UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

JOSÉ AUGUSTO MICHELETTI BURGARELLI

Análise de resíduos de agrotóxicos em flores de morangueiros (*Fragaria x ananassa* DUCH.), e no pólen coletado no interior das colmeias de abelhas (*Tetragonisca angustula*) nas mediações da plantação

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Vieira

São Carlos

2020

JOSÉ AUGUSTO MICHELETTI BURGARELLI

“Análise de resíduos de agrotóxicos em flores de morangueiros (*Fragaria x ananassa* DUCH.), e no pólen coletado no interior das colmeias de abelhas (*Tetragonisca angustula*) nas mediações da plantação”

Dissertação apresentada no Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Vieira

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP.

São Carlos

2020

Aos meus pais, meus irmãos e à Camila, com carinho e gratidão por todo suporte e incentivo ao longo dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas infinitas bênçãos em minha vida.

À Profª Drª Eny Maria Vieira pela orientação, dedicação, ajuda e apoio que possibilitaram a realização desse trabalho.

À Drª Janete Brigante, pelos ensinamentos, apoio e discussões construtivas durante o período de coleta de amostras e conclusões do trabalho.

Aos membros do grupo de pesquisa, principalmente à Fernanda e à Daiane, por todo auxílio e companheirismo.

Ao Instituto de Química de São Carlos e à Universidade de São Paulo por permitir a realização dessa pesquisa e oferecer a estrutura necessária para minha formação.

Aos meus amigos de graduação e de vida pelo apoio, ajuda, amizade e companheirismo durante minha trajetória.

À Camila, namorada, companheira e amiga. Responsável pelo meu "despertar" no mundo da ciência, que me trouxe muitas respostas e certezas.

À minha família, que é meu alicerce, pelo amor e força em todos os momentos.

Enfim, à todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

“Pela aerodinâmica a abelha não deveria voar. Mas como ela não sabe disso, voa do mesmo jeito”

Mary Kay Ash

RESUMO

O aumento da produtividade agrícola sempre foi muito atrelada ao surgimento e uso dos agrotóxicos. Isso fez com que os efeitos nocivos, bem como os impactos que a aplicação destes poderiam eventualmente causar ao ecossistema fossem deixados de lado em primeiro instante. Fortes indícios revelam que o aumento do uso de agrotóxicos é um dos fatores responsáveis pelo desaparecimento de insetos polinizadores, como as abelhas, que são os animais que mais contribuem nessa ação e estão cada vez mais escassas. O presente estudo visa validar um método capaz de identificar e quantificar o inseticida abamectina e o fungicida difenoconazol em flores de morango (*Fragaria x ananassa* DUCH.) e pólen coletado dentro de colmeias de abelhas da espécie *Tetragonisca angustula* alocadas próximas a cultura de morango. Como forma de isolamento dos analitos das amostras foi utilizado o método QuEChERS. O HPLC foi usado para os primeiros testes de detector, assim foi possível otimizar o método para mais tarde ser utilizado como técnica analítica no LC-MS/MS. Testes preliminares foram feitos, avaliando a precisão, exatidão e recuperação do método, os resultados foram de acordo com as diretrizes dos guias da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os limites de detecção e quantificação para as duas matrizes e os dois analitos, no LC-MS/MS foram 0,15 e 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente e para o método 150 ng/g e 500 ng/g respectivamente. Foram obtidas recuperações acima de 70% e o método mostrou-se de boa reprodutibilidade. A validação do método foi feita com matrizes isentas dos agrotóxicos estudados, que foram fortificadas com os analitos. Após validação, o método foi aplicado em amostras ambientais, o fungicida difenoconazol foi detectado e quantificado, os resultados mostraram um acúmulo do agrotóxico no interior das colmeias.

Palavras-chave: Abamectina. Difenoconazol. Abelha. Pólen. Morango

ABSTRACT

The increase of agricultural productivity associated with the emergence and the extensive use of agrochemicals is undeniable. In this sense, the harmful effects, as well as the impacts of those applied toxic agents over ecosystem, was laid aside in the first moment. However, strong evidences indicates that the rising use of agrochemicals is one of the factors associated with the decreasing of pollinating insects, such as bees, which is considering as the animal that contributes most significantly to this process and are increasingly scarce. The present work aims the development and validation of an analytical procedure for the determination of the insecticide abamectin and the fungicide difenoconazole in strawberry flowers (*Fragaria x ananassa* DUCH.) and pollen sampled from bee hives of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. The QuEChERS method was optimized for extraction and clean-up procedures, and analytical performance and determination of the two agrochemicals were verified using LC-MS/MS. For the method validation, obtained results involving linearity (0.5 to 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$), precision (>80%), accuracy (<20%), and recovery in three spiking levels (250, 1000 and 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$) were satisfactory and in accordance with international guidelines on validation. Matrix effect (>74%) was observed for both contaminants in the two matrices. Thus, method can be applied in further studies, being an important tool for the determination of these agrochemicals on investigated matrices and contributing for the environmental risk assessment involving these organisms.

Keywords: Abamectin. Difenoconazole. Bee. Pollen. Strawberry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Química do princípio ativo do inseticida abamectina.....	17
Figura 2 - Estrutura Química do princípio ativo do fungicida difenoconazol.....	18
Figura 3 - a) Morangos gerados por flores parcialmente polinizadas; b) Morangos gerados por flores completamente polinizadas.....	19
Figura 4 - a) Abelha <i>Tetragonisca angustula</i> ; b) Entrada da colmeia das abelhas <i>Tetragonisca angustula</i>	20
Figura 5 - Procedimentos básicos da extração de analitos utilizando o método QuEChERS..	21
Figura 6 - Ilustração da fase móvel líquida percolando a fase estacionária sólida dentro de uma coluna cromatográfica, demonstrando a separação de dois analitos (quadrados e círculos) com propriedades diferentes.	22
Figura 7 – Esquema ilustrativo de uma partícula de C8 que preenche o interior de uma coluna cromatográfica.	24
Figura 8 – Altura equivalente a um prato teórico (H) elevado (verde) e um menor (vermelho).	25
Figura 9 – Coluna cromatográfica preenchida por partículas irregulares, gerando caminhos preferenciais e alargamento da banda cromatográfica.	25
Figura 10 – a) Fenômeno de difusão das moléculas do analito, de uma região de maior concentração para uma de menor; b) Diminuição dos efeitos do termo “B” pelo aumento do fluxo da fase móvel.	26
Figura 11 – Gráfico correlacionando os termos da equação de Van Deemter com a velocidade da fase móvel e a altura de um prato teórico.	27
Figura 12– Meliponário situado no CRHEA, município de São Carlos/SP	29
Figura 13 – a) Culturas de morango na área rural de Bom Repouso-MG, estruturas em túnel (branco) com gotejamento; b) Morangueiros dentro das estufas brancas.....	30
Figura 14 – Fotos georreferenciadas da propriedade denominada “A1” (Latitude / Longitude: 22.48040791S / 46.15663907W).....	31
Figura 15 - Fotos georreferenciadas da propriedade denominada “A2” (Latitude / Longitude: 22.48150975S / 46.14963667W).....	31
Figura 16 - Ilustração da disposição dos pontos de coleta das flores de morango, sendo P1; P2; P3; P4; P5 mais próximos às colmeias respectivamente.....	32

Figura 17 - Passo-a-passo da extração da abamectina e do difenoconazol da flor do morangueiro e do pólen coletado nas colmeias.....	35
Figura 18 - Cromatograma dos analitos difenoconazol (4,1 min) e abamectina (4,8 min) em solvente (ACN) na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ , utilizando fase móvel de 85% MeCN e 15% H ₂ O (acidificada), coluna C8 e comprimento de onda monitorado de 246 nm – HPLC-DAD.	42
Figura 19 - a) Análise cromatográfica (DAD) do extrato da amostra de flor isenta dos analitos de interesse; b) Análise cromatográfica (DAD) do extrato da amostra de flor contaminada previamente por 5,0 mg L ⁻¹ de abamectina e difenoconazol.....	44
Figura 20 - a) Análise cromatográfica (DAD) do extrato da amostra de pólen isenta dos analitos de interesse; b) Análise cromatográfica (DAD) do extrato da amostra de pólen contaminada previamente por 5,0 mg L ⁻¹ de abamectina e difenoconazol.....	44
Figura 21 - Curvas analíticas da abamectina e difenoconazol na matriz flor e pólen utilizando HPLC-DAD.....	47
Figura 22 - Curvas analíticas da abamectina e do difenoconazol na matriz flor e pólen usando LC-MS/MS.....	50
Figura 23 - Gráfico das concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de flores de morango coletadas na área 1, nos meses de nov/2018, jan/2019 e mar/2019.	56
Figura 24 - Gráfico das concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de flores de morango coletadas na área 1, nos meses de nov/2018, jan/2019 e mar/2019.	56
Figura 25 - Gráfico das concentrações do difenoconazol encontrada nas amostras de pólen coletadas no interior das colmeias fixadas na área 1 e 2, nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas e informações ecotoxicológicas da abamectina.	17
Tabela 2: Propriedades físico-químicas e informações ecológicas do difenoconazol.	18
Tabela 3: Os quatro principais mecanismos de interação dos analitos com a FE em cromatografia líquida.	23
Tabela 4: Gradiente da fase móvel utilizada nas análises cromatográficas, cromatógrafo a líquido acoplado ao detector de massas.	33
Tabela 5: Quantidades utilizadas de sais de extração para cada variante do método QuChERS realizado nesse trabalho.	36
Tabela 6: Quantidades de materiais de <i>clean UP</i> utilizados para cada combinação.	37
Tabela 7: Resultados dos testes de extração para a matriz flor pré-fortificada pelos analitos na concentração de 1,0 mg L ⁻¹	42
Tabela 8: Resultados dos testes de extração para a matriz pólen pré-fortificada pelos analitos na concentração de 1,0 mg L ⁻¹	43
Tabela 9: Intervalo linear, equação da reta e coeficiente de determinação das curvas das amostras pré-fortificadas analisadas no DAD.	45
Tabela 10: Concentrações da abamectina na matriz flor, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando DAD.	45
Tabela 11: Concentrações da difenoconazol na matriz flor, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando DAD.	46
Tabela 12: Concentrações da abamectina na matriz pólen, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando DAD.	46
Tabela 13: Concentrações da difenoconazol na matriz pólen, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando DAD.	46
Tabela 14: Intervalo linear, equação da reta e coeficiente de determinação das curvas das amostras pré-fortificadas analisadas no espectrômetro de massas	47
Tabela 15: Concentrações da abamectina na matriz flor, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando MS/MS.	48
Tabela 16: Concentrações da difenoconazol na matriz flor, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando MS/MS.	48

Tabela 17: Concentrações da abamectina na matriz pólen, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando MS/MS.	49
Tabela 18: Concentrações da difenoconazol na matriz pólen, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando MS/MS.	49
Tabela 19: Limites de detecção e de quantificação dos equipamentos e do método para a abamectina.	51
Tabela 20: Limites de detecção e de quantificação dos equipamentos e do método para o difenoconazol.	51
Tabela 21: Precisão e exatidão para três níveis de concentrações (UV-vis) n=5.	52
Tabela 22: Precisão e exatidão para três níveis de concentrações (Espectrômetro de massas) n=5.	53
Tabela 23: Valores de recuperação (RE), efeito de matriz (EM) e eficiência do processo (EP) das amostras obtidos a partir da espectrometria de massas.	54
Tabela 24: Concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de flores de morangueiros coletadas na área 1 (A1), nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019 e os respectivos erros medidos em desvio padrão relativo por cento (RSD%).	55
Tabela 25: Concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de flores de morangueiros coletadas na área 2, nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019 e os respectivos erros medidos em desvio padrão relativo por cento (RSD%).	55
Tabela 26: Concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de pólen coletadas no interior das colmeias fixadas na área 1, nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019 e os respectivos erros medidos em desvio padrão relativo por cento (RSD%).	58
Tabela 27: Concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de pólen coletadas no interior das colmeias fixadas na área 2, nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019 e os respectivos erros medidos em desvio padrão relativo por cento (RSD%).	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A1	Área 1
A2	Área 2
C1	Colmeia 1
C2	Colmeia 2
C3	Colmeia 3
DAD	Detector de Arranjos de Diodos
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DL50	Dose Letal Mediana
DT50	Tempo de meia vida no solo
EM	Efeito de Matriz
EP	Eficiência do Processo
ESI	Ionização por <i>Eletrospray</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
H ₂ O	Água
Jan	Janeiro
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
LC	Cromatografia Líquida
LD _m	Limite de Detecção do método
LD _s	Limite de Detecção do sistema
LQ _m	Limite de Quantificação do método
LQ _s	Limite de Quantificação do sistema
M _{amostra}	Massa da amostra
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mar	Março
MeCN	Acetonitrila
Min	Minuto
MS	Espectrômetro de Massas
Nov	Novembro

PSA	Amina Primária Secundária
P1	Ponto 1
P2	Ponto 2
P3	Ponto 3
P4	Ponto 4
P5	Ponto 5
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo
RE	Recuperação
r^2	Coefficiente de determinação
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
Uv-Vis	Ultravioleta – Visível
$V_{\text{Ressuspendido}}$	Volume ressuspendido
$\mu\text{.a.}$	Unidade de área

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Padrões analíticos e reagentes.....	28
3.2 Área de coleta de matrizes	28
3.2.1 Amostras isentas de agrotóxicos para o desenvolvimento do método.....	28
3.2.2 Amostras para aplicação do método desenvolvido.....	29
3.3 Análise cromatográfica.....	32
3.3.1 Condições cromatográficas em cromatógrafo líquido acoplado a um detector UV-Vis com arranjos de diodos (HPLC-DAD).....	32
3.3.2 Condições cromatográficas em cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS/MS).....	33
3.4 Preparo das amostras para análise.....	33
3.4.1 Curva no solvente.....	34
3.4.2 Curvas no extrato	34
3.4.3 Extração	34
3.4.3.1 Planejamento referente aos tipos de reagentes utilizados no método QuEChERS de extração	36
3.5 Validação do método.....	37
3.5.1 Seletividade.....	37
3.5.2 Linearidade do método	37
3.5.3 Limite de detecção e de quantificação	38
3.5.4 Precisão e exatidão do método.....	39
3.5.5 Efeito matriz, recuperação e eficiência do método	39
3.6 Coleta das amostras para aplicação do método.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1 Parâmetros otimizados para HPLC-DAD	41
4.2 Seleção do método QuEChERS.....	42
4.3 Parâmetros da validação do método para detector DAD e MS.....	43
4.3.1 Seletividade.....	43
4.3.2 Linearidade	45

4.3.3 Limite de detecção e de quantificação do equipamento e do método.....	50
4.3.4 Precisão e exatidão	51
4.3.5 Efeito de matriz (EM), Eficiência do processo de extração (EP) e Recuperação (RE) do método.....	53
4.4 Aplicação do método.....	54
5 CONCLUSÕES	60
6 REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Com um início pré-histórico, a agricultura modificou o comportamento humano: nômades se transformavam em sedentários e fixavam-se em um único local. Não demorou muito para surgir as primeiras aldeias e com elas, tudo o que envolve viver em sociedade com local definido. Norteados desde os primórdios pela agricultura, o homem sempre buscou maior produção, desenvolvendo técnicas de plantio, fertilizantes artificiais e agrotóxicos. Esses últimos estão sendo bastante contestados atualmente, devido aos impactos negativos que geram para com os próprios seres humanos e o meio ambiente (Feldens, 2018).

“Agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais” (Ministério do Meio Ambiente- MMA, 2017).

Os agrotóxicos apresentam diferentes estruturas químicas, portanto, distintas toxicidades e organismos-alvo. O uso dessas substâncias na agricultura visa uma maior produtividade e uma maior conservação de grãos no período de estocagem (Hiemstra et al., 2007; Queiroz et al., 2012).

Esses compostos começaram a ganhar destaque durante a Segunda Guerra Mundial, na qual tropas Americanas faziam o uso do diclorodifeniltricloroetano (DDT) para a erradicação de insetos, que muitas vezes eram vetores de doenças, causando muitas baixas nos campos de batalha. O produto foi então rotulado como eficiente e de baixo custo, sendo amplamente distribuído para fins agrícolas e extinção de pragas em espaços urbanos, no período pós guerra.

Porém, essa grande popularização fez com que etapas como a análise dos impactos que esse novo agente poderia causar fossem ignoradas, o que mais tarde demonstrou-se um grande erro. O sucesso desse agroquímico impulsionou o surgimento de novos organossintéticos, que foram amplamente difundidos e apresentaram grande contribuição para o aumento da produtividade agrícola, bem como o crescimento exponencial das agroindústrias. Esses eventos unidos ficaram conhecidos como a “Revolução Verde” (Bull & Hathaway, 1986).

Uma forma muito utilizada para medir a produtividade agrícola era a de contabilizar quantas pessoas um produtor era capaz de alimentar (além de si mesmo). Um estudo conduzido na Alemanha por Martins (2000), mostrou que em 1950 (antes da Revolução Verde), um produtor era capaz de alimentar 10 pessoas, e em 1991 (após a Revolução Verde), o mesmo produtor alimentava 72 pessoas. É inegável que com o advento do uso dos agrotóxicos,

fertilizantes artificiais e novas técnicas de plantio, a produtividade agrícola atingiu números nunca antes vistos.

Todavia, com o uso indiscriminado desses novos produtos, bem como a falta de estudos quanto aos malefícios que os mesmos poderiam vir a causar, impactos negativos foram sentidos no meio ambiente e nas pessoas responsáveis pela aplicação dos agrotóxicos nas lavouras, que na maioria das vezes não recebiam quase nenhuma instrução e equipamentos de proteção para realizar tal tarefa (Stallen & Lumkes, 1990). Segundo pesquisa realizada pela SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – Ministério da Saúde/FIOCRUZ) entre os anos de 2007 a 2017 foram registradas cerca de 40 mil intoxicações por agrotóxicos no Brasil e 1900 óbitos em decorrência. A ação desses sobre a saúde humana, principalmente nos agricultores que trabalham diariamente nas culturas, costuma ser prejudicial à saúde e muitas vezes fatal, provocando náuseas, tontura, dores de cabeça, alergias, lesões renais e hepáticas, cânceres, infertilidade, alterações genéticas, entre outros (Soares, 2014).

Em 2015, no mundo, a venda de agrotóxicos movimentou US\$ 54,6 bilhões de dólares e o Brasil foi responsável por US\$ 9,61 bilhões do total mencionado, o que corresponde a 887,6 mil toneladas desses produtos, equivalente a 6,19 kg por brasileiro, alcançando, já em 2009, o posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo, ultrapassando os Estados Unidos (SINDIVEG, 2015).

Um dos agrotóxicos muito utilizado nos dias de hoje, devido ao seu amplo espectro de atuação, é o inseticida abamectina (Figura 1), empregado em quase trinta tipos de culturas tendo insetos e ácaros como seus alvos e sendo aplicado em maiores concentrações nos cultivos de tomate, pimentão, pepino, melancia e morango (Abamectin Nortox – bula).

Esse agente químico é considerado, quanto a sua periculosidade ao meio ambiente, de “Classe III – Perigoso ao meio ambiente: altamente persistente e altamente tóxico a organismos aquáticos”. Testes de toxicidade em animais (ratos e coelhos) de laboratório mostraram que a contaminação aguda causa tremores musculares, ataxia e midríase e a contaminação crônica causa dilatação das pupilas, perda de peso, letargia e tremores (Abamectin Nortox – bula).

Figura 1 - Estrutura Química do princípio ativo do inseticida abamectina
 Fonte: Abamectin Nortox – bula.

A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas e informações ecotoxicológicas da abamectina.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas e informações ecotoxicológicas da abamectina.

Propriedades	Abamectina
Massa molecular	873,08 (B _{1a}) – 80% ; 859,05 (B _{1b}) – 20%
Solubilidade em água (pH: 6,59 e 20 °C)	0,0003 g/L
Log Kow (20,1 °C)	4,30
Viscosidade (20 °C)	6,34 cP
Dose agrônômica em massa do produto para a cultura de morangos	13,5 g/ha ; máximo de 2 aplicações em 14 dias
DL ₅₀ Ratos (oral)	2250 mg/Kg
DL ₅₀ <i>Apis mellífera</i> (oral), 48h	0,168 µg/abelha
Persistência no solo (DT ₅₀)	1 dia
Persistência em ambiente aquático (DT ₅₀)	89 dias (sedimentos) 2,4 dias (água apenas)

Fonte: Bula -Nortox.

Outro produto regularmente utilizado na agricultura é o fungicida difenoconazol (Figura 2), indicado para aplicação em quase setenta tipos de culturas, sendo que as que mais requerem quantidades altas do agrotóxico são: nectarina, pêssago e ameixa, seguidos de arroz e couve-flor e em terceiro lugar, morango, pimentão e citros (ANVISA, 2018). Ele é considerado de “Classe II – Muito perigoso ao meio ambiente: altamente persistente no meio e altamente tóxico a organismos aquáticos” de forma que os testes em animais (ratos e coelhos) revelaram que sua toxicidade aguda causa irritação nos olhos, trato respiratório e dérmica, que sua ingestão provoca náusea, vômitos, dores abdominais, diarreia, lesões significativas da parede do tubo

digestivo principalmente do estômago, associadas a espasmos musculares, convulsões e alteração da consciência. A inalação dessa substância em grandes quantidades provoca tosse, dispneia e, nos casos mais graves, expectoração sanguinolenta. Por fim, a contaminação crônica com esse composto pode causar opacificação do cristalino e lesão hepatotóxica que vai da vacuolização até a necrose focal ou multifocal, além do mesmo ser considerado possível agente carcinogênico (Difenoconazol – bula).

Figura 2 - Estrutura Química do princípio ativo do fungicida difenoconazol.
Fonte: Difenoconazol – bula.

A Tabela 2 apresenta algumas propriedades físico-químicas e informações ecológicas do difenoconazol.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas e informações ecológicas do difenoconazol.

Propriedades	Difenoconazol
Peso molecular	406,30
Solubilidade em água (pH: 6,59 e 20 °C)	0,0033 g/L
Log Kow (25,0 °C)	4,40
Viscosidade (25 °C)	529 cP
Dose agrônômica em massa do produto para a cultura de morangos	20,0 g/ha ; máximo de 6 aplicações em 14 dias
DL ₅₀ Ratos (oral)	1463 mg/Kg
DL ₅₀ <i>Apis mellifera</i>	0,177 µg/abelha (oral)
	0,100 µg/abelha (contato)
Persistência no solo (DT ₅₀)	85 dias
Persistência em ambiente aquático (DT ₅₀)	1053 dias (sedimentos)
	3 dias (água apenas)

Fonte: Bula Score; PBBD – Bio-Pesticides DataBase.

Uma pesquisa feita pela ANVISA (2016) avaliou 2500 alimentos de 18 tipos diferentes em 25 estados do Brasil. Os resultados mostram que as culturas de morango utilizam maiores quantidades de agrotóxicos, incluindo abamectina e difenoconazol. Do total avaliado, 63,4%

das amostras de morango foram consideradas contaminadas por excesso de agrotóxicos e/ou com a presença de produtos já banidos, ficando atrás apenas do pimentão (91,8%).

A área plantada hoje no Brasil é próxima a 4 mil hectares, o que gera uma produção de cerca de 105 mil toneladas da fruta e os principais estados produtores são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Distrito Federal (Reisser & Antunes, 2015).

Em média 70% dos morangos produzidos no Brasil são destinados ao consumo “in natura”, e os outros 30% às necessidades da indústria, principalmente ao mercado de frutas e derivados congelados, sendo a fruta que mais apresenta demanda nesse setor (IBRAF, 2012).

Para um melhor desenvolvimento do morango é necessário a presença de agentes polinizadores, tais como as abelhas. Flores parcialmente polinizadas geram morangos com desenvolvimento incompleto como pode ser visto na Figura 3-a). Dessa forma, a presença desses insetos tem grande importância econômica no ramo.

Figura 3 - a) Morangos gerados por flores parcialmente polinizadas; b) Morangos gerados por flores completamente polinizadas

Fonte: ECOA, 2016.

As culturas que não dependem de polinizadores movimentam, hoje, cerca de US\$ 162 bilhões por ano no mundo, já as dependentes, US\$ 837 bilhões (Silva et al., 2014), o que mostra a importância de um ecossistema em equilíbrio em função da produtividade de alimentos.

Um estudo feito em 75 culturas agrícolas brasileiras feito por Giannini et. al. (2015), registrou a presença de 250 espécies de animais polinizadores, sendo 87% desses, abelhas, colocando esses insetos como os primeiros no ranking de polinizadores no mundo. Embora a tamanha importância das abelhas como agentes polinizadores, sua população está diminuindo

cada vez mais com o passar dos anos. O desaparecimento maciço das abelhas *Apis melífera* na Europa e EUA ficou conhecido com a Síndrome do Colapso das Colônias e no Brasil, essa ameaça passou a ser percebida no início de 2010, quando as abelhas mamangavas começaram a desaparecer, a ponto de se extinguir em certas regiões do país (Giannini et al., 2015). Ainda não há uma conclusão consolidada sobre a diminuição no número de abelhas no planeta, porém vários fatores estão sendo investigados, como as mudanças climáticas, o aumento das monoculturas, o desmatamento e o uso de agrotóxicos (ECOIA, 2016).

As flores de morango atraem várias abelhas e - apesar do fato de serem bissexuais e auto férteis, podendo ser também autopolinizadas ou polinizadas pelo vento - estudos comprovam evidente aumento da produtividade da fruta quando uma densidade maior de abelhas nativas participa da polinização, gerando frutos maiores e menos deformados, agregando valor de mercado ao produto (Melagodi-Braga & Kleinert, 2004).

Bastante presente no Brasil, a *Tetragonisca angustula* (Figura 4-a) é uma espécie de abelha, popularmente conhecida como “abelha canudo”, devido ao formato da entrada de suas colmeias assemelharem-se com o mesmo, como pode ser visto na Figura 4-b). Esses insetos são comumente encontrados nas regiões de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (Silveira et al., 2002) e pertencem à classe de abelhas que não apresentam ferrão (Jataí, Mandaçaia, Uruçu etc). O mel produzido por essas abelhas possui maior valor econômico, por ser considerado de sabor e aroma peculiar (Oliveira, 2013) e são bastante conhecidas também, por se adaptarem bem a ambientes urbanos, não raro fixam colmeias em rachaduras de construções.

Figura 4 - a) Abelha *Tetragonisca angustula*; b) Entrada da colmeia das abelhas *Tetragonisca angustula*.
Fonte: Web Bee / Giselda Person.

Como é comum às abelhas, as colmeias de *Tetragonisca angustula* é populada por uma sociedade estratificada, em sua grande maioria (83,6%) constituída por operárias, uma pequena parcela da população é formada por soldados (abelhas operárias maiores), zangões e rainha.

Desse modo justifica-se a importância do surgimento de trabalhos que visam entender qual é o impacto que os agrotóxicos vem causando na vida dos animais polinizadores. Este estudo insere-se no grupo de estudos que visa a detecção de possíveis contaminações por agrotóxicos em colmeias de abelhas.

Um método bastante utilizado para quantificação de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais foi descrito por Anastassiades (2003), e é denominado QuEChERS, da sigla em inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe* (rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro). Os procedimentos básicos da extração podem ser observados na Figura 5.

Figura 5 - Procedimentos básicos da extração de analitos utilizando o método QuEChERS
Fonte: Viera et al., 2016.

Como apresentado na Figura 5, o método consiste na adição de um solvente orgânico à amostra, formando uma solução de duas fases (orgânica e aquosa) e em seguida são adicionados os sais de extração. No método original, descrito por Anastassiades (2003), o solvente orgânico utilizado foi acetonitrila (MeCN), e os sais de extração, sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio.

Quando o solvente orgânico é adicionado à solução aquosa da amostra, duas fases são formadas. Naturalmente, de acordo com as propriedades das moléculas presentes na amostra, elas sofrem partição, ou seja, “migram” para o solvente que possui maior miscibilidade em relação as mesmas, caracterizando uma extração líquido-líquido simples. Todavia, para alguns analitos, essa operação deve ser realizada várias vezes a fim de se obter uma extração perto de 100%. No QuEChERS, os sais de extração têm a finalidade de maximizar esse efeito, sem a necessidade da utilização de mais solvente orgânico e operações repetidas. Eles fazem isso a

partir do efeito chamado de *salting out*, que nada mais é do que a saturação do meio aquoso, tornando-o menos disponível aos analitos, gerando uma maior transferência desses para o meio orgânico.

Como observado na Figura 5, o solvente orgânico é transferido para um frasco contendo adsorventes, que atuam “limpando” a amostra, uma vez que, no processo de transferência dos analitos de um meio a outro, moléculas indesejadas não são exclusas, havendo a necessidade eliminá-las, pois podem atuar como interferentes na fase de análise cromatográfica. No método original, utiliza-se sulfato de magnésio e PSA (amina primária-secundária) com intuito de eliminar as moléculas mais lipofílicas. Após essa etapa uma parcela do solvente orgânico é transferida para *vial* e analisada por instrumentos cromatográficos.

Desde o desenvolvimento do método original, muitos derivados surgiram, utilizando outros sais de extração, outros materiais adsorventes, solventes etc. O método começou a ser aplicado, então, não só para amostras alimentícias, mas para muitas outras (Prestes *et al.*, 2009), como esse trabalho em questão.

Foi utilizado a cromatografia líquida para separação dos analitos de interesse. As técnicas já são bem conhecidas e fundamentadas. É um processo que consiste em duas fases, a móvel (FM) e a estacionária (FE), a primeira sendo um líquido que percola à segunda. A fase móvel carrega os analitos, que interagem com a fase estacionária, sendo que as interações do analito com a fase estacionária e móvel retardam ou aceleram a saída deste da coluna cromatográfica, separando as moléculas de acordo com suas propriedades (Collins et al. 2007), como mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Ilustração da fase móvel líquida percolando a fase estacionária sólida dentro de uma coluna cromatográfica, demonstrando a separação de dois analitos (quadrados e círculos) com propriedades diferentes.

Fonte: Hayes et al., 2014.

Há diferentes tipos de mecanismos de interação utilizados hoje na cromatografia líquida. Os mais usuais são: adsorção, partição, troca iônica e exclusão molecular (ou por tamanho). Esses mecanismos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Os quatro principais mecanismos de interação dos analitos com a FE em cromatografia líquida.

Mecanismo de interação	Ilustração das partículas que preenchem a coluna	Descrição da interação
Adsorção		FE sólida, o analito é adsorvido na superfície da partícula sólida, o equilíbrio entre a FE e da FM justifica a separação dos diferentes analitos.
Partição		FE líquida forma um filme na superfície de um suporte sólido, o analito é absorvido, portanto, no interior da FE, o equilíbrio entre a FE e da FM justifica a separação dos diferentes analitos.
Troca Iônica		Ânions ou cátions são ligados covalentemente à FE, analitos de cargas opostas às impregnadas na FE são atraídos pelas forças eletrostáticas.
Exclusão molecular		A FE geralmente é um gel poroso, os analitos de maior tamanho não adentram a FE, chegando ao detector mais rápido do que os analitos maiores, que passam pelos poros da FE retardando a chegada ao detector.

No presente trabalho, o mecanismo de interação foi a adsorção, sendo uma FE revestida por C8, ou seja, partículas de sílica ligadas quimicamente à cadeias carbônicas alifáticas contendo 8 carbonos, como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 – Esquema ilustrativo de uma partícula de C8 que preenche o interior de uma coluna cromatográfica.
Fonte: Silva et al., 2004.

A eficiência da separação cromatográfica não apenas depende da escolha das fases estacionárias e móveis, mas também do empacotamento da coluna, tamanho das partículas, da difusão e fluxo da fase móvel e também da resistência à transferência de massas.

Todas essas “variáveis” foram equacionadas por Van Deemter (Eq. 1) (Deemter et al 1956).

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C \cdot \mu \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: H = Altura equivalente a um prato teórico;

A = Termo de difusão de Eddy;

B = Coeficiente de dispersão;

C = Resistência à transferência de massa;

μ = Velocidade linear, ou fluxo da fase móvel.

Altura equivalente a um prato teórico, representada pela letra “H” na equação de Van Deemter, mede, em termos físicos, a eficiência da separação cromatográfica, assim, quão maior

a eficiência, menor H , que é representado em unidades de comprimento. Intrinsecamente ela representa a distância que os analitos percorrem na coluna para realizarem uma interação com a fase estacionária, portanto, quanto menor essa distância, mais interações serão realizadas e melhor será a eficiência na separação (Deemter et al., 1956), a Figura 8 ilustra uma cromatograma de H elevado (verde) e de um H menor (vermelho).

Figura 8 – Altura equivalente a um prato teórico (H) elevado (verde) e um menor (vermelho).
Fonte: Lanças F.M., 2016.

É notório a melhor resolução representada no cromatograma vermelho, cuja coluna entrega melhor eficiência, portanto “ H ” menor.

O termo “ A ” da Equação 1 refere-se ao quão bem a fase estacionária preenche a coluna cromatográfica, assim, uma coluna com o termo A elevado possui um preenchimento muito irregular, aumentando a largura da banda cromatográfica e consequentemente diminuindo a eficiência de separação dos analitos (Lanças et al. 2016), conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Coluna cromatográfica preenchida por partículas irregulares, gerando caminhos preferenciais e alargamento da banda cromatográfica.

Fonte: Lanças F.M., 2016.

Como mostrado na Figura 9, o empacotamento da coluna cromatográfica é muito importante no que refere-se à eficiência de separação de analitos, pois quando a coluna é

preenchida por partículas irregulares, de tamanhos não uniformes e maiores, a fase móvel tende a percolar por caminhos preferencias que se formam pelo preenchimento ruim da coluna, que são bem mais presentes nessa situação de empacotamento. Portanto, moléculas do mesmo composto interagem de forma diferente com a coluna (ora percorrendo um caminho, ora outro), alargando a banda cromatográfica e diminuindo a eficiência de separação (Collins et al. 2007).

O termo “B”, coeficiente de dispersão, refere-se à difusão que o analito sofre em solução, migrando de uma região de maior concentração para uma região de menor concentração. Esse fenômeno é inevitável e está de acordo com as leis da termodinâmica. Uma forma de minimizar esse efeito é aumentar a velocidade do fluxo da fase móvel (μ), dessa forma o tempo que o analito tem para difundir ao longo da corrida cromatográfica é menor, diminuindo, portanto, o atraso na chegada das moléculas do composto ao detector, gerando bandas cromatográficas mais finas, de melhor resolução. A Figura 10 ilustra o fenômeno descrito nesse parágrafo (Collins et al. 2007).

Figura 10 – a) Fenômeno de difusão das moléculas do analito, de uma região de maior concentração para uma de menor; b) Diminuição dos efeitos do termo “B” pelo aumento do fluxo da fase móvel.
Fonte: Lanças F.M., 2016.

O termo “C” da Equação 1 refere-se à resistência à transferência de massa. Na corrida cromatográfica existem interações entre as moléculas dos analitos de interesse e a fase estacionária, portanto há um tempo mínimo para que essas interações entrem em equilíbrio. Devido a isso, esse termo é acompanhado pela velocidade do fluxo da fase móvel (μ), uma vez que aumentando a velocidade, diminui-se o tempo para o equilíbrio entre o analito e a fase estacionária, alargando a banda cromatográfica (Collins et al. 2007),.

Uma vez conhecendo os termos da equação de Van Deemter, percebe-se que a velocidade do fluxo da fase móvel, quando muito alta, aumenta a altura equivalente a um prato teórico (H), devido à uma influência direta do termo “C”. Em contra partida, uma velocidade

muito baixa, também aumenta H , causada pela influência do termo “B”. Conclui-se que há uma faixa de velocidade cuja qual H seja menor possível (Lanças et al. 2016), como é demonstrado no gráfico da Figura 11.

Figura 11 – Gráfico correlacionando os termos da equação de Van Deemter com a velocidade da fase móvel e a altura de um prato teórico.

Fonte: Lanças F.M. (2016)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral da pesquisa foi analisar resíduos de agrotóxicos (abamectina e difenoconazol) em flores de morangueiros (*Fragaria x ananassa* DUCH.) e no pólen coletado dentro das colmeias de abelhas nativas sem ferrão da espécie *Tetragonisca angustula*, utilizando um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de massas (LC-MS/MS), relacionando as concentrações de agrotóxicos encontradas para com possíveis malefícios a esses indivíduos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver, validar e aplicar método analítico para a identificação e quantificação dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol presentes nas flores de morango e pólen das colmeias (amostras coletadas em plantações de morangos no município de Bom Repouso – MG) utilizando um cromatógrafo a líquido acoplado à um detector de massas (LC-MS/MS).
- Estabelecer método de extração adequado para pré-concentração das amostras provenientes das flores dos morangos e pólen das colmeias, objetivando detectar e quantificar resíduos de abamectina e difenoconazol. Para este estudo foi utilizado o QuEChERS com algumas modificações.
- Mensurar possíveis impactos para com as abelhas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Padrões analíticos e reagentes

Os padrões analíticos e os reagentes utilizados nessa pesquisa apresentam alto grau de pureza (99%) e foram adquiridos da *Sigma-Aldrich*, assim como os solventes de grau HPLC.

Ambos os padrões (abamectina e difenoconazol) foram adquiridos no estado sólido, necessitando o preparo de soluções diluídas e o solvente utilizado foi a acetonitrila (MeCN) da marca *Riedel-de Haën*TM, sendo as soluções conservadas em freezer a -18° C.

3.2 Área de coleta das matrizes

3.2.1 Amostras isentas de agrotóxicos para o desenvolvimento do método

Foram coletadas amostras isentas de agrotóxicos para o desenvolvimento do método. As flores de morangueiros utilizadas para esse fim, foram coletadas em um canteiro situado na cidade de São Carlos – SP, cujo qual, foi cultivado de forma orgânica.

As amostras de pólen coletadas no interior das colmeias e isentas de agrotóxicos, foram obtidas no município de São Carlos, no meliponário situado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA - EESC) (Figura 12).

Figura 12– Meliponário situado no CRHEA, município de São Carlos/SP
Fonte: Elaborada pelo autor.

A ausência dos agrotóxicos foi confirmada por análises realizadas em HPLC-DAD.

3.2.2 Amostras para aplicação do método desenvolvido

As amostras que foram submetidas às análises, após o método ter sido validado, foram coletadas no município de Bom Repouso/MG. Minas destaca-se por ser a região que mais produz morango no Brasil e Bom Repouso está entre as primeiras cidades.

No último levantamento feito pela Empresa Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER-MG) em 2012, Bom Repouso destinou cerca de 300 hectares para o plantio de morangueiros, produzindo 16,2 toneladas da fruta. Na Figura 13 é possível perceber a incidência da cultura em um curto espaço de distanciamento.

Figura 13 – a) Culturas de morango na área rural de Bom Repouso-MG, estruturas em túnel (branco) com gotejamento; b) Morangueiros dentro das estufas brancas.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Portanto a alta incidência de plantações de morangueiros na região, o que geralmente vem atrelado o alto uso de agrotóxicos, propiciou um ambiente ideal para a realização dos testes.

Tendo em vista isso, foram selecionadas duas propriedades para coleta das flores de morango e fixação de 3 colmeias (em cada) de *Tetragonisca angustula*. Denominou-se “Área 1” (A1) a primeira propriedade e “Área 2” (A2) a outra. As Figuras 14 e 15 são fotos georreferenciadas dos locais aonde as coletas foram realizadas.

Figura 14 – Fotos georreferenciadas da propriedade denominada “A1” (Latitude / Longitude: 22.48040791S / 46.15663907W).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15 - Fotos georreferenciadas da propriedade denominada “A2” (Latitude / Longitude: 22.48150975S / 46.14963667W).

Fonte: Elaborado pelo autor.

É importante salientar que das 3 colmeias fixadas na área 1, apenas duas vingaram, e para a análise das flores de morangueiros, o canteiro foi esquadrado, de modo a ser coletado 5 amostras por canteiro da cultura, 4 pontos do vértice (P1; P2; P4; P5) e 1 ponto central (P3), sendo os vértices P1, P2, P3, P4 e P5 os mais próximos das colmeias respectivamente. Para melhor exemplificar, a coleta das flores é apresentada a Figura 16.

Figura 16 - Ilustração da disposição dos pontos de coleta das flores de morango, sendo P1; P2; P3; P4; P5 mais próximos às colmeias respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Análise cromatográfica

Inicialmente, utilizou-se um cromatógrafo a líquido acoplado a detector DAD, de forma que essa etapa foi importante na realização de testes preliminares, que visaram determinar as condições cromatográficas de análise.

Após a conclusão dessa etapa, o método foi ajustado para a utilização de cromatógrafo a líquido acoplado a espectrômetro de massas.

3.3.1 Condições cromatográficas em cromatógrafo líquido acoplado a um detector UV-Vis com arranjos de diodos (HPLC-DAD)

O cromatógrafo a líquido utilizado foi um Agilent série 1200, equipado com coluna C8 Nucleodur Macherey-Nagel GmbH e Co. 100-5 fase reversa (4,6 x 100 mm; 5 µm). O sistema

é composto por um injetor automático, bomba quaternária, sistema degaseificador, detector UV-Vis com arranjo de diodos e software *ChemStation* para aquisição e processamento de dados. A fase móvel utilizada foi água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (A) e acetonitrila (B) e a corrida cromatográfica foi feita de modo isocrático, com a proporção 15% de A e 85% de B. A vazão utilizada no método foi de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL e temperatura da coluna controlada (25°C). O comprimento de onda selecionado para ambos os analitos foi 246 nm e o tempo de corrida foi de 10 minutos.

3.3.2 Condições cromatográficas em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (LC-MS/MS)

O cromatógrafo utilizado nesse estudo foi um Agilent série 1200, que também foi equipado com a coluna C8 MN Nucleodur. O espectrômetro de massas acoplado é um QTRAP 3200 triplo quadrupolo da SCIEX. Os compostos foram ionizados por *electrospray* (Electro Spray Ionization, ESI) utilizando uma voltagem de 5500 volts e uma temperatura de secagem de solvente de 700 °C, o tempo de corrida foi de 15 minutos. Como fase móvel, dois componentes foram utilizados, água milli-Q acidificada 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila com 1% de ácido fórmico (B), foi feito um gradiente de eluição conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Gradiente da fase móvel utilizada nas análises cromatográficas, cromatógrafo a líquido acoplado ao detector de massas.

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	A (H ₂ O + 0,1% Ác. Fórmico)	B (ACN + 1% Ác.Fórmico)
0,0	1,00	60	40
0,5		60	40
8,0		0	100
12,0		0	100
12,5		60	40
18,0		60	40

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Preparo das amostras para análise

Para posterior validação do método analítico, segundo as normas da ANVISA e o MAPA, são necessários o preparo de três curvas analíticas, curva no solvente, curva do extrato pós-fortificado e curva no extrato pré-fortificado.

3.4.1 Curva no solvente

A curva no solvente foi preparada à partir de uma solução estoque contendo abamectina e difenoconazol em acetonitrila na concentração de 1000 mg L^{-1} . Devido ao uso de dois tipos de detectores, e portanto sensibilidade diferente, foram construídas duas curvas no solvente, com diferentes níveis de concentrações: uma que foi analisado no HPLC-DAD e outra no LC-MS/MS.

Para o DAD foi feita uma curva com as seguintes concentrações: 250,0; 500,0; 750,0; 1000,0; 1500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já para o equipamento com o detector de massas, as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 250,0; 500,0; 750,0; 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.4.2 Curvas no extrato

Foram feitas curvas no extrato da amostra na condição pré-fortificada, ou seja, as flores e o pólen isentos dos agrotóxicos foram contaminadas por concentrações conhecidas de abamectina e difenoconazol antes do processo de extração. Também foi feita na condição pós-fortificada, as matrizes isentas de agrotóxico são processadas e no extrato final é feita a contaminação. As mesmas concentrações já citadas no item 3.3.1 foram utilizadas para a confecção dessas curvas analíticas. A metodologia do processo de extração será comentada no item 3.4.3.

3.4.3 Extração

A extração dos analitos foi feita pelo método QuEChERS modificado, o qual consiste na utilização de solvente orgânico, sais de extração e compostos de *clean up*. A extração ocorre por mecanismo de *salting-out*, que consiste basicamente na saturação do meio aquoso com um sal, promovendo a “migração” dos analitos ali presentes para a fase orgânica. A etapa de *clean up* é responsável por retirar do meio os possíveis interferentes oriundos das matrizes utilizadas.

O passo-a-passo da extração feita nesse estudo, tanto para a matriz flor, quanto para a matriz pólen, está esquematizado na Figura 17.

Figura 17 - Passo-a-passo da extração da abamectina e do difenoconazol da flor do morangueiro e do pólen coletado nas colmeias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No caso das amostras pré-fortificadas, a contaminação das matrizes ocorre como mostrado na etapa “a” da Figura 5. No caso das amostras pós-fortificadas não ocorre a contaminação no item a, mas sim no momento de ressuspensão do extrato, que é ilustrado na etapa “m”.

A massa de amostra foi definida em 0,5 g por uma questão de disponibilidade e cautela para com possíveis impactos às abelhas, além de não comprometer a quantificação dos analitos.

3.4.3.1 Planejamento referente aos tipos de reagentes utilizados no método QuEChERS de extração

Com a finalidade de fazer um estudo sobre a melhor metodologia de extração dos agrotóxicos, foram feitos testes preliminares que envolveram variantes do procedimento tradicional do método QuEChERS.

O método QuEChERS tradicional envolve uma fase de extração seguida por *clean up*, cuja primeira, como o próprio nome já diz, é responsável pela transferência dos analitos presentes na matriz à fase orgânica utilizada e a segunda por reter determinados interferentes oriundos da matriz em questão.

Na etapa de extração, três combinações de sais mais utilizados foram testados: a do método “original” que consiste em usar sulfato de magnésio e cloreto de sódio, a “acetato” que é uma combinação de sulfato de magnésio e acetato de sódio, e por fim, a “citrato”, que envolve os sais sulfato de magnésio, cloreto de sódio e citrato de sódio (Prestes et al., 2011). Esses testes são feitos para possibilitar a escolha do variante do método que apresente os melhores resultados para a validação, uma vez que as mudanças dos reagentes de extração e *clean up*, podem, de acordo com as propriedades físico-químicas dos analitos, gerar recuperações melhores. As quantidades de cada sal em cada variante que foram utilizadas nesse estudo estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5: Quantidades utilizadas de sais de extração para cada variante do método QuChERS realizado nesse trabalho.

Método	Sulfato de Magnésio (g)	Cloreto de sódio (g)	Acetato de sódio (g)	Citrato de sódio (g)
Original	0,40	0,10	-	-
Acetato	0,60	-	0,15 g	-
Citrato	0,40	0,10	-	0,10

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como já mencionado, após a etapa de extração, segue a etapa de *clean up*. Cada matriz é constituída por determinadas substâncias, conferindo propriedades físicas e químicas diferentes umas das outras e devido a isso, vários materiais podem ser empregados nesse processo.

Neste estudo, foram feitos três tipos de *clean up* para cada extrato obtido, portanto, ao todo, nove resultados. Os compostos utilizados nessa etapa foram: sulfato de magnésio, PSA (amina primária secundária), C18 e carvão ativado. As três combinações utilizadas estão apresentadas na Tabela 6 e foram chamadas de “original”, “original + C18” e “original + carvão ativado”.

Tabela 6: Quantidades de materiais de *clean UP* utilizados para cada combinação.

Combinação	Sulfato de Magnésio (mg)	PSA (mg)	C18 (mg)	Carvão ativado (mg)
Original	150	50	-	-
Original + C18	150	50	50	-
Original + C. Ativado	150	50	-	50

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Validação do método

Foram seguidas recomendações dos guias de validação da ANVISA e do MAPA. Em seguida serão mencionados todos os parâmetros que foram determinados com a finalidade de validar o método.

3.5.1 Seletividade

Para se determinar a seletividade do método foi feita a extração de uma amostra isenta dos analitos de interesse e outra com a presença da abamectina e do difenoconazol. O método é seletivo quando a resposta cromatográfica revela que a amostra sem os analitos de interesse, não apresentam sinais na faixa de resposta correspondente aos contaminantes que serão estudados.

3.5.2 Linearidade do método

As curvas analíticas utilizadas na quantificação foram preparadas em amostras de pólen e de flor do morangueiro, ambas fortificadas previamente à extração. A concentração dos analitos variou de 0,5 – 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, contendo dez níveis de concentrações e cada nível foi feito em triplicata. A linearidade foi avaliada de acordo com o coeficiente de determinação da curva (r^2) em um *fit* linear, de modo que quanto mais próximo o r^2 estiver de 1,0, maior é a proporcionalidade linear entre os resultados correspondentes do eixo x e y.

3.5.3 Limite de detecção e de quantificação

De acordo com as normas do guia da ANVISA, o limite de quantificação do equipamento pode ser fixado no menor nível de concentração da curva analítica, tendo que apresentar boa exatidão e precisão.

O limite de detecção do método deve estar abaixo da curva analítica quantitativa. Correlacionando as equações teóricas do limite de quantificação e de detecção (para métodos instrumentais) sugeridos pela ANVISA, temos a Equação 2, que só será válida, caso o equipamento consiga fornecer resultados nessa faixa de trabalho.

$$LD_s = \frac{3}{10} LQ_s \quad (\text{Eq.2})$$

Onde LD_s = limite de detecção do sistema e LQ_s = Limite de quantificação do sistema. Os resultados são apresentados em unidades de massa por volume.

Para a determinação dos limites de detecção e de quantificação do método, deve-se levar em conta a massa de amostra analisada, o volume de solvente na qual a mesma foi ressuspensa no final do processo de extração e as concentrações do limite de detecção e de quantificação do equipamento. Podemos equacionar da seguinte forma:

$$LD_m = \frac{LD_s \times V_{\text{Ressuspendido}}}{M_{\text{Amostra}}} \quad (\text{Eq.3})$$

$$LQ_m = \frac{LQ_s \times V_{\text{Ressuspendido}}}{M_{\text{Amostra}}} \quad (\text{Eq.4})$$

Onde LD_m = Limite de detecção do método; LQ_m = Limite de quantificação do método; $V_{\text{ressuspendido}}$ = Volume no qual a amostra é ressuspensa no final do processo de extração e

M_{amostra} = Massa da amostra analisada. Os resultados são apresentados em unidades de massa dos analitos por massa de amostra analisada.

3.5.4 Precisão e exatidão do método

Para a determinação da precisão, foram selecionados três níveis de concentrações das curvas analíticas, denominados baixo, médio e alto, e esses foram analisados em quintuplicata em um mesmo dia (intradia) e em três dias diferentes (interdias). A precisão foi calculada pela equação do desvio padrão relativo (*Relative Standard Desviation*, RSD), destacada pela Equação 5:

$$RSD = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \quad (\text{Eq.5})$$

Onde “s” = variância e “ $\bar{x}$ ” = média.

A exatidão também foi calculada para esses três níveis de concentrações, através da relação da concentração média experimental sobre a concentração teórica correspondente, como pode ser visto na Equação 6:

$$\text{Exatidão} = \left(\frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100\% \quad (\text{Eq.6})$$

3.5.5 Efeito matriz, recuperação e eficiência do método

O efeito de matriz (EM), a eficiência do processo de extração (EP) e a recuperação (RE) foram calculados conforme Equações 7, 8 e 9. Essas equações estão descritas no trabalho de Matuszewski et al. (2003).

$$EM (\%) = \left(\frac{B}{A} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.7})$$

$$RE (\%) = \left(\frac{C}{B} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.8})$$

$$EP (\%) = \left(\frac{C}{A} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.9})$$

Onde, A= Coeficientes angulares das curvas analíticas no solvente; B= coeficientes angulares das curvas analíticas no extrato pós-fortificado e C= coeficientes angulares das curvas analíticas no extrato do padrão fortificado antes da extração.

A recuperação também pode ser calculada segundo guia da ANVISA, através da divisão da área do sinal cromatográfico da amostra pré-fortificada, pela área da amostra pós-fortificada (para a mostras fortificadas com a mesma concentração), tudo isso multiplicado por 100 %. A Equação 10 ilustra o que foi dito acima.

$$RE (\%) = \left(\frac{\text{Área da banda cromatográfica amostra pré-fortificada}}{\text{Área da banda cromatográfica amostra pós-fortificada}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.10})$$

EM (%) igual a 100, significa que a matriz em questão não interfere na quantificação dos analitos de interesse, valores abaixo de 100, mostram uma influência de supressão e valores acima de 100, uma possível contaminação no que seria as matrizes isentas.

Deseja-se RE (%) próximas a 100, o que é uma decorrência do EM (%). A EP (%) relaciona as perdas do efeito de matriz, juntamente com as perdas devido as várias etapas no processo de extração. Objetiva-se valores próximos a 100.

3.6 Coleta das amostras para aplicação do método

As amostras de flor de morangueiro e pólen foram coletadas na zona rural da cidade de Bom Repouso – MG, como descrito no item 3.2.2. As amostras de flores e pólen do interior das colmeias foram coletadas no mês de novembro/2018, janeiro/2019 e março/2019.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente, devido a uma maior disponibilidade para utilização do equipamento HPLC-DAD em reação ao LC-MS/MS, dedicou-se à utilização do primeiro para a determinação das condições cromatográficas e de extração. Após validação e otimização do método de extração utilizando esse equipamento, as análises foram feitas em LC-MS/MS para a validação nesse detector e futura aplicação, uma vez que esse último detector possui limites de detecção

e de quantificação menores que o DAD, sendo mais indicado para análises de amostras ambientais, cujas concentrações tendem a ser menores.

4.1 Parâmetros otimizados para HPLC-DAD

Para a determinação das condições cromatográficas, vários ajustes tiveram que ser feitos. Um deles foi a determinação da composição da fase móvel.

Partindo dos conhecimentos das propriedades físicas e químicas da abamectina e do difenoconazol, algumas combinações de misturas da fase móvel foram testadas, sendo que o objetivo foi obter melhor seletividade e resolução para os analitos em questão, levando também em consideração o tempo total de corrida. A composição da fase móvel que melhor apresentou resultado foi na proporção 85% de acetonitrila (MeCN) e 15% de água destilada levemente acidificada (0,1% ácido fórmico (v/v)).

Quando a solução contendo abamectina e difenoconazol no solvente (MeCN) foi injetada (utilizando coluna C8 MN Nucleodur 100-5 fase reversa (4,6 x 100 mm; 5 µm)), o primeiro analito detectado foi o difenoconazol e a banda cromatográfica foi registrada em torno de 4,1 minutos. A banda da abamectina foi registrada em 4,8 minutos, de forma que esses sinais cromatográficos ficaram bem separados, garantindo uma boa resolução e seletividade entre os dois analitos, além de proporcionar corridas de curto tempo (10 minutos).

Inicialmente foi monitorado em HPLC-DAD a faixa de comprimento de onda de 100 – 300 nm, afim de observar qual radiação seria a mais adequada. O que foi considerado como de melhor sinal, para os dois compostos na mesma solução, foi o comprimento de onda 246 nm. Os critérios para escolha foram os valores mais elevados de área encontrados e a simetria dos picos dos dois compostos, quando nas mesmas concentrações.

Para ilustrar a escolha da composição da fase móvel e o comprimento de onda monitorado, um cromatograma é apresentado na Figura 18 mostrando o sinal analítico do difenoconazol (4,1 min) e da abamectina (4,8 min) em solvente (MeCN). Como pode ser observado, os dois sinais analíticos apresentam-se suficientemente separados, são picos simétricos com praticamente a mesma área para uma mesma concentração dos compostos, e além disso, é possível efetuar uma corrida de 10 minutos ou menos, o que é algo relativamente rápido.

Figura 18 - Cromatograma dos analitos difenoconazol (4,1 min) e abamectina (4,8 min) em solvente (ACN) na concentração de 1,0 mg L⁻¹, utilizando fase móvel de 85% MeCN e 15% H₂O (acidificada), coluna C8 e comprimento de onda monitorado de 246 nm – HPLC-DAD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Seleção do método QuEChERS

Assim como foi mencionado no item 3.4.3.1, foram feitas extrações utilizando variações do método original QuEChERS para as duas matrizes (flor e pólen). Os resultados, expressos em termos de recuperação (área da banda cromatográfica de amostra pré-fortificada dividida pela área cromatográfica da amostra pós-fortificada), estão presentes nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Resultados dos testes de extração para a matriz flor pré-fortificada pelos analitos na concentração de 1,0 mg L⁻¹.

Sais de extração	Método	Recuperação (%)	
		Difenoconazol	Abamectina
Original	Clean up		
	Original	99,7	61,1
	Original + C18	132,6	41,5
Acetato	Original + C. Ativo	0,0	0,0
	Original	37,3	57,3
	Original + C18	66,4	60,8
Citrato	Original + C. Ativo	0,0	0,0
	Original	95,5	41,4
	Original + C18	56,2	34,2
	Original + C. Ativo	0,0	0,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 8: Resultados dos testes de extração para a matriz pólen pré-fortificada pelos analitos na concentração de 1,0 mg L⁻¹.

Sais de extração	Método	Recuperação (%)	
		Difenoconazol	Abamectina
Original	Original	101,0	115,9
	Original + C18	109,1	108,1
	Original + C. Ativo	0,0	0,0
Acetato	Original	76,1	169,7
	Original + C18	77,6	162,0
	Original + C. Ativo	0,0	0,0
Citrato	Original	74,6	46,1
	Original + C18	73,7	46,4
	Original + C. Ativo	0,0	0,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando os resultados das Tabelas 7 e 8, verifica-se que os testes que apresentaram os melhores resultados (mais próximos de 100%) em termos de recuperação, para a matriz pólen, foram na condição do método de extração utilizando sais do método “original” combinado com *clean up* “original + C18”. Já para a matriz flor, o melhor resultado da extração foi utilizando sais do método “original” e *clean up* “original”.

Vale ressaltar que esses resultados preliminares foram obtidos via HPLC-DAD e o cálculo da recuperação foi feito a partir da área da banda cromatográfica da amostra pré-fortificada sobre área da banda cromatográfica da amostra pós-fortificada multiplicado por 100%, conforme Equação 10.

Portanto foram selecionadas as melhores condições de extração dos analitos das matrizes em questão, selecionando os melhores sais de extração e compostos de *clean Up*, bem como as condições cromatográficas. Uma vez feito isso, o método foi testado utilizando um LC-MS/MS.

4.3 Parâmetros da validação do método para detector DAD e MS

4.3.1 Seletividade

A fim de avaliar a seletividade do método, foram analisadas amostras das matrizes isentas dos analitos de interesse e amostras com os analitos presentes. Os resultados podem ser vistos nas Figuras 19 e 20.

Figura 19 - a) Análise cromatográfica (DAD) do extrato da amostra de flor isenta dos analitos de interesse; b) Análise cromatográfica (DAD) do extrato da amostra de flor contaminada previamente por 5,0 mg L⁻¹ de abamectina e difenoconazol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 - a) Análise cromatográfica (DAD) do extrato da amostra de pólen isenta dos analitos de interesse; b) Análise cromatográfica (DAD) do extrato da amostra de pólen contaminada previamente por 5,0 mg L⁻¹ de abamectina e difenoconazol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado nas figuras 19 e 20, quando é feita a extração das amostras isentas dos dois analitos de interesse, não se observa as bandas cromatográficas na região de

4,1 - 4,3 min e 4,8 - 4,9 min (itens a das figuras mencionadas). Todavia, essas bandas cromatográficas estão presentes nos cromatogramas das amostras que foram previamente dopadas com abamectina e com difenoconazol. O difenoconazol em 4,2 min e a abamectina em 4,8 min (itens b das figuras mencionadas). Tais resultados revelam que o método é seletivo, uma vez que não foi observado compostos interferentes na região de resposta dos analitos de interesse.

4.3.2 Linearidade

Foram construídas curvas analíticas para verificar a linearidade do método, inicialmente utilizando DAD. O intervalo linear, a equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2) são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Intervalo linear, equação da reta e coeficiente de determinação das curvas das amostras pré-fortificadas analisadas no DAD.

Matriz	Analito	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	r^2
Flor	Abamectina	250 – 1500	$y = 0,0178x + 1,4047$	0,9915
Flor	Difenoconazol	250 – 1500	$y = 0,0317x + 0,4133$	0,9989
Pólen	Abamectina	250 – 1500	$y = 0,0350x - 0,2480$	0,9963
Pólen	Difenoconazol	250 – 1500	$y = 0,0351x - 0,0433$	0,9967

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores utilizados para traçar as curvas analíticas, juntamente com o erro estão nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

Tabela 10: Concentrações da abamectina na matriz flor, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando DAD.

Abamectina na Flor - DAD		
Concentração (μL^{-1})	Área cromatográfica média (u.a.); n=3	Desvio Padrão Relativo (%)
250	5,41	10,67
500	10,88	9,04
750	15,20	6,43
1000	19,34	6,81
1250	22,39	3,87
1500	28,91	4,46

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 11: Concentrações da difenoconazol na matriz flor, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando DAD.

Difenoconazol na Flor - DAD		
Concentração (μL^{-1})	Área cromatográfica média (u.a.); n=3	Desvio Padrão Relativo (%)
250	8,15	5,77
500	15,91	7,58
750	25,16	4,80
1000	31,94	5,01
1250	40,20	5,22
1500	47,77	2,71

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 12: Concentrações da abamectina na matriz pólen, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando DAD.

Abamectina no Pólen - DAD		
Concentração (μL^{-1})	Área cromatográfica média (u.a.); n=3	Desvio Padrão Relativo (%)
250	8,63	8,20
500	17,01	2,21
750	25,9	7,43
1000	35,19	0,58
1250	45,39	1,88
1500	51,22	0,65

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 13: Concentrações da difenoconazol na matriz pólen, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando DAD.

Difenoconazol no Pólen - DAD		
Concentração (μL^{-1})	Área cromatográfica média (u.a.); n=3	Desvio Padrão Relativo (%)
250	9,12	11,44
500	16,71	4,41
750	27,19	2,98
1000	34,95	1,38
1250	42,44	4,06
1500	53,53	1,31

Fonte: Elaborada pelo autor.

As curvas analíticas referentes aos dados apresentados nas Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 estão presentes na Figura 21.

Figura 21 - Curvas analíticas da abamectina e difenoconazol na matriz flor e pólen utilizando HPLC-DAD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observando os r^2 das curvas presentes na Figura 21, verificou-se que há uma boa relação linear entre as áreas das bandas cromatográficas e as concentrações da faixa de trabalho, tanto para a abamectina quanto para o difenoconazol, na flor e no pólen. Isso pôde ser afirmado devido aos coeficientes de determinação (r^2) estarem acima do valor de 0,99, recomendado pela ANVISA.

Outras curvas analíticas foram construídas para a análise no LC-MS/MS, devido a maior sensibilidade desse detector em relação ao DAD, possibilitando a detecção de níveis mais baixos de concentrações. O intervalo linear, a equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2) das curvas no LC-MS/MS estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Intervalo linear, equação da reta e coeficiente de determinação das curvas das amostras pré-fortificadas analisadas no espectrômetro de massas

Matriz	Análito	Intervalo Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	r^2
Flor	Abamectina	0,5 – 1000,0	$y = 73,66x - 978,3$	0,9927
Flor	Difenoconazol	0,5 – 1000,0	$y = 5447,6x + 41872,0$	0,9951
Pólen	Abamectina	0,5 – 1000,0	$y = 95,353x + 332,37$	0,9945
Pólen	Difenoconazol	0,5 – 1000,0	$y = 6403,4x - 147626$	0,9937

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores utilizados para traçar as curvas analíticas, juntamente com o erro estão nas Tabelas 15, 16, 17 e 18.

Tabela 15: Concentrações da abamectina na matriz flor, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando MS/MS.

Abamectina na Flor – MS/MS		
Concentração (μL^{-1})	Área cromatográfica média (u.a.); n=3	Desvio Padrão Relativo (%)
0,5	4,12E+01	10,77
1,0	9,40E+01	2,40
5,0	3,97E+02	3,89
10,0	8,37E+02	1,80
50,0	1,31E+03	4,67
100,0	3,51E+03	0,82
500,0	2,59E+04	0,34
750,0	3,89E+04	0,25
1000,0	5,65E+04	0,44

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 16: Concentrações da difenoconazol na matriz flor, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando MS/MS.

Difenoconazol na Flor – MS/MS		
Concentração (μL^{-1})	Área cromatográfica média (u.a.); n=3	Desvio Padrão Relativo (%)
0,5	3,81E+04	0,42
1,0	5,24E+04	0,28
5,0	7,01E+04	1,22
10,0	2,75E+05	0,13
50,0	6,88E+05	0,06
100,0	1,42E+06	1,16
500,0	3,22E+06	0,78
750,0	4,90E+06	1,24
1000,0	6,10E+06	0,76

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 17: Concentrações da abamectina na matriz pólen, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando MS/MS.

Abamectina no Pólen – MS/MS		
Concentração (μL^{-1})	Área cromatográfica média (u.a.); n=3	Desvio Padrão Relativo (%)
0,5	5,12E+02	13,07
1,0	1,01E+03	7,90
5,0	1,52E+03	5,41
10,0	3,33E+03	1,29
50,0	1,05E+04	3,53
100,0	2,60E+04	0,76
500,0	4,35E+04	1,05
750,0	6,54E+04	1,75
1000,0	9,47E+04	0,74

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 18: Concentrações da difenoconazol na matriz pólen, suas respectivas áreas cromatográficas média referentes às triplicatas e os erros associados, utilizando MS/MS.

Difenoconazol no Pólen – MS/MS		
Concentração (μL^{-1})	Área cromatográfica média (u.a.); n=3	Desvio Padrão Relativo (%)
0,5	2,21E+04	0,62
1,0	4,59E+04	0,72
5,0	5,29E+04	0,97
10,0	1,37E+05	0,28
50,0	3,66E+05	0,30
100,0	1,08E+06	0,72
500,0	2,67E+06	0,24
750,0	4,29E+06	0,24
1000,0	6,10E+06	0,13

Fonte: Elaborada pelo autor.

As curvas analíticas referentes aos dados apresentados nas Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18 estão presentes na Figura 22.

Figura 22 - Curvas analíticas da abamectina e do difenoconazol na matriz flor e pólen usando LC-MS/MS.
Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados referentes à linearidade estão de acordo com as diretrizes da ANVISA, uma vez que os coeficientes de determinação ficaram todos acima de 0,99, evidenciando uma relação linearmente proporcional entre a área da banda cromatográfica e a sua correspondente concentração.

4.3.3 Limite de detecção e de quantificação do equipamento e método

Como as análises foram feitas em diferentes equipamentos, tem-se diferentes limites de detecção e de quantificação para cada um detector. Os limites de detecção (LD_s) e de quantificação (LQ_s) para a abamectina e o difenoconazol, tanto na flor do morangueiro quanto no pólen foram 75,0 e 250,0 µg L⁻¹, respectivamente, quando no HPLC-DAD. Já para o espectrômetro de massas, o limite de detecção e de quantificação, tanto na flor do morangueiro quanto no pólen foram 0,15 e 0,5 µg L⁻¹, respectivamente.

Dessa forma, utilizando a equação 3 e 4, obteve-se os valores do Limite de Detecção (LD_m) e de Quantificação (LQ_m) do método. Para HPLC-DAD o limite de detecção foi de 150,0 ng do analito por grama de amostra e o limite de quantificação foi de 500,0 ng do analito por grama de amostra, tanto para a flor quanto para o pólen e para ambos os analitos. Para LC – MS/MS, o limite de detecção do método foi de 0,3 ng do analito por grama de amostra e o limite de quantificação do método foi de 1,0 ng por grama de amostra, tanto para a flor quanto para o pólen e para ambos os analitos.

Para melhor ilustrar os limites de detecção e quantificação dos equipamentos e do método, os valores estão apresentados na Tabela 19 e 20.

Tabela 19: Limites de detecção e de quantificação dos equipamentos e do método para a abamectina.

Limites de detecção e de quantificação dos equipamentos (para a abamectina)		
Detector	Limite de detecção (LD)	Limite de Quantificação (LQ)
DAD	75,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	250,00 $\mu\text{g L}^{-1}$
MS/MS	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$
Limites de detecção e de quantificação do método (para a abamectina)		
Detector	Limite de detecção (LD)	Limite de Quantificação (LQ)
DAD	150,00 ng/g	500,00 ng/g
MS/MS	0,30 ng/g	1,00 ng/g

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 20: Limites de detecção e de quantificação dos equipamentos e do método para o difenoconazol.

Limites de detecção e de quantificação dos equipamentos (para o difenoconazol)		
Detector	Limite de detecção (LD)	Limite de Quantificação (LQ)
DAD	75,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	250,00 $\mu\text{g L}^{-1}$
MS/MS	0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$
Limites de detecção e de quantificação do método (para o difenoconazol)		
Detector	Limite de detecção (LD)	Limite de Quantificação (LQ)
DAD	150,00 ng/g	500,00 ng/g
MS/MS	0,30 ng/g	1,00 ng/g

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.4 Precisão e exatidão

Conforme mencionado em materiais e métodos (item 3), foram selecionados três níveis de concentração. Para a análise em HPLC-DAD, os níveis de concentrações denominados

baixo, médio e alto foram 250,0; 1000,0 e 1500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As análises foram feitas em quintuplicatas e os resultados obtidos estão presentes na Tabela 21.

Tabela 21: Precisão e exatidão para três níveis de concentrações (UV-vis) n=5.

Matriz	Analito	Níveis	Precisão Intradia DSR (%)	Precisão Interdias DSR (%)	Exatidão (%)
Flor	Abamectina	Baixo	9,02	10,31	60,10
		Médio	8,45	7,46	61,10
		Alto	5,12	8,44	69,42
Flor	Difenoconazol	Baixo	7,89	9,99	97,14
		Médio	9,03	9,84	99,70
		Alto	7,83	8,02	102,33
Pólen	Abamectina	Baixo	2,98	5,13	100,91
		Médio	4,90	3,67	108,10
		Alto	2,30	4,10	110,55
Pólen	Difenoconazol	Baixo	9,34	8,45	99,67
		Médio	4,26	8,80	109,10
		Alto	6,30	7,09	111,11

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para uma medida ser considerada precisa, segundo o guia da ANVISA e do MAPA, o desvio padrão relativo não deve ultrapassar o valor de 15%. Verifica-se pelos dados da Tabela 13, tanto para os testes feitos intradia, quanto interdias, que os resultados são precisos. No que diz respeito à exatidão, os guias definem um intervalo de 80 - 120%, sendo assim, a única medida que não se encontrava nesse intervalo foi a correspondente à extração da abamectina na matriz flor do morangueiro, que ao menos superou 70%, revelando uma ineficiência de 30 a 40% desse analito no processo de extração. Porém, dentre os testes de QueChERS feitos, esse foi o que apresentou maior recuperação e precisão de abamectina e difenoconazol.

Para as amostras analisadas no LC-MS/MS, três níveis de concentrações diferentes foram preparadas e analisadas cada uma em quintuplicata, o nível denominado baixo ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($750,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Os resultados obtidos estão presentes na Tabela 22.

Tabela 22: Precisão e exatidão para três níveis de concentrações (Espectrômetro de massas) n=5.

Matriz	Analito	Níveis	Precisão Intradia DSR (%)	Precisão Interdias DSR (%)	Exatidão (%)
Flor	Abamectina	Baixo	3,78	6,19	80,84
		Médio	0,91	3,14	88,15
		Alto	0,25	0,22	92,82
Flor	Difenoconazol	Baixo	1,29	1,80	100,99
		Médio	1,11	0,90	108,34
		Alto	1,09	2,28	103,32
Pólen	Abamectina	Baixo	7,31	6,55	108,71
		Médio	3,90	4,17	90,21
		Alto	1,14	1,03	90,43
Pólen	Difenoconazol	Baixo	0,72	1,33	96,65
		Médio	0,24	1,41	97,17
		Alto	0,17	1,11	105,23

Fonte: Elaborada pelo autor.

Neste caso, percebe-se que todas as medidas também atenderam recomendações da ANVISA para serem consideradas precisas. As exatidões também estão de acordo com as diretrizes dos guias de validação que o estudo seguiu, uma vez que todos os valores desse parâmetro encontram-se no intervalo de 80 – 120% conforme mostrado na Tabela 14.

Portanto, a extração da abamectina de amostras de flores de morangueiros, que não era considerada exata quando analisada em HPLC-DAD, quando analisada em LC-MS/MS, atende aos requisitos. Isso se deve à maior sensibilidade e seletividade que o espectrômetro de massas oferece em relação ao DAD. Vale ressaltar, que para um bom método não depende apenas do preparo de amostra adequado, mas também do detector adequado.

4.3.5 Efeito de matriz (EM), Eficiência do processo de extração (EP) e Recuperação (RE) do método

O efeito de matriz (EM), a eficiência do processo de extração (EP) e a recuperação (RE) foram calculados conforme as Equações 6, 7 e 8. A Tabela 23 contém os resultados referentes às análises feitas no equipamento acoplado ao espectrômetro de massas.

Tabela 23: Valores de recuperação (RE), efeito de matriz (EM) e eficiência do processo (EP) das amostras obtidos a partir da espectrometria de massas.

Matriz	Analito	RE (%)	EM (%)	EP (%)
Flor	Abamectina	74,91	80,48	60,10
Flor	Difenoconazol	112,10	83,21	93,28
Pólen	Abamectina	98,86	100,07	98,93
Pólen	Difenoconazol	93,77	97,80	91,71

Fonte: Elaborada pelo autor.

A recuperação do método variou de 74 a 112%, sendo que números próximos a 100% são desejáveis, portanto os resultados atendem as recomendações dos guias seguidos (ANVISA e MAPA). A menor recuperação obtida foi oriunda da extração da abamectina da matriz flor, que foi de 74,91%. Tal recuperação pode ser aceita, uma vez que foi mostrado que o método é preciso e exato.

A baixa eficiência (EP) na extração da abamectina na flor de morangueiro (60,10%) é consequência da supressão iônica, provocada pelo efeito de matriz (80,48%), e pela recuperação relativamente baixa (74,81%) do processo.

4.4 Aplicação do método

As amostras analisadas foram coletadas na zona rural do município de Bom Repouso – MG, como já descrito no item 3.2.2.

Antes de apresentar os resultados, é importante informar que não foram encontrados níveis de concentrações do inseticida abamectina acima do limite de detecção do método em nenhuma das amostras coletadas em campo. Portanto os dados apresentados serão apenas do fungicida difenoconazol.

Algumas hipóteses foram formuladas para tal acontecimento: primeiramente, a dose agrônômica do inseticida abamectina é, em massa, 13,5 g/ha no cultivo de morango, sendo permitida apenas duas aplicações no período de 14 dias, em contra partida, a do fungicida difenoconazol é de 20 g/ha com seis aplicações permitidas ao longo de 14 dias. Essas informações, sugerem, preliminarmente, que a probabilidade de encontrar o fungicida difenoconazol em comparação com o inseticida abamectina são maiores.

Outro fator que pode ser considerado, é a persistência do difenoconazol. A meia vida do princípio ativo no ambiente terrestre é de 85 dias, já o da abamectina é de apenas 1 dia. Essas informações estão presentes na Tabela 1 e 2.

Como já mencionado no item 3.6, foram feitas coletas nos meses 11/2018; 01/2019 e 03/2019 e os resultados das amostras analisadas de flores de morangueiros estão presentes na Tabela 24 e 25.

Tabela 24: Concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de flores de morangueiros coletadas na área 1 (A1), nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019 e os respectivos erros medidos em desvio padrão relativo por cento (RSD%).

Pontos coletados	Concentração de Difenoconazol em Nov/2018		Concentração de Difenoconazol em Jan/2019		Concentração de Difenoconazol em Mar/2019	
	(ng g ⁻¹)	RSD%	(ng g ⁻¹)	RSD%	(ng g ⁻¹)	RSD%
P1	3,42	3,00	1,13	7,11	4,91	6,04
P2	< LQ*	-	< LQ	-	2,83	8,56
P3	<LQ	-	1,25	5,26	<LQ	18,90
P4	3,31	5,81	4,89	13,00	7,06	4,28
P5	<LQ	-	1,81	16,61	3,12	12,17

*< LQ = concentração abaixo do limite de quantificação do método.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 25: Concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de flores de morangueiros coletadas na área 2, nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019 e os respectivos erros medidos em desvio padrão relativo por cento (RSD%).

Pontos coletados	Concentração de Difenoconazol em Nov/2018		Concentração de Difenoconazol em Jan/2019		Concentração de Difenoconazol em Mar/2019	
	(ng g ⁻¹)	RSD%	(ng g ⁻¹)	RSD%	(ng g ⁻¹)	RSD%
P1	<LQ*	-	4,92	2,93	2,68	12,92
P2	<LQ	-	3,44	15,12	4,02	8,67
P3	<LQ	-	2,21	10,15	3,12	13,38
P4	1,01	3,59	2,28	4,39	<LQ	-
P5	<LQ	-	2,21	13,00	7,53	8,73

*< LQ = concentração abaixo do limite de quantificação do método.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para melhor ilustrar os resultados obtidos referentes ao difenoconazol presentes nas amostras de flores de morangueiros coletadas na área 1 e 2, em meses diferentes, os dados foram plotados em gráficos, mostrados nas Figuras 23 e 24.

Figura 23 - Gráfico das concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de flores de morango coletadas na área 1, nos meses de nov/2018, jan/2019 e mar/2019.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 24 - Gráfico das concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de flores de morango coletadas na área 1, nos meses de nov/2018, jan/2019 e mar/2019.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando os resultados da presença do difenoconazol nas amostras de flores de morangueiros nos três diferentes meses, percebe-se uma maior concentração do fungicida, em geral, no mês de março de 2019 e a menor concentração no mês de novembro de 2018, algo

que pode ser encarado com certa naturalidade, uma vez que quanto mais tempo de plantio, mais números de aplicações do agrotóxico, e portanto, a possibilidade de uma maior concentração residual do agrotóxico.

A concentração mais alta encontrada na flor do morangueiro foi de 7,53 ng de difenoconazol por grama de amostra analisada, que ocorreu no mês de março no ponto 5 da área 2, quase igualando-se ao ponto 4 do mês de março da área 1, com 7,06 ng/g.

Como esta pesquisa visa, em primeiro momento, analisar os impactos dos agrotóxicos para com as abelhas, necessita-se buscar informações sobre as capacidades e hábitos desse inseto. A literatura diz (Vida Natural) que uma abelha faz cerca de 40 voos diários, tocando em média 40 mil flores, e que em cada voo carrega, em média, 40 mg de pólen para a colmeia (Fujiyoshi, H. – Departamento de Apicultura Yamada). A abelha operária da espécie *Tetragonisca angustula* pesa em média (com o estômago vazio) 5,3 mg e a rainha (com o estômago vazio) 27,2 mg (Prato 2010).

Utilizando o maior concentração encontrado na flor do morangueiro nesse estudo (7,53 ng/g), e sabendo que a abelha é capaz de carregar, em média, por voo, 40 mg de pólen, tem-se que, por voo, ela “entra em contato” com 0,3012 ng de difenoconazol. Ainda considerando a média de 40 voos diários, temos uma exposição física diária de 12,048 ng do difenoconazol por abelha ou, convertendo a unidade para micro gramas, temos 0,012048 µg do fungicida por abelha por dia. É importante ressaltar, que esse valor deve ser um pouco menor, uma vez que a área de contato do pólen para com a abelha não é exatamente o valor da massa que ela carrega, tratando-se portanto, de uma aproximação.

Segundo as informações da bula do produto, o DL50 por contato para abelhas é de 0,100 µg/abelha (Tabela 2). Dessa forma, o valor máximo diário, segundo as amostras de flores analisadas nesse trabalho, que a abelha pode ter tido contato é cerca de 10% do DL50. É importante salientar que, embora a concentração do agrotóxico em questão esteve abaixo do DL50, não significa que o fungicida não está gerando impactos para a abelha ou para a colônia, significa apenas que a “dose” de difenoconazol não é suficiente para dizimar 50% de uma população da espécie. Porém, já há estudos que mostram a diminuição do tempo de vida das abelhas e mudanças comportamentais que comprometem o bom funcionamento da colônia devido à exposição a agrotóxicos. Dessa forma, um estudo dos impactos do difenoconazol para com esse inseto, seria de grande importância.

Além das flores coletadas, foram feitas as coletas do pólen já dentro das colmeias, e novamente não foi detectado a presença de abamectina, apenas difenoconazol. Como já mencionado, foram fixadas 3 colmeias por propriedade, porém na área 1, apenas 2

permaneceram ativas. A concentração de difenoconazol encontradas nas amostras coletadas nos meses de novembro/2018, janeiro/2019 e março/2019 estão presentes nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26: Concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de pólen coletadas no interior das colmeias fixadas na área 1, nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019 e os respectivos erros medidos em desvio padrão relativo por cento (RSD%).

Colmeias	Concentração de		Concentração de		Concentração de	
	Difenoconazol em amostras coletadas em Nov/2018		Difenoconazol em amostras coletadas em Jan/2019		Difenoconazol em amostras coletadas em Mar/2019	
	(ng g ⁻¹)	RSD%	(ng g ⁻¹)	RSD%	(ng g ⁻¹)	RSD%
C1	8,32	7,74	456,12	4,80	31,81	3,31
C2	<LD*	-	140,28	3,56	4,11	4,33

*< LQ = concentração abaixo do limite de quantificação do método.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 27: Concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de pólen coletadas no interior das colmeias fixadas na área 2, nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019 e os respectivos erros medidos em desvio padrão relativo por cento (RSD%).

Colmeias	Concentração de		Concentração de		Concentração de	
	Difenoconazol em amostras coletadas em Nov/2018		Difenoconazol em amostras coletadas em Jan/2019		Difenoconazol em amostras coletadas em Mar/2019	
	(ng g ⁻¹)	RSD%	(ng g ⁻¹)	RSD%	(ng g ⁻¹)	RSD%
C1	2,12	13,30	114,25	10,50	31,09	3,98
C2	4,15	7,63	52,12	10,31	3,22	17,77
C3	>LD*	-	82,89	7,00	83,03	3,18

*< LQ = concentração abaixo do limite de quantificação do método.

Fonte: Elaborada pelo autor.

De modo a facilitar a visualização dos dados e para efeitos de comparação, os dados de concentração do difenoconazol no pólen coletados no interior das colmeias, foram apresentados em um único gráfico para as duas áreas, como pode ser visto na Figura 25.

Figura 25 - Gráfico das concentrações do difenoconazol encontrada nas amostras de pólen coletadas no interior das colmeias fixadas na área 1 e 2, nos meses de nov/2018; jan/2019 e mar/2019.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando os resultados referentes às concentrações de difenoconazol encontradas nas amostras de pólen coletadas no interior das colmeias, percebe-se uma maior concentração de difenoconazol no mês de janeiro de 2019.

O que mais preocupa nesses resultados é a maior concentração do fungicida em amostras de pólen dentro da colmeia, em relação ao encontrado em amostras de flores de morangueiros coletadas em campo. Isso pode ser devida à meia vida do difenoconazol ser um pouco maior dentro do ambiente da colmeia, talvez por não sofrer o intemperie de sol e chuva, ter uma temperatura mais homogênea e conter substâncias bactericidas naturais (Maciel et al. 2018). Sugerindo, portanto, um estudo sobre esse fato em cima do tema: O ambiente das colmeias estaria “conservando” os agrotóxicos?

Uma vez o pólen dentro da colmeia, a via de contaminação da abelha se altera, passando de contato para oral. É importante ressaltar que o pólen atua, ora como um alimento principal, quando as abelhas operárias estão em suas duas primeiras semanas de vida, ora como suplementar, após as duas semanas de vida. O mel é responsável por fornecer energia às

abelhas, enquanto o pólen, sais minerais, vitaminas e proteínas (Fujiyoshi, H. – Departamento de Apicultura Yamada).

Como já mencionado, os maiores valores de concentrações do fungicida revelaram-se em janeiro, com destaque para a colmeia 1 da área 1, que apresentou uma concentração de 456 ng de difenoconazol por grama de pólen, três vezes maior que a concentração encontrada na colmeia vizinha, presente na mesma área para o mesmo período.

Escolhendo esse pior cenário e comparando com o DL50 oral do difenoconazol para abelhas *Apis Mellifera* (0,177 µg por abelha), seria necessário, para atingir essa dose, a ingestão de 0,39 g de pólen por abelha, o que representa cerca de 73 vezes o peso médio da abelha operária, que é de 5,3 mg (Prato 2010). Considerando que esse grupo de abelhas vive até 60 dias, é pouco provável que ela consuma essa quantidade de pólen. Outro fator que deve ser levado em consideração é o número de indivíduos por colmeia. É importante lembrar que a comparação feita nesse parágrafo utiliza o DL50 para a espécie de abelha *Apis Mellifera* e alguns estudos mostram que as abelhas sem ferrão assim como as nativas apresentam maior sensibilidade aos agrotóxicos, comparado com a *Apis Mellifera* de meliponários (Revista Fapesp 05/2019).

Novamente, salienta-se que, mesmo não atingindo da dose letal de 50% da população, não pode-se descartar os possíveis malefícios que a presença desse agrotóxico pode causar na vida das abelhas, bem como mudanças comportamentais, diminuição da natalidade e menor expectativa de vida (Agência Brasil 2019). Portanto, estudos dos impactos às abelhas tornam-se necessários.

5 CONCLUSÕES

Os testes de validação foram bem sucedidos, as medidas apresentaram ter reprodutibilidade e exatidão e as curvas analíticas tiveram uma boa correspondência linear. A recuperação nos processos de extração foram satisfatórias e o método mostrou-se seletivo.

Para tal êxito, foi preciso determinar uma composição de fase móvel adequada, que possibilitou boa resolução e seletividade das bandas cromatográficas desejadas, além de uma corrida de curta duração. Foi importante a construção e execução do planejamento acerca dos diferentes tipos de constituintes dos sais de extração e materiais de *clean up* do método QuEChERS. Dessa forma, foi possível selecionar os que apresentaram melhores resultados.

Em HPLC-DAD, as medidas apresentaram boa reprodutibilidade e exatidão, a recuperação do difenoconazol em amostras de flores do morangueiros e em amostras de pólen apresentaram valores acima de 90%. A abamectina no pólen também atingiu esse valor, porém esse agrotóxico não apresentou boa recuperação quando extraído da flor do morangueiro, cuja recuperação foi de 60%, tal problema é atenuado quando a amostra é analisada no LC-MS/MS, onde a recuperação está na faixa de 75%. O que evidencia uma maior sensibilidade e seletividade do espectrômetro de massas comparado ao DAD.

A maior concentração do difenoconazol encontrada em amostras de flores de morangueiros, foi de 7,53 nanogramas de difenconazol por grama de flor. Considerando a capacidade de cada abelha e esse máximo encontrado, estima-se, aproximadamente, que a abelha estaria sujeita ao contato de 0,012048 µg do difenoconazol por dia de trabalho. Conhecendo o DL50 por contato desse agrotóxico em relação ao organismo da abelha *Apis Mellifera* (0,100 µg por abelha), conclui-se que as concentrações estão abaixo dos que causariam morte aguda, porém não se pode descartar sintomas crônicos decorrentes de uma contaminação diária por contato. É importante salientar que abelhas sem ferrão e nativas são mais sensíveis aos agrotóxicos (Revista Fapesp 05/2019).

As concentrações do difenoconazol encontradas em amostras de pólen coletado dentro das colmeias, mostraram-se maiores que as encontradas em amostras de flores dos morangueiros, sugerindo uma conservação, ou aumento no tempo de meia vida do fungicida no ambiente da colmeia, que não tem influência de sol e chuva, possui temperaturas mais homogêneas e substâncias bactericidas naturais. Mesmo em maior concentração, o valor máximo encontrado está longe de causar um efeito letal agudo, porém, como no caso anterior, não se pode descartar efeitos crônicos. Estudos sobre estes mostram-se, portanto, necessários.

6 REFERÊNCIAS

ABAMECTIN NORTOX – BULA. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/abamectinnortox1117.pdf>>. Acesso em 11 out. 2018.

AGENCIA BRASIL – Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2019-04/agrotoxicos-encurtam-vida-e-modificam-comportamento-de-abelhas>> . Acesso 17 set. 2020.

AGROLINK: Bula Score – Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/score_3106.html> . Acesso 19 nov. 2019.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos. Resolução – RDC nº 166, de 25 de julho de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017. 22 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de garantia de qualidade Analítica**. Brasília, 2011. 227 p.

BPDB: Bio-Pesticide DataBase. Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/Reports/230.htm>> . Acesso 19 nov. 2019.

BULL, D.; HATHAWAY, D. Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo. Petrópolis: Vozes/Oxfam/Fase, 1986.

COLLINS, C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. 1ª reimpressão. Editora UNICAMP. 2007.

DEEMTER, van J.J.; ZUIDERWEG, F.J.; KLINKENBERG, A. - Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, v.5 ; ed. 6; p. 271-289; 1956.

DIFENOCONAZOL – BULA. **Prisma**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/prisma.pdf>>. Acesso em 11 out. 2018.

ECOIA - A importância dos polinizadores na agricultura – Mais abelhas, mais alimentos. **Revista Horizonte**; ed. Especial, 2016. Disponível em: <www.horizontegeografico.com.br>.

FELDENS, L. - O homem, a agricultura e a história. **Univates**, ed. 1, p. 171, 2018.

FUJIYOSHI, H. – **Departamento de Apicultura Yamada**. Disponível em: https://www.3838.com/portuguese/mitsubachi_park/frombeefarm/14/. Acessado 22 nov. 2019.

GIANINNI T.C.; CORDEIRO G.D.; FREITAS B.; SARAIVA A.M., IMPREATRIZ-FONSECA V.L. 2015a. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *Journal of Economic Entomology*. **PublMed**, v. 108, p. 839-848.

LABORATÓRIO DE ABELHAS. Ministério da Educação/USP. Disponível em: <<http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/6619>>. Acesso em 10 out. 2018.

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.

HAYES, R; AHAMED,A.; EDGE, T.; ZHANG, H. Coreshell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography.. **Journal of Chromatography A**. **1357**: 3652, 2014.

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas. Panorama da cadeia produtiva das frutas em 2012 e projeções para 2013. São Paulo. 127p. 2012.

LANÇAS, F.M. . Cromatografia Líquida Moderna - HPLC / CLAE. 2a.. ed. Campinas: **Editora Atomo**, 2016. v. 1. 352p.

MACIEL, F.A.O.; BRAGA, R.B.; SILVA, T.L.; FREITAS, B.M.; GOMES, D.G. Reconhecimento de padrões sazonais em colônias de abelhas *Apis mellifera* via clusterização. **Editora UPF**, v. 10, n. 3, p. 74–88, 2018.

MARTINS, P. R. **Trajetórias tecnológicas e meio ambiente: a indústria de agroquímicos/transgênicos no Brasil**. 2000. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Campinas, 2000.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analystical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Segurança Química**. Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em 04 set. 2018.

NASCIMENTO, J.E.M, SILVA JUNIOR, G.C., SOUZA, T.H.S., TOLEDO, V.A.A. O pólen apícola e seus benefícios à saúde humana. **APACAME**, n147, 2018.

NORTOX. Disponível em: <www.nortox.com.br/wp-content/uploads/2017/05/FISPQ-06-2002_03_Abamectin_Nortox.pdf> e <www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/abamectin-nortox_3435.html> Acesso 20 nov. 2019.

OLIVEIRA, F. F. de. **Revisão do Gênero Frieseomelitta von Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), com Notas Bionômicas de Algumas Espécies**. 2003. Tese (doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

PORTAL ANVISA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D36%2B%2BDifenoconazol.pdf/fce161cd-d3d4-41b2-b4ff-53438306cf4d>>. Acesso 20 nov. 2019

PRATO, M. Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas, e multiplicação de colônias em *Tetragonisca Angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). 2010. Tese

(Mestrado) -Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/ USP. Ribeirão Preto/SP 2010.

PRATO, M; SOARES, A E E. Production of Sexuals and Mating Frequency in the Stingless Bee *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae). **Neotropical Entomology**. 2013.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M.B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v.3 , n.1, p. 51-64, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012.

RAISSER, C. Jr.; ANTUNES, L.E.C. Panorama do cultivo de morangos no Brasil. **Campo & Negócio**, ed. Jan/2015, p. 58-59, 2014.

REVISTA FAPESP – Sem ferrão e muito sensíveis.; ed. 279; 05/2019.

SILVA, C R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím. Nova [online]**. 2004, vol.27, n.2, p.270-276.

SILVA, C. I.; ALEIXO, K. P.; SILVA, B. N.; FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Guia ilustrado das abelhas polinizadoras do Brasil**. 1. Ed. São Paulo: Editora do Instituto de Estudos Avançados da Universidade de S. Paulo, 2014. Co-editor: Ministério do Meio Ambiente – Brasil. V. 1000. 54 p. ISBN: 978-85-63007-07-0

SILVEIRA, F. A.; MELO G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: edição do autor, 2002. 253 p.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL - **SINDIVEG**. BALANÇO 2015. Setor de agroquímicos confirma queda de vendas. São Paulo: SINDIVEG, 2015. 3p

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS – **SINITOX**. Ministério da Saúde/FIOCRUZ. Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br>>. Acesso em 10 out. 2018

SOARES, W. L. Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura. 2010. Tese (doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

STALLEN, M.P.K.; L.M. LUMKES. Improving Spraying Techniques for Vegetables in Indonesia; scope and strategy. LEHRI/ATA-395, n. 22, Lembang/Indonesia.

VIDA NATURAL. Disponível em: <<http://vidanat.com.br/informacoes/curiosidades-sobre-as-abelhas/>> Acessado 21 nov. 2019.