200 $\mu\text{g g}^{-1}$). Os gráficos dos resíduos da regressão foram plotados e estudados para investigação de perfis óbvios que demonstrassem heterocedasticidade ou desvio de linearidade, sendo que os pontos fora do intervalo foram indicados como *outliers* (valores extremos), de acordo com o método proposto por MEYER e ZUND (1993). Os *outliers* foram formalmente diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados *Jackknife*. Este teste foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2% no número original de resultados (HORWITZ, 1995).

- Precisão: a precisão foi avaliada mediante análise, em seis replicatas, de amostras branco de pólen fortificadas com os analitos em três níveis de concentração dos analitos (0,025, 0,100 e 0,300 $\mu\text{g g}^{-1}$) e o padrão interno (0,200 $\mu\text{g g}^{-1}$). O Guia SANCO (2009) recomenda a análise em cinco replicatas, porém por se tratar de muitos analitos, considerou-se prudente realizar todas as análises em seis replicatas. Os resultados obtidos para cada analito foram quantificados a partir da regressão de curvas analíticas preparadas em amostras branco fortificadas nas mesmas concentrações. As extrações foram realizadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e nos mesmos equipamentos. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR), que deve ser inferior a 20 % (SANCO, 2009).

- Exatidão: a exatidão foi avaliada a partir da fortificação de amostras branco de pólen apícola em três níveis de concentração dos analitos (0,025, 0,100 e 0,300 $\mu\text{g g}^{-1}$) e o padrão interno (0,200 $\mu\text{g g}^{-1}$). Os resultados obtidos para cada analito foram quantificados a partir de curvas analíticas preparadas em amostras branco fortificadas

nas mesmas concentrações. A exatidão foi avaliada e expressa como porcentagem de recuperação, definida como a razão entre a concentração obtida em relação aos valores preditos pela regressão. De acordo com a SANCO (2009), os valores aceitáveis de recuperação devem estar entre 70 e 120 %.

- Limites de detecção e quantificação: os limites de detecção e quantificação foram determinados através da análise de amostras branco de pólen fortificadas em níveis decrescentes de concentração dos analitos (0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200 e 0,300 para QuEChERS e 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300; 0,500 e 0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$ para partição com ACN), avaliando a exatidão e a precisão dos resultados. O limite de detecção do método (LOD), estabelecido para cada analito, foi igual à mínima concentração detectável dos analitos, presentes na amostra fortificada, com razão sinal-ruído igual a 3. O limite de quantificação do método (LOQ) foi igual à concentração mínima dos analitos presentes na amostra fortificada, com razão sinal-ruído igual a 10, que pôde ser quantificada pelo método analítico com precisão e exatidão.

III.2.2.5. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ESPONJAS DE POLIURETANO (PUF)

III.2.2.5.1. CONDIÇÕES ANALÍTICAS (GC-MS/MS *ION TRAP*)

As condições analíticas definidas para a determinação de agrotóxicos em pólen apícola foram utilizadas nas análises das amostras de esponjas de poliuretano. Da mesma forma, todos os extratos obtidos nos testes para avaliação do procedimento de extração e análise das amostras de PUF foram analisados por GC-MS/MS *Ion trap* utilizando os dois métodos de monitoramento de íons I e II.

III.2.2.5.2. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PUF

Para avaliação do preparo das amostras de PUF por *Soxhlet*, foram utilizadas amostras branco e amostras branco fortificadas com os agrotóxicos (0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$) e o padrão interno lindano (0,200 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Antes de serem submetidas à extração com diclorometano, cada esponja, previamente limpa, foi cortada em oito partes iguais para melhor acondicionamento no extrator e aumento da superfície de contato. A temperatura de extração foi mantida a 60 °C e o tempo de extração foi igual oito horas, sendo que nestas condições foram obtidos quatro ciclos por hora.

Os extratos obtidos, coletados em balão de fundo redondo, foram evaporados com aquecimento (40 °C), em rotaevaporador até *secura*. Os extratos secos foram ressuspensos com 5 mL de ACN para completa lavagem dos balões e transferidos para tubos de polipropileno de 12 mL. Os extratos foram novamente evaporados até *secura* e ressuspensos com 1 mL de ACN. Os extratos finais foram filtrados em membrana de 0,22 µm e submetidos à análise cromatográfica.

III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.3.1. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA

A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) são as técnicas mais comumente utilizadas para a análise de multirresíduos de agrotóxicos em matrizes diversas.

O analisador de massas do tipo *Ion trap*, utilizado neste trabalho, é amplamente empregado na análise de agrotóxicos em diversas matrizes. Embora não existam trabalhos na literatura que tenham utilizado este tipo de analisador para determinação de agrotóxicos em pólen apícola, alguns trabalhos empregaram a mesma técnica para análise de outras matrizes complexas, inclusive o mel (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008; ZACHARIS *et al.*, 2012).

Neste tipo de analisador de massas, o *trap* é ajustado para capturar todos os íons que entram no espectrômetro de massas e os íons de m/z que não são de interesse são levados à instabilidade para ejeção. Uma vez que a seleção, a fragmentação e a subsequente análise dos íons são realizadas na mesma parte do instrumento,

separados apenas pelo tempo, a detectabilidade no *Ion trap* está diretamente relacionada à resolução cromatográfica, que é essencial para aumentar a quantidade de íons aprisionados no *trap*, através da otimização dos parâmetros de ionização dos analitos em cada janela de tempo de retenção.

III.3.1.1. PADRONIZAÇÃO INTERNA

O uso do padrão interno é recomendado para assegurar a execução correta de todo o procedimento de extração e análise de cada amostra e correta injeção de cada extrato final no sistema cromatográfico. O método de padronização interna é útil, especialmente pelo fato de que independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como temperatura da coluna e tamanho da amostra. Na cromatografia à gás, quando a amostra é introduzida via seringa e injeção manual, o uso de padrão interno é fundamental (RIBANI *et al.*, 2004). A substância a ser escolhida como padrão interno deve ser adicionada às amostras antes da extração e deve apresentar características de polaridade e suscetibilidade à degradação, semelhantes às substâncias analisadas (SANCO, 2009).

O lindano, agrotóxico pertencente à classe dos organoclorados, foi utilizado neste trabalho como padrão interno por apresentar polaridade intermediária em relação aos analitos escolhidos. De acordo com os testes de detectabilidade, realizados em solução padrão, foi estabelecido o uso de concentração constante igual a $0,200 \mu\text{g g}^{-1}$ nas amostras, amostras fortificadas, extratos fortificados e soluções padrão de trabalho.

A razão entre a área obtida para cada substância de interesse e a área do padrão interno foi utilizada para quantificação dos analitos.

III.3.1.2. DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES ANALÍTICAS (GC-MS/MS *ION TRAP*)

Na análise de soluções padrão dos agrotóxicos utilizando o Programa de temperatura descrita na Tabela 2, foi obtida a separação cromatográfica da maioria dos analitos, porém a resolução entre os picos não foi suficiente para análise no *Ion trap*.

Sendo assim, dois programas de monitoramento de íons (I e II) foram desenvolvidos a fim de aumentar a detectabilidade através do aumento da janela de tempo de retenção para o monitoramento de cada íon. Ambos os programas utilizam o

Programação de temperatura descrita na Tabela 2, no entanto, o analisador de massas está programado para monitorar íons diferentes em cada método.

O desenvolvimento dos dois programas de monitoramento de íons permitiu a determinação das 69 substâncias selecionadas, sendo 41 no programa I (Figuras 2 a 7) e 28 no programa II (Figuras 8 a 11), além de seus isômeros. O lindano, que foi utilizado como padrão interno, foi monitorado em ambos os métodos.

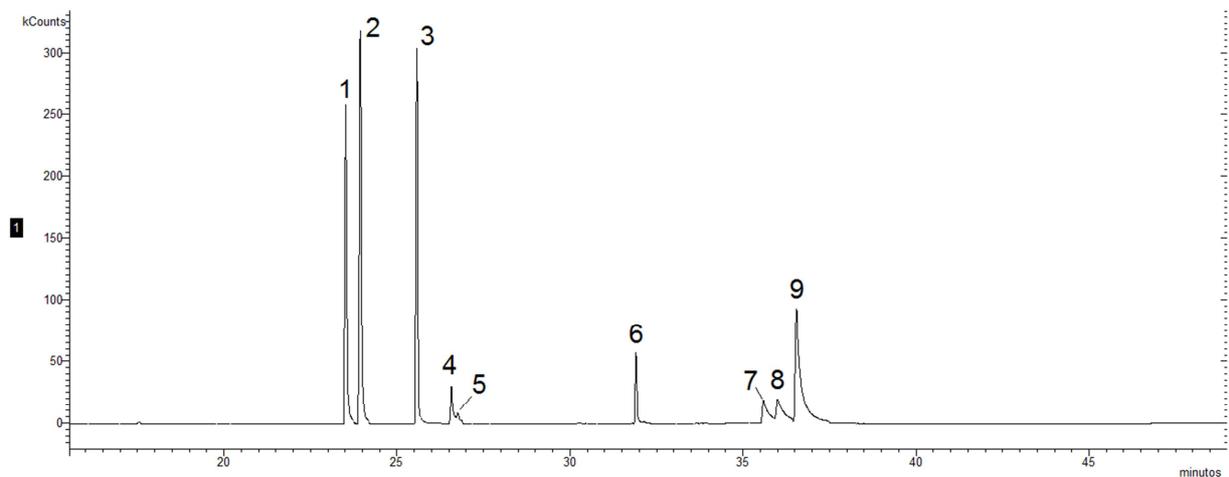


Figura 2. Cromatograma do Mistura 1A de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1- Acetocloro (23,5 min), 2-Alacloro (23,9 min), 3-Aldrin (25,6 min), 4-Bentazona (26,6 min), 5- Desconhecido, 6-Carbofenotion (31,9 min), 7-Cialotrina I (35,6 min), 8- Cialotrina II (36,0 min), 9- Azinfós Etil (36,6 min). Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*, modo *full scan*.

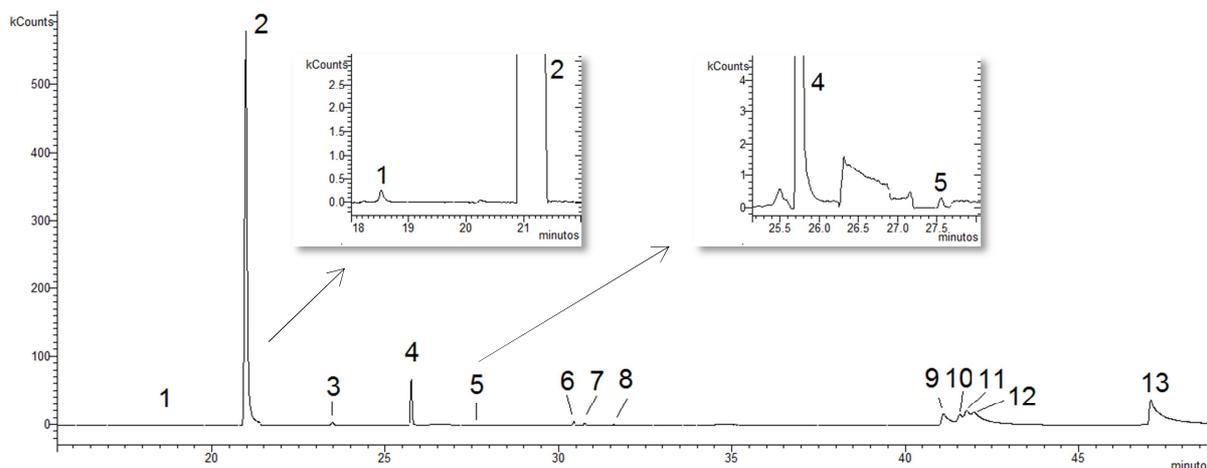


Figura 3. Cromatograma do Mistura 1B de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Dimetoato (18,6 min), 2-Chlorotalonil (21,0 min), 3-Clorpirifós metil (23,5 min), 4-Clorpirifós Etil (25,7 min), 5-Clorfenvifós (27,6 min), 6-Desconhecido, 7- Clorobenzilato (30,7 min), 8-Desconhecido, 9 a 12-Cipermetrina (41,1, 41,6, 41,8, 42,0 min), 13-Deltametrina (47,1 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *ion trap*, modo full scan.

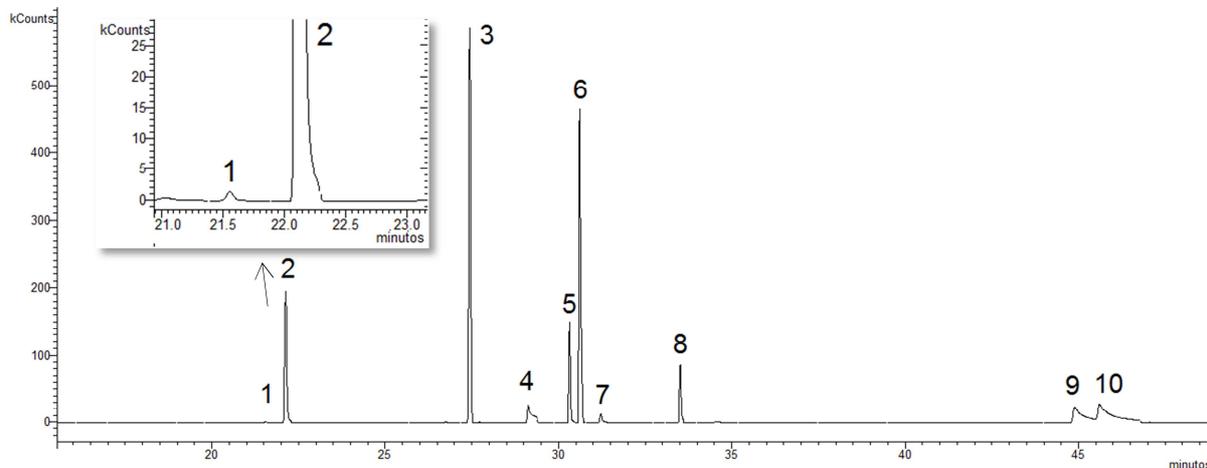


Figura 4. Cromatograma do Mistura 1C de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Dissulfoton (21,6 min), 2-Etrinfós (22,1 min), 3-Fipronil (27,4 min), 4-Fenamifós (29,1 min), 5-Endrin (30,3 min), 6-Fluazifope (30,6 min), 7- Endrin aldeído (31,2 min), 8- Endrin Cetona (30,6 min), 9 e 10-Esfenvalerato (44,9 e 45,6 min). Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *ion trap*, modo full scan.

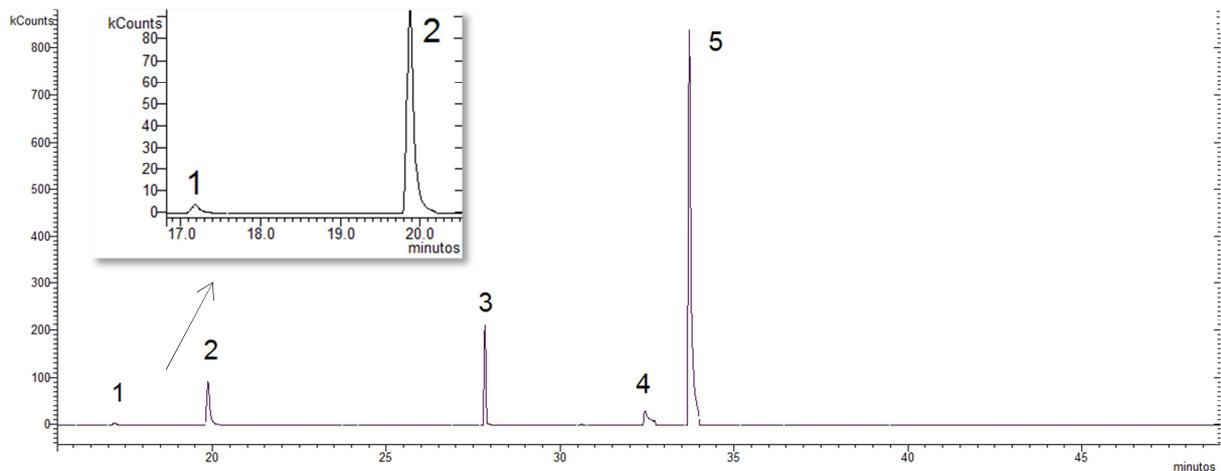


Figura 5. Cromatograma do Mistura 1D de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Forato (17,2 min), 2-Lindano (20,0 min), 3-Folpete (27,9 min), 4-Hexazinona (32,4 min), 5-Fosmet (33,7 min). Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *ion trap*, modo *full scan*.

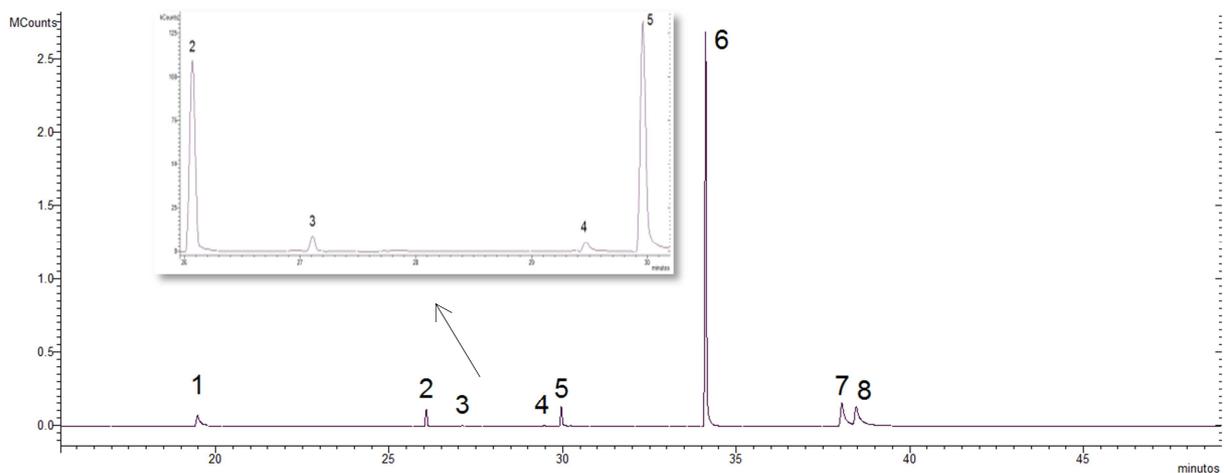


Figura 6. Cromatograma do Mistura 1E de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Pentaclorofenol (19,5 min), 2-Paration Etil (26,1 min), 3-Pendimetalina (27,1 min), 4-Profenofós (29,5 min), 5-Oxifluorfem (30,0 min), 6-Metoxiclor (34,1 min), 7 e 8-Permetrina (38,0 e 38,5 min). Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *ion trap*, modo *full scan*.

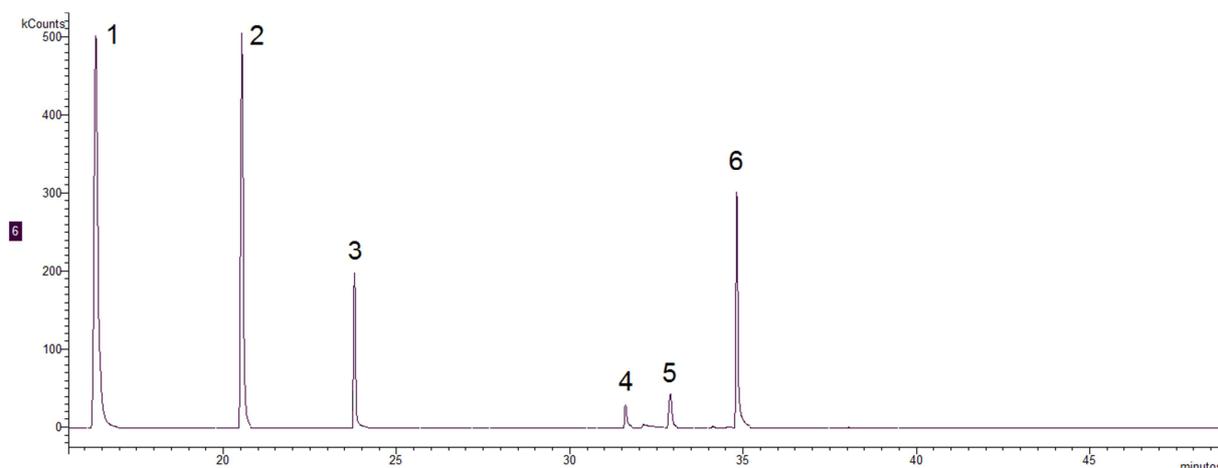


Figura 7. Cromatograma do Mistura 1F de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Trifluralina (16,3 min), 2-Terbufós (20,5 min), 3-Vinclozin (23,8 min), 4-Triazofós (31,6 min), 5-Propargito (32,9 min), 6-Tetradifon (34,8 min). Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*, modo *full scan*.

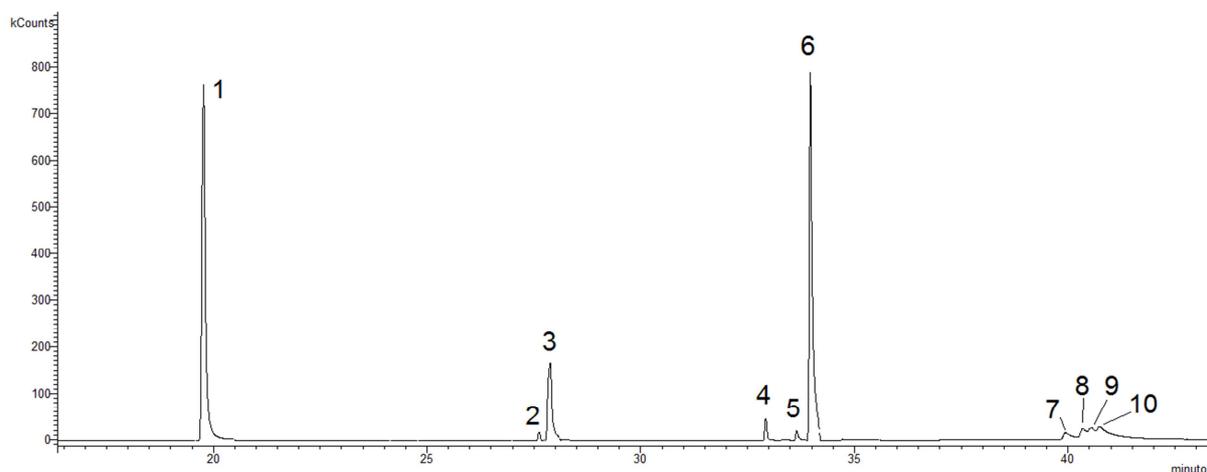


Figura 8. Cromatograma do Mistura 2A de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Clomazona (19,8 min), 2-Captana (27,2 min), 3-Bioaletrina (27,9 min), 4-Captafol (32,9 min), 5-Carbosulfan (33,6 min), 6-Bifentrin (34,0 min), 7-10-Ciflutrina (39,9, 40,3, 40,5 e 40,7 min). Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2I. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*, modo *full scan*.

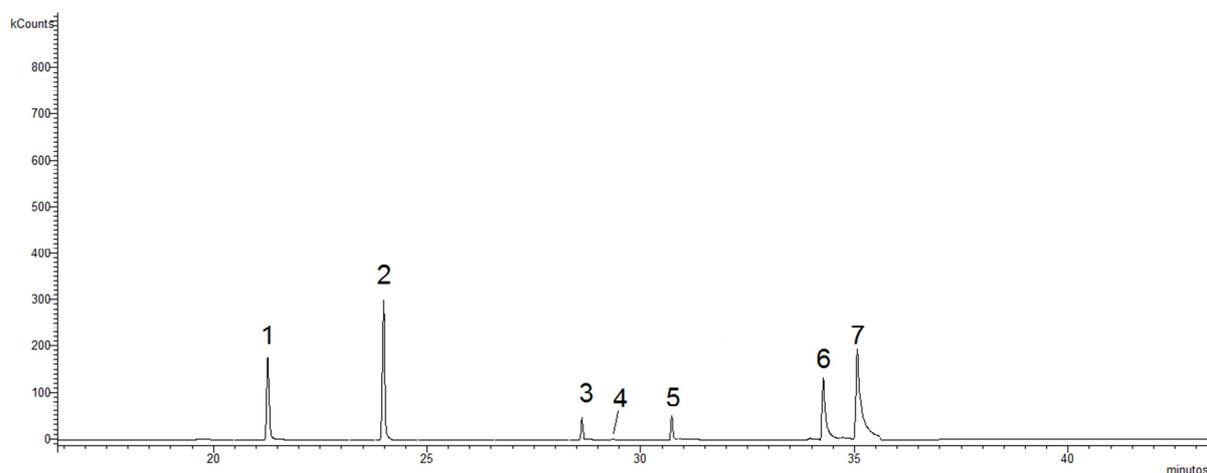


Figura 9. Cromatograma do Mistura 2B de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Diazinon (21,3 min), 2-Heptacloro (24,0 min), 3-Endossulfan alfa (28,6 min), 4-Fludioxonil (29,3 min), 5-Endossulfan beta (30,7 min), 6-Fempropatrim (34,3 min), 7-Fosalone (35,1 min). Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2I. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*, modo *full scan*.

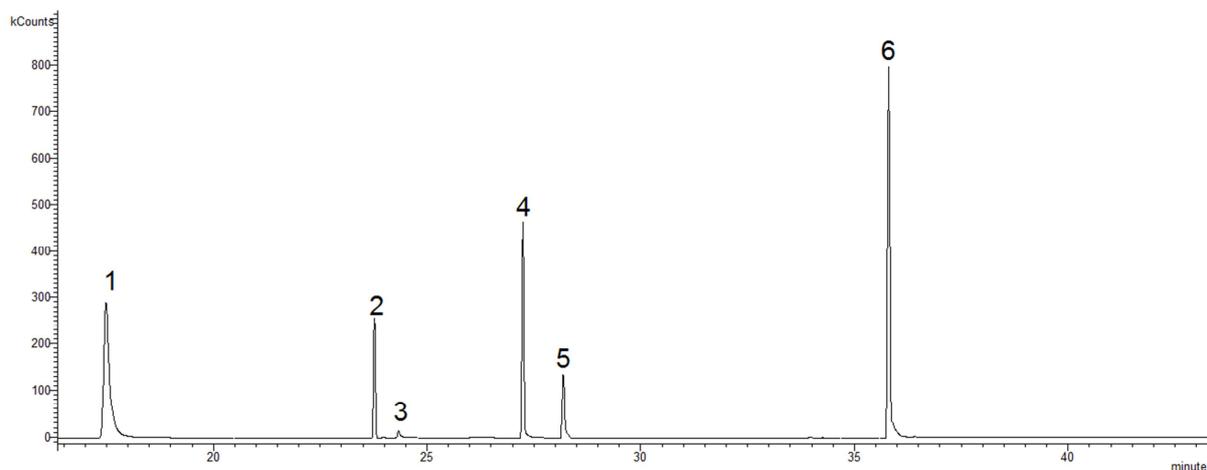


Figura 10. Cromatograma do Mistura 2C de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Hexacorobenzeno (17,5 min), 2-Paration metil (23,8 min), 3-Metalaxil (24,3 min), 4-Heptacloro Epóxido (27,2 min), 5-Metidation (28,9 min), 6-Mirex (35,8 min). Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2I. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*, modo *full scan*.

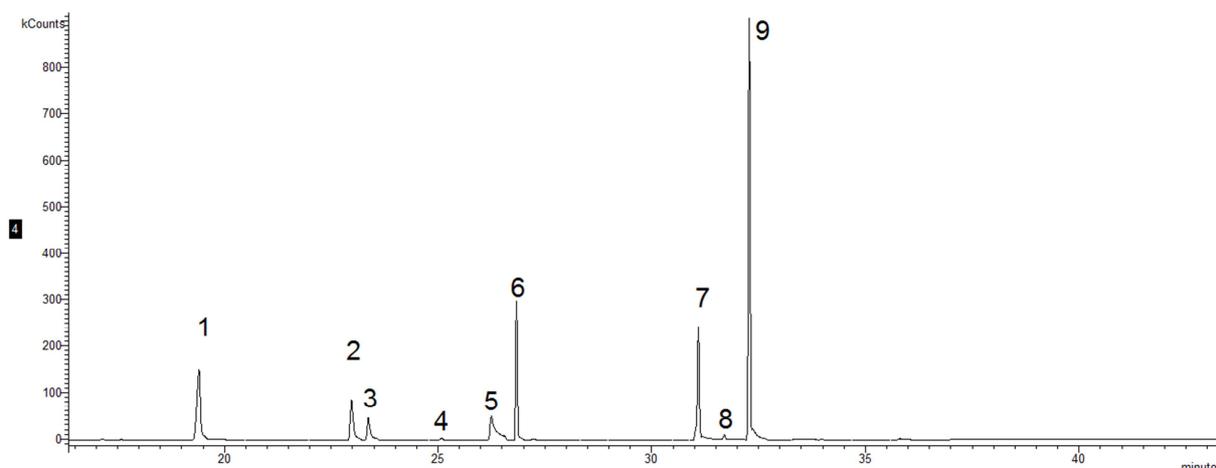


Figura 11. Cromatograma do Mistura 2D de solução padrão ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos analitos: 1-Simazina (19,4 min), 2-Picloran (23,0 min), 3-Propanil (23,4 min), 4-Pirimifós Etil (25,1 min), 5-Triadimenon (26,2 min), 6-Pirimifós Metil (26,8 min), 7 a 9-DDT (31,1, 31,7 e 32,3 min). Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2l. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*, modo *full scan*.

As Tabelas 5 e 6 apresentam um resumo dos dois métodos de monitoramento de íons, com os tempos de retenção de cada analito e seus isômeros, íon precursor, formas de onda, energias de fragmentação aplicadas para dissociação e detectabilidade do método analítico para os agrotóxicos em solução padrão. Devido à baixa detectabilidade, não foi possível estabelecer as condições de fragmentação para triadimenol e vinclozin.

O método analítico apresentou detectabilidade adequada (razão sinal/ruído igual ou superior a 30) em níveis iguais ou inferiores a $1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 69% dos analitos em solução padrão, sendo 32 analitos (46%) no nível de concentração igual a $0,100 \mu\text{g mL}^{-1}$, 7 (10%) no nível de concentração igual a $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 9 (13%) no nível de concentração igual a $1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para os demais agrotóxicos, a detectabilidade do método analítico foi acima de $1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Por se tratar do desenvolvimento de um método analítico capaz de determinar níveis residuais de diversos agrotóxicos em amostras de pólen apícola, somente as substâncias com detectabilidade adequada em concentração igual a $0,100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram selecionadas para as etapas seguintes do trabalho.

Como não há regulamentação para a presença de resíduos de agrotóxicos em pólen apícola, a faixa de concentração estudada foi definida de acordo com o Regulamento 396 de 2005 da União Europeia (UE, 2005), que fixou um LMR (Limite Máximo de Resíduos) de $0,010 \mu\text{g g}^{-1}$ para os produtos que não tenham legislação específica e de acordo com os LMR estabelecidos no Brasil para agrotóxicos em outros alimentos, que na maioria dos casos variam entre $0,005$ e $0,200 \mu\text{g g}^{-1}$ (ANVISA, 2010a).

Tabela 5. Tempos de retenção, íon precursor, formas de onda e energias de fragmentação aplicadas para dissociação de cada substância analisada no Programa de monitoramento de íons I.

Analito	CAS	Classificação	Tempo de retenção (min)	Íon Precursor (m/z)	Forma de onda	Energia colisão (V)	Detectabilidade em solução padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Organoclorados							
Aldrin	309-00-2	Inseticida	25,6	293,1	Ressonante	0,4	0,100
Clorobenzilato	510-15-6	Inseticida	30,8	307,3	Ressonante	0,7	5,000
Clorotalonil	1897-45-6	Fungicida	21	266,4	Ressonante	1,0	0,500
Endrin Aldeído	7421-93-4	Produto de degradação	31,3	345,0	Ressonante	0,3	5,000
Endrin Cetona	53494-70-5	Produto de degradação	33,5	317,2	Ressonante	0,3	0,500
Endrin	72-20-8	Inseticida	30,3	281,2	Ressonante	0,6	0,500
Lindano*	58-89-9	Inseticida e Rodenticida	19,9	218,9	Não Ressonante	70	0,100
Metoxiclor	72-43-5	Inseticida	34,1	227,3	Ressonante	0,4	0,100
Pentaclorofenol	87-86-5	Fungicida	19,5	266,3	Ressonante	0,5	1,000
Tetradifon	116-29-0	Acaricida	34,8	159,0	Não Ressonante	60	0,100
Organofosforados							
Azinfós Etil	2642-71-9	Inseticida	36,6	132,0	Não Ressonante	60	0,500
Carbofenotion	786-19-6	Inseticida	31,9	341,8	Ressonante	0,5	1,000

Clorfenvinfós	470-90-6	Inseticida	27,6	361,1	Ressonante	0,7	10,000
Clorpirifós Metil	5598-13-0	Inseticida	23,4	286,0	Ressonante	0,4	0,100
Clorpirifós	2921-88-2	Inseticida e Nematicida	25,8	286,4	-	-	5,000
Dimetoato	60-51-5	Inseticida	18,6	229,8	Não Ressonante	65	10,000
Dissulfoton	298-04-4	Inseticida e Nematicida	21,6	88,0	Não Ressonante	25	0,100
Etrinfós	38260-54-7	Inseticida	22,2	292,0	Não Ressonante	70	0,100
Fenamifós	22224-92-6	Insecticida e Nematicida	29,2	303,2	Ressonante	0,4	5,000
Forato	298-02-2	Inseticida e Nematicida	17,2	74,9	Ressonante	0,6	10,000
Fosmet	732-11-6	Inseticida	33,7	160,1	Ressonante	0,7	1,000
Paration Etil	56-38-2	Inseticida e Nematicida	26,1	291,0	Não Ressonante	35	0,100
Profenofós	41198-08-7	Insecticida	29,5	375,1	Não Ressonante	70	5,000
Terbufós	13071-79-9	Inseticida e Nematicida	20,5	231,2	Não Ressonante	50	0,100
Triazofós	24017-47-8	Inseticida	31,6	314,2	Não Ressonante	70	5,000

Piretroides							
Cialotrina	91465-08-6	Inseticida	35,6	197,2	Ressonante	0,5	1,000
Cipermetrina	52315-07-8	Inseticida	41,1	181,2	Ressonante	0,5	5,000
Deltametrina	52918-63-5	Inseticida	47,1	253,2	Ressonante	0,6	10,000
Esfenvalerato	66230-04-4	Inseticida	44,9	225,2	Ressonante	0,3	5,000
Permetrina I	52645-53-1	Inseticida	38,1	183,0	Não Ressonante	65	0,100
Permetrina II	52645-53-1	Inseticida	39,0	183,0	Não Ressonante	65	0,100
Carbamato							
Carbaril	63-25-2	Inseticida	24,1	144,0	-	-	5,000
Dinitrolanilidas							
Pendimetalina	40487-42-1	Herbicida	27,1	252,0	Não Ressonante	50	0,100
Trifluralina	1582-09-8	Herbicida	16,3	306,0	Não Ressonante	70	0,100
Outros							
Acetocloro	34256-82-1	Herbicida	23,5	223,1	Não Ressonante	60	0,100
Alacloro	15972-60-8	Herbicida	23,9	188,2	Não Ressonante	45	0,100
Bentazona	25057-89-0	Herbicida	26,6	197,9	Não Ressonante	65	1,000

Fipronil	120068-37-3	Inseticida	27,5	369,6	Ressonante	1	1,000
Fluazifope	79241-46-6	Herbicida	30,6	282,3	Ressonante	0,4	0,100
Folpete	133-07-3	Fungicida	27,9	260,2	Ressonante	0,5	1,000
Hexazinona	51235-04-2	Herbicida	32,4	171,1	Ressonante	0,4	10,000
Oxifluorfem	42874-03-3	Herbicida	29,9	252,0	Ressonante	0,5	0,100
Propargito	2312-35-8	Inseticida	32,9	135,0	Não Ressonante	45	0,100
Triadimenol	55219-65-3	Fungicida	28,2	112,0	-	-	
Vinclozin	50471-44-8	Fungicida	23,8	285,3	-	-	

*- Padrão Interno

CAS: Registro no *Chemical Abstracts Service*

Tabela 6. Tempos de retenção, íon precursor, formas de onda e energias de fragmentação aplicadas para dissociação de cada substância analisada no Programa de monitoramento de íons II.

Analito	CAS	Classificação	Tempo de retenção (min)	Íon Precursor (m/z)	Forma de onda	Energia colisão (V)	Detectabilidade em solução padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Organoclorado							
Endossulfan alfa	959-98-8	Inseticida	28,6	241,2	Ressonante	0,4	0,100
Endossulfan beta	33213-65-9	Inseticida	30,7	267,1	Não Ressonante	70	0,100
Heptacloro Epóxido	1024-57-3	Inseticida	27,2	353,2	Ressonante	0,4	0,100
Hexaclorobenzeno	118-74-1	Inseticida e Fungicida	17,5	286,2	Ressonante	0,6	0,100
Lindano*	58-89-9	Inseticida e Rodenticida	19,9	218,9	Não Ressonante	70	0,100
Mirex/Declorana	2385-85-5	Inseticida	35,8	274,3	Ressonante	0,3	0,100
o'p' DDT	789-02-6	Inseticida	31,1	235,6	Ressonante	0,3	0,100
p'p' DDT	50-29-3	Inseticida	32,3	235,6	Ressonante	0,4	0,500
Organofosforado							
Diazinon	333-41-5	Inseticida	21,2	305,3	Não Ressonante	65	0,100
Fentoato	2597037	Inseticida	29,3	274,0	Não Ressonante	45	0,100
Fosalone	2310-17-0	Inseticida	23,9	182,2	Não Ressonante	60	0,100

Malation	121-75-5	Inseticida	25,6	127,0	Não Ressonante	30	0,100
Metidation	950-37-8	Inseticida	28,2	144,8	Não Ressonante	40	5,000
Paration Metil	298-00-0	Inseticida e Nematicida	23,8	263,2	Não Ressonante	55	0,100
Pirimifós Etil	23505-41-1	Inseticida	26,8	318,3	Ressonante	0,4	0,100
Pirimifós metil	29232-93-7	Inseticida	25,1	217,1	Ressonante	1	0,500
Piretroides							
Bifentrin	82657-04-3	Inseticida	33,9	181,1	Não Ressonante	60	0,100
Bioaletrina	584-79-2	Inseticida	27,9	123,1	Não Ressonante	40	0,100
Ciflutrina	68359-37-5	Inseticida	39,9	206,3	Ressonante	0,8	5,000
Fempropatrim	39515-41-8	Inseticida	34,2	181,0	Não Ressonante	65	0,100
Carbamato							
Carbossulfan	55285-14-8	Inseticida	33,6	160,2	Não Ressonante	55	10,000
Outros							
Captafol	2425-06-1	Fungicida	32,9	312,2	Ressonante	0,4	10,000
Captana	133-06-2	Fungicida	27,6	264,0	Não Ressonante	60	5,000
Clomazona	81777-89-1	Herbicida	17,8	204,0	Ressonante	0,7	0,500

Fludioxonil	131341-86-1	Fungicida	35,1	248,2	Não Ressonante	40	5,000
Metalaxil	57837-19-1	Fungicida	24,4	206,2	Não Ressonante	60	0,100
Picloram	1918021	Herbicida	22,9	241,3	Ressonante	0,5	1,000
Propanil	709-98-8	Herbicida	23,4	217,1	Ressonante	0,2	10,000
Simazina	122-34-9	Herbicida	19,4	202,2	Ressonante	0,6	0,500
Triadimefon	43121-43-3	Fungicida	26,2	208,2	Ressonante	0,7	1,000

* Padrão Interno

CAS: Registro no *Chemical Abstracts Service*

Nas Tabelas 7 e 8 estão detalhados os 32 analitos selecionados com detectabilidade adequada, bem como os íons de quantificação e confirmação de identidade definidos para cada um deles nos métodos de monitoramento I e II e para o padrão interno, lindano, incluído nos dois métodos de monitoramento.

Tabela 7. Programa de monitoramento de íons I. Íons monitorados para quantificação e confirmação de identidade de cada substância.

Íons monitorados (m/z)		
Analito	Quantificação	Confirmação de Identidade
Aldrin	257,0+291,0	291,0, 257,1, 293,0
Bifentrin	180,9	181,0, 165,1, 166,1
Bioaletrina	123,0+81,0	81,0, 123,0, 95,0
Clorpirifós Metil	271,0+285,9	270,8, 207,9, 287,0
Dissulfoton	59,9	59,9, 88,9, 87,9
Endossulfan alfa	205,9	239,0, 205,9, 242,0
Endossulfan beta	268,1	268,1, 267,0, 264,9
Fempropatrim	181,2	181,0, 180,1, 182,1
Lindano*	41,9+145,9+185,9	41,9, 148,0, 145,9
Metalaxil	206,1+132,0+162,0	206,0, 162,1, 132,0
Mirex	271,9	272,0, 273,8, 238,9
o'p' DDT	165,0+200,0+235,0	200,0, 235,0, 236,1
Oxifluorfem	224,0+252,2	249,1, 224,0, 196,0
Paration Etil	291,0+289,2	290,8, 263,0, 141,8
Paration Metil	263,0	261,1, 263,2, 148,1
Pendimetalina	252,0	252,1, 208,0, 191,0
Propargito	135,0	135,0, 107,0, 136,0
Tetradifon	131,0+158,9	131,0, 158,9, 132,0
Trifluralina	306,1+264,1	306,1, 264,1, 307,1

*Padrão Interno
m/z: razão massa/carga

Tabela 8. Programa de monitoramento de íons II. Íons monitorados para quantificação e confirmação de identidade de cada substância.

Íons monitorados (m/z)		
Analito	Quantificação	Confirmação de Identidade
Acetocloro	145,9+223,1	223,0, 224,0, 146,0
Alacloro	188,0	188,0, 160,0, 187,2
Diazinon	304,0	304,0, 179,1, 305,0
Etrinfós	292,0+181,0	292,0, 181,0, 291,0
Fentoato	273,8	273,8, 245,8, 272,4
Fluazifope	283,1+254,1	283,1, 282,2, 238,0
Fosalone	182,2	181,9, 151,9, 138,0
Heptacloro Epóxido	316,8+350,8	263,0, 316,8, 354,0
Hexaclorobenzeno	285,8	284,0, 288,0, 257,0
Lindano*	41,9+145,9+185,9	41,9, 148,0, 145,9
Malation	125,0	125,0, 126,8, 125,9
Metoxiclor	212,2	212,1, 196,0, 228,2
Permetrina **	183,0	183,0, 168,0, 165,1
Pirimifós Etil	319,0	182,0, 319,0, 166,0
Terbufós	230,8	230,8, 202,8, 174,8

*Padrão Interno

** Soma dos isômeros

m/z: razão massa/carga

III.3.1.3. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA POR QUECHERS

Inicialmente, os testes com amostras de pólen apícola foram realizados utilizando como referência o método QuEChERS (Procedimento I) (Item III.2.2.3.1.1), previamente estabelecido e validado no laboratório de resíduos e contaminantes da Embrapa Meio Ambiente para o preparo de diversas outras matrizes para determinação de agrotóxicos.

Utilizando este procedimento para o preparo de amostras, foram obtidos resultados de eficiência de extração entre 60 e 113% com 1 g de amostra e entre

53 e 116% com 2 g de amostra branco fortificada ($0,200 \mu\text{g g}^{-1}$). Para a extração de 5 g de amostra foram obtidos valores entre 32 e 74% de eficiência de extração.

Além dos resultados de eficiência de extração, os cromatogramas obtidos com a extração de 5 g de amostra apresentaram muitos interferentes no tempo de retenção dos analitos. Embora os resultados de eficiência de extração para 1 ou 2 g de amostra tenham sido semelhantes, o uso de 2 g de pólen apícola para extração permitiu o aumento da detectabilidade do método analítico, por fornecer extratos pré concentrados devido ao uso de 1 mL de ACN para ressuspensão.

Na otimização dos parâmetros volume de ACN, tempo de ultrassom e massa de PSA, foi realizada a análise estatística dos resultados de eficiência de extração e análise empírica, observando limpeza dos cromatogramas (picos interferentes) obtidos e sinal analítico.

Para as análises estatísticas, utilizando-se o software Design Expert 6.0.4 (Minneapolis, USA), inicialmente foram calculados os modelos matemáticos para cada um dos compostos em estudo. O grau de ajuste de cada modelo às respostas observadas foi determinado pela análise do perfil de distribuição dos resíduos e pelo emprego do método de análise da variância (ANOVA) da regressão. Esses parâmetros foram avaliados com um nível de significância de 0,05.

Apenas 8 modelos (Bioaletrina, Dissulfoton, Fosalone, Metalaxil, o'p'DDT, Paration Etil, Pendimetalina e Propargito) apresentaram regressão significativa. Dentre estes, dois modelos apresentaram falta de ajuste (Bioaletrina e Dissulfoton). Os demais modelos não apresentaram regressão significativa e, por isso não poderiam ser empregados para realizar previsões.

Desta forma, com o objetivo de se estabelecer condições de extração ideais comuns para todos os analitos, foi empregado o método de otimização simultânea proposto por Derringer e Suich (1980), que se baseia na definição de uma função de desejabilidade para cada resposta, com valores restritos a um intervalo aceitável definido.

O algoritmo buscou maximizar o valor da eficiência de extração dentro dos limites empíricos, que são o menor e o maior valor obtidos experimentalmente

para cada analito. A maior desejabilidade foi de 0,80, para uma condição que empregaria -1,68 para a variável A, 0,50 para a variável B e +1,68 para a variável C. Nesta condição experimental, as eficiências teóricas que seriam obtidas para cada um dos analitos variaram entre 66 % para metoxiclor e 306% para o dissulfoton, com uma média de 142%.

Foi realizada, ainda, uma otimização sugerindo que o algoritmo maximizasse as eficiências de extração na faixa entre 80 e 120%. Para estas condições, nenhuma solução foi encontrada.

Realizando o mesmo procedimento de otimização, porém, entre 70 e 120%, a solução com melhor desejabilidade (0,69) utilizaria a variável A no nível -1,68, a variável B em -0,32 e a variável C em +1,68. Os resultados teóricos para esta otimização variaram entre 71% para metoxiclor e 271% para o dissulfoton, com uma média de 134%.

Em todas as otimizações, os modelos utilizados não foram significativos, o que poderia levar a uma diferença significativa entre os valores teóricos e os que seriam obtidos experimentalmente.

Diante destes resultados, as melhores condições de extração foram definidas somente com base na análise empírica realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos nos ensaios no ponto central e nos pontos axiais do planejamento experimental, verificando os melhores resultados de limpeza do cromatograma e resposta analítica. Cada variável foi avaliada individualmente, fixando-se as demais no ponto central.

Nos estudos para avaliação da melhor quantidade do sorvente PSA, observou-se uma relação direta entre a massa de PSA utilizada e a seletividade do método analítico, especialmente no fim dos cromatogramas.

Em relação ao volume de ACN, o menor volume estudado (6,6 mL) não foi suficiente para adequada extração dos analitos, enquanto o uso de maior volume de ACN (23,4 mL), embora tenha aumentado a eficiência de extração dos analitos, favoreceu a extração de inteferentes da matriz, prejudicando a seletividade do método analítico.

Do mesmo modo, quanto menor o tempo de ultrassom, menor foi a eficiência de extração dos analitos, e quanto maior o tempo, mais interferentes foram observados no cromatograma. Nos tempos de retenção dos analitos metalaxil, metoxiclor, mirex, propargito e tetradifon foram observadas a presença de interferentes da matriz que comprometeriam a determinação e quantificação destes compostos nas amostras de pólen apícola nos níveis de fortificação estudados.

O uso do Procedimento II de extração (Item III.2.2.3.1.1), em que foram utilizadas as condições definidas na etapa de otimização - 15 mL de ACN e 15 min no banho de ultrassom para extração e adição de 95 mg de PSA para a etapa de limpeza - forneceu cromatogramas limpos (Figuras 12 a 15) com valores de eficiência de extração entre 52% e 125% para os 26 analitos para os quais o método analítico apresentou detectabilidade e seletividade, conforme detalhado nas Tabela 9.

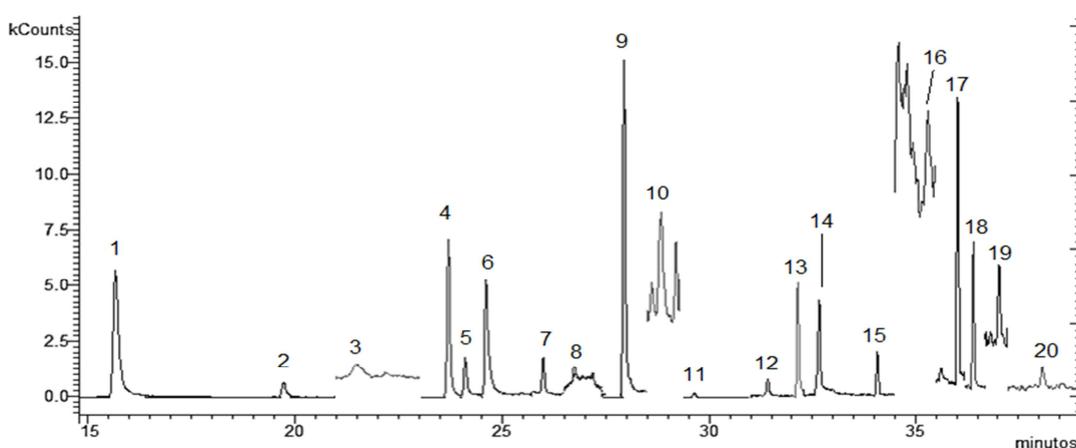


Figura 12. Cromatograma de amostra branco fortificada com a mistura I dos analitos ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o padrão interno ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$). 1-Trifluralina (15,7 min), 2-Lindano (20,0 min), 3-Dissulfoton (21,5 min), 4-Clorpirifós Metil (23,7 min), 5-Paration Metil (24,1 min), 6-Metalaxil (24,6 min), 7-Aldrin (25,9 min), 8-Paration Etil (26,7 min), 9-Pendimetalina (27,9 min), 10-Bioaletrina (28,6 min), 11-Endossulfan alfa (29,6 min), 12-Oxifluorfem (31,4 min), 13-Endossulfan beta (32,1 min), 14 e 15- DDT (32,7 e 34,1 min), 16-Propargito (35,3 min), 17-Bifentrin (36,0 min), 18-Fempropatrim (36,4 min), 19-Tetradifom (37,0 min), 20-Mirex (38,1 min). Método de preparo de amostras: QuEChERS. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*. Programa de monitoramento de íons I.

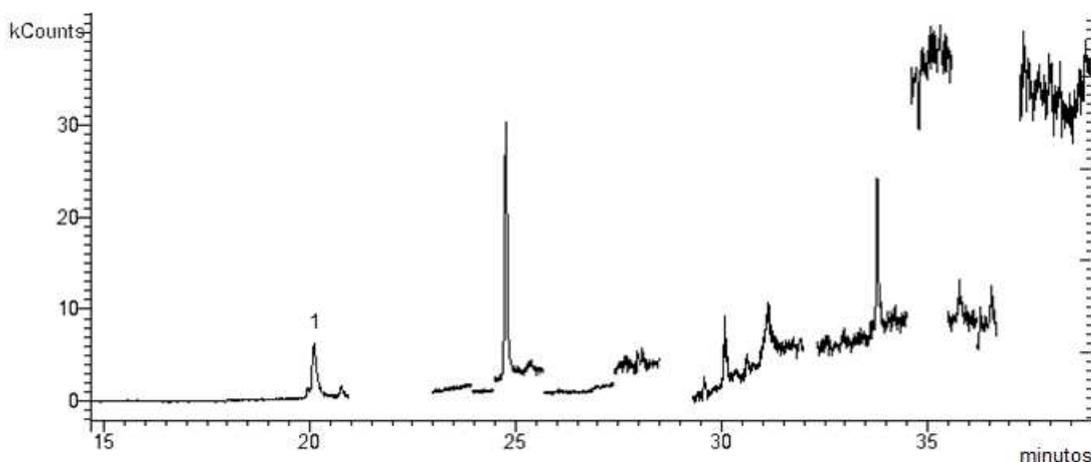


Figura 13. Cromatograma de amostra branco de pólen apícola fortificada com o padrão interno ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$). 1-Lindano (20,0 min). Método de preparo de amostras: QuEChERS. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*. Programa de monitoramento de íons I.

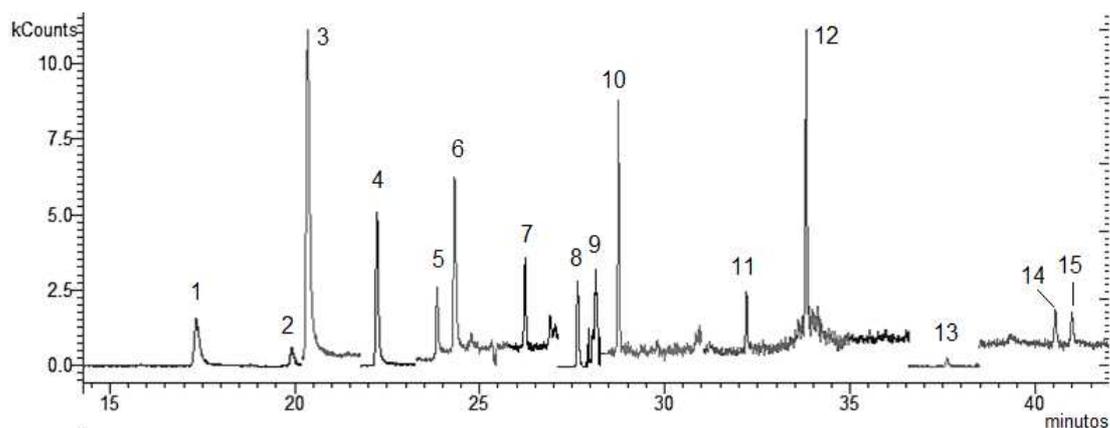


Figura 14. Cromatograma de amostra branco fortificada com a mistura II dos analitos ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o padrão interno ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$). 1-Hexaclorobenzeno (17,0 min), 2-Lindano (19,7 min), 3-Terbufós (20,2 min), 4-Etrinifós (22,1 min), 5-Acetocloro (23,8 min), 6-Alacloro (24,2 min), 7-Malation (26,1 min), 8-Pirimifós Etil (27,6 min), 9-Heptacloro Epóxido (28,0 min), 10-Fentoato (28,6 min), 11-Fluazifope (32,1 min), 12-Metoxiclor (36,3 min), 13-Fosalone (37,4 min), 14 e 15-Permetrina (40,3 e 40,8 min). Método de preparo de amostras: QuEChERS. Coluna: Rxi® 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*. Programa de monitoramento de íons II.

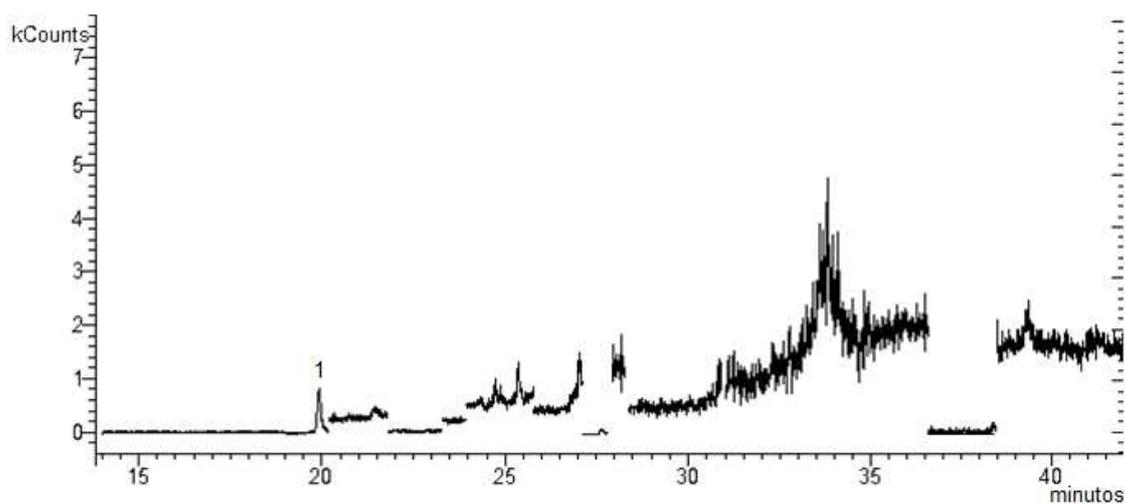


Figura 15. Cromatograma de amostra branco de pólen apícola fortificada com o padrão interno ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$). 1-Lindano (20,0 min). Método de preparo de amostras: QuEChERS. Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*. Programa de monitoramento de íons II.

Tabela 9. Valores de eficiência de extração, obtidos para amostras fortificadas com os analitos ($0,200 \mu\text{g g}^{-1}$), nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS.

Agrotóxico	Eficiência de extração (% de recuperação)
Acetocloro	67
Alacloro	68
Aldrin	92
Bifentrin	100
Bioaletrina	78
Clorpirifós Metil	92
Dissulfoton	111
Endossulfan alfa	79
Endossulfan beta	82
Etrinifós	94
Fempropatrim	72
Fentoato	82
Fluazifope	97
Fosalone	66
Heptacloro Epóxido	125
Hexaclorobenzeno	89
Malation	87
o'p' DDT	100
Oxifluorfem	71
Paration Etil	65
Paration Metil	53
Pendimetalina	86
Permetrina*	99
Pirimifós Etil	111
Propargito	20
Terbufós	104
Trifluralina	89

* Soma dos isômeros

III.3.1.4. OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA POR PARTIÇÃO COM ACN

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de otimização do método QuEChERS, foram utilizados 2 g de amostras, 15 mL de ACN e 15 min no banho de ultrassom para extração por partição com ACN, conforme detalhado no Item III.2.2.3.1.2 (PROCEDIMENTO III).

Os cromatogramas característicos de amostras branco de pólen fortificadas com as misturas I e II dos agrotóxicos são apresentados nas Figuras 16 e 17.

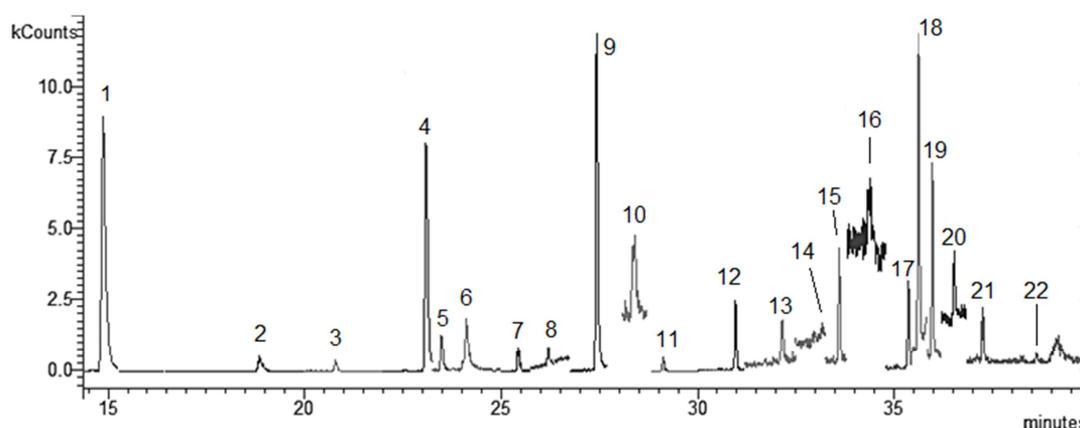


Figura 16. Cromatograma de amostra branco fortificada com a mistura I dos analitos ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o padrão interno ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$). 1-Trifluralina (14,9 min), 2-Lindano (18,9 min), 3-Dissulfoton (20,8 min), 4-Clorpirifós Metil (23,1 min), 5-Paration Metil (23,5 min), 6-Metalaxil (24,1 min), 7-Aldrin (25,4 min), 8-Paration Etil (26,2 min), 9-Pendimetalina (27,4 min), 10-Bioaletrina (28,4 min), 11-Endossulfan alfa (29,1 min), 12-Oxifluorfem (31,0 min), 13-Endossulfan beta (31,7 min), 14 e 15-DDT (32,1 e 33,6 min), 16-Propargito (34,4 min), 17-Desconhecido, 18-Bifentrin (35,6 min), 19-Fempropatrim (35,9 min), 20-Tetradifom (36,5 min), 21-Desconhecido, 22-Mirex (38,6 min). Método de preparo de amostras: Partição com ACN. Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*. Programa de monitoramento de íons I.

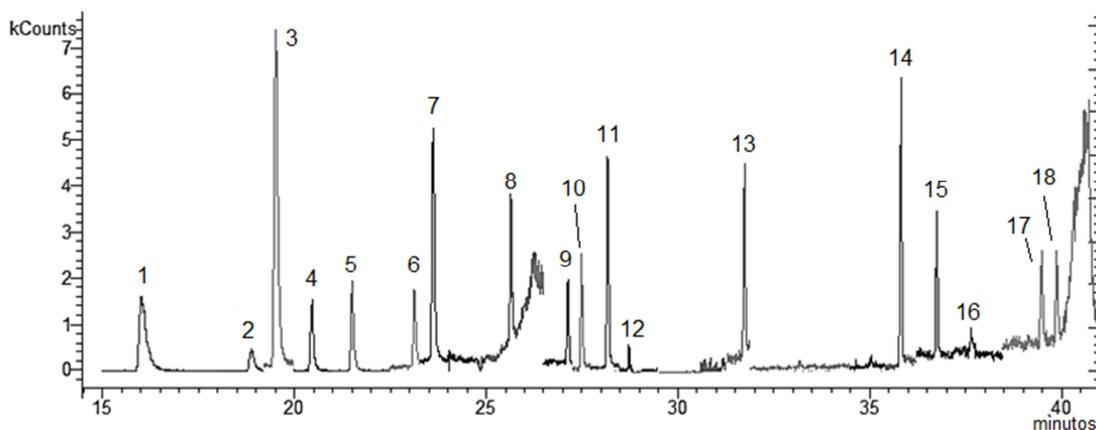


Figura 17. Cromatograma de amostra branco fortificada com a mistura II dos analitos ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o padrão interno ($0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$). 1-Hexaclorobenzeno (16,0 min), 2-Lindano (18,9 min), 3-Terbufós (19,5 min), 4- Diazinon (20,5 min), 5-Etrinifós (21,5 min), 6-Acetocloro (23,1 min), 7-Alacloro (23,6 min), 8-Malation (25,6 min), 9-Pirimifós Etil (27,1 min), 10-Heptacloro Epóxido (27,5 min), 11-Fentoato (28,2 min), 12-Metidation (28,7 min), 13-Fluazifope (31,7 min), 14-Metoxiclor (35,8 min), 15-Fosalone (36,8 min), 16 e 17-Permetrina (39,5 e 39,9 min). Método de preparo de amostras: Partição com ACN. Coluna: Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 μm). Programação de temperatura descrita na Tabela 2. Volume de injeção: 1 μL . Analisador de massas *Ion trap*. Programa de monitoramento de íons II.

Assim como ocorreu para o método de extração por QuEChERS, nos tempos de retenção dos analitos diazinon, metalaxil, metoxiclor, mirex, propargito e tetradifon foi observada a presença de interferentes da matriz que interferiram na determinação e quantificação destes compostos em amostras de pólen apícola nos níveis de fortificação estudados.

O uso do método de extração por partição forneceu resultados de eficiência de extração entre 22% e 132% para os 26 analitos para os quais o método apresentou detectabilidade e seletividade (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de eficiência de extração, obtidos para amostras fortificadas com os analitos ($0,200 \mu\text{g g}^{-1}$), nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por partição com ACN.

Agrotóxico	Eficiência de extração (% de recuperação)
Acetocloro	80
Alacloro	94
Aldrin	57
Bifentrin	16
Bioaletrina	39
Clorpirifós Metil	27
Dissulfoton	71
Endossulfan alfa	28
Endossulfan beta	47
Etrinfós	93
Fempropatrim	55
Fentoato	78
Fluazifope	74
Fosalone	67
Heptacloro Epóxido	115
Hexaclorobenzeno	132
Malation	123
o'p' DDT	22
Oxifluorfem	86
Paration Etil	63
Paration Metil	42
Pendimetalina	40
Permetrina*	46
Pirimifós Etil	88
Propargito	-
Terbufós	71
Trifluralina	39

* Soma dos isômeros

A Figura 20 apresenta uma comparação entre os resultados de eficiência de extração, obtidos nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por partição com ACN e por QuEChERS.

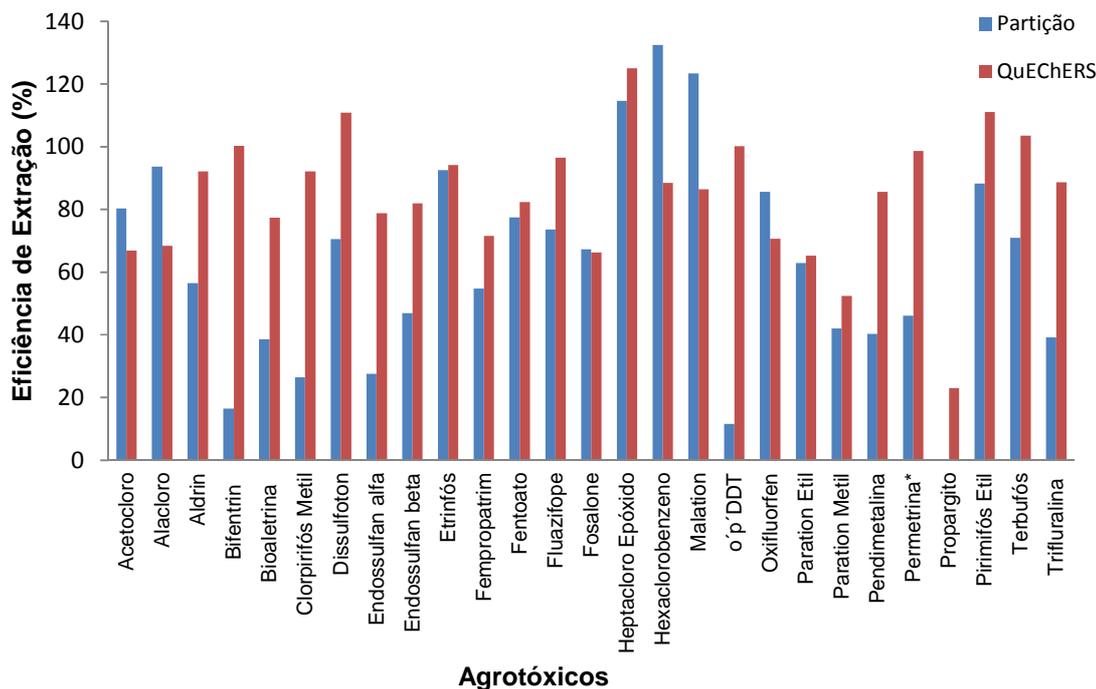


Figura 18. Valores de eficiência de extração, obtidos para amostras fortificadas com os analitos ($0,200 \mu\text{g g}^{-1}$), nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS e por partição com ACN. *Soma dos isômeros.

Pelos resultados obtidos verificou-se que a eficiência de extração, usando o método QuEChERS no preparo de amostras, levou a resultados de eficiência de extração iguais ou superiores para 21 dos 27 agrotóxicos avaliados, quando comparado com o método por partição com ACN. Um dos agrotóxicos, o propargito, apresentou baixa eficiência de extração pelo método QuEChERS e praticamente não foi detectado quando a partição do pólen com ACN foi realizada. Desta forma, esse agrotóxico foi eliminado dos estudos.

III.3.1.5. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA

Após os testes preliminares de detectabilidade, bem como de desenvolvimento dos métodos analíticos e de preparo de amostras, dos 69 analitos inicialmente avaliados, 26 deles (acetocloro, alacloro, aldrin, bifentrin,

bioaletrina, clorpirifós metil, dissulfoton, endossulfan alfa, endossulfan beta, etrinfós, fempropatrim, fentoato, fluazifope, fosalone, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, malation, o'p' DDT, oxifluorfem, paration etil, paration metil, pendimetalina, permetrina, pirimifós etil, terbufós e trifluralina) apresentaram resultados adequados quando analisados em amostras fortificadas de pólen apícola. Portanto, os métodos foram validados para esses agrotóxicos, todos incluídos no programa de monitoramento de resíduos em alimentos (PARA) da ANVISA e/ou no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCR) do Ministério da Agricultura, conforme detalhado no Capítulo IV (Item IV.4.1).

A seletividade do método analítico foi avaliada através da análise de amostras branco de pólen apícola, verificando a ausência de compostos interferentes no tempo de retenção dos analitos e do padrão interno. Embora ambos os métodos tenham apresentado seletividade, o preparo de amostras por QuEChERS forneceu cromatogramas mais limpos, com menor presença de compostos interferentes nos cromatogramas e menor intensidade no sinal da linha de base, em relação ao método por partição com ACN.

A interferência de compostos presentes na amostra pode ser difícil de ser eliminada, causando o chamado efeito matriz. Estes efeitos podem ser observados através de um aumento ou diminuição da resposta do detector ao analito na presença da matriz.

Para avaliação do efeito matriz (descrito no item III.2.2.4), foi realizada a comparação dos resultados obtidos em solução padrão e no extrato fortificado em vários níveis de concentração, através da quantificação dos analitos na matriz utilizando curvas analíticas preparadas em solução padrão de trabalho. Os resultados de razão matriz/solvente foram expressos em porcentagem de efeito matriz e estão apresentados na Tabela 11.

Devido aos altos valores de efeito matriz observados principalmente nos níveis inferiores de concentração, uma faixa mais ampla de estudo foi definida, com níveis de concentração maiores para o método de preparo de amostras com

ACN. Desta forma, os métodos QuEChERS e partição com ACN foram validados na faixa de 0,010 a 0,300 e 0,010 a 0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

No gráfico comparativo dos valores obtidos pela extração por QuEChERS e por partição com ACN (Figura 21) é possível visualizar a evidente diminuição do efeito matriz utilizando o método QuEChERS para o preparo de amostras, principalmente nos níveis inferiores de concentrações.

Embora com resultados muito diferentes, em ambos os métodos analíticos foram observados os efeitos da matriz. Como esses efeitos geralmente são variáveis e imprevisíveis e podem variar a cada amostra, a calibração utilizando a própria matriz é mais confiável, principalmente quando se trata de técnicas particularmente suscetíveis, como é o caso da espectrometria de massas (SANCO, 2009). Sendo assim, ambos os métodos estabelecidos para a análise de amostras de pólen apícola foram validados utilizando-se curvas analíticas preparadas em amostras branco de pólen fortificadas.

A análise dos espectros de massas dos picos nos tempos de retenção dos analitos nos cromatogramas obtidos com o método de preparo de amostras por partição indicou que o efeito matriz está relacionado à presença de interferentes com sinal analítico muito superior aos analitos e não a um incremento na ionização. A acentuada diminuição nos valores de efeito matriz quando se utilizou o método QuEChERS confirmou esses resultados, demonstrando inclusive que houve supressão iônica para alguns analitos, como bifentrin, clorpirifós metil, endossulfan beta, fempropatrim, fluazifope, fosalone e trifluralina, em diferentes níveis de concentração.

Tabela 11. . Valores de efeito matriz, obtidos para cada nível de fortificação nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS e por partição com ACN.

Analito	Valores de efeito matriz (%) obtidos para cada nível de fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)													
	QuEChERS						Partição							
	0,010	0,025	0,050	0,100	0,200	0,300	0,010	0,025	0,050	0,100	0,200	0,300	0,500	0,700
Acetocloro	111	97	128	93	108	93		322	437	374	261	180	187	114
Alacloro	103	93	145	107	107	100	271	391	362	250	204	148	138	104
Aldrin	294	79	108	81	81	81			95	74	74	64	59	
Bifentrin	169	48	70	51	44	44		3295	2153	1098	830	596	450	308
Bioaletrina	122	95	127	96	93	92			1201	688	391	265	190	149
Clorpirifós Metil	152	76	66	89	55	55		276	268	224	176	148	115	97
Dissulfoton	129	107	72	110	75	82			88	75	66	62	54	
Endossulfan alfa			83	104	118	138			50	43	42	42	43	
Endossulfan beta		89	56	81	73	72			2020	1491	1252	940	783	829
Etrinifós	100	107	134	105	114	112		424	459	344	270	272	203	145
Fempropatrim	58	60	107	64	65	68			1001	425	228	168	143	128
Fentoato			204	129	124	116			790	528	387	255	282	217
Fluazifope	135	31	92	63	85	72				4184	2287	2120	1486	
Fosalone	18	19	46	51	61	55				2522	1167	896	631	
Heptacloro	95	193	157	82	82	87			120	99	102	79	98	80

Epóxido														
Hexaclorobenzeno		83	131	70	69	61	44	79	58	48	49	42	53	44
Malation	85	86	122	93	95	94					3399	2077	1532	849
o'p'DDT		73	135	94	103	108			304	252	230	195		
Oxifluorfem	122	123	99	76	66	58			265	134	100	66	54	
Paration Etil	274	139	89	79	95	96			190	139	110	83	71	
Paration Metil	117	39	147	67	87	83			457	382	263	187	170	
Pendimetalina	301	134	102	78	88	79		322	194	144	102	86	77	
Permetrina*		89	91	56	54	54				2692	1108	866	571	
Pirimifós Etil	254	152	188	116	115	113		289	287	229	158	109	110	87
Terbufós	90	101	130	99	95	87	194	232	254	233	176	131	136	110
Trifluralina	100	77	80	66	84	78	89	88	83	70	67	62	56	51

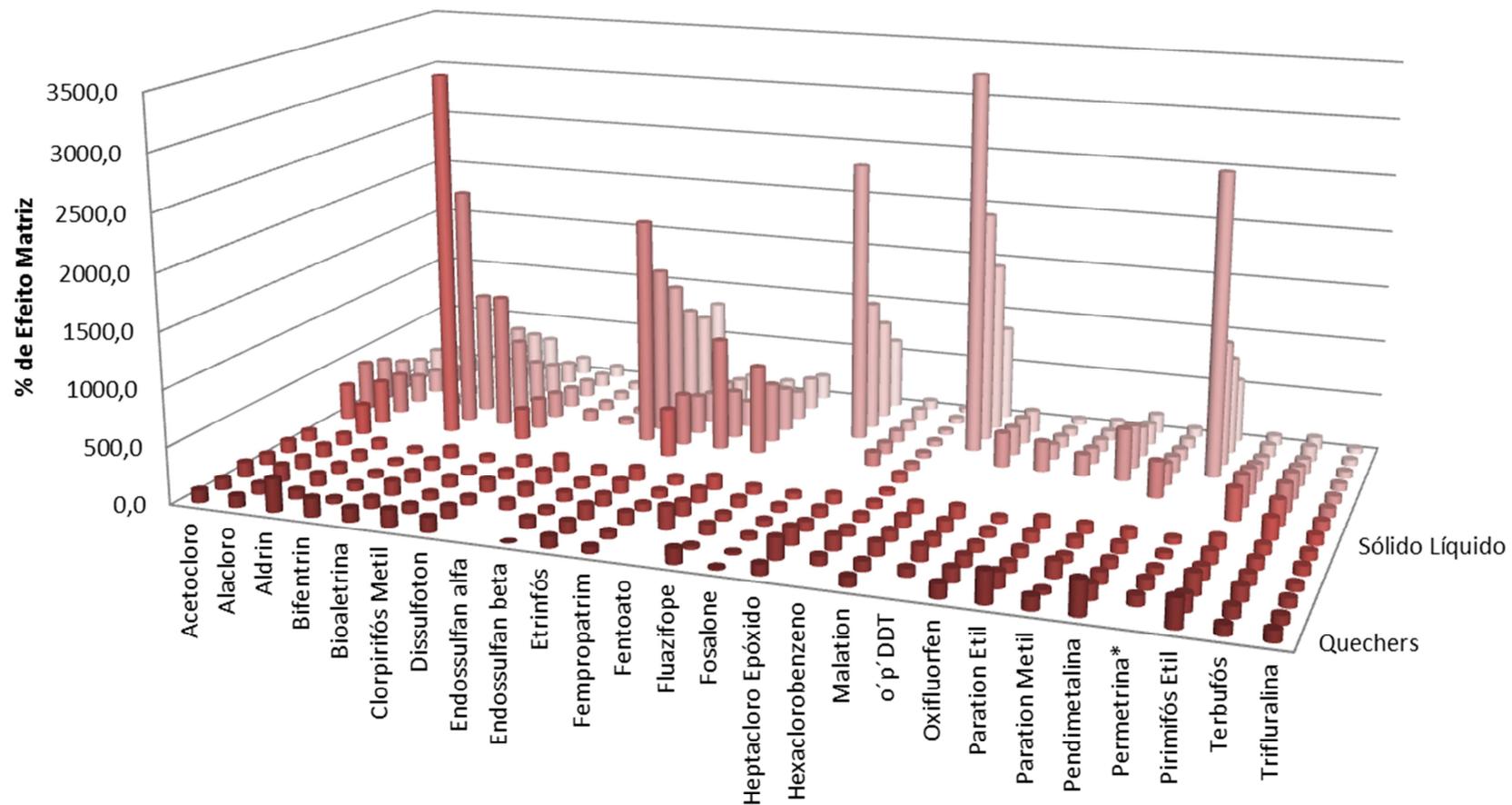


Figura 19. Valores de efeito matriz, obtidos para cada nível de fortificação nos testes de otimização do preparo de amostras de pólen apícola por QuEChERS e por partição com ACN. * soma dos isômeros

Em relação à linearidade, todas as curvas preparadas na amostra branco de pólen fortificada apresentaram linearidade na faixa de trabalho, com coeficiente de correlação (r) superior a 0,95, com exceção das curvas analíticas para os agrotóxicos heptacloro epóxido, fosalone e dissulfoton no método de extração por QuEChERS e fentoato, fluazifope, oxifluorfem e paration etil para o método de partição com ACN, que apresentaram coeficiente de correlação entre 0,90 e 0,95. Em toda a faixa de estudo, não foi observada linearidade para o endossulfan beta, fosalone, hexaclorobenzeno e permetrina para o método de partição com ACN.

As curvas analíticas foram estatisticamente avaliadas quanto à possível presença de valores extremos (*outliers*) (teste de significância dos resíduos e teste de *Jackknife*) e homocedasticidade (teste de Levene). Todas as curvas analíticas obtidas se mostraram homocedásticas e, portanto, para estabelecer a equação da reta foi empregado o método dos mínimos quadrados ordinários. Os gráficos de resíduos e curvas analíticas, preparadas na amostra branco fortificada com os analitos, obtidas utilizando o preparo de amostras por QuEChERS e por partição com ACN são apresentados nos Anexos I e II, respectivamente.

A análise do gráfico dos resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios da linearidade, presença de amostras atípicas, heterocedasticidade e dependência entre os erros. Uma curva bem ajustada apresenta erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (homocedasticidade), e ausência de pontos atípicos ou *outliers*.

Analisando os resultados da Tabela 12, pode-se observar que o método por QuEChERS apresentou maior detectabilidade e linearidade em relação ao método por partição, com resultados mais altos de coeficiente de correlação e ampliação da faixa linear de resposta nos níveis inferiores para a maioria dos analitos, inclusive para o hexaclorobenzeno, permetrina, endossulfan beta, o p´DDT e fosalone, para os quais não foi possível definir a faixa linear através do método de extração por partição.

Tabela 12. Valores de faixa linear ($\mu\text{g g}^{-1}$) e linearidade (r) dos métodos analíticos, obtidos para cada agrotóxico, utilizando os dois métodos de preparo de amostras por QuEChERS e por partição com ACN.

Analito	QuEChERS		Partição com ACN	
	Faixa Linear $\mu\text{g g}^{-1}$	Linearidade (r)	Faixa Linear $\mu\text{g g}^{-1}$	Linearidade (r)
Acetocloro	0,050-0,300	0,960	0,050-0,700	0,985
Alacloro	0,050-0,300	0,970	0,050-0,700	0,981
Aldrin	0,025-0,300	0,998	0,100-0,700	0,979
Bifentrin	0,025-0,300	0,990	0,100-0,700	0,980
Bioaletrina	0,050-0,300	0,950	0,100-0,700	0,982
Clorpirifós Metil	0,025-0,200	0,980	0,050-0,700	0,953
Dissulfoton	0,010-0,300	0,940	0,200-0,700	0,953
Endossulfan alfa	0,010-0,300	0,980	0,100-0,700	0,986
Endossulfan beta	0,010-0,300	0,970	-	-
Etrinifós	0,025-0,300	0,980	0,050-0,700	0,985
Fempropatrim	0,025-0,300	0,960	0,200-0,700	0,953
Fentoato	0,050-0,300	0,960	0,100-0,700	0,941
Fluazifope	0,025-0,300	0,960	0,200-0,700	0,917
Fosalone	0,100-0,300	0,920	-	-
Heptacloro Epóxido	0,050-0,300	0,910	0,050-0,700	0,970
Hexaclorobenzeno	0,050-0,300	0,960	-	-
Malation	0,025-0,300	0,970	0,050-0,700	0,965
o'p'DDT	0,025-0,300	0,990	-	-
Oxifluorfem	0,010-0,1300	0,970	0,100-0,700	0,940
Paration Etil	0,050-0,300	0,960	0,200-0,700	0,930
Paration Metil	0,010-0,200	0,980	0,100-0,700	0,994
Pendimetalina	0,025-0,300	0,990	0,025-0,700	0,987
Permetrina	0,025-0,300	0,950	-	-
Pirimifós Etil	0,050-0,300	0,970	0,050-0,700	0,974
Terbufós	0,025-0,300	0,990	0,050-0,700	0,996
Trifluralina	0,010-0,300	0,990	0,025-0,700	0,995

Os valores de precisão dos métodos analíticos utilizando o preparo de amostras por QuEChERS e por partição com ACN em três níveis de fortificação estão detalhados na Tabela 13.

No nível de fortificação igual $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$ foi obtida precisão aceitável em ambos os métodos analíticos para os agrotóxicos oxifluorfem, alacloro, acetocloro, terbufós, malation, trifluralina, etrinfós, pirimifós etil e pendimetalina. Neste nível de concentração, o método por QuEChERS apresentou precisão ainda para o *o*'*p*'DDT, paration etil, clorpirifós metil, bioaletrina.

Na análise de amostras fortificadas com $0,100 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,300 \mu\text{g g}^{-1}$, o preparo de amostras por QuEChERS apresentou precisão, com desvio padrão relativo inferior a 20% (DPR<20%), para todos os analitos, exceto para o agrotóxico heptacloro epóxido. O método analítico com preparo de amostras por partição com ACN apresentou precisão para 13 e 16 analitos na análise de amostras fortificadas com $0,100 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,300 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Quando se utilizou o preparo de amostras por partição com ACN não foi obtida precisão (DPR<20%) em toda a faixa de estudo para os analitos bifentrin, endossulfan beta, hexaclorobenzeno e permetrina.

Ambos os métodos analíticos não apresentaram precisão adequada (menor do que 20%) para os analitos *o*'*p*'DDT, paration etil, endossulfan beta, bifentrin, heptacloro epóxido, aldrin, fluazifope, fosalone, dissulfoton, fentoato, permetrina, paration metil, hexaclorobenzeno e endossulfan alfa neste nível de fortificação.

Tabela 13. Valores de precisão (DPR, %) obtidos para cada nível de fortificação nos testes de validação dos métodos analíticos utilizando os métodos QuEChERS e partição com ACN de preparo de amostras de pólen apícola.

Analitos	Desvio padrão relativo (DPR, %)					
	QuEChERS ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Partição com ACN ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	0,025	0,100	0,300	0,025	0,100	0,300
Acetocloro	9,3	7,7	7,5	13,0	17,2	35,5
Alacloro	17,7	12,2	13,1	10,1	27,8	28,7
Aldrin	31,0	4,9	6,8	28,3	17,4	12,9
Bifentrin	27,4	9,2	5,8	41,6	35,1	26,9
Bioaletrina	18,6	16,2	7,5	245,0	14,5	10,7
Clorpirifós Metil	11,0	11,2	10,4	53,7	48,6	30,6
Dissulfoton	41,3	16,6	1,4		26,3	13,7
Endossulfan alfa	58,8	11,7	8,0	86,5	13,7	6,8
Endossulfan beta	23,1	14,0	11,4	37,3	32,8	20,9
Etrinifós	16,3	8,5	12,6	15,6	19,5	30,9
Fempropatrim	12,8	17,6	9,3	32,1	27,9	29,8
Fentoato	42,8	12,3	10,9	21,5	18,1	23,9
Fluazifope	32,4	13,8	21,2	39,9	31,8	19,7
Fosalone	33,4	19,5	18,3	38,7	41,3	33,8
Heptacloro Epóxido	27,9	78,7	21,1	245,0	19,7	17,5
Hexaclorobenzeno	55,9	19,7	10,3	115,8	60,0	71,3
Malation	12,0	12,8	16,0	14,6	17,3	13,2
o'p' DDT	20,5	8,3	10,3		7,6	6,5
Oxifluorfem	16,1	11,8	9,3	4,9	18,1	18,9
Paration Etil	20,9	7,5	1,6		40,2	11,6
Paration Metil	51,9	10,1	14,3	35,4	8,4	3,4
Pendimetalina	16,5	5,4	8,0	17,5	18,7	8,2
Permetrina*	44,5	14,6	17,3	127,3	56,8	35,5
Pirimifós Etil	16,5	15,9	11,0	16,7	21,5	20,6
Terbufós	16,5	12,1	11,2	14,4	37,4	33,7
Trifluralina	8,2	3,5	5,7	15,4	19,8	9,7

A exatidão do método analítico, expressa como porcentagem de recuperação, que representa a razão entre o valor obtido e o valor predito pela regressão, foi expressa em porcentagem. Como o objetivo principal deste trabalho é realizar o monitoramento de analitos de diversas classes, valores muito diferentes de recuperação eram esperados, considerando que estão incluídas substâncias com características químicas muito distintas entre si.

Embora tenha sido observada maior dispersão dos valores de recuperação no preparo de amostras por QuEChERS, a maioria dos resultados de recuperação apresentaram resultados adequados, com valores entre 70 e 120% em ambos os métodos (Tabela 14).

De acordo com as instruções do guia SANCO (2009), para métodos multirresíduos, valores baixos de recuperação podem ser aceitos como adequados se os resultados são consistentes, ou seja, apresentam precisão, com coeficiente de variação inferior a 20%. Desta forma, alguns resultados obtidos fora do intervalo aceitável de recuperação foram considerados adequados devido aos resultados de precisão e exatidão.

O método de preparo de amostras por QuEChERS apresentou exatidão (recuperação entre 70 e 120%) para todos os analitos nos níveis de fortificação iguais a $0,100 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,300 \mu\text{g g}^{-1}$. No nível inferior avaliado, foi obtida precisão ($\text{DPR} < 20\%$) para 12 dos 26 analitos (clorpirifós metil, endossulfan beta, fempropatrim, trifluralina, aldrin, bifentrin, fluazifope, pendimetalina, oxifluorfem, o'p'DDT, dissulfoton e etrinfós).

Utilizando o preparo de amostras por partição com ACN, foi obtida precisão somente para pendimetalina, trifluralina, hexaclorobenzeno, bifentrin, fosalone no nível de fortificação igual a $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$. Não foi possível calcular os valores de exatidão para 14 analitos, cujas faixas lineares estão acima deste nível. O método apresentou exatidão para a maioria dos analitos no nível de fortificação igual a $0,100 \mu\text{g g}^{-1}$ e para todos os analitos no nível de fortificação igual a $0,300 \mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 14. Valores de exatidão (%) obtidos para cada nível de fortificação nos testes de validação dos métodos analíticos utilizando os métodos QuEChERS e partição com ACN de preparo de amostras de pólen apícola.

Analito	Recuperação (%)					
	QuEChERS ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Partição com ACN ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	0,025	0,100	0,300	0,025	0,100	0,300
Acetocloro	146,7	97,0	117,4	62,1	105,6	101,7
Alacloro	163,1	94,4	115,0	64,9	99,1	109,8
Aldrin	105,2	107,2	104,7		124,3	87,6
Bifentrin	105,6	96,6	104,0	89,8	107,2	87,1
Bioaletrina	200,5	67,3	113,8		108,0	102,8
Clorpirifós Metil	72,4	125,9	101,2	52,7	124,1	105,2
Dissulfoton	116,5	101,7	114,2		114,0	93,6
Endossulfan alfa	121,9	98,0	102,4		113,0	91,4
Endossulfan beta	98,8	98,0	108,5	65,9	115,0	99,2
Etrinifós	120,3	97,0	112,2	63,7	109,2	107,5
Fempropatrim	100,7	92,2	111,6		192,5	93,2
Fentoato		73,8	122,9		100,6	109,7
Fluazifope	107,9	89,9	113,6		106,2	101,8
Fosalone		85,0	116,3	102,2	106,1	93,7
Heptacloro Epóxido	170,9	93,7	106,5		86,9	112,9
Hexaclorobenzeno	160,3	101,7	114,2	80,9	99,3	96,6
Malation	122,2	93,7	115,1	66,0	112,6	101,8
o'p' DDT	114,5	96,8	105,4		53,3	68,8
Oxifluorfem	112,3	91,6	112,2		94,7	94,1
Paration Etil	352,1	83,8	113,2		107,6	88,9
Paration Metil	257,2	82,2	113,5		109,1	93,8
Pendimetalina	109,4	103,1	106,8	72,0	109,0	96,9
Permetrina*	127,4	90,1	110,8		117,0	97,0
Pirimifós Etil	208,2	85,7	113,3	59,9	118,6	106,7
Terbufós	137,8	96,6	111,2	63,1	111,2	109,7
Trifluralina	103,5	102,8	107,2	79,7	98,7	99,1

*soma do isômeros

Os valores de limite de detecção e quantificação de ambos os métodos analíticos estão detalhados na Tabela 15.

O método de extração por QuEChERS permitiu a obtenção de limites de detecção e quantificação inferiores aos obtidos quando se utilizou a extração por partição com ACN, com valores de LOQ igual a $0,010 \mu\text{g g}^{-1}$ para etrinfós e terbufós e igual a $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$ para os outros 13 analitos. Para os demais analitos o LOQ deste método analítico foi igual a $0,050 \mu\text{g g}^{-1}$ ou $0,100 \mu\text{g g}^{-1}$.

Os valores de LOQ do método analítico utilizando extração por partição com ACN foram iguais ou menores que $0,100 \mu\text{g g}^{-1}$ para 14 agrotóxicos e iguais a $0,200 \mu\text{g g}^{-1}$ para outras 5 substâncias. Para os agrotóxicos fosalone e clorpirifós metil, os LOQ foram iguais a $0,200 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,300 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,500 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Não foi possível determinar o LOQ para os analitos fempropatrim, endossulfan beta, permetrina, bifentrin e hexaclorobenzeno, que não apresentaram exatidão e precisão em toda a faixa de concentração estudada.

Tabela 15. Valores de Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) do método para cada analito.

Analitos	Quechers		Partição	
	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Acetocloro	0,010	0,025	0,025	0,050
Alacloro	0,010	0,025	0,025	0,050
Aldrin	0,025	0,050	0,050	0,100
Bifentrin	0,050	0,100	-	-
Bioaletrina	0,010	0,025	0,100	0,200
Clorpirifós Metil	0,010	0,025	0,500	0,700
Dissulfoton	0,025	0,050	0,100	0,200
Endossulfan alfa	0,025	0,050	0,050	0,100
Endossulfan beta	0,025	0,050	-	-
Etrinifós	0,005	0,010	0,025	0,050
Fempropatrim	0,010	0,025	-	-
Fentoato	0,050	0,100	0,100	0,200
Fluazifope	0,050	0,100	0,050	0,100
Fosalone	0,050	0,100	0,300	0,500
Heptacloro Epóxido	0,025	0,050	0,050	0,100
Hexaclorobenzeno	0,050	0,100	-	-
Malation	0,010	0,025	0,025	0,050
o'p' DDT	0,010	0,025	0,100	0,200
Oxifluorfem	0,010	0,025	0,050	0,100
Paration Etil	0,010	0,025	0,100	0,200
Paration Metil	0,050	0,100	0,050	0,100
Pendimetalina	0,010	0,025	0,050	0,100
Permetrina*	0,025	0,050	-	-
Pirimifós Etil	0,010	0,025	0,025	0,050
Terbufós	0,005	0,010	0,025	0,050
Trifluralina	0,010	0,025	0,010	0,025

*soma do isômeros

Resultados semelhantes de LOD e LOQ foram obtidos por Wiest et al. (2011), que desenvolveram um método analítico para a determinação de contaminantes ambientais em amostras de abelhas, mel e pólen apícola por GC-ToF e por LC-MS/MS. O preparo de amostras foi realizado por QuEChERS modificado com a adição de 8 mL de água e 3 mL de hexano, além de 10 mL de ACN na etapa de extração, para eliminação de interferentes polares. Entre os 80 compostos determinados, foram obtidos LOQ entre 0,014 e 0,128 $\mu\text{g g}^{-1}$ para aldrin, bifentrin, clorpirifós metil, endossulfan alfa, endossulfan beta, malation, paration e permetrina na determinação por GC-ToF. A maioria dos resultados foi muito semelhante aos obtidos no presente trabalho com exceção do aldrin e endossulfan alfa, que apresentaram LOQ aproximadamente quatro vezes inferior. Os valores de LOQ muito semelhantes indicam que a adição de hexano não interfere significativamente nos resultados finais. Os LOQ para o agrotóxico clorpirifós metil foram iguais a 0,026 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,052 $\mu\text{g g}^{-1}$ por GC-ToF e LC-MS/MS, respectivamente. Os demais analitos citados foram analisados somente por GC-ToF.

Os agrotóxicos alacloro, bifentrin, clorpirifós, dissulfoton, malation, pirimifós etil e terbufós também foram incluídos no método analítico desenvolvido por Kasiotis et al. (2014) para determinação de 115 substâncias de diferentes classes em pólen apícola, mel e abelhas por LC-ESI-MS/MS com preparo de amostras por QuEChERS modificado com hexano. Os LOQ para alacloro, bifentrin, clorpirifós, dissulfoton foram entre 2 e 50 vezes inferiores aos LOQ obtidos no presente trabalho. Considerando a semelhança no preparo de amostras, os baixos LOQ foram obtidos provavelmente devido a maior sensibilidade do analisador de massas do tipo quadrupolo. Por outro lado, o LOQ para o terbufós foi cinco vezes superior ao obtido neste trabalho.

Os resultados obtidos demonstraram a eficiência dos dois métodos analíticos desenvolvidos e validados. Embora, o preparo de amostras por QuEChERS tenha fornecido extratos mais limpos, com melhores resultados nos parâmetros de validação para os 26 analitos, o método analítico utilizando a partição com ACN

para o preparo de amostras permitiu a determinação de 19 agrotóxicos em pólen apícola com precisão e exatidão.

III.3.2. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ESPONJAS DE POLIURETANO (PUF)

Nos estudos para o desenvolvimento de método analítico para determinação de agrotóxicos em amostras de PUF foram incluídos os 26 agrotóxicos para os quais o método para análise de pólen apícola foi validado.

A extração das esponjas de poliuretano foi realizada através da extração por *Soxhlet*, empregada há anos neste tipo de análise. Como solvente, foi utilizado o diclorometano, amplamente utilizado, inclusive nos trabalhos mais recentes devido à sua disponibilidade e facilidade no uso de apenas um solvente (LING *et al.*, 2011).

As mais notáveis vantagens que o método de *Soxhlet* apresenta são que a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo sua constante renovação; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante (LUQUE DE CASTRO e GARCÍA-AYUSO, 1998).

Para avaliar o desempenho do método analítico foram utilizadas amostras branco de PUF previamente limpas por *Soxhlet* com diclorometano acetona, amostras branco fortificadas ($0,700 \mu\text{g g}^{-1}$) e extratos de amostras branco fortificados ($0,700 \mu\text{g g}^{-1}$).

Nos testes de seletividade, não foi observada a interferência de compostos da matriz no tempo de retenção dos analitos. No entanto, houve coeluição de um interferente no tempo de retenção do padrão interno, lindano, utilizado para análise do pólen apícola. A eficiência de extração dos analitos em amostras fortificadas com $0,700 \mu\text{g g}^{-1}$ variou entre 56 e 87 %.

Na comparação entre os cromatogramas obtidos na análise de soluções padrão e extratos fortificados, foi observado efeito matriz entre 71% e 249%, no

nível de fortificação igual a $0,700 \mu\text{g g}^{-1}$, indicando a necessidade do preparo de curvas analíticas na matriz.

Embora não tenha sido implementada a validação analítica, os métodos de limpeza e extração por QuEChERS demonstraram ser eficientes na remoção dos interferentes e extração dos agrotóxicos, respectivamente.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO PÓLEN APÍCOLA COMO BIOINDICADOR DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

IV.1. INTRODUÇÃO

A fim de avaliar o potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos foram realizados: 1-estudos de sorção destas substâncias em pólen; 2-monitoramento ambiental através da análise de amostras de pólen coletadas em um apiário experimental; 3-análise de amostras coletadas em apiários comerciais, localizados em região de alta produção agrícola.

Os estudos de sorção foram realizados a fim de avaliar a afinidade dos agrotóxicos em relação ao pólen apícola, pois, embora muitos trabalhos demonstrem a presença destas substâncias em amostras de pólen, não existem dados sobre sua capacidade em reter as substâncias presentes no ambiente. Como não estão disponíveis procedimentos para estudos de sorção em matrizes biológicas, foram utilizados os procedimentos estabelecidos e padronizados para sorção de compostos orgânicos em solo descritos no Guia 106 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2000).

Para o monitoramento ambiental, um apiário experimental foi instalado em uma região com condições conhecidas. Entre os anos 2012 e 2013, amostras de pólen apícola foram coletadas e a presença de agrotóxicos no ambiente foi monitorada por amostragem passiva através do uso de dispositivos contendo discos de espuma de poliuretano (PUF), distribuídos na região em estudo.

O potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental foi avaliado ainda através da análise de amostras coletadas em apiários próximos a regiões de alta produção agrícola, em colônias em que houve morte de abelhas, com causa suspeita de contaminação por agrotóxicos.

IV.2. MATERIAL

IV.2.1. EQUIPAMENTOS E COLUNA CROMATOGRÁFICA

Durante este trabalho foi utilizado um equipamento de cromatografia a gás acoplado ao espectrômetro de massas sequencial, GC-MS/MS *Ion Trap* 3900/Saturn 2100 T da *Varian* (EUA). Os dados foram adquiridos e processados no *software MS Workstation* versão 6.5 da *Varian*. Todos os testes foram realizados com a coluna analítica Rxi[®] 5 Sil (0,25 mm x 30 m, 0,25 µm), *Restek* (EUA)

Foram utilizadas, ainda, balança analítica modelo CP 225D (*Sartorius*, Alemanha), balança semi-analítica, modelo SA 210 (*Scientech*, Índia) e mesa agitadora modelo MA 139/CFT (*Marconi*, Brasil). Para o preparo de amostras foi empregado um *Misturaer* modelo Lab Dancer (*Ika*, Brasil), banho de ultra-som modelo *Transsonic* 660/H (*Elma*, Alemanha) e centrífuga modelo *Heraeus Multifuge* 3L-R (*Thermo*, EUA). As amostras de pólen apícola foram desidratadas em estufa de secagem com renovação/circulação de ar modelo MA035/1 (*Marconi*, Brasil).

IV.2.2. SOLVENTES E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados - sulfato de magnésio (MgSO₄), cloreto de sódio (NaCl), citrato de sódio diidratado (C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O); citrato de sódio sesquidratado - eram grau analítico, da marca J. T. Baker (EUA). O sorvente PSA (amina primária secundária) utilizado foi da marca *Varian* (EUA) e a ACN, grau HPLC, da marca *Tedia* (Brasil). Foram utilizados, ainda, diclorometano e acetona, grau analítico, da *Tedia* (Brasil) para extração por *Soxhlet*. Os padrões analíticos de acetocloro, alacloro, dissulfoton, endossulfan alfa, endossulfan beta, etrinfós, fempropatrim, fosalone, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, oxifluorfem, paration etil, paration metil, pendimetalina e terbufós foram adquiridos da empresa *Dr. Ehrenstorfer* (Augsburg, Alemanha) e os padrões analíticos aldrin, bifentrin, bioaletrina, clorpirifós metil, DDT, fentoato, fluazifope, malation, permetrina, pirimifós etil e trifluralina da *Fluka* (EUA), todos com teor mínimo de 98%.

IV.3. MÉTODOS

IV.3.1. PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO

IV.3.1.1. *Soluções Estoque*

A partir dos padrões comerciais dos agrotóxicos foram preparadas soluções estoques individuais dos agrotóxicos na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ através da diluição de 10 mg de cada padrão em 10 mL do solvente adequado para cada substância. Os agrotóxicos alacloro, aldrin, bifentrin, bioaletrina, clorpirifós metil, etrinfós, oxifluorfen, trifluralina, fluazifope, fosalone, heptacloro epóxido, malation, terbufós e pendimetalina foram diluídos em acetona; DDT, endossulfan alfa, endossulfan beta, paration metil, dissulfoton, fentoato, paration etil, permetrina, pirimifós etil, em hexano; fempropatrim em metanol; e hexaclorobenzeno em clorofórmio.

Conforme testes anteriores, realizados no Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa, as soluções foram armazenadas e permaneceram estáveis em frascos de vidro, mantidas em freezer ($-16 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e utilizadas por um período máximo de doze meses.

IV.3.1.2. *Soluções Intermediárias*

Foram preparadas soluções intermediárias dos padrões dos analitos e do padrão interno na concentração de $1,0$ e $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ através da diluição de $0,100$ mL de cada solução estoque em 10 mL de ACN. Essas soluções foram armazenadas em frascos de vidro e permaneceram estáveis durante um mês em freezer ($-16 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

IV.3.1.3. *Soluções de Trabalho*

As soluções de trabalho dos analitos em concentrações iguais a $0,010$; $0,025$; $0,030$; $0,050$; $0,100$; $0,200$; $0,300$; $0,500$ e $0,700 \mu\text{g mL}^{-1}$ e padrão interno,

(0,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,700 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas diariamente, mediante diluição das soluções intermediárias em ACN.

Na análise das amostras de pólen apícola, para dinamização do procedimento, diversas substâncias foram diluídas em uma mesma solução de trabalho, tendo sido preparados 2 misturas, I e II, contendo os analitos determinados pelo método de monitoramento I e II, respectivamente. A mistura I continha as 15 substâncias determinadas pelo método de monitoramento I, que são: aldrin, bifentrin, bioaletrina, clorpirifós metil, dissulfoton, endossulfan alfa, endossulfan beta, fempropatrim, o'p' DDT, oxifluorfem, paration etil, paration metil, pendimetalina e trifluralina, além do padrão interno, lindano. A mistura II continha as 13 substâncias determinadas pelo método de monitoramento II, que são: acetocloro, alacloro, etrinfós, fentoato, fluazifope, fosalone, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, malation, permetrina, pirimifós etil e terbufós, e o padrão interno, lindano. Para padronização interna, a solução intermediária de lindano foi diluída nas soluções de trabalho em concentração final igual a 0,200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para os testes de sorção foram preparadas soluções de trabalho para o aldrin e o malation em concentrações iguais a 0,200; 0,400; 0,500; 0,600; 0,800; 1,000; 2,000; 5,000; 10,000 e 20,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

IV.3.2. PREPARO DE AMOSTRAS E EXTRATOS FORTIFICADOS

IV.3.2.1. *Preparo de amostras branco de pólen apícola fortificadas*

Amostras de pólen apícola, adquiridas comercialmente, foram moídas e fortificadas com as soluções padrão intermediárias dos analitos.

Para o preparo das curvas analíticas para quantificação dos agrotóxicos nas amostras de pólen apícola, foram preparadas amostras fortificadas com as misturas I e II dos analitos em níveis de concentração iguais a 0,010; 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300 e 0,500 $\mu\text{g g}^{-1}$ e do padrão interno em concentração igual a 0,200 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Para os testes de sorção foram preparadas amostra branco de pólen fortificadas com o aldrin e o malation em concentrações iguais e 0,200; 0,400; 0,500; 0,600; 0,800; 1,000; 2,000; 5,000; 10,000 e 20,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Todas as amostras de pólen foram fortificadas com pelo menos 15 horas de antecedência às análises para garantir a incorporação dos agrotóxicos na matriz. Todas as amostras foram previamente analisadas pelo método desenvolvido para confirmação da ausência (abaixo do limite de detecção do método) de agrotóxicos.

IV.3.2.2. Preparo de extrato da amostra branco de pólen fortificado

Para os testes de sorção foram preparados extratos de amostra branco de pólen fortificado fortificados com o aldrin e o malation em concentrações iguais a 0,200; 0,400; 0,500; 0,600; 0,800; 1,000; 2,000; 5,000; 10,000 e 20,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

IV.3.2.3. Preparo de amostra branco de PUF fortificadas

Amostras branco de PUF, previamente limpas por extração por *Sohxlet*, foram fortificadas com soluções padrão intermediárias dos analitos em concentração final igual a 0,700 $\mu\text{g g}^{-1}$ e do padrão interno em concentração igual a 0,200 $\mu\text{g g}^{-1}$.

IV.3.3. LEVANTAMENTO DOS AGROTÓXICOS A SEREM INCLUÍDOS NO ESTUDO

Para o levantamento das substâncias a serem incluídas no monitoramento ambiental foram coletadas informações sobre as substâncias utilizadas na região e no campo experimental da Embrapa, substâncias pesquisadas no Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura (MAPA), e no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e substâncias proibidas.

As informações sobre as substâncias utilizadas na região do campo experimental foram obtidas diretamente com os produtores, que foram questionados sobre as culturas existentes em suas propriedades e sobre o uso de agrotóxicos. Para as entrevistas, foi desenvolvido um questionário simples com o mínimo de questões possível (Anexo III).

Para o levantamento sobre as substâncias utilizadas no campo experimental, as informações eram coletadas mensalmente com os pesquisadores responsáveis pelo campo.

As informações sobre as substâncias incluídas nos programas de monitoramento foram coletadas na legislação específica de cada programa: Instrução Normativa SDA n.18, de 25 de junho de 2013, que institui o PNCRC (MAPA, 1999); e Resolução RDC nº 119, de 19 de maio de 2003, que institui o PARA (ANVISA, 2003).

IV.3.4. ESTUDOS DE SORÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA

A escolha dos agrotóxicos incluídos nos estudos de sorção foi feita com base nos coeficientes de partição ($\log P$), a fim de se avaliar a sorção de substâncias com diferentes características químicas.

Devido à inexistência de procedimentos estabelecidos para testes de sorção em matrizes como o pólen, todos os testes de sorção foram realizados de acordo com as recomendações do guia OECD 106 (OECD, 2000), que estabelece o procedimento para os estudos de sorção em solo.

IV.3.4.1. SORÇÃO DOS AGROTÓXICOS NO FRASCO

Para avaliação de uma possível sorção dos agrotóxicos aldrin e malation no frasco, tubos de vidro e de plástico contendo 10 mL de solução aquosa de cada analito ($1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram agitados por 0 e 20 horas em mesa agitadora com temperatura controlada ($24 \text{ }^\circ\text{C}$). Após o término de cada período de agitação, a solução foi descartada e cada tubo lavado por três vezes com água para garantir a eliminação de resíduos dos analitos que não estivessem sorvidos no frasco. Em

seguida, os tubos foram lavados com 5 mL de ACN, agitados em *vortex* por 1 minuto e mantidos em banho de ultrassom por 15 min. A solução obtida foi submetida à análise por GC-MS/MS *Ion trap*. A concentração sorvida em cada tubo foi quantificada através do uso de curvas analíticas preparadas em solução padrão no solvente (0,200; 0,400; 0,600; 0,800; 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Quando necessário, os extratos foram pré-concentrados por evaporação do solvente e ressuspensos em 1,0 mL de ACN.

IV.3.4.2. AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS SORVIDOS EM PÓLEN

Para os estudos de sorção em pólen apícola, 100 mg de amostras branco de pólen apícola foram agitadas com 10 mL de água por 12 horas a 24 °C. Após esse período, foram adicionadas às suspensões 100 μL da solução intermediária (1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do agrotóxico em estudo, resultando em uma fortificação do pólen de 1,00 $\mu\text{g g}^{-1}$. As soluções foram agitadas por mais 20 horas em mesa agitadora com temperatura controlada (24 °C). Após esse período, as suspensões foram centrifugadas a 13440 g por 15 min.

Dois procedimentos foram avaliados para quantificação dos agrotóxicos aldrin e malation sorvidos, por determinação indireta do agrotóxico em solução, ou direta, no pólen apícola.

Os resultados dos dois procedimentos foram avaliados através da precisão, calculada a partir da análise de extratos de amostras fortificadas preparados de acordo com cada procedimento, em triplicata. A precisão foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR) que, de acordo com o Guia SANCO (2009), deve ser inferior a 20%.

IV.3.4.2.1. *Quantificação indireta em solução*

Para quantificação indireta, o sobrenadante obtido após centrifugação de cada suspensão foi transferido para outro tubo e submetido a duas extrações sucessivas por partição líquido-líquido com 5 mL de acetato de etila, em cada

etapa. Depois de filtrado (0,22 μm), o extrato total das duas extrações (fase orgânica) foi submetido à análise por GC-MS/MS *Ion trap*.

Para os cálculos da concentração em cada ensaio, curvas analíticas foram preparadas. Para tanto, 100 mg de amostras branco de pólen apícola foram agitadas com 10 mL de água por 12 horas a 24 °C. Após esse período, as suspensões foram centrifugadas a 13440 g por 15 min e os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e fortificados com cada analito em diferentes concentrações (0,200; 0,400; 0,500; 0,600; 0,800; 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os extratos fortificados foram submetidos a duas extrações sucessivas por partição líquido-líquido com 5 mL de acetato de etila, em cada etapa. Depois de filtrado (0,22 μm), o extrato total das duas extrações (fase orgânica) foi submetido à análise por GC-MS/MS *Ion trap*.

IV.3.4.2.2. *Quantificação direta no pólen*

A quantificação direta foi realizada através da extração do pólen (precipitado) por partição com 10 mL de ACN, agitação em *vortex* e centrifugação durante 15 min (13440 g/ 5 °C). Depois de filtrado (0,22 μm), o extrato obtido foi submetido à análise por GC-MS/MS *Ion trap*. As concentrações foram calculadas a partir de uma curva analítica. Para tanto, 100 mg de amostras branco de pólen apícola foram agitadas com 10 mL de água por 12 horas a 24 °C. Após esse período, as suspensões foram centrifugadas a 13440 g por 15 min e os sobrenadantes descartados. Os precipitados (pólen) foram fortificados com cada analito em diferentes concentrações (0,200; 0,400; 0,500; 0,600; 0,800; 1,000 $\mu\text{g g}^{-1}$). Após um período de 12 horas para incorporação do analito na matriz, os precipitados fortificados foram submetidos a extrações com 10 mL de ACN. Depois de filtrado (0,22 μm), o extrato foi submetido à análise por GC-MS/MS *Ion trap*.

IV.3.4.3. CINÉTICAS DE SORÇÃO

Para os estudos cinéticos foi definida uma razão pólen/água de 1:100 m/v. Suspensões contendo 100 mg de pólen e 10 mL de água foram agitadas por 12 horas em mesa agitadora com temperatura controlada (24 °C), em tubo de vidro

ou de plástico, para aldrin e malation, respectivamente. Em seguida, foi adicionado o analito em concentração igual a $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ e a suspensão foi agitada por 0, 1, 2, 3, 5, 7, 20 e 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Após o período de agitação, as suspensões foram centrifugadas a 13440 g por 15 min e o pólen analisado. Para os cálculos da quantidade sorvida, foram utilizadas curvas analíticas preparadas conforme descrito em IV.3.4.2.2, nos níveis de fortificação iguais a 0,200; 0,400; 0,500; 0,600; 0,800; 1,000 $\mu\text{g g}^{-1}$. Para estimar o tempo de equilíbrio, os valores de porcentagem de sorção (A_{ti}) foram plotados em função do tempo de agitação.

Os modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda-ordem e Elovich foram aplicados a fim de se avaliar o mecanismo cinético de sorção. O modelo de pseudo-primeira-ordem é descrito pela equação linear a seguir (Equação 1):

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad (1)$$

onde q_e é a concentração máxima sorvida no equilíbrio e k_1 é a constante para o modelo cinético de pseudo-primeira-ordem. O gráfico de $\log(q_e - q_t)$ versus t é uma reta onde $\log q_e$ e $-k_1/2,303$ correspondem ao intercepto e a inclinação, respectivamente (PLAZINSKI *et al.*, 2009; QIU *et al.*, 2009).

O modelo de pseudo-segunda-ordem considera que a capacidade de sorção é proporcional ao número de sítios ativos ocupados no sorvente; a sua forma linear pode ser representada pela Equação 2.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (2)$$

onde q_e e a constante de segunda ordem (k_2) são determinadas diretamente a partir da inclinação e intercepto da reta obtida do gráfico t/q_t versus t , respectivamente (PLAZINSKI *et al.*, 2009).

O modelo de Elovich considera que a cinética de sorção ocorre rapidamente na etapa inicial, associada com o movimento do composto com a maior parte do

sorvente acessível, seguido de uma etapa lenta devido à difusão da partícula dentro e fora dos microporos do sorvente (FERNANDEZ-BAYO et al., 2008; PLAZINSKI et al., 2009). A Equação 3 apresenta a forma linearizada da equação de Elovich.

$$q_t = \frac{1}{Y} \ln(XY) + \frac{1}{Y} \ln t \quad (3)$$

onde X e Y são constantes. O intercepto $(1/Y) \ln(XY)$ corresponde à quantidade sorvida durante a etapa rápida (q_{fast}), enquanto a inclinação $(1/Y)$ representa a sorção lenta relacionada com a duração da segunda etapa (FERNANDEZ-BAYO et al., 2008).

IV.3.4.4. ISOTERMAS DE SORÇÃO DE ALDRIN E MALATION EM PÓLEN APÍCOLA

Para a construção das isotermas de sorção dos agrotóxicos em pólen apícola, 100 mg de pólen com 10 mL de água, em tubo de vidro e de plástico, para o aldrin e o malation, respectivamente, foram agitados por 12 horas. Em seguida, cada analito foi adicionado em concentrações finais iguais a $0,500 \mu\text{g g}^{-1}$, $1,000 \mu\text{g g}^{-1}$, $2,000 \mu\text{g g}^{-1}$, $5,000 \mu\text{g g}^{-1}$, $10,000 \mu\text{g g}^{-1}$ e $20,000 \mu\text{g g}^{-1}$ de pólen.

As suspensões foram agitadas horizontalmente por 20 horas em mesa agitadora com temperatura controlada ($24 \text{ }^\circ\text{C}$). Após esse período, as suspensões foram centrifugadas a 13440 g por 15 min e o precipitado (pólen) analisado, conforme descrito anteriormente em IV.3.4.2.2.

Para os cálculos da concentração de cada agrotóxico sorvido, foram preparadas curvas analíticas em amostras branco de pólen fortificadas com aldrin e malation, em níveis iguais a 0,200, 0,400, 0,500, 0,600, 0,800, 1,000, 2,000, 5,000 e $10,000 \mu\text{g g}^{-1}$. Quando necessário, os extratos foram diluídos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Os resultados foram modelados pela equação de *Freundlich* (Equação 4) que propõe uma isoterma empírica para um sistema não ideal, supondo uma superfície heterogênea e sítios de ligação não equivalentes, bem como para uma sorção em

multicamadas. Na equação de Freundlich, K_F ($\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$) e $1/n$ são o coeficiente de sorção de *Freundlich* e a sensibilidade, respectivamente. A sensibilidade, também conhecida como o expoente de *Freundlich* ou fator linearidade, é uma constante referente à intensidade da sorção.

$$\log C_p^{ads} (eq) = \log K_F^{ads} + \frac{1}{n} \log C_{aq}^{ads} (eq) \quad (4)$$

onde C_p^{ads} e C_{aq}^{ads} são as concentrações da substância sorvida no pólen e em solução aquosa, respectivamente.

IV.3.5. MONITORAMENTO AMBIENTAL ATRAVÉS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PARA DETERMINAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR AGROTÓXICOS

IV.3.5.1. LOCAL DE ESTUDO

Para o monitoramento ambiental através da análise de amostras de pólen apícola para determinação de agrotóxicos foi instalado um apiário com 10 colmeias em região de vegetação nativa localizada na área de reserva legal no Campo Experimental do Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente (CNPMA) - Embrapa Meio Ambiente, localizado no km 127,5 da rodovia SP-340 (Campinas – Mogi Mirim), bairro Tanquinho Velho, município de Jaguariúna, região de Campinas-SP, entre os rios Atibaia e Jaguari, com área total de 131,0 ha, entre os meridianos de 22°42'44" e 22°42'55" latitude Sul e 47°00'53" e 47°01'05" de longitude Oeste.

As principais culturas dentro e ao redor do campo experimental são a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), pastagem para fenação (diversas espécies de gramíneas), café (*Coffea arabica* L.), citrus (principalmente *Citrus sinensis*), milho (*Zea mays*), girassol (*Helianthus annuus*), eucalipto (*Eucaliptus* spp.), adubação verde (diversas espécies) e áreas de mata nativa (áreas de preservação permanente e reserva legal).

IV.3.5.2. COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

A coleta de amostras de pólen apícola foi realizada diretamente nas 10 colmeias do apiário com a utilização de coletores de pólen de alvado (frontais) (Figuras 22 a 24) que é o modelo de coletor mais comum e com maior eficiência de coleta e proteção do material armazenado. Este tipo de coletor possui uma régua, ou trampa coletora, com orifícios de 4,5 mm que permitem a passagem das abelhas operárias, mas são pequenos o suficiente para desprender as grãos de pólen da corbícula (espécie de cesta presente nas patas posteriores) que cairão nas gavetas localizadas na parte inferior desses equipamentos (LEGLER, 2002).



Figura 20. Apiário instalado em região de vegetação nativa localizada na área de reserva legal no Campo Experimental do Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente (CNPMA) - Embrapa Meio Ambiente.

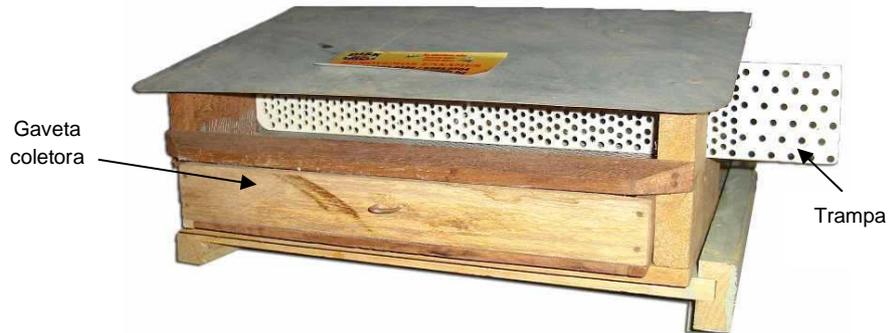


Figura 21. Coletor de pólen de alvado (frontal).

Durante o período de coletas, cada colmeia permanecia com a trampa coletora, por três dias sucessivos, nos quais o pólen era coletado, e com descanso, ou acesso livre das abelhas por aproximadamente 30 dias, para evitar a ocorrência de impactos negativos no aspecto nutricional das mesmas e, conseqüentemente, no desenvolvimento populacional das colônias.



Figura 22. Abelhas forrageiras carregando grãos de pólen, entrando na colmeia através das trampas coletoras no coletor de pólen de alvado.

Dessa forma, diariamente eram obtidas 10 amostras com um total de 30 amostras por período de coleta, conforme esquema apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Esquema de coleta de amostras de pólen apícola.

1° Período de coleta		2° Período de coleta		...
Dias 1-3	Dias 4-34	Dias 35-37	Dias 38-68	...
COLETA	DESCANSO	COLETA	DESCANSO	...

Todos os procedimentos de processamento das amostras foram realizados de acordo com as recomendações de boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado (CAMARGO *et al.*, 2003).

Para a coleta do pólen retido nas gavetas coletoras, foram utilizadas bandejas de plástico com tampa, largas e rasas o suficiente para que não ocorresse a prensagem dos grãos por excesso de peso das camadas superiores sobre as inferiores, uma vez que os grãos ainda apresentam umidade alta nesta etapa.

Em seguida, o pólen coletado era devidamente acondicionado em frascos de vidro, identificados com a numeração específica de cada colmeia, sendo transportados para o laboratório e eram congeladas (-16 °C) para evitar a proliferação de micro-organismos. Para garantir que a água fosse reintegrada aos grãos, as amostras eram armazenadas em geladeira (5 °C) até total descongelamento. Para desidratação em estufa com circulação de ar forçado, o pólen era colocado em finas camadas, acondicionado em bandejas vasadas. A temperatura da estufa foi mantida entre 40 e 42 °C e o pólen seco por um período de 8 a 12 horas, variando de acordo com o tipo de pólen e a umidade das amostras.

A umidade total de cada amostra foi calculada como a diferença entre a massa antes e após a desidratação. A umidade final do pólen deve ser no máximo, 4%.

Todas as amostras desidratadas foram moídas em processador, homogeneizadas e armazenadas em frascos de vidro em local fresco e arejado.

As análises quanto à presença de agrotóxicos foram realizadas através do método desenvolvido e validado conforme descrito no Capítulo 3 desta tese. O preparo de amostras consistiu no emprego do QuEChERS e a quantificação foi realizada por GC-MS/MS (Figura 25).

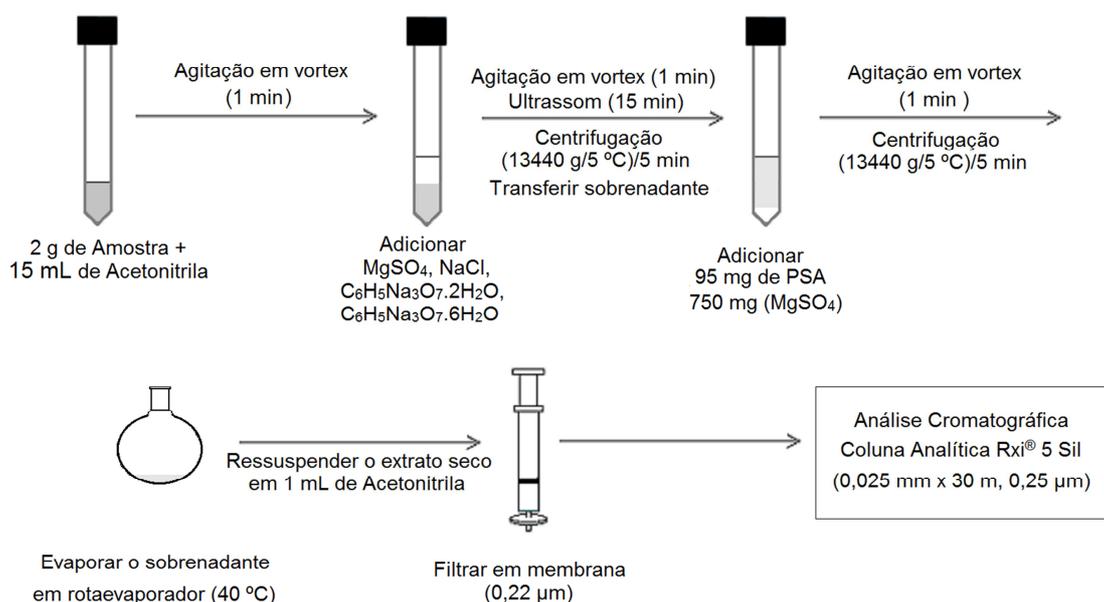


Figura 23. Etapas do procedimento analítico para determinação de agrotóxicos em amostras de pólen apícola.

IV.3.5.3. AMOSTRAGEM PASSIVA

Como controle, a presença de agrotóxicos no ambiente foi monitorada por amostragem passiva através do uso de dispositivos contendo discos de espuma de poliuretano (PUF), distribuídos na região em estudo. Para amostragem do ambiente, seis dispositivos foram instalados no campo experimental da Embrapa, sendo um no apiário e os demais ao redor da reserva na qual o apiário foi instalado. Durante todo o estudo, estes dispositivos foram utilizados e as esponjas

de poliuretano (PUF) eram trocadas e analisadas a cada período de coleta de pólen apícola, permanecendo no ambiente durante aproximadamente 30 dias.

IV.3.5.3.1. *Esponjas de poliuretano (PUF) – Preparo e limpeza.*

Foram utilizados discos de PUF brancos, com 14 cm de diâmetro, 1,35 cm de espessura, densidade igual a $0,018 \text{ g cm}^3$, área superficial igual a 324 cm^2 , massa igual a 3,3 g e volume igual a $184,7 \text{ cm}^3$ (SHOEIB e HARNER, 2002).

Antes de serem utilizados, os discos foram submetidos à limpeza por extrações sucessivas por *Soxhlet* com diclorometano e acetona, com quatro ciclos por hora, durante 8 horas com cada solvente, para eliminar a presença de possíveis contaminantes e/ou interferentes. Após a limpeza, cada esponja foi retirada do extrator com pinça e seca em capela de exaustão. Em seguida, os discos foram acondicionados individualmente em papel alumínio até o momento de serem utilizados em campo.

IV.3.5.3.2. *Dispositivos de amostragem passiva*

Os dispositivos de amostragem passiva consistem de duas bacias com diâmetros de 30 e 24 cm posicionados em um eixo comum, que também fixa o disco de PUF na posição adequada, conforme ilustrado na Figura 26 (KOHOUTEK *et al.*, 2006). Este dispositivo, todo construído em aço inoxidável, protege as esponjas dos efeitos do sol e da chuva e permite um fluxo estável de ar no interior da esponja. Gotas de água condensadas são drenadas através de quatro furos na bacia inferior.



Figura 24. Dispositivo de amostragem passiva com disco de esponja de poliuretano PUF. a. bacias de inox com eixo central em inox; b. disco e esponja de poliuretano instalada no centro do dispositivo, fixada ao eixo central com o auxílio de porcas e arruelas em inox; c. instalação da bacia inferior, com os furos para drenagem da água; d. dispositivo instalado no campo.

IV.3.5.3.3. Coleta e análise das amostras de PUF

Após o período de monitoramento, de aproximadamente um mês, cada amostra foi retirada dos dispositivos de amostragem passiva com pinça, acondicionada individualmente em papel alumínio e armazenada sob refrigeração (-16 °C) até o momento da análise. As coletas de PUF foram programadas para serem realizadas no terceiro dia de cada etapa de coleta de pólen apícola, permitindo assim, o monitoramento da qualidade ambiental durante cada mês antecedente às coletas de pólen.

Antes da análise, cada esponja foi cortada em oito partes para melhor acondicionamento no extrator e aumento da superfície de contato. Todas as amostras coletadas foram submetidas à extração por *Soxhlet* e análise para determinação de agrotóxicos por CG-MS/MS *Ion Trap* seguindo os procedimentos do método analítico detalhado no Capítulo 3.

IV.3.6. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PROVENIENTES DE APIÁRIOS COMERCIAIS DE RIBEIRÃO PRETO

IV.3.6.1. COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Amostras de pólen apícola coletadas diretamente pelos apicultores em 21 colmeias, provenientes de diferentes apiários na região de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, foram congeladas e enviadas ao Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa para processamento e análise.

O processamento e análise das amostras foram realizados conforme descrito para as amostras coletadas no campo experimental (Item IV.3.5.2.)

IV.3.6.2. ANÁLISE POLÍNICA DE AMOSTRAS COLETADAS EM RIBEIRÃO PRETO

Dez amostras coletadas em Ribeirão Preto foram enviadas para o Núcleo de Pesquisa em Palinologia do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo para análise polínica. Para a preparação das lâminas de microscopia foram utilizados 2 g de cada amostra homogeneizada por maceração.

A preparação das amostras seguiu o método padrão Europeu de MAURIZIO e LOUVEAUX (1965) para amostras de mel, sem o uso da acetólise, com algumas modificações sugeridas em Barth et al. (2009) e Modro et al. (2009), que consistem primeiramente na maceração de cada amostra até diluição, homogeneização em 10 mL de álcool a 70% com posteriores lavagens em água destilada e água glicerinada. A vedação foi realizada com parafina derretida e o excesso foi retirado manualmente com gilete e algodão embebido com álcool 70%.

Cinco lâminas de cada amostra foram confeccionadas para se obter resultados significativos. O uso deste método evita a perda de informações importantes para a identificação dos tipos polínicos entomófilos (proveniente de plantas polinizadas por abelhas), como por exemplo, aspecto do citoplasma, a presença ou não de trifina e óleos (BARTH, 1989). Além disso, essa técnica não provoca a mudança de coloração dos grãos de pólen, servindo para a comparação com a bibliografia melissopalínológica existente no Brasil.

Na análise qualitativa das amostras, a identificação dos grãos de pólen foi feita com base em suas morfologias, descrevendo-se sumariamente suas características estruturais e designando-os como “tipos polínicos”. O tipo polínico é designado pelo nome de um dos gêneros ou espécie que nele se inclui, ou mesmo somente pela família, não estando relacionado ao Código Internacional de Nomenclatura Botânica, e sim estabelecendo uma proximidade do material analisado a um determinado grupo taxonômico (SALGADO-LABOURIAU, 1973). A identificação dos tipos polínicos foi baseada, principalmente, na comparação com o pólen da coleção de referência de lâminas de microscopia de plantas brasileiras da Palinoteca do Instituto de Botânica, assim como em catálogos polínicos.

Na análise quantitativa foram identificados e contados aproximadamente 1000 grãos de pólen por amostra. A determinação da contribuição polínica das plantas da flora apícola polinífera foi realizada pela análise percentual de cada tipo polínico observado em cada amostra, realizando-se o cálculo de frequência, agrupando-os em classes de acordo com Zander (*apud* BARTH, 1989): pólen dominante (PD) maior ou igual a 45% do total de grãos de pólen contados; pólen acessório (PA) entre 15% e 45%; pólen isolado importante (PII) entre 3% e 15%; e pólen isolado ocasional (PIO) menor ou igual a 3%. De acordo com as frequências observadas, a representatividade de cada tipo polínico foi estabelecida em cada amostra relacionando-se ao porte da planta.

IV.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.4.1 LEVANTAMENTO DOS AGROTÓXICOS A SEREM INCLUÍDOS NO ESTUDO

No raio de 1 km, existem sete propriedades ao redor do local onde o apiário foi instalado no campo experimental (Figura 27), com distância mínima de aproximadamente 150 metros (propriedade 1) e distância máxima de aproximadamente 950 metros em linha reta (propriedades 4 e 6). As propriedades 1 e 4 cultivam somente gramíneas para pastagem; 2 e 3 são produtoras de laranja; 5 e 6 são fazendas de plantação de cana de açúcar; e na propriedade 7, a principal atividade é a produção de mudas de plantas ornamentais.



Figura 25. Imagem de satélite Campo Experimental da Embrapa Meio Ambiente. Fonte: Google Maps. Propriedades 1 e 4-cultivo de gramíneas para pastagem; 2 e 3- plantação de laranja; 5 e 6- plantação de cana de açúcar; e na propriedade 7- plantação de mudas de plantas ornamentais. ■ – local de instalação do apiário experimental.

Embora o questionário fosse simples, foi observada grande resistência dos agricultores em relação ao fornecimento de informações sobre o uso de agrotóxicos. A Tabela 16 apresenta as informações que foram obtidas em apenas três das sete propriedades visitadas.

Tabela 16. Informações sobre as atividades agrícolas e substâncias utilizadas em três das propriedades vizinhas do campo experimental, obtidas durante as entrevistas.

Propriedade	Função do entrevistado	Principal atividade	Substâncias utilizadas	Classe	Classificação
1	Agrônomo responsável	Gramíneas	Deltametrina	Piretroide	Inseticida
			2,4-D*	Clorofenoxiácido	Herbicida
2	Gerente	Plantação de laranja	Abamectina	Avermectinas	Inseticida
			Carbendazin	Imidazol	Fungicida
			Mancozebe	Carbamato	Fungicida
			Espirodiclofeno	Cetoenol	Inseticida
			Imidaclopride	Neonicotinoide	Inseticida
			Tiofanato metílico	Imidazol	Fungicida
			Dimetoato	Organofosforado	Inseticida
			Beta ciflutrina	Piretroide	Inseticida
			Glifosato	Fosfoglicina	Herbicida
3	Agrônomo responsável	Plantação de laranja	Abamectina	Avermectinas	Inseticida
			Imidaclopride	Neonicotinoide	Inseticida

* 2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético.

De acordo com os entrevistados, todas as substâncias informadas são aplicadas somente quando necessário, sendo que nos laranjais, o uso das substâncias citadas ocorre principalmente na época das floradas, conforme relatado.

Entre as substâncias listadas, os inseticidas dimetoato, ciflutrina e deltametrina, foram incluídos neste trabalho por serem compatíveis com a análise por cromatografia a gás. Os demais agrotóxicos: abamectina, carbendazin, tiofanato metílico, espirodiclofeno, 2,4-diclorofenoxiacético, imidaclopride, mancozebe e glifosato não puderam ser incluídos uma vez que são incompatíveis com o método de escolha.

A abamectina tem sido determinada em diversas matrizes por cromatografia líquida com detectores de ultravioleta (HERNÁNDEZ-BORGES *et al.*, 2007), fluorescência (DISERENS e HENZELIN, 1999) e espectrometria de massas (DURDEN, 2007; POZO *et al.*, 2003; VALENZUELA *et al.*, 2000).

Para a determinação de carbendazin, o grupo de Liu (2009) utilizou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodos. Grujic *et al.* (2005) descreveram um método utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) para a determinação de carbendazin em suco de frutas, assim como o grupo de Nakamura (2011), que fez a determinação de carbendazin em produtos agrícolas, como arroz, soja e tomate por LC-MS/MS.

Entre as substâncias utilizadas no entorno do apiário, também são determinadas por cromatografia líquida, o tiofanato metílico (TAYLOR *et al.*, 2002; GRANBY *et al.*, 2004), o espirodiclofeno (HIEMSTRA e KOK, 2007; PIZZUTTI *et al.*, 2009) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (TAYLOR *et al.*, 2002; KASHYAP *et al.*, 2005).

Devido a sua baixa volatilidade, geralmente a determinação de imidaclopride também é realizada por cromatografia líquida (PROENÇA *et al.*, 2005; PIZZUTI *et al.*, 2009). A análise por cromatografia a gás foi descrita para análise de vegetais como tomate. No entanto, antes da análise é necessária uma etapa de hidrólise em meio básico para formação de um produto volátil e estável termicamente.

A análise direta de ditiocarbamatos (DTC) como mancozebe por cromatografia, por exemplo, é inviável devido à formação de complexos destas substâncias com íons metálicos geralmente formando polímeros, muito pouco solúveis na maioria dos solventes orgânicos. Um método muito utilizado para detecção de ditiocarbamatos em hortaliças e frutas é por espectroscopia na faixa UV/VIS (ultravioleta/visível). Este método se baseia na determinação do CS₂ gerado após a digestão ácida dos DTC, na presença de cloreto estanoico (CALDAS *et al.*, 2004).

A determinação do glifosato por cromatografia a gás necessita de reações de derivatização para obtenção de compostos voláteis, visto que o analito apresenta elevada polaridade e pouca volatilidade (AMARANTE Jr. *et al.*, 2002; SEE *et al.*, 2010).

Durante o período de monitoramento, entre março de 2012 e julho de 2013 foram utilizados no campo experimental, os inseticidas imidaclopride e cipermetrina; o fungicida procimidona; os herbicidas oxifluorfen e glifosato; e o inseticida biológico Dipel[®].

Nos meses em que as coletas de pólen apícola foram realizadas (março e maio de 2012 e março, abril e maio de 2013), somente o glifosato e o Dipel[®] foram utilizados no campo experimental.

Considerando a necessidade do desenvolvimento de um método analítico multirresíduos que poderia ser utilizado para ações de monitoramento em outras regiões, buscou-se maximizar a quantidade de substâncias a serem determinadas, através da inclusão de agrotóxicos muito utilizados no Brasil e que estivessem incluídos no Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), do Ministério da Agricultura (MAPA) e/ou no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foram incluídas, ainda, algumas substâncias proibidas que poderiam apresentar resíduos devido a sua persistência ou uso ilegal.

No total, foram incluídas 69 substâncias no levantamento, entre as quais, 51 (74%) estavam incluídas no PNCRC e 61 (88%) no PARA, sendo que 45 substâncias (65%) estavam incluídas em ambos os programas de monitoramento.

Em relação aos agrotóxicos proibidos, foram selecionadas 19 substâncias, entre as quais, 16 (84%) estão incluídas no PARA e 7 (37%) no PNCRC.

Entretanto, nos estudos para avaliação do potencial do pólen apícola como bioindicador, foram incluídas somente 26 (38%) substâncias, para as quais o método analítico foi validado (Capítulo 3). Entre essas substâncias, 25 (96%) estão incluídas no PARA, da ANVISA, 18 (69%) estão incluídas no PNCRC, e 9 (35%) tem seu uso proibido no Brasil, conforme detalhado na Tabela 17.

Tabela 17. Substâncias incluídas nos estudos para avaliação do potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos. Classificação e programas de monitoramento oficiais no qual estão inseridas.

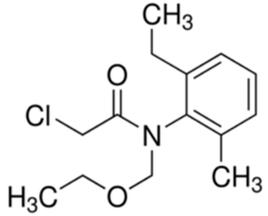
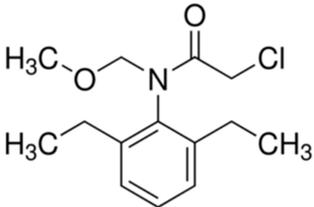
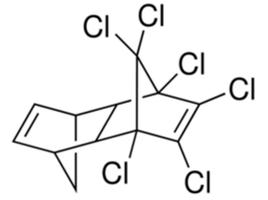
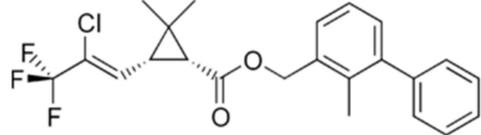
Agrotóxico	Grupo	Classificação	PNCRC	PARA	Uso proibido
Acetocloro	Outros	Herbicida	X		
Alacloro	Outros	Herbicida	X	X	
Aldrin	Organoclorado	Inseticida		X	X
Bifentrin	Piretroide	Inseticida	X	X	
Bioaletrina	Piretroide	Inseticida		X	
Clorpirifós Metil	Orgafosforado	Inseticida	X	X	
DDT	Organoclorado	Inseticida		X	X
Dissulfoton	Orgafosforado	Inseticida e Nematicida	X	X	
Endossulfan alfa	Organoclorado	Inseticida	X	X	X
Endossulfan beta	Organoclorado	Inseticida	X	X	X
Etrinfós	Orgafosforado	Inseticida		X	X
Fempropatrim	Piretroide	Inseticida	X	X	X
Fentoato	Orgafosforado	Inseticida	X	X	
Fluazifope	Outros	Herbicida	X	X	
Fosalone	Orgafosforado	Inseticida		X	

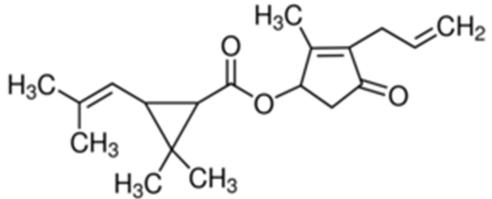
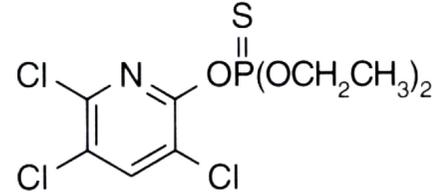
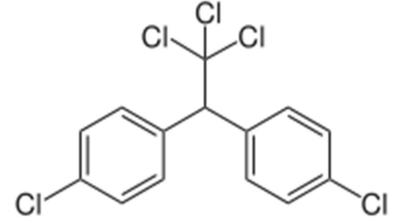
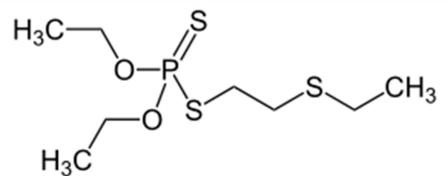
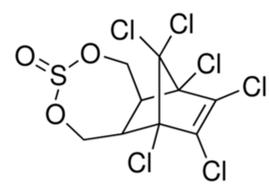
Heptacloro Epóxido	Organoclorado	Inseticida		X	X
Hexaclorobenzeno	Organoclorado	Inseticida		X	
Malation	Orgafosforado	Inseticida	X	X	
Oxifluorfen	Outros	Herbicida	X	X	
Paration Etil	Orgafosforado	Inseticida		X	X
Paration Metil	Orgafosforado	Inseticida e Nematicida	X	X	X
Pendimetalina	Dinitroanilida	Herbicida	X	X	
Permetrina	Piretroide	Inseticida	X	X	
Pirimifós Etil	Orgafosforado	Inseticida		X	
Terbufós	Orgafosforado	Inseticida e Nematicida	X	X	
Trifluralina	Dinitroanilida	Herbicida	X	X	

PNCRC: Programa nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
 PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos.

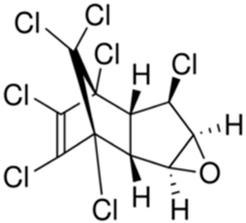
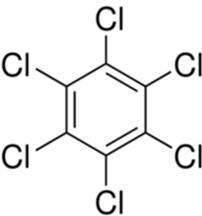
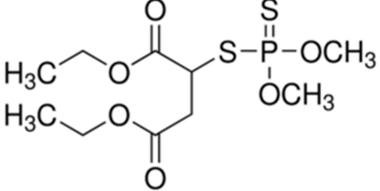
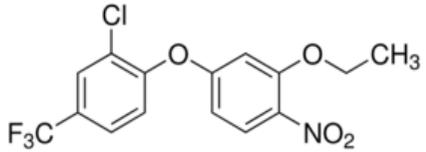
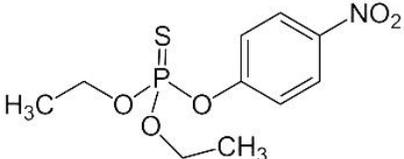
A Tabela 18 apresenta as propriedades físico-químicas das 26 substâncias incluídas nos estudos.

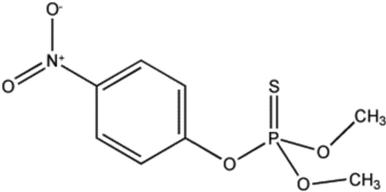
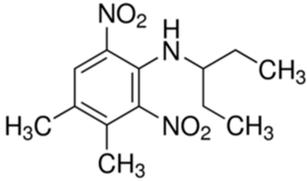
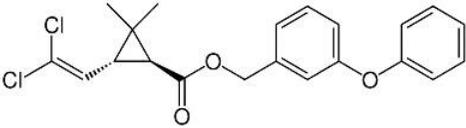
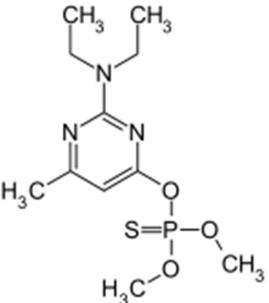
Tabela 18. Propriedades físico-químicas das 26 substâncias incluídas no estudo de avaliação do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos.

Agrotóxico	Massa molar (g mol ⁻¹)	Log P*	Solubilidade em água* (mg L ⁻¹)	Estrutura molecular
Acetocloro	269,8	4,1	282,0	
Alacloro	269,8	3,5	240,0	
Aldrin	364,9	6,5	0,03	
Bifentrin	422,9	6,6	<0,01	

Bioaletrina	302,4	4,7	4,6	
Clorpirifós Metil	350,6	4,0	2,74	
DDT	354,5	6,9	<0,01	
Dissulfoton	274,4	3,95	25	
Endossulfan (alfa e beta)	406,9	4,74	0,32	

Etrinfós	292,3	2,9	40,0	<chem>CC1=CN(C=C(C=C1)OCC)OP(=S)(OC)OC</chem>
Fempropatrim	349,4	6,04	0,3	<chem>CC1(C)C(C1)C(=O)OCC(C#N)c2ccc(Oc3ccccc3)cc2</chem>
Fentoato	320,4	3,7	11,0	<chem>CCOC(=O)C(c1ccccc1)SOP(=S)(OC)OC</chem>
Fluazifope	383,4	4,5	1,0	<chem>CC(O)C(=O)O[C@H](C)c1ccc(Oc2cc(F)(F)Fcn2)cc1</chem>
Fosalone	367,8	4,0	1,4	<chem>CCOP(=S)(OC)OCCN1C(=O)OC2=CC=C(Cl)C=N21</chem>

Heptacloro Epóxido	373,3	5,4	0,06	
Hexaclorobenzeno	284,8	3,93	<0,01	
Malation	330,4	2,75	148,0	
Oxifluorfem	361,7	4,9	0,2	
Paration Etil	291,3	3,8	12,4	

Paration Metil	263,2	2,9	55,0	
Pendimetalina	281,3	5,2	0,3	
Permetrina	391,3	6,1	0,2	
Pirimifós Etil	305,3	4,9	93,0	

Terbufós	288,4	4,5	4,5	
Trifluralina	335,3	5,3	0,2	

* Fonte: IUPAC. Agrochemical information, 2014.

IV.4.2. ESTUDOS DE SORÇÃO DE AGROTÓXICOS EM PÓLEN APÍCOLA

Para avaliação do potencial do pólen apícola como um bioindicador da contaminação ambiental é fundamental o conhecimento de sua afinidade em relação às substâncias em estudo.

Com o intuito de se determinar os coeficientes de sorção e isothermas de sorção do pólen apícola em relação aos agrotóxicos, estudos de sorção foram realizados de acordo com os procedimentos estabelecidos e padronizados para sorção de compostos orgânicos em solo. De acordo com o Guia OECD 106 (2000), os estudos preliminares têm como objetivo avaliar a razão soluto/solução ótima para cada substância, a sorção no frasco utilizado e o tempo de equilíbrio (OECD, 2000).

Como esse foi o primeiro estudo relacionado à sorção dos agrotóxicos em pólen apícola, objetivou-se avaliar a sorção de substâncias com diferentes características químicas, particularmente o log P. O log P, que é o logaritmo da razão da concentração do soluto na fase orgânica e na fase aquosa, é o valor utilizado para caracterizar a lipofilia de uma substância, permitindo, assim, obter uma estimativa de sua absorção em matrizes lipofílicas. Os valores de log P para os agrotóxicos em estudo variaram de 2,75 a 6,9 (Tabela 18). Dessa forma, o aldrin e o malation foram escolhidos para os testes de sorção por possuírem os coeficientes de partição (log P) na faixa superior (acima de 6) e inferior (menor que 3), respectivamente entre os 26 analitos para os quais o método analítico foi desenvolvido e validado.

IV.4.2.1. SORÇÃO NO FRASCO

Nos testes de sorção dos analitos no frasco de polipropileno, o aldrin apresentou alta afinidade pelo polipropileno com aproximadamente 50% de sorção no equilíbrio, para soluções aquosas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com as normas da OECD 106 (2000), a sorção no tubo é considerada aceitável quando pelo menos 90% da concentração da substância em estudo permanece em solução. Desta

forma, todos os testes para o aldrin foram realizados em tubos de vidro, no qual a sorção foi desprezível.

Os testes para o malation foram feitos em tubos de polipropileno, já que não foi observada afinidade significativa deste analito pelo polipropileno ou vidro no mesmo nível de concentração avaliado para o aldrin.

Todos os resultados obtidos estão detalhados na Tabela 19, que apresenta os valores de porcentagem de concentração de cada analito sorvida nos tubos de polipropileno e de vidro no tempo inicial e após 20 horas de agitação. Os analitos foram removidos do tubo por lavagem com solvente conforme descrito no Item IV.3.4.1.

Tabela 19. Porcentagem de concentração de aldrin e malation em solução aquosa ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) sorvidos nos tubos de vidro e de plástico no tempo inicial e após 20 horas de agitação.

Tempo (horas)	Sorção no tubo (%)			
	Aldrin		Malation	
	Vidro	Polipropileno	Vidro	Polipropileno
0	2,2	16,6	1,8	2,4
20	5,5	46,9	2,5	3,1

IV.4.2.2. AVALIAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS SORVIDOS

Embora o Guia da OECD 106 (2000) permita que as determinações da quantidade sorvida da substância sejam realizadas na solução aquosa que ficou em contato com o sorvente (método indireto) priorizou-se, neste trabalho, a determinação do agrotóxico diretamente no pólen (método direto). No entanto, o método indireto também foi avaliado. O método direto de fato é mais apropriado, uma vez que o objetivo do ensaio é estabelecer a quantidade da substância sorvida no sorvente. No entanto, por empregar, de modo geral, procedimentos mais simples de preparo de amostras, os métodos indiretos têm sido mais usados,

principalmente quando a quantificação é realizada por cromatografia líquida. No presente trabalho, uma vez que a solução aquosa é incompatível com a cromatografia a gás, uma partição com solvente teria que ser empregada no preparo de amostra, tanto da solução que ficou em contato com o pólen, como o próprio pólen.

Os resultados de precisão obtidos nos ensaios para avaliação da melhor condição de extração estão detalhados na Tabela 20.

Tabela 20. Resultados de precisão dos métodos para determinação de aldrin e malation em pólen por partição com ACN e em solução aquosa por partição com acetato de etila. Concentração inicial dos analitos igual a $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$.

	Fase analisada	Concentração média ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Precisão (DPR %)
Aldrin (n=3)	Pólen	0,788	2,0
	Sobrenadante	0,134	34,4
Malation (n=3)	Pólen	0,614	2,3
	Sobrenadante	0,302	18,1

A determinação direta dos agrotóxicos, no pólen, forneceu resultados de precisão adequados, com valores de desvio padrão relativo iguais a 2,0% e 2,3% para aldrin e malation, respectivamente, enquanto a determinação indireta, no sobrenadante, não apresentou resultados adequados de precisão.

O balanço de massa (somatória da concentração do agrotóxico no sobrenadante e pólen) para o aldrin foi de 92,6% e para o malation de 91,6%, o que pode ser considerado aceitável para o nível de concentração e pelo método de análise empregado.

Para os ensaios subsequentes (estudos de sorção), foi determinada a concentração do agrotóxico sempre no pólen em vez da solução.

IV.4.2.3. RAZÃO PÓLEN/ÁGUA

De acordo com a OECD (2000), testes preliminares devem ser feitos para a determinação da razão de solo/solução ideal, que depende do coeficiente de

distribuição K_D e a porcentagem de sorção. O guia estabelece que as razões soluto/solução ótimas devem resultar em uma sorção maior que 20% e preferencialmente maior que 50% no equilíbrio.

Para definição da razão pólen/água adequada, inicialmente foram realizados estudos exploratórios que indicaram alta afinidade destas substâncias pelo pólen apícola. De acordo com a OECD (2000), ensaios com substâncias que apresentem forte sorção em relação ao soluto podem ser realizados em suspensões com razão sorvente/solução até 1/100 m/v.

Nos testes com a razão pólen/água 1/100 m/v foram obtidos resultados adequados com sorção de 60% do agrotóxico malation e 80% do agrotóxico aldrin no pólen no tempo de equilíbrio. Os resultados apresentaram precisão com valores de desvio padrão relativo iguais a 1,7% e 2,1% para malation e aldrin, respectivamente.

IV.4.2.4. CINÉTICAS DE SORÇÃO PARA OS ANALITOS

A determinação do tempo de equilíbrio de sorção é uma etapa fundamental demandada pela OECD 106 para a realização dos estudos de sorção/dessorção em solos (OECD, 2000).

Os tempos de equilíbrio foram estabelecidos por meio do gráfico da sorção de cada analito versus o tempo de agitação (0, 1, 2, 4, 5, 7, 20, 24 e 48 h) (Figura 28). A concentração inicial dos analitos em contato com o pólen foi de $1,000 \mu\text{g g}^{-1}$ para o aldrin e o malation.

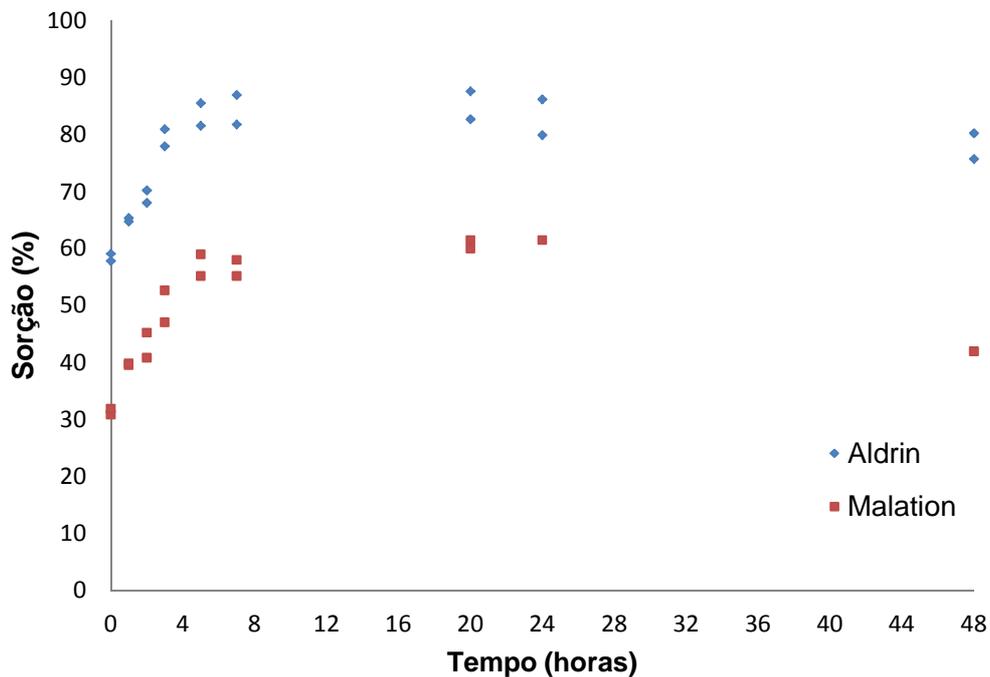


Figura 26. Perfil de sorção dos analitos aldrin e malation em pólen apícola em relação ao tempo. Concentração inicial dos analitos igual a $1,000 \mu\text{g g}^{-1}$.

Para ambos os analitos, observou-se o mesmo perfil de sorção, rápida nas primeiras horas até alcançar um período de equilíbrio entre 7 e 24 horas. Em 48 horas, a concentração do malation apresentou uma diminuição de aproximadamente 30%, provavelmente devido a sua hidrólise ou biodegradação. A concentração de aldrin, um organoclorado persistente, permaneceu praticamente inalterada entre 24 h e 48 horas.

Os resultados das cinéticas foram modelados pelas equações de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Elovich, todas na forma linear. Baseado nos coeficientes de correlação, o modelo de pseudo-segunda ordem foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais para os dois compostos ($r > 0,99$) (Tabela 21).

Tabela 21. Parâmetros cinéticos de sorção para aldrin e malation.

Modelos	Parâmetros	Analitos	
		Aldrin	Malation
Elovich	$(1/Y) \ln(XY)$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,381	0,075
	$1/Y$ ($\mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$)	0,07	0,08
	r	0,816	0,919
Pseudo-primeira- ordem	q_e ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,876	0,615
	$k_1 \times 10^{-4}$ ($\mu\text{g g}^{-1} \text{min}^{-1}$)	25,3	46,1
	r	0,770	0,941
Pseudo-segunda- ordem	q_e ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,901	0,615
	$k_2 \times 10^{-4}$ ($\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$)	933,8	472,2
	r	0,998	0,998

Os valores teóricos de q_e para aldrin e malation estão de acordo com os resultados experimentais apresentados na Figura 28. Os valores mais altos de k_2 indicam a sorção mais rápida do aldrin no pólen em relação ao malation.

IV.4.2.5. ISOTERMAS DE SORÇÃO

As isotermas em fase líquida, representadas por curvas que mostram a variação da concentração do soluto na fase sólida em função da concentração na fase aquosa, em uma determinada temperatura, constituem a primeira informação experimental para se conhecer a capacidade de sorção de uma matriz. A forma das isotermas indica o tipo de interação entre o composto em estudo e a matriz sorvente.

Os processos de sorção e dessorção são determinados pelas propriedades do sorvente, como polaridade, presença de grupos de ligação, porosidade e área

de superfície; do soluto, como a natureza do composto, se orgânico ou inorgânico, e estrutura química, como carga iônica, tamanho da molécula, presença de anéis e de grupos polares; e fatores externos tais como pH, temperatura e intensidade de agitação, que também são capazes de afetar o processo de sorção (MARSHALL *et al.*, 1999).

Com o objetivo de estimar a quantidade de cada substância sorvida por grama de pólen em função da concentração de analito em solução as isotermas, ajustadas a forma linear da equação de *Freundlich*, foram construídas (Figura 29).

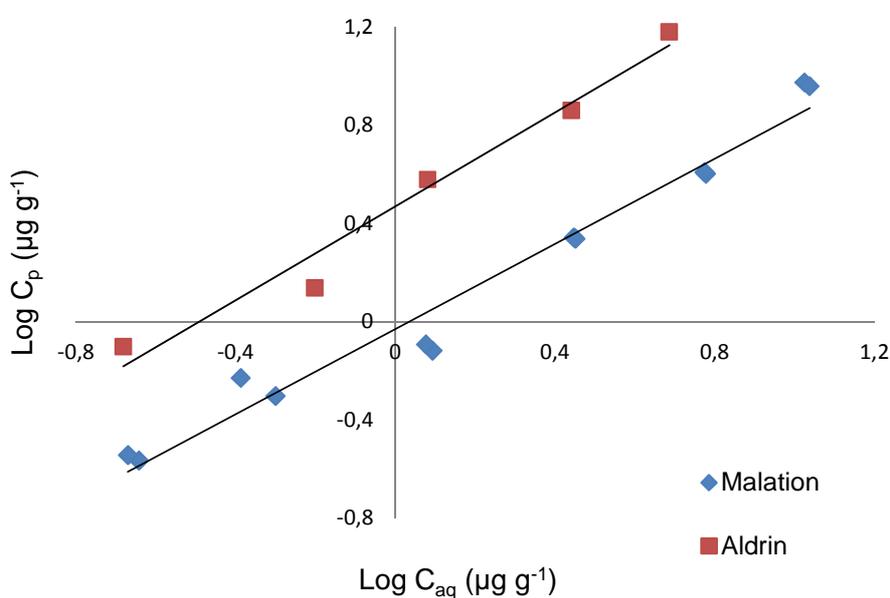


Figura 27. Isotermas de sorção para os agrotóxicos aldrin (■) e malation (◆) em pólen apícola, ajustadas à forma logarítmica da Equação de *Freundlich*.

Os dados obtidos pela equação de *Freundlich* na forma linear (logarítmica) foram modelados e os parâmetros calculados para o aldrin e o malation estão (Tabela 22).

Tabela 22. Coeficiente de sorção de *Freundlich* (K_F), sensibilidade ($1/n$), coeficiente de correlação (r) para aldrin e malation.

Modelo	Parâmetros	Analitos	
		Aldrin	Malation
	Log P	6,5	2,4
<i>Freundlich</i>	K_F ($\mu\text{g}^{1-1/n}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}$)	2,946	0,934
	$1/n$	0,956	0,867
	R	0,986	0,985

De acordo com os resultados obtidos, os agrotóxicos aldrin e malation apresentam forte afinidade pelo pólen apícola. O aldrin apresentou maior coeficiente de sorção, tanto nos testes de cinética como nos estudos das isotermas de sorção, indicando sua maior afinidade pelo pólen apícola em relação ao malation. Muito provavelmente, a interação hidrofóbica do agrotóxico por sítios lipofílicos do pólen, que apresenta em sua constituição 10 a 36% de proteínas, aproximadamente 5% de lipídios, além de açúcares, fibras vegetais, minerais e vitaminas, é a responsável pelo processo de sorção.

Na análise das cinéticas de sorção, bem como dos coeficientes de sorção de *Freundlich* (K_F) foi observada uma relação direta entre a afinidade dos agrotóxicos pelo pólen apícola e o coeficiente de partição (log P).

Desta forma, os resultados indicaram o potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental pelos agrotóxicos estudados, devido a grande probabilidade destas substâncias, quando presentes no ambiente, serem transferidas para o pólen, considerando que a alta capacidade de sorção desta matriz mesmo para o malation, que apresenta o menor valor de log P entre os agrotóxicos incluídos neste trabalho (Tabela 18).

IV.4.3. MONITORAMENTO AMBIENTAL PARA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR AGROTÓXICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA

IV.4.3.1. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS

IV.4.3.1.1. Coleta e processamento das amostras de pólen apícola provenientes do campo experimental

Entre março de 2012 e maio de 2013, foram realizadas cinco etapas de coleta de amostras de pólen apícola nas dez colmeias posicionadas no campo experimental da EMBRAPA. No total foram coletadas 145 amostras, tendo sido obtidas 30 amostras por mês nos meses de maio de 2012 e março, abril e maio de 2013. Em março de 2012 foram obtidas apenas 25 amostras devido ao período de adaptação das colmeias aos coletores de pólen.

Na Figura 30, em que são apresentados os valores médios de massa das amostras coletadas, pode-se observar que houve grande variação na quantidade de pólen coletado nas diferentes colmeias, sendo que as médias variaram entre 5 g para a colmeia número 8 e 29 g para a colmeia número 5.

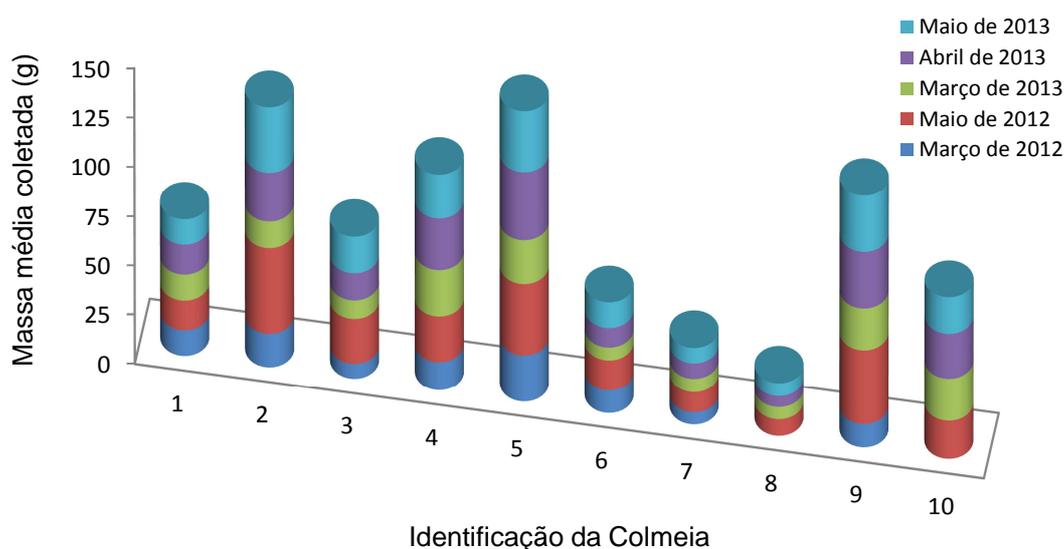


Figura 28. Valores médios de massa (g) das amostras de pólen apícola coletadas entre março de 2012 e maio de 2013, por colmeia do apiário experimental.

A produtividade de pólen pode ser influenciada por muitos fatores, como pouca disponibilidade de plantas fornecedoras de pólen; entrada e armazenamento de pólen na colmeia; rainha com baixa postura; rainha com carga genética inadequada para produção de pólen; falta de espaço para a rainha fazer a postura; falta ou pouca alimentação; excesso de vento no alvado; morte de larvas provocada por doença; enxames muito fracos; e enxames muito populosos (MAGALHÃES, 2005).

Considerando que todas as caixas e coletores de pólen eram iguais nas 10 colmeias, e que não havia problemas de doença ou extremos de população nas colmeias, e que todas as colônias tinham acesso ao mesmo tipo e quantidade de alimento, a diferença na produtividade foi atribuída às características genéticas de cada colmeia.

A umidade das amostras coletadas variou entre 3% e 48%, de acordo com o clima nos períodos de coleta.

IV.4.3.1.2. *Análise das amostras de pólen apícola para determinação de agrotóxicos*

Todas as amostras de pólen apícola coletadas no campo experimental foram analisadas em duplicata através do método analítico com preparo de amostras por QuEChERS, desenvolvido e validado anteriormente.

Entre as 145 amostras coletadas, 18 (12%) apresentaram resultados positivos para a pendimetalina, porém com uma concentração abaixo do limite de quantificação do método e 4 amostras (3%) apresentam resultado positivo para a bioatetrina, porém também inferior ao limite de quantificação. Para ambos os analitos, o LOQ do método analítico é igual a $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$.

Amplamente utilizada no Brasil, a pendimetalina é um herbicida do grupo das dinitroanilinas (herbicidas amarelos), utilizado no controle anual da maioria das gramíneas e de ervas daninhas de folhas largas em culturas de milho, batata, arroz, algodão, soja, tabaco, amendoim e girassol (COUTINHO *et al.*, 2005; RODRIGUES e ALMEIDA, 2005). Para os seres humanos, a pendimetalina é

levemente tóxica podendo ser moderadamente irritante para as mucosas da boca, do nariz, da garganta e dos pulmões.

A bioaletrina pertence à classe dos piretroides, que são amplamente utilizados para controle de várias pragas na agricultura. Devido a sua baixa toxicidade para o homem e sua rápida e eficaz ação inseticida, os piretroides são utilizados como inseticidas domésticos e nas formulações de loções e shampoos antipediculose e antiparasitários. No Brasil, o uso da bioaletrina está autorizado somente para uso domissanitário (ANVISA, 2010b).

Considerando a alta afinidade do pólen apícola pelos agrotóxicos, os níveis baixos ou indetectáveis dos agrotóxicos nas amostras coletadas foram atribuídos ao não uso das substâncias investigadas ao redor do apiário e/ou preferência floral das abelhas em relação às espécies disponíveis na mata nativa, naturalmente protegidas de contaminação.

IV.4.3.2. Coleta e análise de amostras de PUF para determinação de agrotóxicos

Durante o estudo foram coletadas 30 amostras de PUF nos mesmos períodos de coleta das amostras de pólen apícola, sendo 6 esponjas em cada etapa de coleta.

Na análise das amostras, nenhuma das esponjas apresentou níveis detectáveis dos agrotóxicos analisados.

IV.4.4. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PROVENIENTES DE APIÁRIOS COMERCIAIS

IV.4.4.1. AMOSTRAS COLETADAS EM APIÁRIOS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO, SP

No total foram recebidas 21 amostras de pólen apícola, provenientes de diferentes apiários da região de Ribeirão Preto, São Paulo. De acordo com o relato dos apicultores, em dois apiários houve morte de abelhas, com suspeita de contaminação por agrotóxicos. Em ambos os apiários com suspeita de contaminação, foram coletadas amostras em duas colônias, sendo uma em que

houve morte de abelhas e outra saudável. As demais amostras foram coletadas aleatoriamente em outros apiários.

Em relação à quantidade de amostra coletada em cada colmeia, houve uma grande variação entre 5 g e 260 g. A umidade das amostras coletadas variou entre 9% e 45%.

IV.4.4.2. ANÁLISE POLÍNICA DAS AMOSTRAS CONTAMINADAS COLETADAS EM RIBEIRÃO PRETO

Nas 10 amostras analisadas foram identificados 38 tipos polínicos, reconhecendo-se 33 gêneros e 23 famílias: *Alibertia* (Rubiaceae), *Althernanthera* (Amaranthaceae), *Amaranthus* (Amaranthaceae), *Anadenanthera* (Fabaceae), *Antigonum leptopus* (Polygonaceae), *Asteraceae* tipo 1, *Astronium* (Anacardiaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Bidens* (Asteraceae), *Borreria* (Rubiaceae), *Caesalpinia* (Fabaceae), *Cecropia* (Cecropiaceae), *Citrus* (Rutaceae), *Commelina* (Commelinaceae), *Diodia* (Rubiaceae), *Emilia sonchifolia* (Asteraceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Eugenia/Syzygium* (Myrtaceae), *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), Fabaceae, *Hyptis* (Lamiaceae), *Malpighiaceae*, *Maytenus* (Celastraceae), *Melastomataceae/Combretaceae*, *Mimosa caesalpiniaefolia* (Fabaceae), *Myrcial/Psidum* (Myrtaceae), *Nectandra/Ocotea* (Lauraceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Pinus* (Pinaceae), *Piper* (Piperaceae), *Poaceae*, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *Sida* (Malvaceae), *Tapirira* (Anacardiaceae), *Trixis* (Asteraceae), *Schizolobium parahyba* (Fabaceae), *Sorocea* (Moraceae), *Vernonia* (Asteraceae). Não foi possível identificar 3 tipos de pólen (Não identificado microreticulado, Não identificado 1 e Não identificado reticulado).

Os tipos polínicos mais frequentes (>45%) foram *Althernanthera* e *Citrus*, seguidos de *Bidens* com 15 a 45%. O restante apresentou baixa frequência.

Com os resultados obtidos verificou-se o grande predomínio de pólen de plantas herbáceas, seguido pelo de plantas de cultivo (*Citrus*) e, com menor representatividade o de espécies arbóreas exóticas (*Eucalyptus*) e da mata.

A amostra proveniente da colônia pertencente ao apiário com suspeita de contaminação (RP57), porém que não foi afetada, apresentou perfil de pólen heterofloral com maior contribuição do pólen de ervas (*Baccharis* e *Bidens*) e *Eucalyptus*. A amostra coletada no mesmo apiário, na colônia em que houve morte de abelhas (RP58), apresentou predominância de grãos de pólen do gênero *Althernanthera*, família *Amaranthaceae*, que são conhecidas por serem plantas daninhas que se desenvolvem em meios aquáticos ou em terra firme.

No outro apiário atingido, a amostra coletada na colônia com suspeita de contaminação (RP59) apresentou perfil heterofloral com maior contribuição do pólen de plantas cítricas cultivadas do gênero *Citrus* (72,5 %).

Todas as demais amostras apresentaram perfil monofloral de ervas do gênero *Althernanthera*.

IV.4.4.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PÓLEN APÍCOLA PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS

Todas as 21 amostras de pólen apícola coletadas nos apiários em Ribeirão Preto foram analisadas em duplicata através do método analítico com preparo de amostras por QuEChERS, desenvolvido e validado anteriormente.

Entre as 21 amostras coletadas, 7 (33%) estavam contaminadas com pelo menos um agrotóxico, sendo que em 5 (24%) amostras foram detectadas duas ou três substâncias, conforme detalhado na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados obtidos na análise de amostras de pólen apícola coletadas em Ribeirão Preto para determinação de agrotóxicos.

Agrotóxicos	Amostras / Concentração média (DPR) ($\mu\text{g g}^{-1}$)						
	RP59	RP62	RP64	RP67	RP68	RP70	RP74
Trifluralina	0,035 (0,002)						
Bioaletrina	0,43 (0,01)						
Aldrin	<0,025			0,102 (0,009)		<0,025	
Endossulfan alfa	0,145 (0,001)						
Fempropatrim					<0,025	<0,025	<0,025
Alacloro	<0,050						
Permetrina				<0,050	<0,050	<0,050	0,07 (0,02)

Na análise da amostra coletada em um dos apiários em que havia suspeita de intoxicação das abelhas, foram detectados dois herbicidas diferentes, a trifluralina e o alacloro. As amostras coletadas no outro apiário em que houve morte de abelhas, não apresentaram níveis detectáveis dos agrotóxicos avaliados.

A presença do agrotóxico trifluralina, que é um herbicida autorizado para uso em citros e amplamente utilizado no controle de ervas daninhas, foi coerente com o resultado da análise polínica em que foi verificada a predominância de pólen do gênero *Citrus*. Considerada praticamente não tóxica para os seres humanos e para as abelhas, a trifluralina é altamente tóxica para os peixes e outros animais aquáticos, podendo acumular-se nos peixes, além de afetar a sobrevivência de alevinos e crustáceos em exposições crônicas em níveis baixos, em torno de $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$.

Na União Europeia, o LMR para a trifluralina é entre $0,01$ e $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ para frutas e legumes. Como não existe regulamentação em relação aos limites

máximos de resíduos para o pólen, de acordo com a UE, o LMR deve ser considerado igual a $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$, que é o limite padrão, estabelecido para substâncias e produtos não regulamentados (UE, 2005). No Brasil, o LMR para a trifluralina varia entre $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ para legumes e frutas (ANVISA, 2014).

O alacloro é um herbicida utilizado para controle de gramíneas anuais e ervas daninhas, em plantações de milho, algodão, soja, cana-de-açúcar, café, amendoim e girassol. No entanto, o uso deste agrotóxico vem sendo discutido internacionalmente pelos efeitos que pode representar para saúde. A Convenção de Roterdã, um acordo entre países que regula o comércio internacional de certos agrotóxicos e substâncias químicas perigosas, incluiu o alacloro no Anexo III do regulamento, que trata das substâncias químicas sujeitas ao Procedimento de Consentimento Prévio Informado (PIC). Assim, os países signatários da Convenção, como o Brasil, devem adotar medidas de controle no comércio internacional do produto, assegurando informações adequadas sobre os riscos e perigos do alacloro à saúde humana (CETESB, 2012). Embora se saiba que a população está exposta a pequenas quantidades de alacloro através da ingestão de alimentos e água potável contendo resíduos do herbicida, os efeitos da exposição humana a baixas doses ambientais de alacloro ainda não são conhecidos.

Nas demais amostras, o maior nível de contaminação igual a $0,432 \mu\text{g g}^{-1}$ foi encontrado para o inseticida piretroide bioaletrina. Embora essa concentração seja alta, considerando que representa mais da metade da dose letal (DL_{50}) para os mamíferos ($709 \mu\text{g g}^{-1}$), de acordo com a EPA (*US Environment Protection Agency*), a bioaletrina apresenta baixo risco para as abelhas por exposição oral ou de contato, com DL_{50} igual a $3,4 \mu\text{g abelha}^{-1}$ (EPA, 2009; IUPAC, 2014), o que justifica a sobrevivência da colônia contaminada. A bioaletrina que também foi detectada, em níveis abaixo do LOQ, em amostras coletadas no campo experimental, é muito acessível por ser utilizada como inseticida doméstico e pode ter sido utilizada intencionalmente com o objetivo de matar as abelhas.

A permetrina, também pertencente à classe dos piretroides, foi detectada em quatro amostras, sendo uma com $0,070 \mu\text{g g}^{-1}$ em uma amostra e em limites abaixo do LOQ em três amostras. A permetrina é um inseticida moderadamente tóxico para o homem, amplamente utilizado em campanhas de saúde pública, principalmente no controle de ectoparasitas de pequenos animais com produtos de uso doméstico. Na agricultura, é autorizada para uso foliar nas culturas de algodão, arroz, café, citros, couve-flor, feijão, fumo, milho, repolho, soja, tomate, trigo e uva (ANVISA, 2010b). Muito tóxica para as abelhas, principalmente se comparada a bioaletrina, a permetrina apresenta DL_{50} igual a $0,029 \mu\text{g abelha}^{-1}$, podendo provocar a perda da capacidade de orientação impedindo o seu retorno à colmeia.

O Aldrin, que foi detectado em três amostras, é um inseticida que foi muito utilizado entre as décadas de 50 e 70, principalmente nas culturas de algodão e milho, mas seu uso foi banido devido à sua elevada persistência no ambiente e capacidade de bioacumulação. Esse agrotóxico e seu metabólito, dieldrin, fazem parte da lista de poluentes orgânicos persistentes (POP) da Convenção de Estocolmo (ONU, 2001).

Devido à alta persistência, o aldrin e o dieldrin ainda podem ser encontrados no ambiente mesmo que não estejam mais sendo utilizados. O aldrin é convertido em dieldrin sob ação da luz solar e de bactérias. Desse modo, o dieldrin é predominante no ambiente, mesmo quando a substância utilizada foi o aldrin. Ambos os compostos podem ser encontrados na atmosfera a partir de arraste pelo vento por aplicação na lavoura, evaporação de águas contaminadas e adsorção a partículas em suspensão. No solo, o aldrin pode evaporar lentamente ou sofrer oxidação, originando o dieldrin (CETESB, 2009). De acordo com a Resolução do CONAMA 420/2009, o nível máximo permitido para Aldrin em solo é $0,030 \mu\text{g g}^{-1}$ (MMA, 2009).

Pertencente à classe dos organoclorados, o endossulfam que é moderadamente tóxico por via oral ou por contato com a pele (WHO, 2004), foi introduzido comercialmente em 1954 para controle de insetos em frutas, hortaliças, chás e culturas não alimentícias, como tabaco e algodão. Há mais de

20 anos, o endossulfam teve seu uso proibido ou restringido em vários países devido à toxicidade para o ser humano e animais silvestres. Em 2010, o Brasil cancelou o registro de nove produtos à base de endossulfam e estabeleceu uma retirada programada do ingrediente ativo do mercado brasileiro até julho de 2013, quando foi definitivamente proibido. Classificado como um inseticida-acaricida, suas formulações eram autorizadas para aplicação foliar nas culturas de soja, café, algodão e cana-de-açúcar até julho de 2013. Como o aldrin, também faz parte da lista de POPs da Convenção de Estocolmo (CETESB, 2012b).

Em uma das amostras foi detectada a presença de endossulfam alfa, o isômero beta não apresentou níveis detectáveis. Os dois isômeros são biologicamente ativos e as proporções em que se encontram no produto final são 70% isômeros alfa e 30% isômeros beta. Em solos ácidos e neutros a permanência destes isômeros é de um a dois meses para α -endossulfam e de três a nove meses para β -endossulfam em condições aeróbicas (EPA, 2002).

O grupo de Chauzat et al. (2006) relatou a contaminação em 5 amostras (7 %) de pólen apícola com endossulfam em um estudo de monitoramento, realizado durante 3 anos em apiários localizados na França. O nível médio de contaminação foi igual a $0,081 \mu\text{g g}^{-1}$. Wiest et al. (2011) encontraram uma amostra de mel contaminada com endossulfam com concentração inferior a $0,031 \mu\text{g g}^{-1}$ entre as 142 amostras coletadas em 16 apiários da França entre 2008 e 2009.

No Brasil, em um estudo realizado com amostras de pólen apícola provenientes das cinco regiões, Santos e Funari (2005) detectaram aldrin em uma amostra, em concentração igual a $0,002 \mu\text{g g}^{-1}$, e endossulfam em 19 amostras, em níveis que variaram entre $0,001$ e $0,033 \mu\text{g g}^{-1}$. No total, entre as 69 amostras analisadas, 34 (49%) amostras estavam contaminadas com esses ou outros agrotóxicos proibidos, como zolone, dieldrin, endrin aldeído, heptacloro epóxico, endrin, p,p'-DDE e p,p'-DDT, em níveis que variaram entre $0,001$ e $0,094 \mu\text{g g}^{-1}$. Compostos organofosforados, como o cumafós, fention, diclorvós, diazinon, malation, zolone, paration metil também foram encontrados em 31 amostras (45 %) em níveis entre $0,001$ e $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$. Os piretroides deltametrina, ciflutrina, cipermetrina e permetrina foram encontrados em 41 amostras (59 %). Os níveis de

permetrina variaram entre 0,001 e 0,272 $\mu\text{g g}^{-1}$ e em uma das amostras a soma dos piretroides atingiu 0,715 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Resíduos de aldrin e endossulfan também foram encontrados em amostras de mel que foram coletadas na região de Bauru, São Paulo, entre 1999 e 2004. Os níveis de contaminação variaram entre 0,001 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,021 $\mu\text{g g}^{-1}$ (RISSATO *et al.*, 2006).

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES FINAIS

Através do levantamento de dados no campo experimental da Embrapa Meio Ambiente, Jagariúna, SP e nas propriedades vizinhas, e coleta de informações nas monografias de agrotóxicos da ANVISA e documentos do PNCRC, um total de 69 substâncias de 6 classes diferentes foram incluídas no estudo para desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em pólen apícola e esponjas de poliuretano. Embora a baixa detectabilidade do detetor de massas *Ion Trap* tenha sido um fator limitante para a determinação da maioria dos analitos na concentração necessária ($<0,100 \mu\text{g mL}^{-1}$), dois métodos analíticos foram desenvolvidos e validados para a determinação dos agrotóxicos acetocloro, alacloro, aldrin, bifentrin, bioaletrina, clorpirifós metil, DDT, dissulfoton, endossulfan alfa, endossulfan beta, etrinfós, fempropatrim, fentoato, fluazifope, fosalone, heptacloro epóxido, hexaclorobenzeno, malation, oxifluorfem, paration etil, paration metil, pendimetalina, permetrina, pirimifós etil terbufós, e trifluralina em amostras de pólen apícola.

O procedimento de preparo de amostras anterior a quantificação por GC-MS/MS *Ion trap* é uma etapa fundamental para garantir a detectabilidade e seletividade do método. O preparo de amostras usando QuEChERS apresentou melhor desempenho (remoção de interferentes e/ou concomitantes) para o preparo de amostras de pólen apícola para determinação de agrotóxicos em relação a partição sólido-líquido com ACN, tendo sido validado para a determinação de 26 agrotóxicos de diferentes classes, com resultados adequados de precisão e exatidão. Os limites de detecção e de quantificação do método analítico variaram entre $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,050 \mu\text{g g}^{-1}$ e entre $0,010 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,100 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

O método analítico com preparo de amostras por partição com ACN foi validado para determinação de 19 agrotóxicos em pólen apícola. Os limites de detecção e de quantificação do método analítico variaram entre $0,010 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,500 \mu\text{g g}^{-1}$ e entre $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,700 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

O emprego de um planejamento experimental do tipo composto central 2^3 para estabelecer as condições ótimas para o método QuEChERS não se mostrou

vantajoso nos objetivos deste trabalho, devido ao número elevado de analitos e do tipo do detetor usado na quantificação.

Nos estudos de sorção do agrotóxico no pólen apícola, foi observada forte afinidade dos agrotóxicos aldrin e malation pelo pólen apícola, que possuem características químicas muito distintas entre si, indicando o potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental pelos agrotóxicos estudados, devido a grande probabilidade destas substâncias, quando presentes no ambiente, serem transferidas para o pólen. Ainda, os estudos evidenciaram a aplicabilidade dos estudos de sorção que são definidos pela OECD para avaliar a sorção de compostos em solos, para o pólen. Mediante a construção de isotermas de *Freundlich* e do coeficiente de *Freundlich* é possível comparar agrotóxicos quanto à afinidade pelo pólen.

Os níveis baixos ou não detectáveis de agrotóxicos nas amostras de pólen apícola coletadas no campo experimental podem ser decorrentes da baixa produção agrícola nos períodos de coleta ou da localização privilegiada das colmeias na mata nativa. Na análise das amostras de PUF, utilizado como amostrador passivo de contaminação ambiental, também não foram encontrados níveis detectáveis dos agrotóxicos investigados, corroborando o não uso destas substâncias na região ou no campo experimental.

A presença de agrotóxicos em 33% das amostras fornecidas por apicultores de Ribeirão Preto confirmou a eficiência do método analítico validado e a necessidade do monitoramento ambiental quanto à presença de resíduos de agrotóxicos.

Os resultados demonstraram o potencial do pólen apícola como bioindicador de contaminação ambiental por agrotóxicos.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANTE, Jr., O.P., SANTOS, T.C.R., BRITO, N.M., RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova*, v.25, n.4, p.589-593, 2002.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC International*, v.86, n.2, p.412-31, 2003.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003. Resolução RDC nº 119, de 19 de maio de 2003, que institui o PARA-Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/anvisa+portal/anvisa/inicio/agrotoxicos+e+toxicologia/publicacao+agrotoxico+toxicologia/programa+de+analise+de+residuos+de+agrotoxicos+em+alimentos+%28para%29>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- ANVISA, 2010b. Agrotóxicos. Monografias autorizadas. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- ANVISA & UFPR, 2012. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 de Abril de 2012. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrotoxicos+em+2012>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- ANVISA, 2014. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), LMRs PARA 2014. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/anvisa+portal/anvisa/inicio/agrotoxicos+e+toxicologia/publicacao+agrotoxico+toxicologia/programa+de+analise+de+residuos+de+agrotoxicos+em+alimentos+%28para%29>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- ARANDA, 2010. La salud no es lo primero en el modelo agroindustrial. *Jornal Página 12* (Argentina) de 14/06/2010. Disponível em: <http://www.pagina12.com.ar/diario/elpais/1-147561-2010-06-14.html>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- ARAÚJO, D. S. Análise dos resultados dos planos de controlo de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal: anos 2007-2009. 2011, 84p. Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Universidade Nova de Lisboa, 2011.
- ARMSTRONG, J.L., DILLS, R.L., YU, J., YOST, M.G., FENSKE, R.A. A sensitive LC-MS/MS method for measurement of organophosphorus pesticides and their oxygen analogs in air sampling matrices. *Journal of Environmental Science and*

- Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v.49, n.2, 2014.
- BACANDRITSOS, N., GRANATO, A., BUDGE, G., PAPANASTASIOU, I., ROINIOTI, E., CALDON, M., FALCARO, C., GALLINA, A., MUTINELLI, F. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.105, p.335–340, 2010.
- BALAYIANNIS, G., BALAYIANNIS, P. Bee Honey as an Environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.55, p.462–470, 2008.
- BALTAZAR, M.T., OLIVEIRA, R.J.D., BASTOS, M.B., TSATSAKISE, A.M., DUARTE, J.A., CARVALHO, F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—A mechanistic approach. *Toxicology Letters*, *Article in press*, 2014.
- BARTH, O.M. 1989. O pólen no mel brasileiro. Gráfica Luxor, Rio de Janeiro.
- BARTH, O.M., MUNHOZ, M.C., LUZ, C.F.P. Botanical origin of *Apis* pollen loads using color, weight and pollen morphology data. *Acta Alimentaria*. v.38, n.1, p133-139, 2009.
- BERRADA, H., JUAN, C. FONT, G. Multiresidue analysis of pesticides in pollen by pressurized liquid extraction and gas chromatography mass spectrometry. *Toxicology Letters*, v.196, Supplement, 17 p, S343, 2010.
- BOLOGNESI, C., MERLO, F.D. Pesticides: Human Health Effects. *Encyclopedia of Environmental Health*, p. 438-453, 2011.
- BRASIL. LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm. Acesso em 15 de julho de 2014.
- BURKLE, L.A., MARLIN, J.C., KNIGHT, T.M. Plant–pollinator interactions over 120 years: loss of species, co-occurrence, and function. *Science*, v.339, p.1611–1615, 2013.
- CALDAS, E.D., MIRANDA, M.C.C., CONCEIÇÃO, M.H., SOUZA, L.C.K.R. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. *Food and Chemical Toxicology*, v.42, p.1877-1883, 2004.
- CAMARGO, R. C. R., RÊGO, J.G.S., LOPES, M.T.R., PEREIRA, F.M. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2003 (Série Documentos,81).
- CASTILHO, I. O envenenamento das abelhas. Disponível em: <http://envolverde.com.br/sociedade/envenenamento-abelhas/>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- CETESB, 2012. Alacloro: Ficha de Informação Toxicológica. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/Alacloro.pdf>. Acesso em 14/07/2014.

- CETESB, 2009. Aldrin e Dieldrin: Ficha de Informação Toxicológica, 2009. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/aldrin-dieldrin.pdf>. Acesso em 14/07/2014.
- CETESB, 2012b. Endossulfam: Ficha de Informação Toxicológica. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/Endossulfam.pdf>. Acesso em 14/07/2014.
- CHAKRA CHAEMFA, JONATHAN L. BARBER, TILMAN GOCHT, TOM HARNER, IVAN HOLOUBEK, JANA KLANOVA, KEVIN C. JONES. Field calibration of polyurethane foam (PUF) disk passive air samplers for PCBs and OC pesticides. *Environmental Pollution*, v.156, n.3, p.1290–1297, 2008.
- CHAUZAT, M. P., FAUCON, J.P., MARTEL, A.C., LACHAIZE, J., COUGOULE, N., AUBERT, M. A Survey of Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France. *Journal of Economic Entomology*, v.99, n.2, p.253-262, 2006.
- CHAUZAT, M.P., MARTEL, A.C., COUGOULE, N., PORTA, P., LACHAIZE, J., ZEGGANE, S., AUBERT, M., CARPENTIER, P., FAUCON, J.P. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.30, n.1, p.103-111, 2011.
- CODEX ALIMENTARIUS. Residues of pesticide in foods and animal feeds. Codex Alimentarius Commission – Food and agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, p.180, 1998.
- COONEY, M.A., DANIELS, J.L., ROSS, J.A., BRESLOW, N.E., POLLOCK, B.H., OLSHAN, A.F. Household pesticides and the risk of Wilms tumor. *Environmental Health Perspective*, v.115, n.1, p.134–137, 2007.
- COUTINHO, CLÁUDIA F. B., SONIA T. TANIMOTO, ANDRESSA GALLI, GUSTAVO S. GARBELLINI, MARISA TAKAYAMA, RAQUEL B. DO AMARAL, LUIZ H. MAZO, LUIS A. AVACA, SERGIO A. S. MACHADO. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.15, p.65-72, 2005. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/pesticidas/article/view/4469>. Acesso em: 17 Jul. 2014.
- DE ROSSI, C. Pesticides in the atmosphere Occurrence, distribution and behaviour of selected pesticides in the vinicultural area of Trier, Germany. Dissertation. (Doktor der Naturwissenschaften). Universität Trier, Trier, 2010. Disponível em: <http://ubt.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2010/573/pdf/DeRossiChiaraDiss.pdf>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- DERRINGER, G., AND SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, v.12, n.4, p.214-219, 1980.

- DISERENS, H., HENZELIN, M. Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.833, p13–18, 1999.
- DURDEN, D.A. Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *Journal of Chromatography B*, v.850, n.1-2, p.134-146, 2007.
- EPA, 2002. EU-MRLs Regulation EC 396/2005: Regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, p.L70/1-L7016. Disponível em: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage. Acesso em 17 de Julho de 2014.
- EPA, 2009. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Reregistration Eligibility Decision for Allethrin. EPA 738-R-07-001. Última revisão em 2009. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/allethrins-amended-red.pdf>. Acesso em 17 de Julho de 2014.
- FARAJZADEH, M.A., MOGADDAM, M.R., GHORBANPOUR, H. Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid–liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, v.1347, p.8–16, 2014.
- FERNANDEZ, M., PADRÓN, C., MARCONI, L., GHINI, S., COLOMBO, R., SABATINI, A. G., GIROTTI, S. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, v.922, p.257-65, 2001.
- FERNÁNDEZ-BAYO, J. D., NOGALES, R., ROMERO, E. Evaluation of the sorption process for Imidacloprid and Diuron in eight agricultural soils from Southern Europe using various kinetic models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.5266-5272, 2008.
- FORTES, C., APREA, C. Cancer risks from exposure to pesticides. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier, Burlington, pp. 489–497, 2011.
- GARCÍA-CHAO, M. AGRUÑA, M.J., CALVETE, G.F., SAKKAS, V., LLOMPART, M., DAGNAC, T. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. *Analytica Chimica Acta*, v. 672, p.107-113, 2010.
- GENNARO, D.P., CAVALIERE, V., ANNOSCIA, D., VARRICCHIO, P., CAPRIO, E., NAZZI, F., GARGIULO, G., PENNACCHIO, F. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.110, n.46, p. 18466-18471. Disponível em:

- www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1314923110. Acesso em 17 de julho de 2014.
- GREGORC, A., EVANS, J.D., SCHARF, M., ELLIS, J.D. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*, v.58, p.1042-1049, 2012.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. M., RIAL-OTERO, R., CANCHO-GRANDE, B. SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography–ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *Journal of Chromatography A*, v.1196–1197(1–2), 100–109, 2008.
- GRANBY, K., ANDERSEN, J. H., CHRISTENSEN, H. B. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, v.520, p.165-176, 2004.
- GRUJIC, S., RADISIC, M., VASILJEVIC, T., LAUSEVIC, M. Determination of carbendazim residues in fruit juices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, v.22, n.11, p.1132–1137, 2005.
- GUAN HUA XING, YING LIANG, LING XUAN CHEN, SHENG CHUN WU, MING HUNG WONG. Exposure to PCBs, through inhalation, dermal contact and dust ingestion at Taizhou, China – A major site for recycling transformers. *Chemosphere*, v.83, n. 4, p.605–611, 2011.
- HALM, M.P., RORTAIS, A., ARNOLD, G., TASEI, J.N., RAULT, S. New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environment Science Technology*, v. 40, p.2448–2454, 2006.
- HERNÁNDEZ-BORGES, J., RAVELO-PÉREZ, L.M., HERNÁNDEZ-SUÁREZ, E.M., CARNERO, A., RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A. Analysis of abamectin residues in avocados by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v.1165, n. 1–2, p.52-5, 2007.
- HIEMSTRA, M., KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1154, n.1-2, p.3-25, 2007.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: Revised 1994 (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 67, n. 2, p. 331-343, 1995.
- IBGE. Brasil, série histórica de área plantada e produção agrícola; safras 1998 a 2010. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- IUPAC. Agrochemical Information, 2014. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/421.htm> Acesso em 16 de julho de 2014.

- JOHNSON, M., PRICE, D., L'HIRONDELLE, S., FLEMING, R., OGDEN, A. Limited report: tree species vulnerability and adaptation to climate change: final technical report. Saskatchewan Research Council Publication No. 12416-1E10. 2010.
- JONSSON, O., FRIES, I., KREUGER, J. 2013. Determination of Pesticides in Bees and Pollen by Liquid and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. York Pesticides, 2013: Conference on Pesticide Behaviour in Soils, Water and Air. Disponível em. <http://www.york.ac.uk/conferences/yorkpesticides2013/pdfs/B36.pdf>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- KASHYAP, S.M., PANDYA, G.H., KONDAWAR, V.K., GABHANE, S.S. Rapid analysis of 2,4-D in soil samples by modified Soxhlet apparatus using HPLC with UV detection. *Journal of Chromatographic Science*, v.43, n.2, p.81-6, 2005.
- KASIOTIS, K.M., ANAGNOSTOPOULOS, C., ANASTASIADOU, P., MACHERA, K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of the Total Environment*, v.485-486, p.633-642, 2014.
- KOHOUTEK, J., HOLOUBEK, I., KLÁNOVÁ, J. Methodology of Passive Sampling. TOCOEN, s.r.o. Brno/RECETOX MU Brno. TOCOEN REPORT No. 300, February 2006, 14 pp.
- KOIFMAN, S., KOIFMAN, R.J. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutation Research*, v. 544, n. 2-3, p. 305- 311, nov. 2003.
- KOIFMAN, S., HATAGIMA, A. Exposição aos agrotóxicos e câncer ambiental. In: PERES, F., MOREIRA, J. C. (Org.). *É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ, 2003. p. 75-99.
- LAMBERT, O., PIROUX, M., PUYO, S., THORIN, C., LARHANTEC, M., DELBAC, F., POULIQUEN, H. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution*, v.170, p.254-259, 2012a.
- LAMBERT, O., VEYRAND, B., DURAND, S., MARCHAND, P., LE BIZEC, B., PIROUX, M., PUYO, S., THORIN, C., DELBAC, F., POULIQUEN, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere*, v.86, p. 98-104, 2012b.
- LEISS, J.K., SAVITZ, D.A. Home pesticide use and childhood cancer: a case-control study. *American Journal of Public Health* February, v.85, n.2, p.249-252, 1995.
- LEGLER, S. *Pólen apícola*. Santa Maria: UFSM, 2ª.Ed, 2002, 16p.
- LING, Z., XU, D., ZOU, S., LEE, S., HO, K. Characterizing the Gas-phase Organochlorine Pesticides in the Atmosphere over the Pearl River Delta Region. *Aerosol and Air Quality Research*, v. 11, p.238-246, 2011.

- LIU, X.S, TONG, Z.F.ZHEN, L., HUANG DA, X., GAO, X., XU, C.Y. Simultaneous analysis of thiabendazole, carbendazim and 2-aminobenzimidazole in concentrated fruit juices by liquid chromatography after a single Mistura-mode solid-phase extraction cleanup. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v.44, n.6, p.591-597, 2009.
- LOZOWICKA, B. The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.97, p.210-22, 2013.
- LUQUE DE CASTRO, M.D., GARCÍA-AYUSO, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, v.369, n.1-2, p.1-10, 1998.
- MAGALHÃES, E.O. Produção de Pólen. III Seminário de Própolis do Nordeste// Encontro Nacional de Produtores Pólen, Bahia, 2005. Disponível em: http://wp.ufpel.edu.br/apicultura/files/2010/09/apostila_sobre_polen1.pdf. Acesso em 17 de julho de 2014.
- MA, X., BUFFLER, P.A., GUNIER, R.B., DAHL, G., SMITH, M.T., RENIER, K., REYNOLDS, P. Critical windows of exposure to household pesticides and risk of acute leukemia. *Environmental Health Perspectives*, v.110, p.955-960, 2002.
- MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastastecimento, 1999. Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999, que institui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2042-1999.pdf. Acesso em 17 de julho de 2014.
- MARTINELLI, O.J. Agroquímicos: relatório setorial preliminar. Porto Alegre: UNESP/GEEIN/UNICAMP/DPCT 46 p. Relatório Técnico. DP., 2003.
- MAURIZIO A, LOUVEAUX J. 1965. Pollens de plantes mellifères d'Europe. Union des Groupements Apicoles Francais, Paris.
- MELCHERT, W.R., CARDOSO, E.A. Construção de amostrador passivo de baixo custo para determinação de dióxido de nitrogênio. *Química Nova*, v.29, n.2, p.365-367, 2006.
- MENEGAUX, F., BARUCHEL, A., BERTRAND, Y., LESCOEUR, B., LEVEGER, G., NELKEN, B., SOMMELET, D., HÉMON, D., CLAVEL, J. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occupational and Environmental Medicine*, v.63, p.131-134, 2006.
- MEYER, P. C., ZUND, R. E. Statistical methods in analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 81-134.
- MMA-Ministério do Meio Ambiente, 2009. Resolução do CONAMA 420/2009, de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Acesso em 17 de julho de 2014.

- MMA-Ministério do Meio Ambiente, 2014. Polinizadores em risco de extinção são ameaça à vida do ser humano. Disponível em <http://www.mma.gov.br/informma/item/9976-polinizadores-em-risco-de-extin%C3%A7%C3%A3o-%C3%A9-amea%C3%A7a-%C3%A0-vida-do-ser-humano?tmpl=component&print=1>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- MARASCHIN, L. Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal mato-grossense. 2003, 88p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente), Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.
- MARSHALL, W.E. WARTELLE, L.H., BOLER, D.E., JOHNS, M.M., TOLES, C.A., Enhanced metal adsorption by soybean hulls modified with citric acid. *Bioresource Technology*, v. 69, p. 263-268, 1999.
- MODRO, A.F.H., MAIA, E., SILVA, I.C., LUZ, C.F.P., MESSAGE, D. Subamostragem de pólen apícola para análise melissopalínológica. *Hoehnea*, v.36, n.4, p.709-714, 2009.
- MONGE, P., WESSELING, C., GUARDADO, J., LUNDBERG, I., AHLBOM, A., CANTOR, K.P., WEIDERPASS, E., PARTANEN, T. Parental occupational exposure to pesticides and the risk of childhood leukemia in Costa Rica. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, v.33, p.293-303, 2007.
- MORGANO, M.A., MARTINS, M.C.T., RABONATO, L.C., MILANI, R.F., YOTSUYANAGI, K. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 2010. A comprehensive investigation of the mineral composition of brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.6876–6883, 2010.
- MULLIN, C.A., FRAZIER, M., FRAZIER, J.L., ASHCRAFT, S., SIMONDS, R., VANENGELSDORP, D., PETTIS, J.S. High levels of miticides and agrochemicals in north american apiaries: implications for honey bee health. *PLoS ONE*, v.5, n.3, e9754, p.1-19, 2010. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0009754&representation=PDF>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- NAKAMURA, M., FURUMI, Y., WATANABE, F., MIZUKOSHI, K., TANIGUCHI, M., NEMOTO, S. Determination of carbendazim, thiophanate, thiophanate-methyl and benomyl residues in agricultural products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, v.52, n.3, p.148-155, 2011.
- NIELSEN, S., MUELLER, B.A., DE ROOS, A.J., VIERNES, H.M., FARIN, F.M., CHECKOWAY, H. Risk of brain tumors in children and susceptibility to organophosphorus insecticides: the potential role of paraoxonase (PON1). *Environmental Health Perspective*, v.113, n.7, p.909-913, 2005.
- OECD, 2000. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 1: Physical-chemical properties. Test nº 106: Adsorption – desorption using a batch equilibrium method. Organization for the Economic Cooperation and Development.

- ONU. Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, 2001. Disponível em: http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf. Acesso em 17 de julho de 2014.
- PANSERI, S., CATALANO, A., GIORGI, A., ARIOLI, F., PROCOPIO, A., BRITTI, D., CHIESA, L.M.. Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control*, v.38, p.150-156, 2014.
- PERES, F.J., MOREIRA, C., DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: Peres, F., Moreira, J. C. (Org.) *É veneno ou é remédio? - agrotóxicos, saúde e ambiente*, 1. ed. Rio de Janeiro: ed. FIOCRUZ. 2003.
- PERUGINI, M., DI SERAFINO, G., GIACOMELLI, A., MEDRZYCKI, P., SABATINI, A.G., ODDO, L.P., MARINELLI, E., AMORENA M. Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Bees (*Apis mellifera*) and Honey in Urban Areas and Wildlife Reserves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.7440–7444, 2009.
- PERUGINI, M., MANERA, M., GROTTA, L. ABETE, M.C., TARASCO, R., AMORENA, M. Heavy metals (Hg, Cr, Cd and Pb) contamination in urban areas and natural reserves: honeybees as bioindicators. *Biological Trace Element Research*, v.140, p.170–176, 2011.
- PETTIS J.S., VANENGELSDORP D., JOHNSON J., DIVELEY G. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. *Naturwissenschaften*, v.99, p.153-158, 2012.
- PIZZUTTI, I.R., KOK, A., HIEMSTRA, M., WICKERT, C., PRESTES, O.D. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1216, n.21, p.4539-4552, 2009.
- PLAZINSKI, W., RUDZINSKI, W., PLAZINSKA, A. Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: A review. *Advanced Colloid Interface Science*, v.152, p.2-13, 2009.
- PORRINI, C., SABATINI, A.G., GIROTTI, S., GHINI, S., MEDRZYCKI, P., GRILLENZONI, F., BORTOLOTTI, L., GATTAVECCHIA, R., CELLI, G. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, v.38, p.63-70, 2003.
- POZO, O.J, MARIN, J.M, SANCHO, J.V, HERNÁNDEZ, F. Determination of abamectin and azadirachtin residues in orange samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.992, n.1-2, p.133-140, 2003.
- POZO, K., HARNER, T., LEE, S.C., SINHA, R.K., SENGUPTA, B., LOEWEN, M., GEETHALAKSHMI, V., KANNAN, K., VOLPI, V. Assessing seasonal and spatial trends of persistent organic pollutants (POPs) in Indian agricultural regions using PUF disk passive air samplers. *Environmental Pollution*, v.159, n.2, p.646–653, 2011.

- PROENÇA, P., TEIXEIRA, H., CASTANHEIRA, F., PINHEIRO, J. MONSANTO, P.V., MARQUES, E.P., VIEIRA, D.N. Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis. *Forensic Science International*, v.153, n.1, p.75-80, 2005.
- QIU, H., PAN, B.C., ZHANG, Q.J., ZHANG, W.M., ZHANG, Q. Critical review in adsorption kinetic models. *Journal of Zhejiang University Science A*, v.10, p.716-724, 2009.
- RANGEL, C.F. Monitoramento de agrotóxicos em águas brutas e tratadas destinadas ao consumo humano, utilizando método multi-resíduo por EFS/CG-EM. 2008, 130p. Dissertação (Mestrado em ciências). Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- REIS, V.D.A. Mel Orgânico: Oportunidades e desafios para a apicultura no Pantanal, Embrapa Pantanal, Corumbá, Brasil, 2003. RIGHI, D.A., BERNARDI, M.M., PALERMO-NETO, J. Toxicologia dos praguicidas organoclorados e piretróides. In: SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à medicina veterinária. Ed. Manole, Barueri, Brasil, Cap. 10. 1ed. 942p.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, p.771-780, 2004.
- RIGHI, D. A., BERNADI, M. M., PALERMO-NETO, J. Toxicologia dos praguicidas organoclorados e piretróides. In: João Palermo Neto, Dario Abbud Righi e Maria Martha Bernardi. (Org.). Toxicologia aplicada à medicina veterinária. Barueri - São Paulo: Manole, v. 1, p. 267-290, 2008.
- RISSATO, S.R., GALHIANE, M.S. KNOLL, F.R.N., APON, B.M. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, v.1048, p.153-159, 2004.
- RISSATO, S.R., GALHIANE, M.S., KNOLL, F.R.N., ANDRADE, R.M.B., ALMEIDA, M.V. Método multiresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. *Química Nova*, v.29, n.5, p.950-955, 2006.
- RODRIGUES, B. N., ALMEIDA, F. S. Guia de herbicidas. 5 ed. Londrina: autores, 2005. 591p.
- SALGADO-LABOURIAU, M.L. 1973. Contribuição à palinologia dos cerrados. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 291p.
- SANCO, EUROPEAN COMMISSION. 2009. Document No. SANCO/10684/2009. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em: 17 julho de 2014.

- SANTOS, M.L.A., FUNARI, S.R.C. Pólen Coletado por *Apis Mellifera* no Diagnóstico da Poluição Ambiental Causada por Praguicidas e Metais no Brasil. Tese (Doutorado em Zootecnia). UNESP, Botucatu, SP, 2005.
- SEE, H.H., HAUSER, P.C., IBRAHIM, W.A., SANAGI, M.M. Rapid and direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminophosphonic acid by online preconcentration CE with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, v.31, n.3, p.575-582, 2010.
- SHOEIB, M., HARNER, T. Characterization and comparison of three passive air samplers for persistent organic pollutants. *Environmental Science and Technology*, v.36, p.4142-4151, 2002.
- SINDIVEG, 2014. Recorde, venda de defensivo no país em 2013 atingiu US\$ 11,5 bi. Disponível em <http://www.sindiveg.org.br/noticiaonline.php?cod=2413>. Acesso em 15 de julho de 2014.
- TAYLOR, M. J., HUNTER, K., HUNTER, K. B., LINDSAY, D., BOUHELLEC, S. L. Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography, A*, v.982, n.2, p.225-236, 2002.
- TOMAZELA, J.M. Agrotóxico é a causa da morte de 4 milhões de abelhas em gavião Peixoto. Estadão, 18 de fevereiro de 2014. Disponível em: <http://sustentabilidade.estadao.com.br/noticias/geral,agrotoxico-e-a-causa-da-morte-de-4-milhoes-de-abelhas-em-gaviao-peixoto,1131737>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- TYLIANAKIS, J.M. Ecology. The global plight of pollinators. *Science*, v.339, p.1532-1533, 2013a.
- TYLIANAKIS, J.M. Pollination decline in context—response. *Science*, v. 340, p.924–925, 2013b.
- TOMITA, R. Y., BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *Biológico*, v.64, n.2, p.135-42, 2002.
- TSAI, J., KAYE, W.E., BOVE, F.J. Wilms tumor and exposures to residential and occupational hazardous chemicals. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v.209, p.57-64, 2006.
- UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) n. 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Fevereiro de 2005. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:pt:PDF>. Acesso em 17 de julho de 2014.
- VAN DER STEEN, J.J., DE KRAKER, J., GROTENHUIS T. Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Monitoring and Assessment*, v.184, n.7, p.4119-26, 2012.

- VALENZUELA, A.I., REDONDO, M.J., PICO, Y., FONT, G. Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.871, n.1–2, p.57-65, 2000.
- VEIGA, M.M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. *Ciências e Saúde Coletiva*, v.12, n.1, p.145-152, 2007.
- WANIA, F., SHEN, L., LEI, Y. D., TEIXEIRA, C., MUIR, D. C. G. Development and calibration of a resin-based passive sampling system for persistent organic pollutants in the atmosphere. *Environmental Science Technology*, v.37, n.1352-1359, 2003.
- WHO, 2004. World Health Organization: The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. 60p. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf. Acesso em 17 de julho de 2014.
- WIEST L, BULETÉ A, GIROUD B, FRATTA C, AMIC S, LAMBERT O, POULIQUEN H, ARNAUDGUILHEM C. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v.1218, n.34, p.5743-56, 2011.
- WILLIAMSON, S.M., WRIGHT, G.A. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, v.216, p.1799-807, 2013.
- WOLTERBEEK, B. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution*, v.120, n.1, p.11-21, 2002.
- ZACHARIS, C.K., ROTSIAS, I., ZACHARIADIS, PG., ZOTOS, A. Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, v.134, n.3, p.1665–1672, 2012.

CAPÍTULO VII

ANEXO

ANEXO I. GRÁFICOS DE RESÍDUOS E CURVAS ANALÍTICAS PREPARADAS NA AMOSTRA BRANCO FORTIFICADA COM OS ANALITOS, OBTIDAS UTILIZANDO O PREPARO DE AMOSTRAS POR QUECHERS.

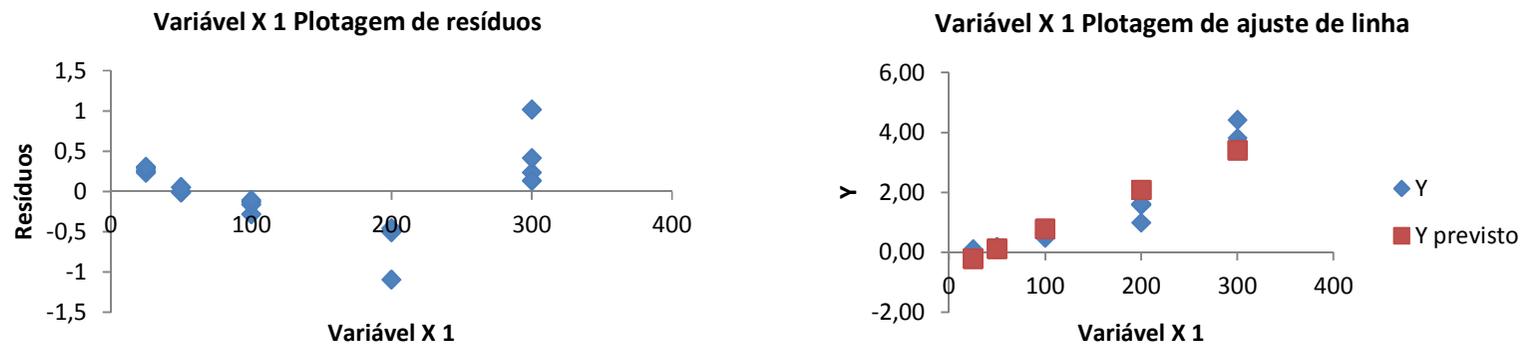


Figura 1. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com hexaclorobenzeno.

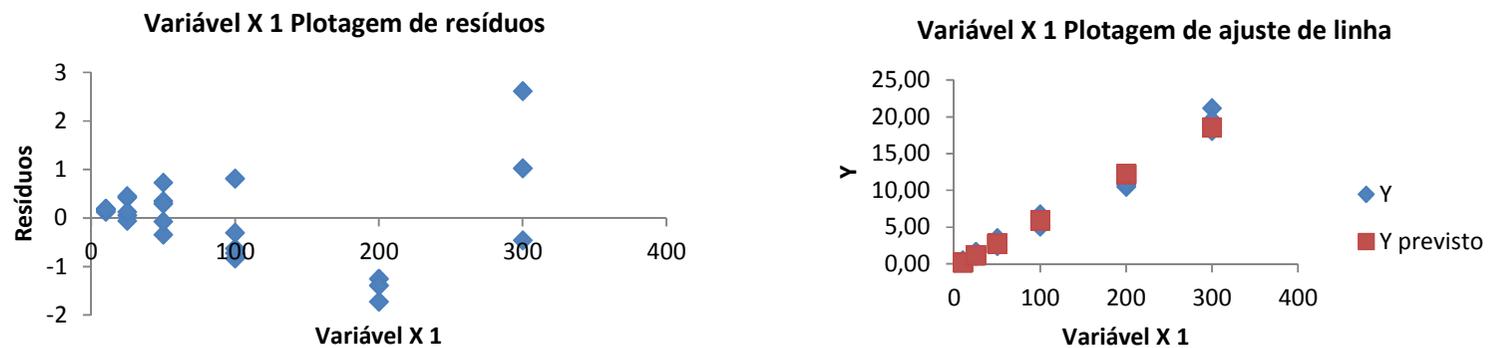


Figura 2. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com terbufós.

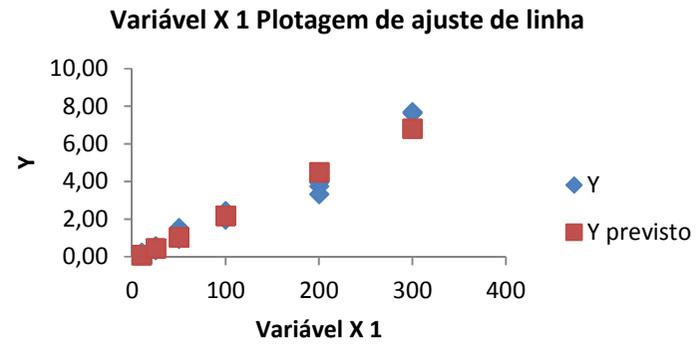
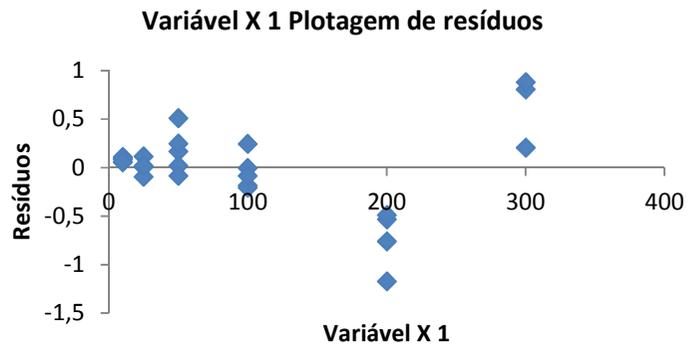


Figura 3. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com etrinfós.

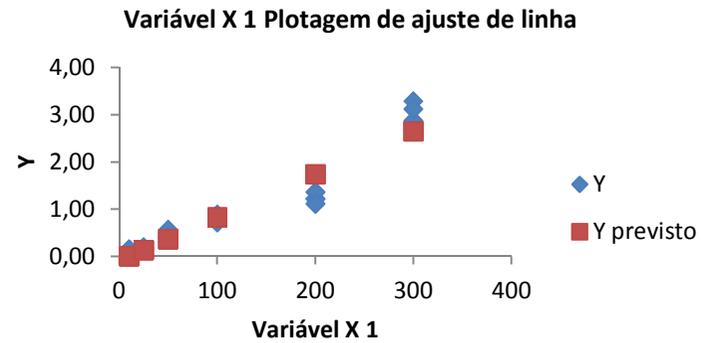
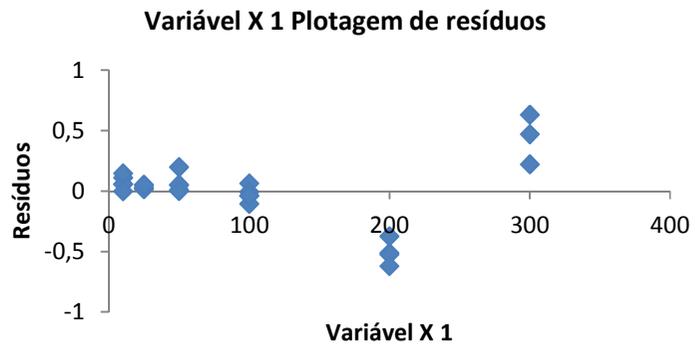


Figura 4. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com acetocloro.

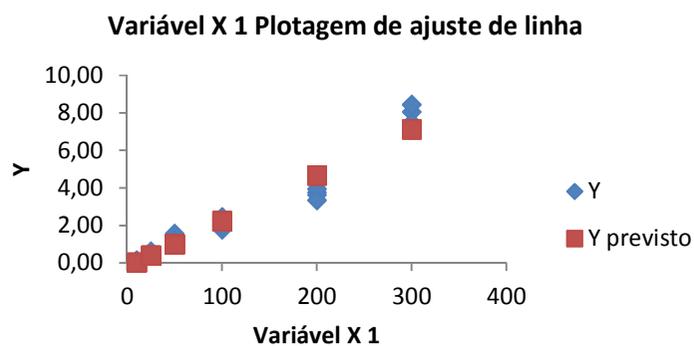
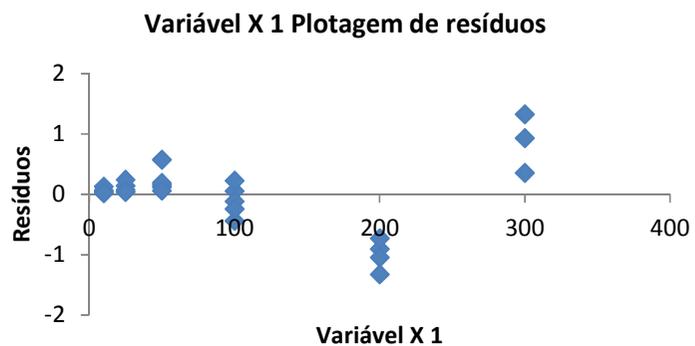


Figura 5. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com alacloro.

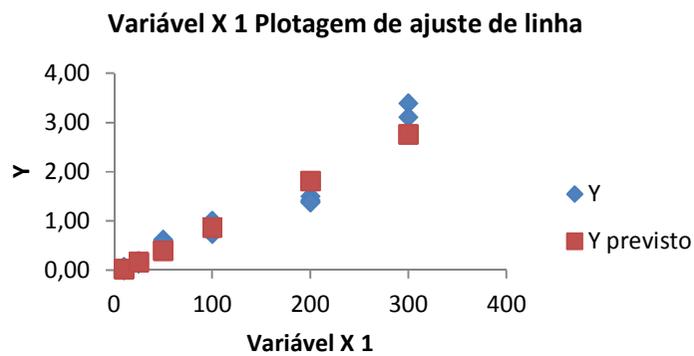
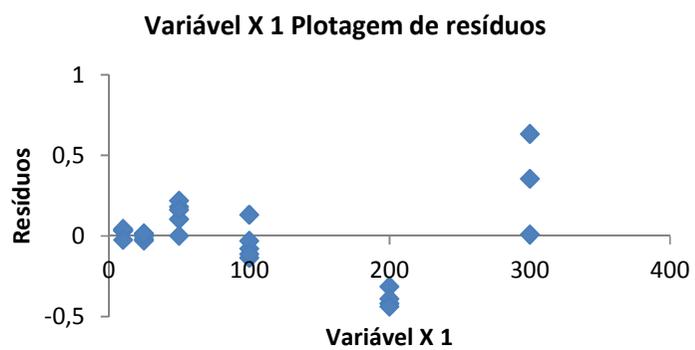


Figura 6. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com malation.

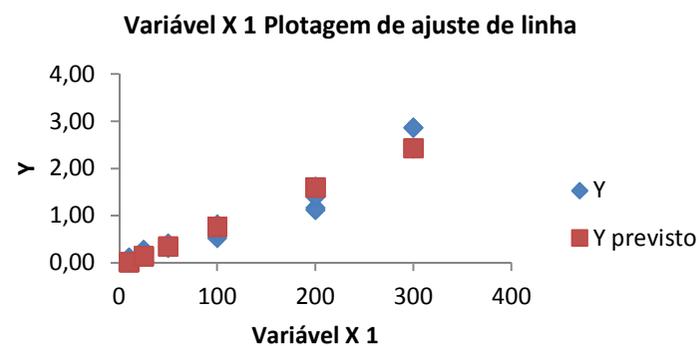
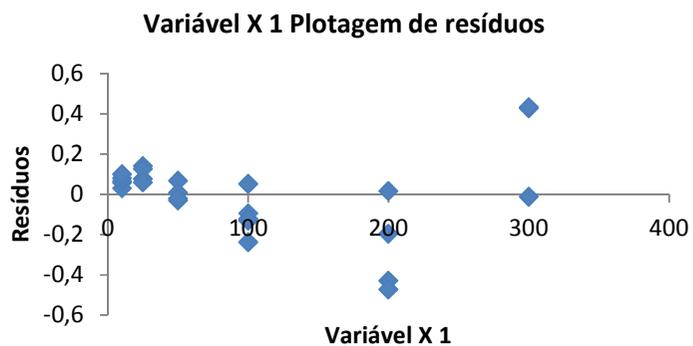


Figura 7. Gráfico De Resíduos E Curvas Analíticas Preparadas Na Amostra Branco Fortificada Com Pirimifós Etil

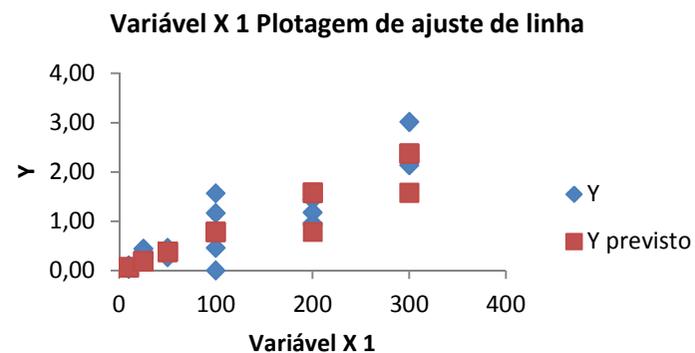
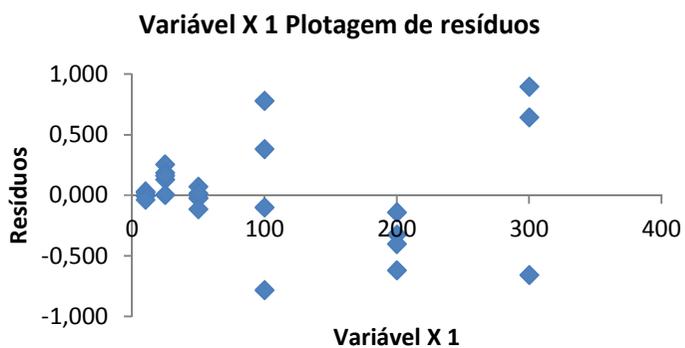


Figura 8. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com heptacloro epóxido.

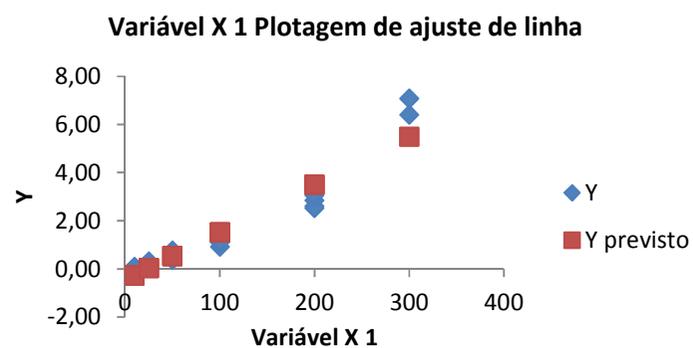
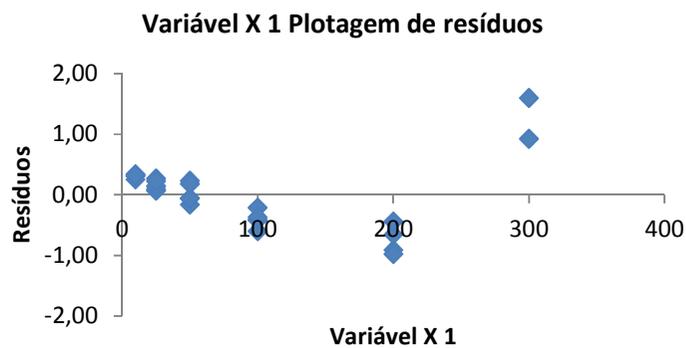


Figura 9. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com fentoato.

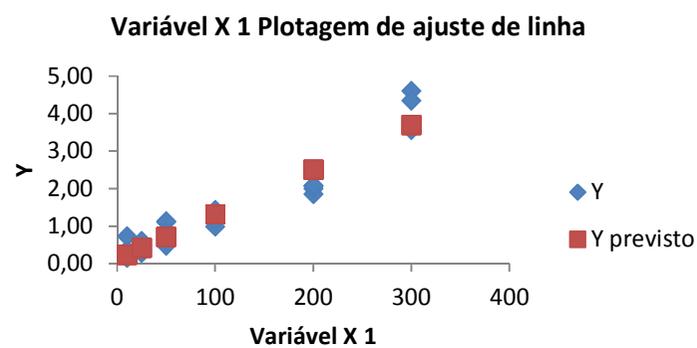
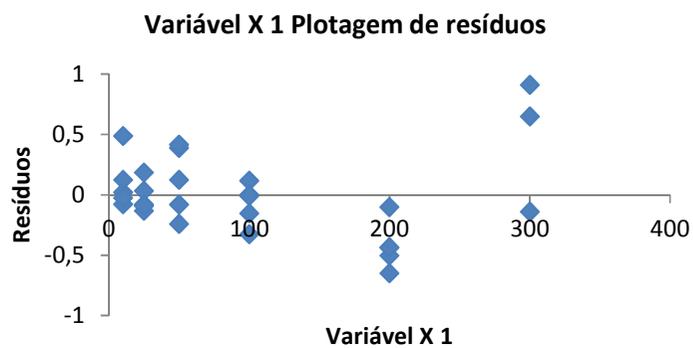


Figura 10. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com fluazifope.

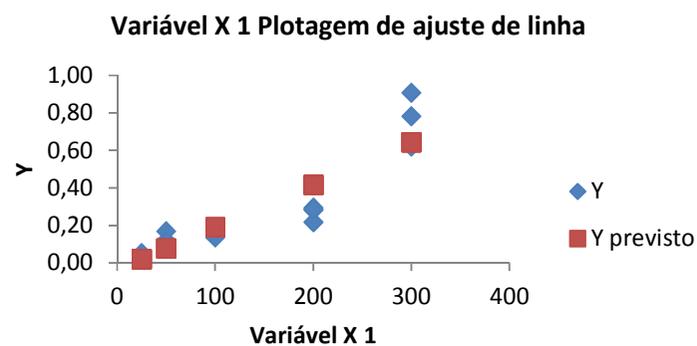
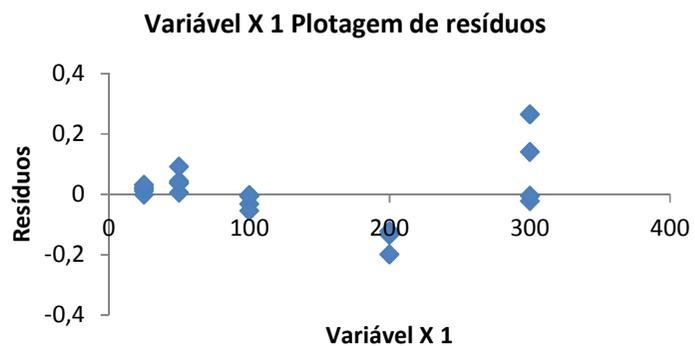


Figura 11. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com fosalone.

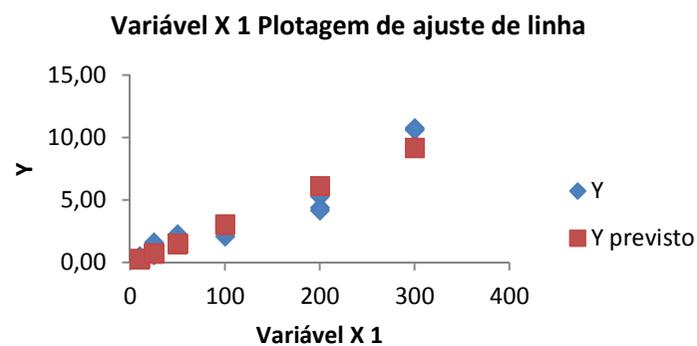
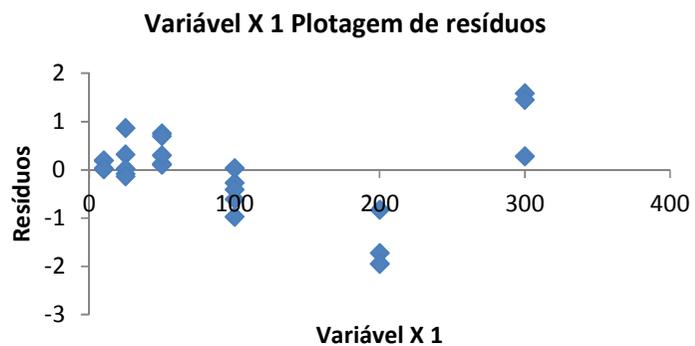


Figura 12. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com permetrina (soma dos isômeros).

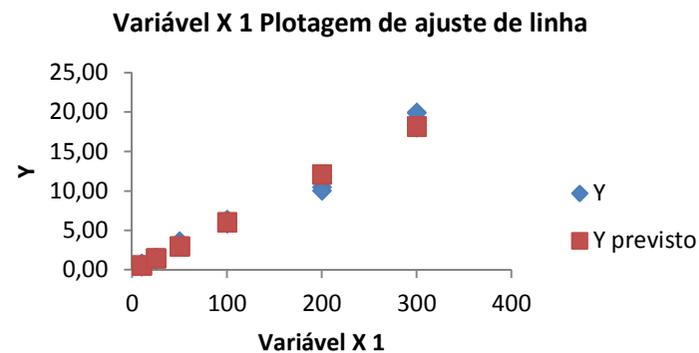
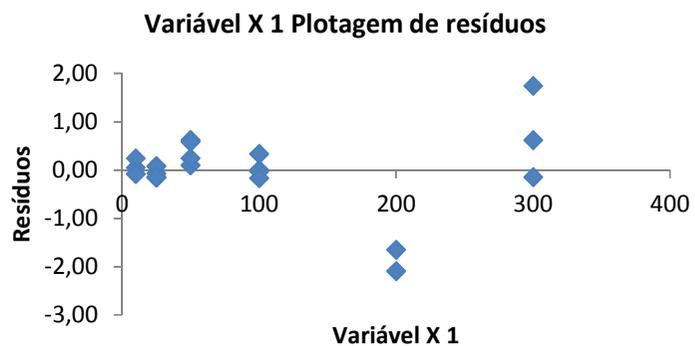


Figura 13. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com trifluralina.

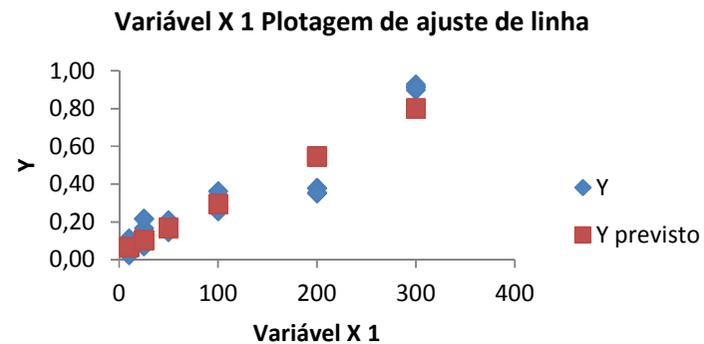
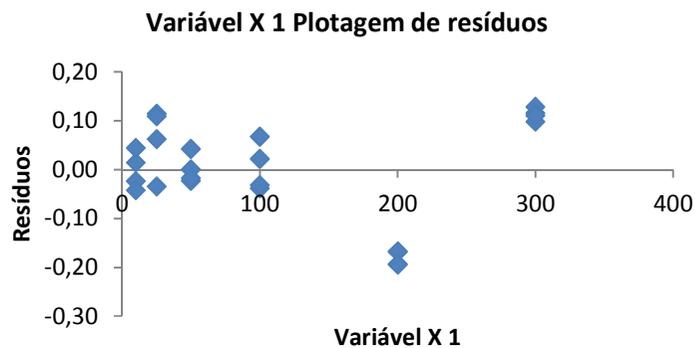


Figura 14. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com dissulfoton.

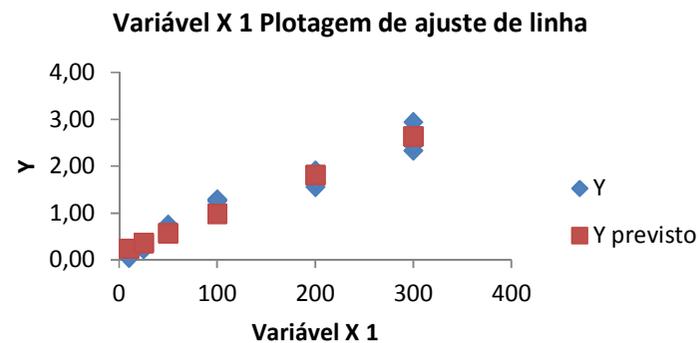
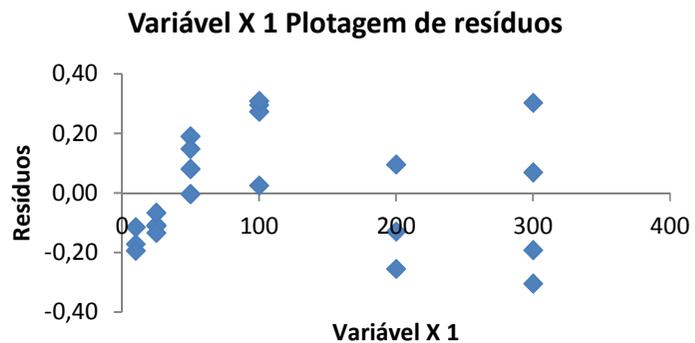


Figura 15. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com clorpirifós metil.

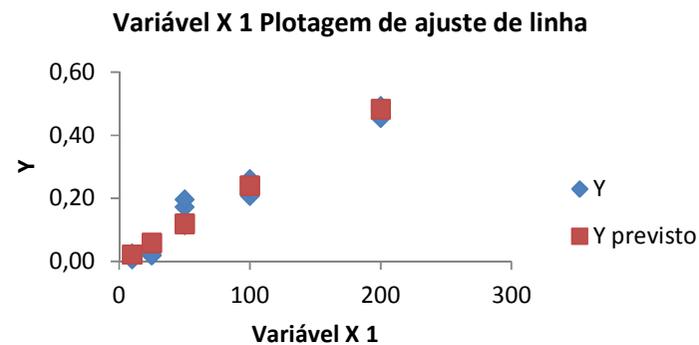
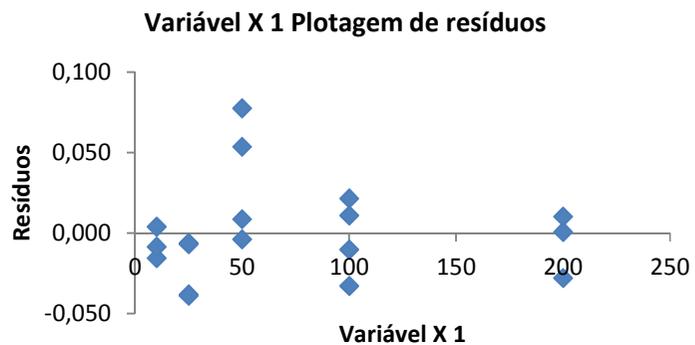


Figura 16. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com paration metil.

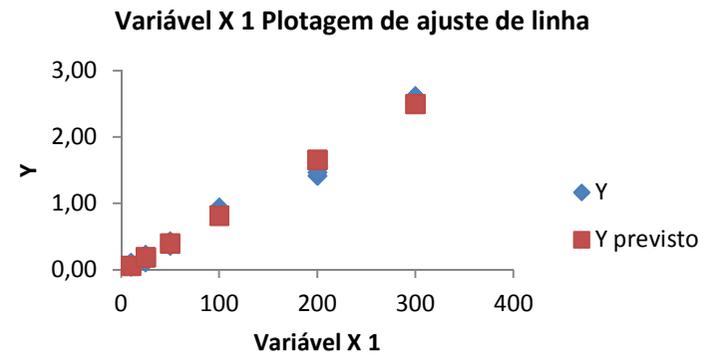
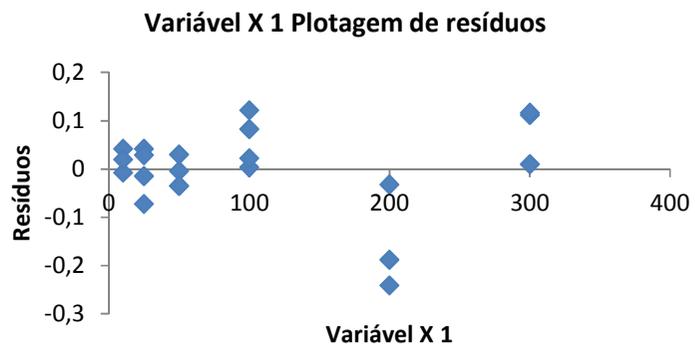


Figura 17. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com aldrin.

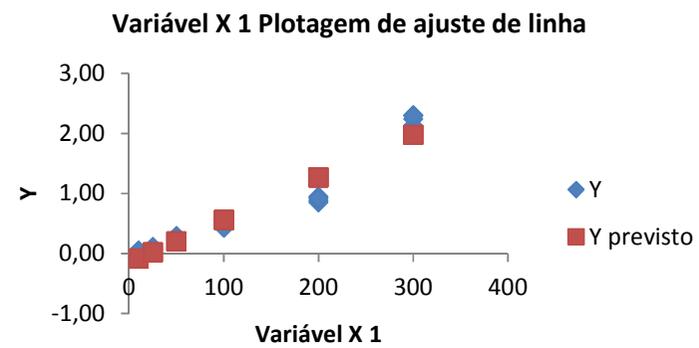
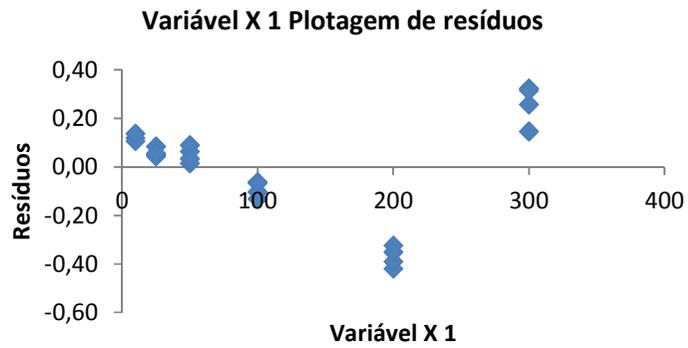


Figura 18. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com paration etil.

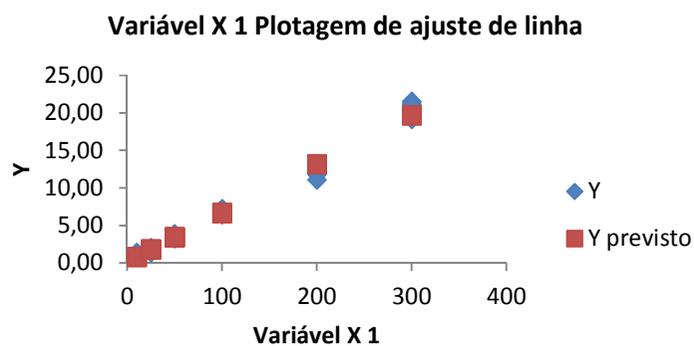
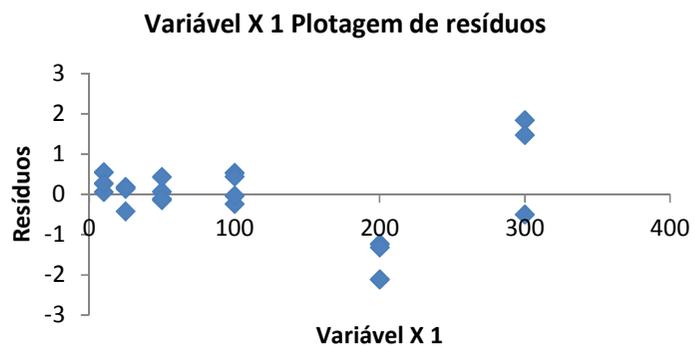


Figura 19. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com pendimetalina.

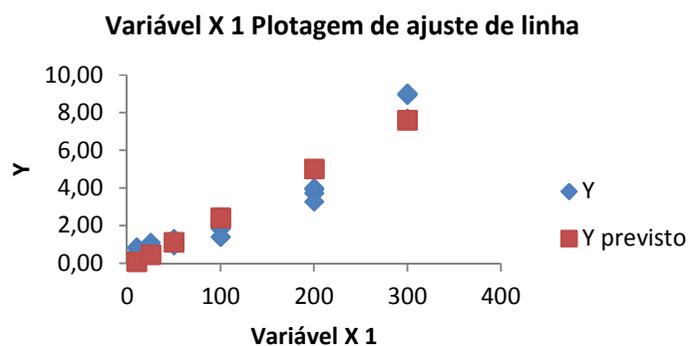
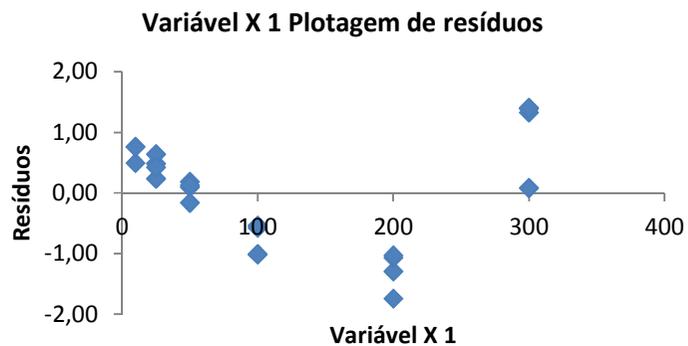


Figura 20. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com bioaletrina

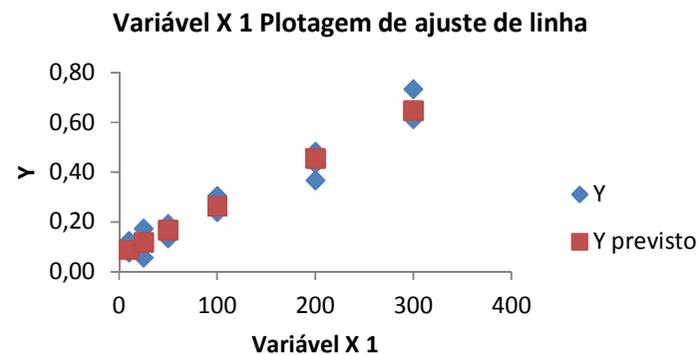
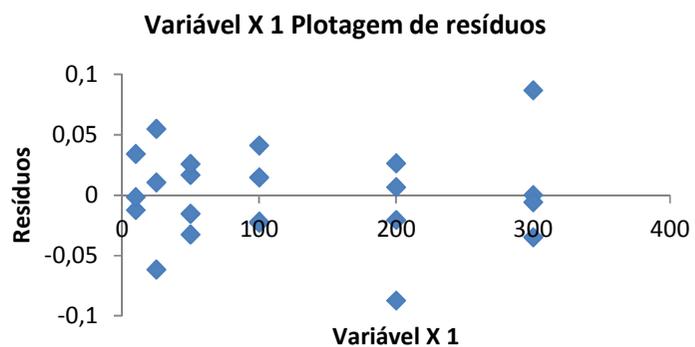


Figura 21. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com endossulfan alfa.

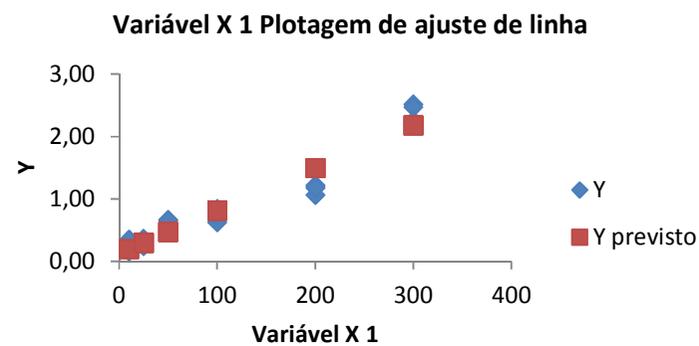
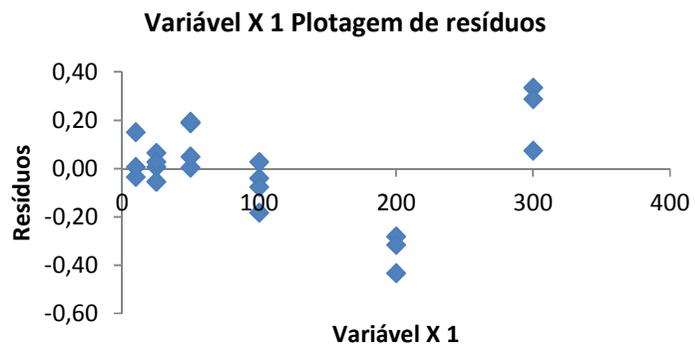


Figura 22. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com oxifluorfen.

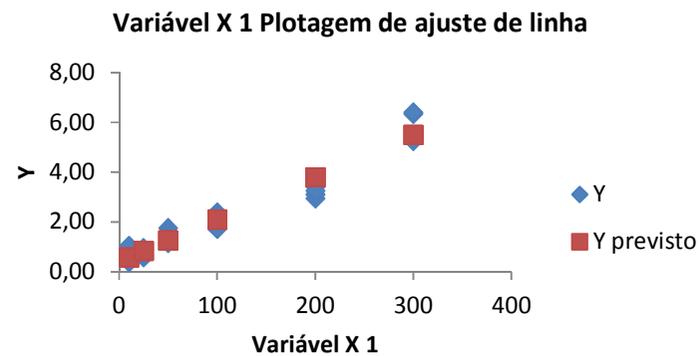
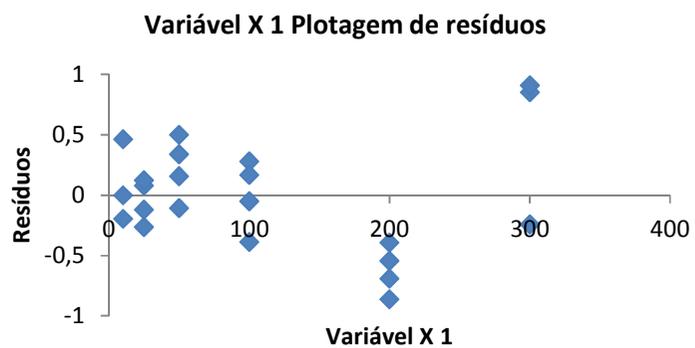


Figura 23. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com endossulfan beta.

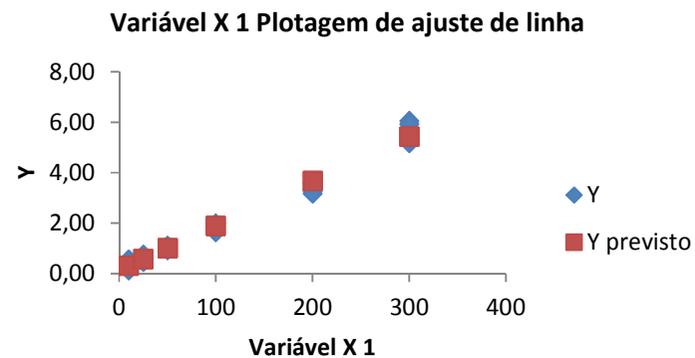
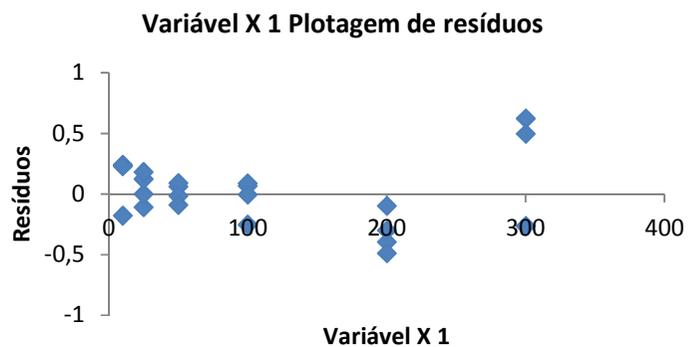


Figura 24. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com o'p'DDT.

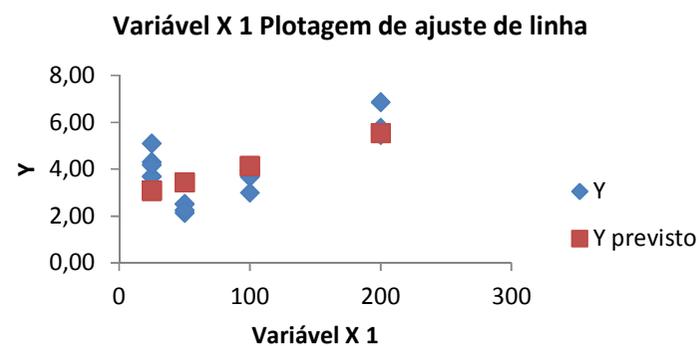
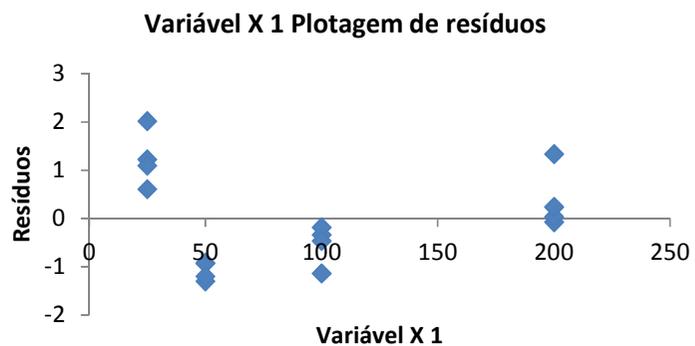


Figura 25. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com propargito.

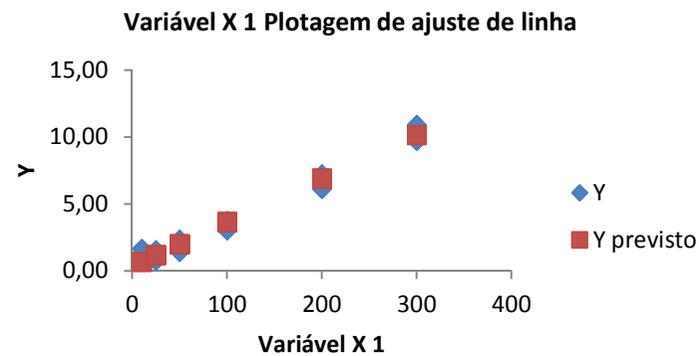
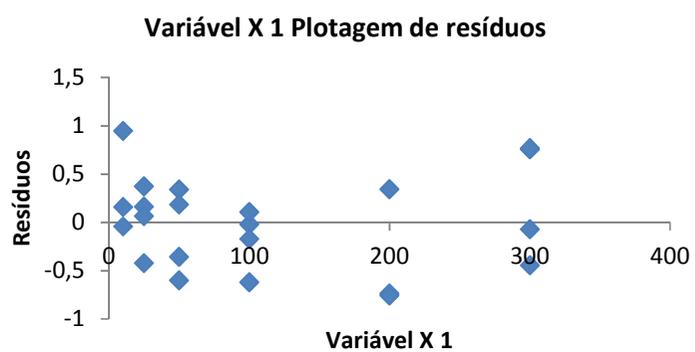


Figura 26. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com bifentrin.

ANEXO II. GRÁFICOS DE RESÍDUOS E CURVAS ANALÍTICAS, PREPARADAS NA AMOSTRA BRANCO FORTIFICADA COM OS ANALITOS, OBTIDAS UTILIZANDO O PREPARO DE AMOSTRAS POR PARTIÇÃO COM ACN.

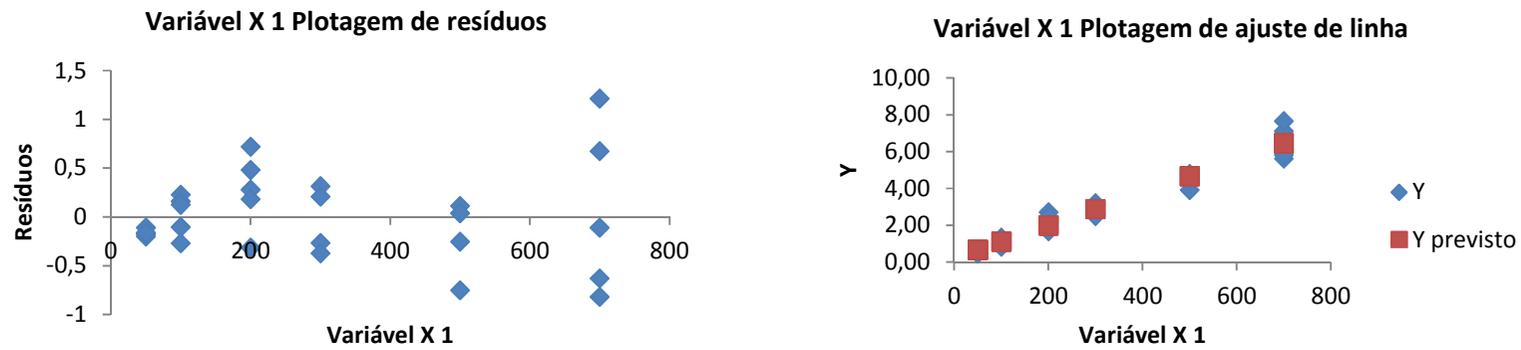


Figura 1. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com acetochloro.

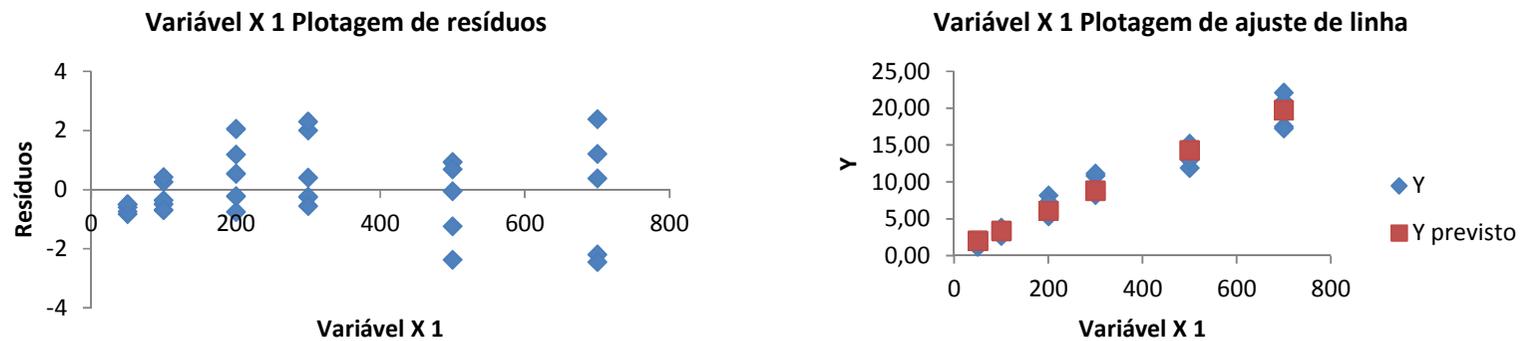


Figura 2. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com alacloro.

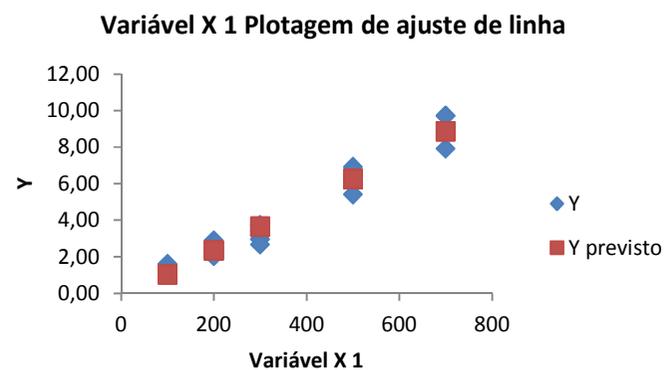
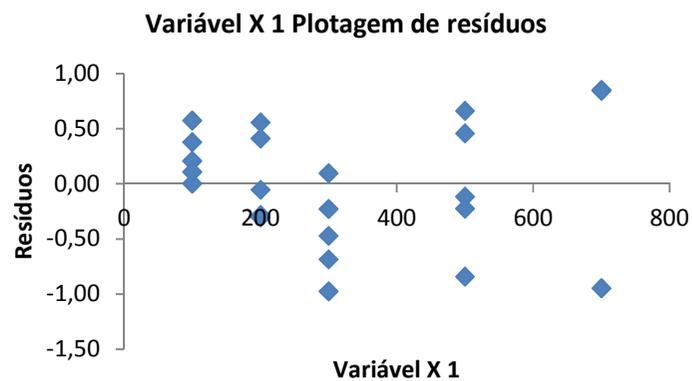


Figura 3. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com aldrin.

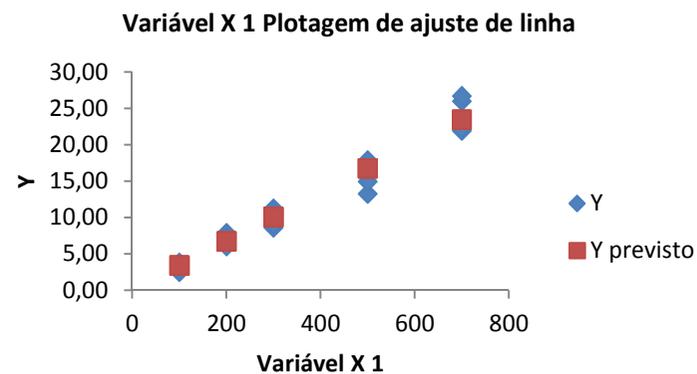
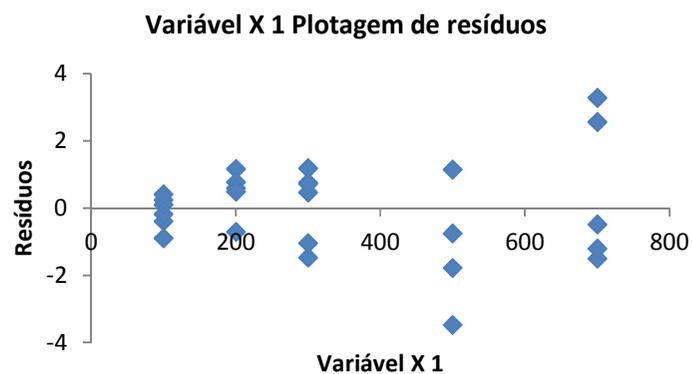


Figura 4. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com bioaletrina.

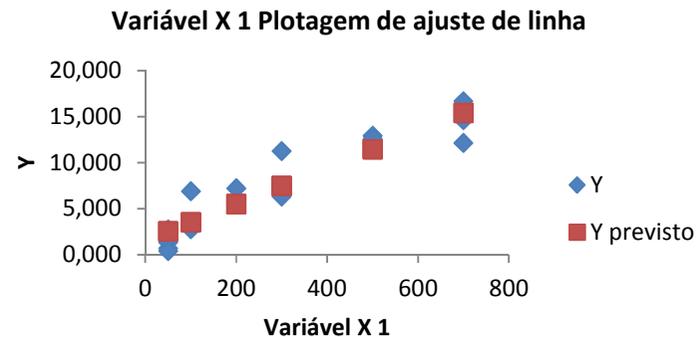
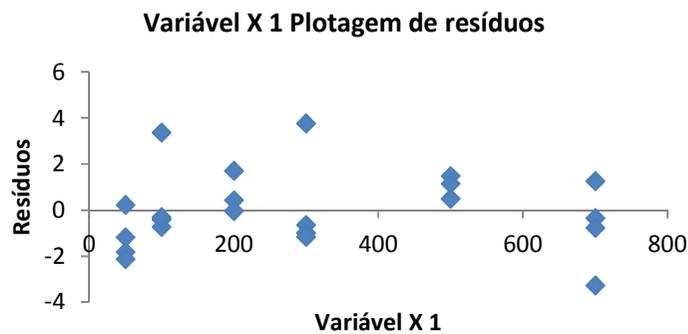


Figura 5. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com clorpirifós metil.

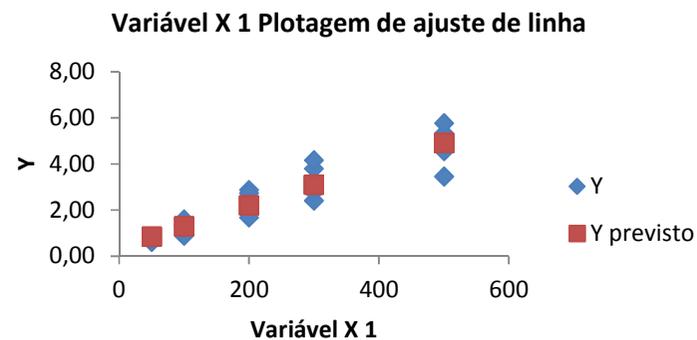
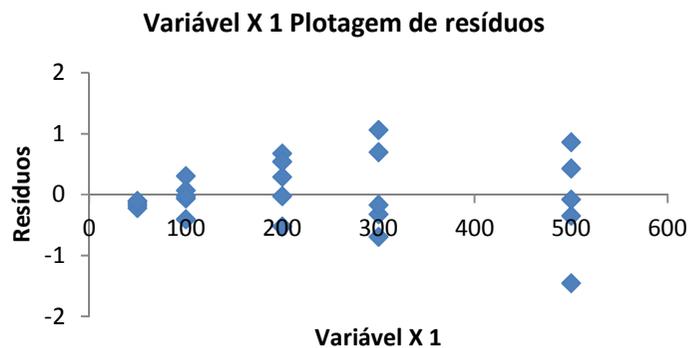


Figura 6. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com diazinon.

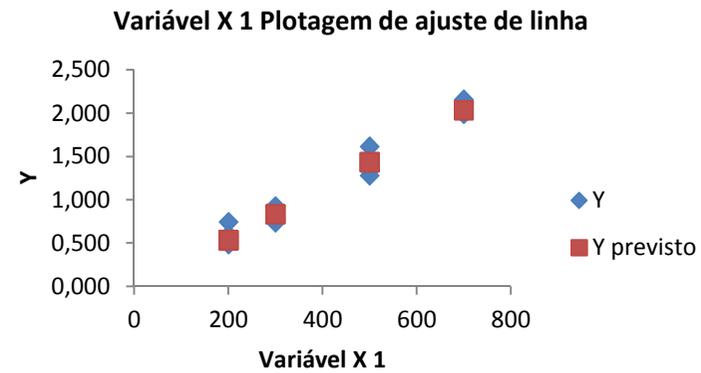
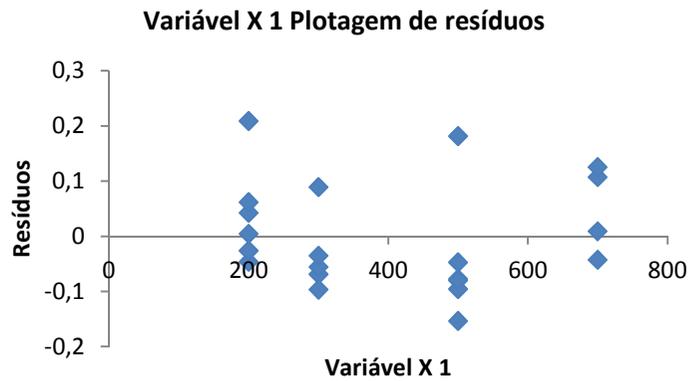


Figura 7. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com dissulfoton.

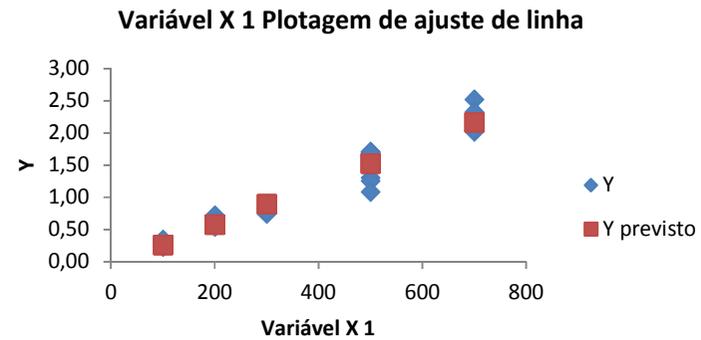
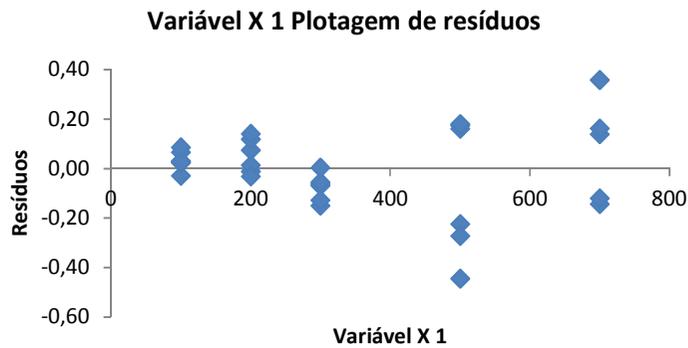


Figura 8. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com endossulfan alfa.

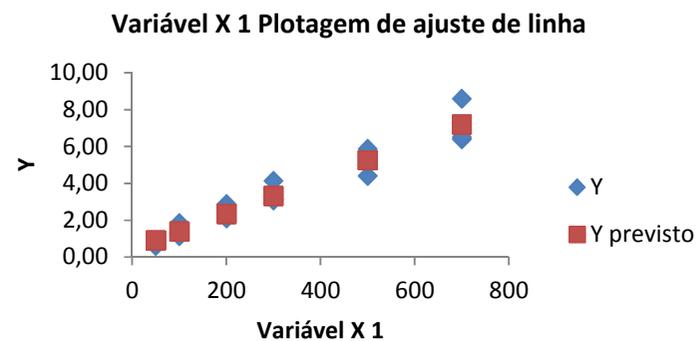
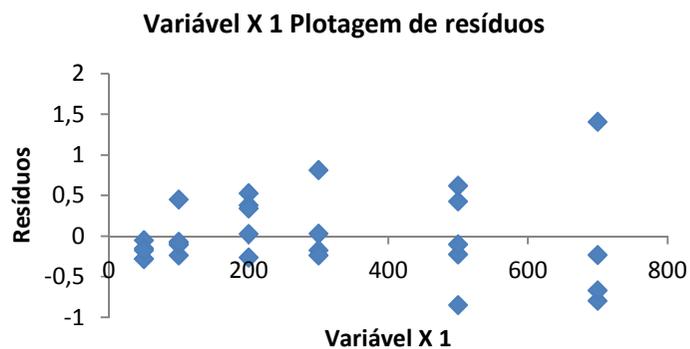


Figura 9. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com etrinfós.

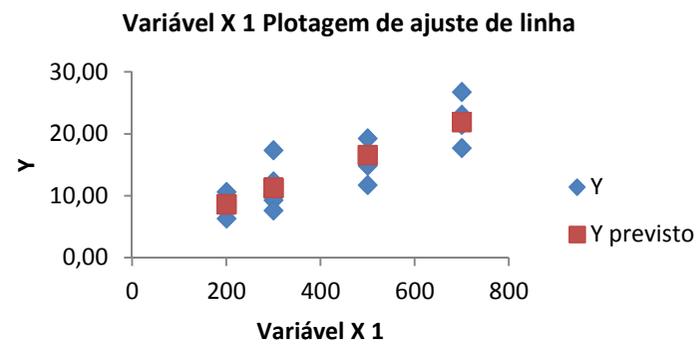
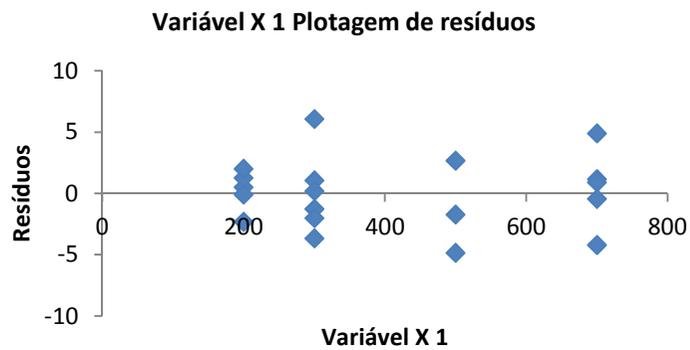


Figura 10. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com fempropatrim.

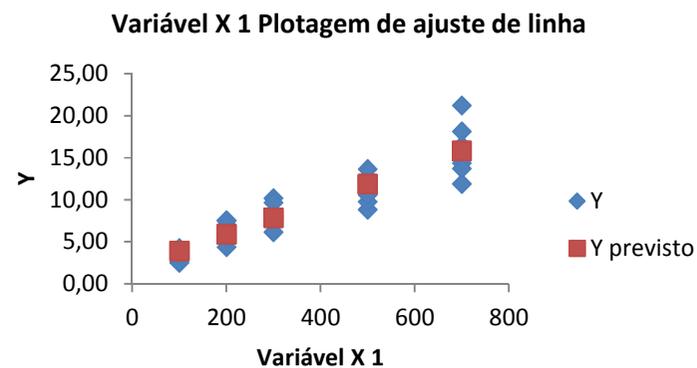
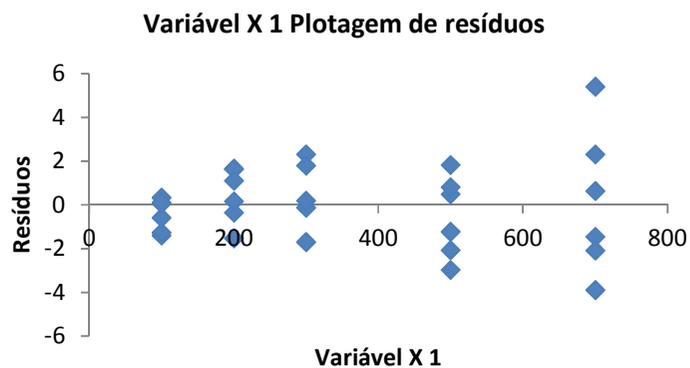


Figura 11. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com fentoato.

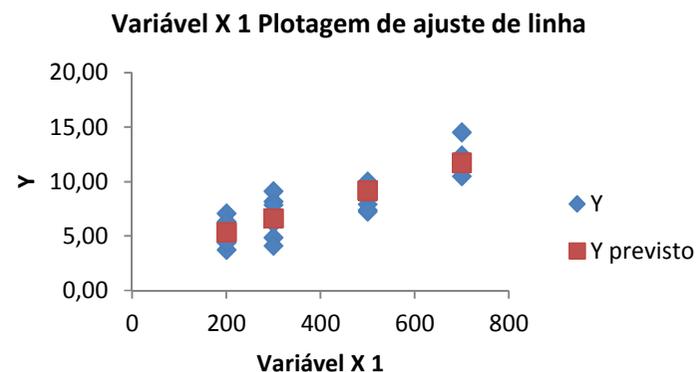
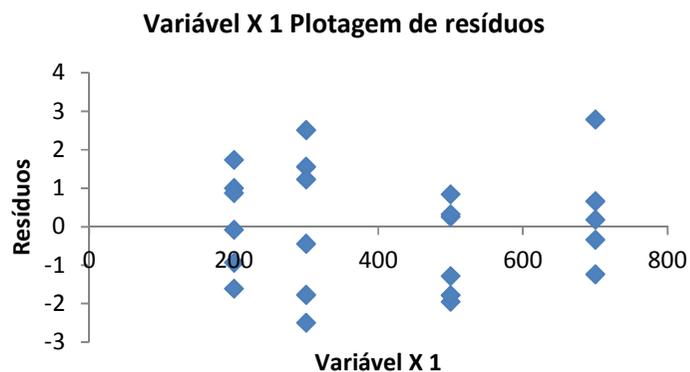


Figura 12. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com fluazifope.

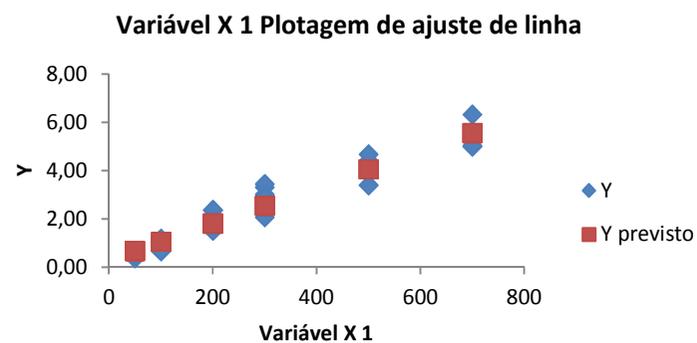
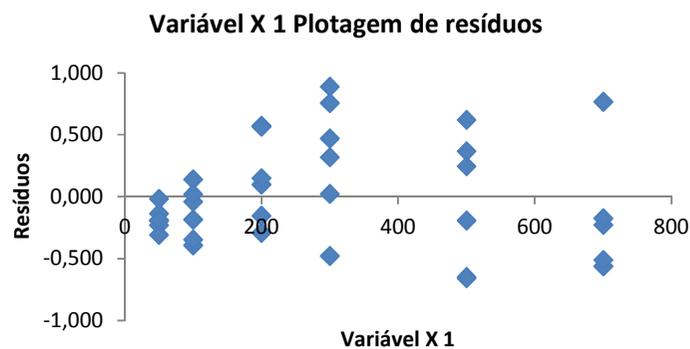


Figura 13. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com heptacloro epóxido.

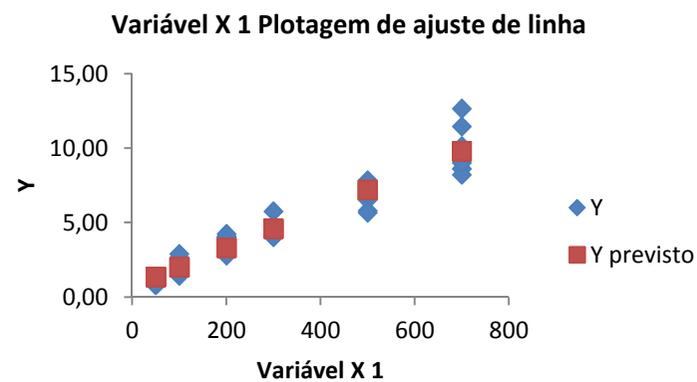
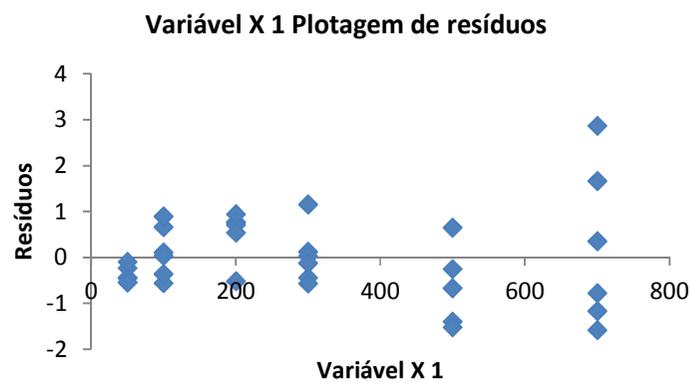


Figura 14. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com malation.

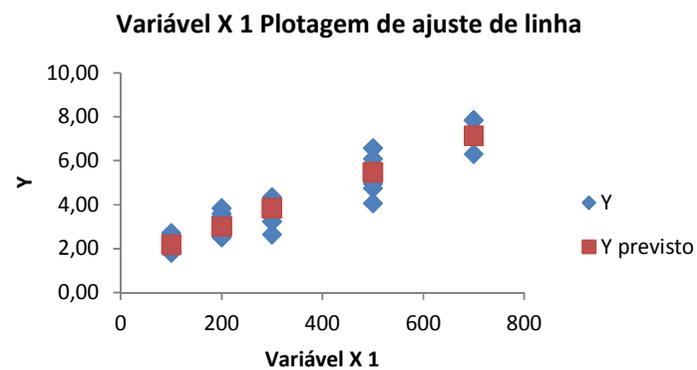
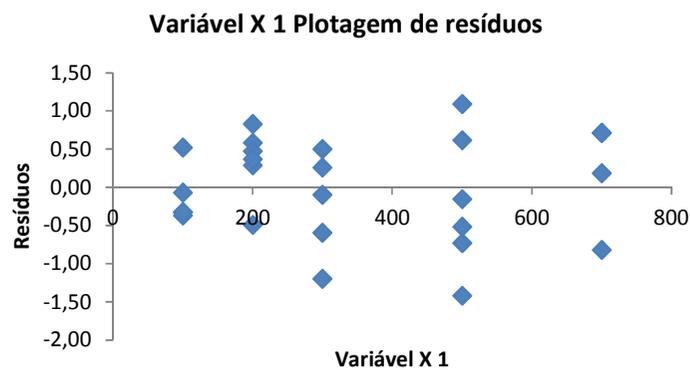


Figura 15. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com oxifluorfen.

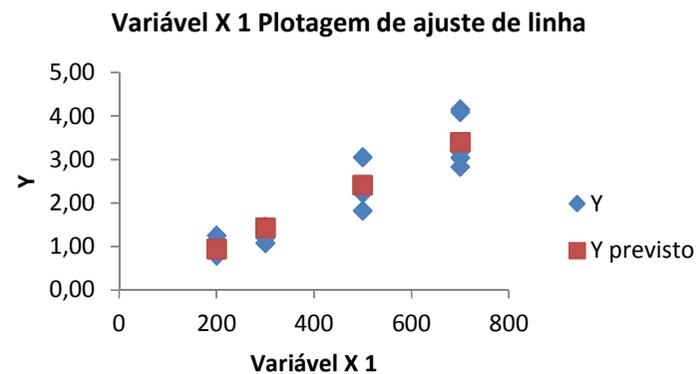
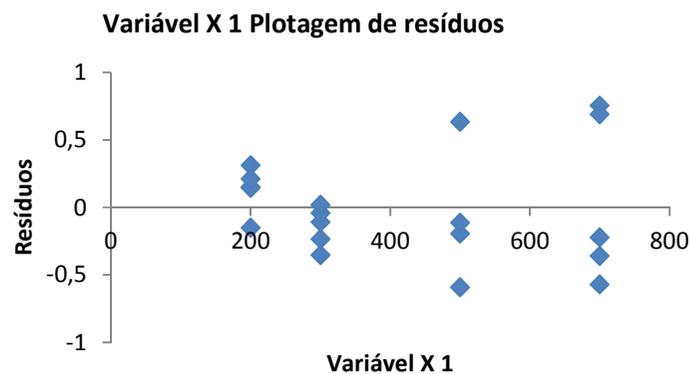


Figura 16. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com paration etil.

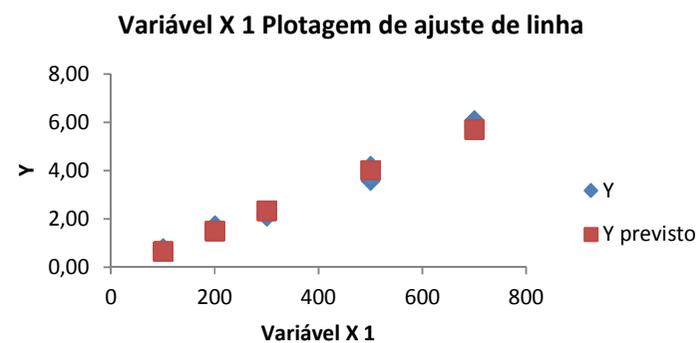
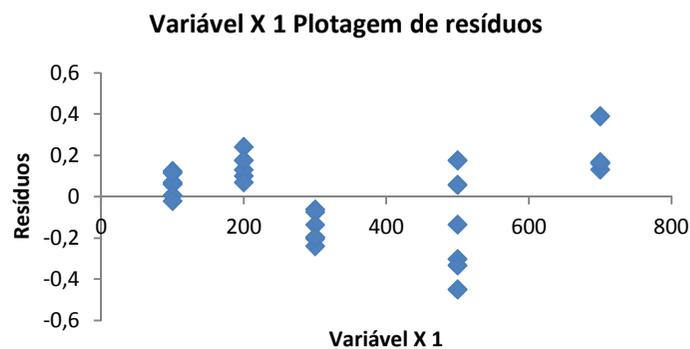


Figura 17. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com paration metil.

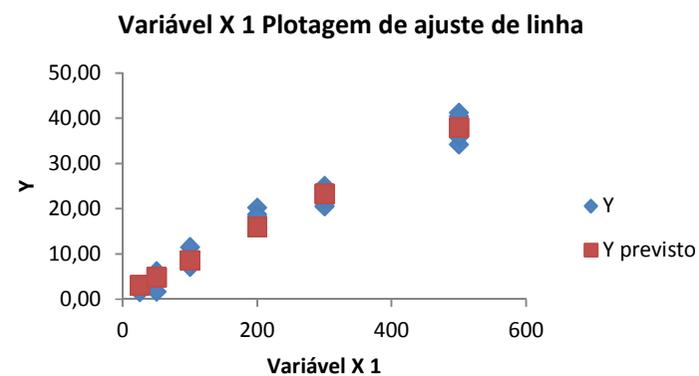
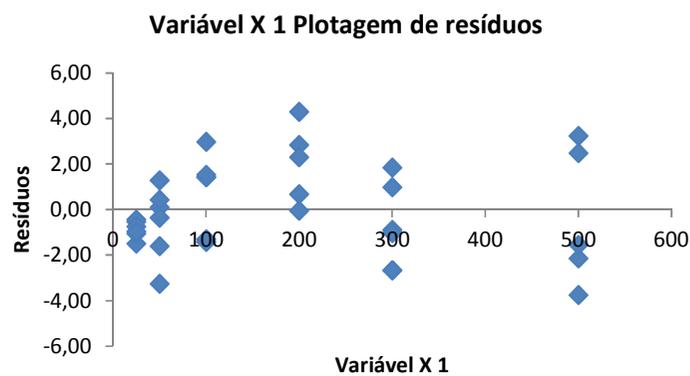


Figura 18. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com pendimentalina.

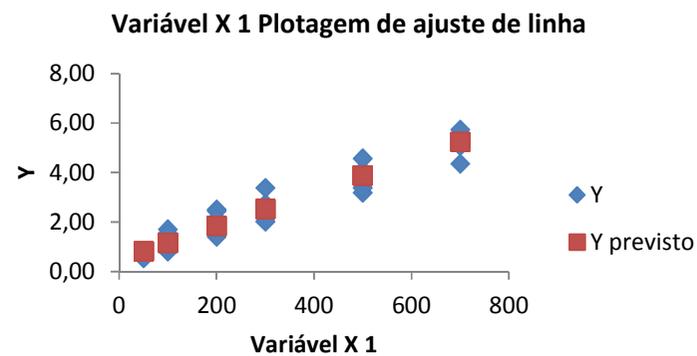
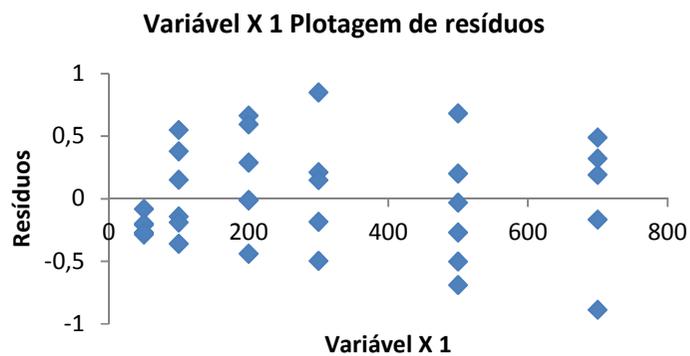


Figura 19. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com pirimifós etil.

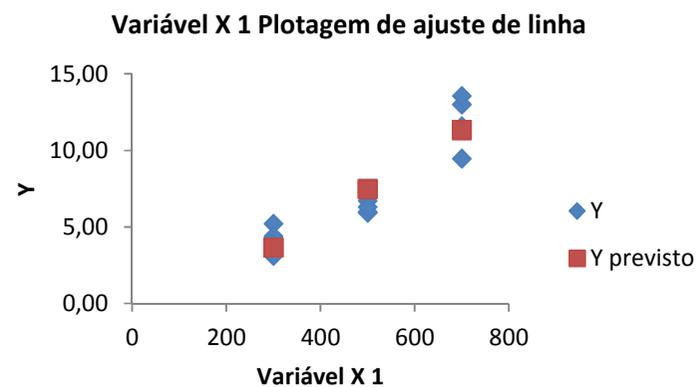
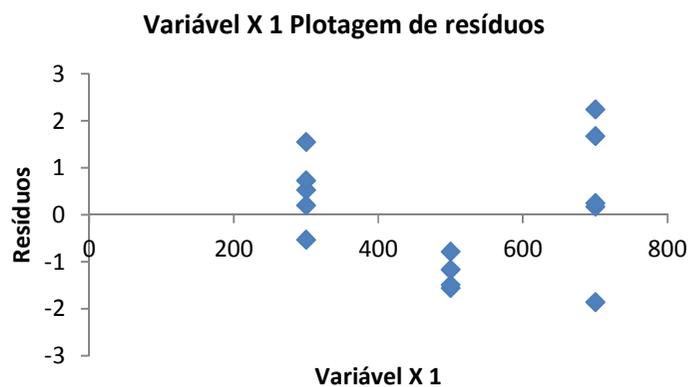


Figura 20. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com propargito.

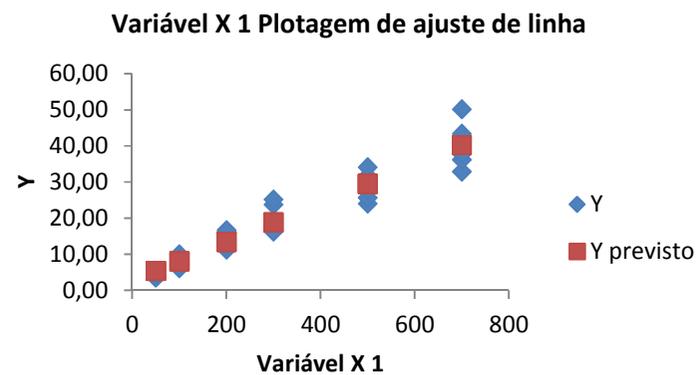
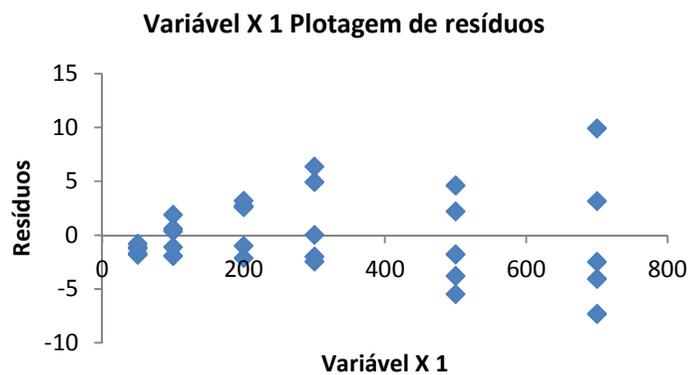


Figura 21. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com terbufós.

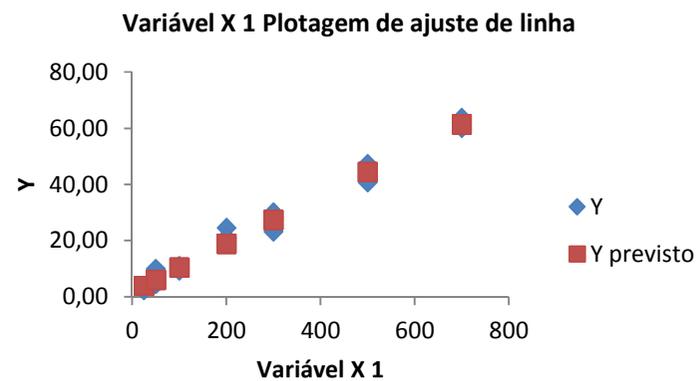
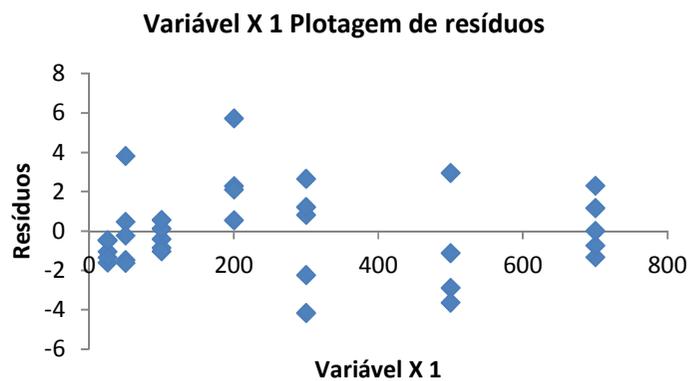


Figura 22. Gráfico de resíduos e curvas analíticas preparadas na amostra branco fortificada com trifluralina.

ANEXO III. QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA ENTREVISTA AOS AGRICULTORES DE PROPRIEDADES VIZINHAS DO CAMPO EXPERIMENTAL DO CNPMA, EMBRAPA, JAGUARIÚNA, SP.

QUESTIONÁRIO

Nome da propriedade: _____

Endereço: _____

Nome do Entrevistado: _____

Função do Entrevistado: _____

Principal atividade da propriedade: _____

1. Qual (ou quais) cultura(s) existe(m) na propriedade?

2. Há aplicação de agrotóxicos na sua propriedade?

3. Qual (ou quais) pesticida(s) geralmente é (são) utilizado(s) em cada cultura?

4. Qual (ou quais) é (são) a(s) forma(s) de aplicação?

5. Qual (ou quais) é (são) a(s) dose(s) aplicada(s)?

6. Qual (ou quais) é (são) o(s) período(s) de aplicação?

