AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS NEONICOTINÓIDES EM ÁGUAS SUPERFICIAIS VIA
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE
MASSAS EM TANDEM (HPLC – MS/MS)**

PRISCILA OLIVEIRA AMARAL

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:
Prof. Dr. Jose Oscar Vega Bustillos**

**São Paulo
2017**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS NEONICOTINÓIDES EM ÁGUAS SUPERFICIAIS VIA
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE
MASSAS EM TANDEM (HPLC – MS/MS)**

PRISCILA OLIVEIRA AMARAL

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:
Prof. Dr. Jose Oscar Vega Bustillos**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2017

Dedico este trabalho a minha família e a todas as pessoas que utilizam a ciência para tornar o mundo um lugar melhor.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me ensinaram que o estudo e o esforço são essenciais para qualquer situação na vida.

Aos meus irmãos Leticia e Marcelo que sempre me apoiaram e me fizeram rir nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Leonardo que escutou todas as minhas ideias e reclamações e sempre apoiou meus sonhos.

Ao meu orientador Dr. Oscar Vega Bustillos, por todas as conversas sobre a vida, o trabalho e a ciência ao longo destes cinco anos, por sempre ter me incentivado a me manter na ciência e por ser primeiro a idealizar esse projeto.

A todos os meus colegas de laboratório: Marcelo, Glaucia, Francine, Caíke, Claudio por todos os “grapetes” e risadas ao longo destes dois anos.

À minha amiga Maíse que me ajudou muito no laboratório e sempre souber me aconselhar na hora certa.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e ao Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) por fornecer a infraestrutura utilizada neste trabalho.

Ao Daniel Temploni Lebre, uma pessoa essencial para o aprendizado da espectrometria de massas e de grande ajuda no desenvolvimento da metodologia por cromatografia líquida.

Ao Centro de Espectrometria de Massas Aplicada (CEMSA) por fornecer parte da infraestrutura utilizada neste trabalho e todos os analistas que trabalharam neste período: Carol, Renan, Raquel e Joyce. Todos me ensinaram a trabalhar com a cromatografia líquida com conselhos e metodologias bem aplicadas.

À Dra Elaine Martins por todos os seus ensinamentos e disponibilidade, e às suas alunas Gisele e Larissa por me ajudarem com os equipamentos do laboratório e por todas as conversas.

À Michelle da Bayer por ter me fornecido os primeiros padrões de Clotianidina e Imidacloprido utilizados neste trabalho.

Ao senhor João Conde que auxiliou na coleta das amostras em Piratininga.

Ao meu amigo Vinicius por ter me ajudado a elaborar todos os desenhos utilizados neste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Se as abelhas desaparecerem da face da terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana. - Albert Einstein

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS NEONICOTINÓIDES EM ÁGUAS
SUPERFICIAIS VIA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM (HPLC -
MS/MS)**

PRISCILA OLIVEIRA AMARAL

RESUMO

O presente estudo teve como propósito o desenvolvimento de um método para a determinação e a validação de uma metodologia para a identificação e quantificação de Neonicotinóides em águas superficiais coletadas na região de Bauru, no estado de São Paulo. As técnicas analíticas estudadas para o desenvolvimento deste método foram a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC - MS/MS), a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) e a cromatografia a gás acoplada ao detector de captura de elétrons (GC/ECD). A classe de pesticidas Neonicotinóides foi escolhida para este trabalho por estar relacionada com um súbito desaparecimento de abelhas em colônias de todo o mundo. Este fenômeno é conhecido como colapso de desordem das colônias (*Colony Collapse Disorder* – CCD) e o mesmo é caracterizado por uma rápida perda na população de abelhas adultas. Os Neonicotinóides utilizados neste estudo foram os compostos Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam que foram proibidos na sua utilização como pesticidas na Europa pelo regulamento de execução nº 540/2011. As amostras foram concentradas utilizando as técnicas de extração em fase sólida (SPE) e extração líquido líquido (LLE) e injetadas no HPLC –MS/MS, GC/MS e GC/ECD. As técnicas de GC/ECD e GC/MS não foram satisfatórias para a determinação na matriz água, pois, o limite de detecção (10 mg L^{-1}), esta acima do valor máximo permitido na legislação da agência de proteção ambiental americana ($0,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). A técnica de HPLC – MS/MS utilizando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) provou –se adequada para este estudo por obter limites de quantificação entre $5,89$ a $8,06 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e uma linearidade entre $0,9963$ e $0,9993$ para os três compostos.

**CHEMICAL CHARACTERIZATION OF NEONICOTINOIDS IN SURFACE
WATERS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH
TANDEM MASS SPECTROMETRY (HPLC –MS/MS)**

PRISCILA OLIVEIRA AMARAL

ABSTRACT

The present study aimed to develop a method for the determination and validation of a method for the identification and quantification of Neonicotinoids in surface waters collected in the Bauru region, in the state of São Paulo. The analytical techniques studied for the development of this method were the high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC - MS / MS), gas chromatography with mass spectrometry (GC / MS) and gas chromatography with electron capture detector (GC / ECD). The class of pesticides Neonicotinoids was chosen for this work because it is related to a sudden disappearance of bees in colonies around the world. This phenomenon is known as Colony Collapse Disorder (CCD) and it is characterized by a rapid loss in the population of adult bees. The Neonicotinoids used in this study were the compounds Clothianidin, Imidacloprid and Thiamethoxam which were banned in their use as pesticides in Europe by Implementing Regulation No. 540/2011. The samples were concentrated using solid phase extraction (SPE) and liquid liquid extraction (LLE) techniques and injected into HPLC-MS / MS, GC / MS and GC / ECD. The GC / ECD and GC / MS techniques were not satisfactory for determination in the water matrix because the detection limit (10 mg L^{-1}) is above the maximum allowed by the US Environmental Protection Agency ($0.6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). The HPLC - MS / MS technique using the multiple reaction monitoring (MRM) proved to be adequate for this study because it obtained quantification limits between 5.89 and $8.06 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ and a linearity between 0.9963 and 0.9999 for the three compounds.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. COLAPSO DE DESORDEM DAS COLONIAS E A PERDA DE ABELHAS.....	7
3.1 Colapso de Desordem das Colônias - CCD	7
3.2 A morte das abelhas no mundo.....	8
3.3 Morte de abelhas no Brasil.....	9
3.4 <i>Varroa destructor</i>	11
3.5 Viroses que afetam a colônia	11
3.6 Infecções por fungos que afetam a colônia.....	13
3.7 Neonicotinóides.....	14
3.7.1 Clotianidina.....	15
3.7.2 Imidacloprido	16
3.7.3 Tiametoxam.....	16
3.7.4 Modo de ação dos Neonicotinóides em insetos	17
3.7.5 Como eles afetam o meio ambiente?.....	17
3.7.6 Estudos sobre Neonicotinóides e abelhas	18
3.8 Legislação	21
4. METODOS CROMATOGRÁFICOS E PREPARAÇÃO DE AMOSTRA.....	23
4.1 Extração em fase sólida	23
4.2 Extração líquido - líquido.....	24
4.3 Técnicas cromatográficas	25
4.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas em tandem.....	26
4.3.2 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas	29
4.3.3 Cromatógrafo a gás acoplado ao detector de captura de elétrons..	30
5. VALIDAÇÃO	32
5.1 Documentos utilizados para a validação	32
5.2 Figuras de mérito	32
5.2.1 Curva de calibração	33
5.2.2 Especificidade	33
5.2.3 Limite de decisão ($CC\alpha$).....	34
5.2.4 Capacidade de detecção ($CC\beta$).....	34
5.2.5 Veracidade	34
5.2.6 Repetibilidade.....	35

5.2.7 Reprodutividade	35
5.2.8 Recuperação	36
5.2.9 Robustez	37
6. MATERIAIS E MÉTODOS	39
6.1 Materiais e reagentes	39
6.2 Equipamentos	40
6.3 Amostragem	42
6.4 Metodologia analítica	45
6.4.1 Análise de metais em águas superficiais	45
6.4.2 Extração em fase solida (SPE).....	46
6.4.2.1 Definição de cartuchos de extração.....	46
6.4.2.2 Definição da metodologia de extração.....	48
6.4.2.3 Definição da faixa de pH da amostra	48
6.4.3 Extração Líquido - Líquido (LLE).....	49
6.4.4 Condições analíticas do HPLC- MS/MS	50
6.4.4.1 Condições analíticas para o HPLC – MS/MS API 2000.....	53
6.4.4.2 Condições analíticas para o HPLC – MS/MS Q TRAP 3200 ...	53
6.4.5 Condições analíticas para GC/MS	54
6.4.6 Condições analíticas para GC/ ECD	55
6.5 Ensaios de validação	56
6.6 Preparação das amostras segundo os experimentos do ResVal.....	57
6.6.1 Limites de validação permitidos para cada analito	57
6.6.2 Curva de calibração.....	58
6.6.3 Experimento 1.....	58
6.6.4 Experimento 2.....	59
6.6.5 Experimento 3.....	59
6.6.6 Experimento 4.....	59
6.7 Determinação da Robustez.....	59
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
7.1 Análise de metais em amostras de água	61
7.2 Extração em fase sólida	62
7.2.1 Escolha do cartucho	62
7.2.2 Escolha da metodologia	64
7.2.3 Escolha da faixa de pH	65
7.3 Extração líquido líquido	67

7.4 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC/MS) .	70
7.5 Cromatografia a gás acoplada detector de captura de elétrons (GC/ECD)	72
7.6 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC – MS/MS).....	72
7.6.1 Análises via HPLC – MS/MS API 2000	73
7.6.2 Análises via HPLC – MS/MS API 3200	79
7.7 Validação de acordo com o documento 2002/657/CE utilizando o ResVal.....	80
7.7.1 Curva de calibração	80
7.7.2 Experimento 1	81
7.7.3 Experimento 2	84
7.7.4 Experimento 3	87
7.7.5 Experimento 4	90
7.7.6 Resultados do ResVal.....	92
7.8 Resultados da Robustez	96
7.9 Análises de água superficial.....	98
8. CONCLUSOES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Figuras de mérito para DOQ CGCRE 008 e a 2002/657/CE.	33
TABELA 2 - Planejamento fatorial utilizado pelo teste de Youden para a determinação da robustez.....	37
TABELA 3 - Testes de extração realizados para definir a metodologia de extração em fase sólida com as respectivas referências.....	48
TABELA 4 - Resultados da otimização do modo MRM.....	52
TABELA 5 – Parâmetros avaliados na análise por FIA.....	52
TABELA 6 - Programação do gradiente de eluição para as análises de água via HPLC – MS/MS utilizando o equipamento API 2000. A e B são solventes utilizados na eluição das amostras.	53
TABELA 7 - Programação do gradiente de eluição para as análises de água via HPLC – MS/MS utilizando o equipamento QTRAP 3200. A e B são solventes utilizados na eluição das amostras.	54
TABELA 8 - Configurações analíticas do GC/MS.	55
TABELA 9 - Programação da temperatura da coluna do GC/MS	55
TABELA 10 - Configurações analíticas do GC/ECD	56
TABELA 11 - Programação da temperatura da coluna do GC/ ECD	56
TABELA 12 - Curva de calibração para cada Neonicotinóide.....	58
TABELA 13 - Amostras que serão preparadas para os experimentos do ResVal.	58
TABELA 14 - Fatores selecionados para a determinação da robustez.....	60
TABELA 15 - Resultados da análise de metais em amostras de água	61
TABELA 16 - Parâmetros utilizados na fonte de íons do HPLC - MS/MS.....	73
TABELA 17 - Regressão linear e coeficiente de determinação das curvas de calibração realizadas com solvente	77
TABELA 18 - Regressão linear e coeficiente de determinação das curvas de calibração realizadas com matriz.....	77
TABELA 19 - Curvas de calibração e coeficiente de determinação para a Clotianidina	81
TABELA 20 - Curvas de calibração e coeficiente de determinação para o Imidacloprido.....	81
TABELA 21 - Curvas de calibração e coeficiente de determinação para o Tiametoxam	81
TABELA 22 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 1 (adição de padrão após a extração).	82
TABELA 23 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 1 (adição de padrão após a extração).....	82

TABELA 24 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 1 (adição de padrão após a extração).	83
TABELA 25 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração).....	84
TABELA 26 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração).	85
TABELA 27 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração).....	86
TABELA 28 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 3 (níveis de validação em solvente).	87
TABELA 29 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 3 (níveis de validação em solvente).	88
TABELA 30 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 3 (níveis de validação em solvente).	89
TABELA 31 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 4 (adição de padrão após a extração)	90
TABELA 32 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 4 (adição de padrão após a extração).	91
TABELA 33 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 4 (adição de padrão após a extração).	91
TABELA 34 - Limite de decisão e capacidade de detecção para a Clotianidina. ..	92
TABELA 35 - Limite de decisão e capacidade de detecção para o Imidacloprido.	93
TABELA 36 - Limite de decisão e capacidade de detecção para o Tiametoxam. ..	93
TABELA 37 - Desvio padrão e coeficiente de variação para a Clotianidina.	94
TABELA 38 - Desvio padrão e coeficiente de variação para o Imidacloprido.	94
TABELA 39 - Desvio padrão e coeficiente de variação para o Tiametoxam.	94
TABELA 40 – Resultados do coeficiente de variação para a repetitividade dos compostos em estudo.	94
TABELA 41 - Resultados do coeficiente de variação para a reprodutividade dos compostos em estudo.	95
TABELA 42 - Resultados de recuperação para a Clotianidina.	95
TABELA 43 - Resultados de recuperação para o Imidacloprido.	96
TABELA 44 - Resultados de recuperação para o Tiametoxam.	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura molecular da Clotianidina.....	15
FIGURA 2 - Estrutura molecular do Imidacloprido.	16
FIGURA 3 - Estrutura molecular do Tiametoxam.....	17
FIGURA 4 - Esquema de extração por fase solida (SPE).....	24
FIGURA 5 - Esquema de extração líquido- líquido.	25
FIGURA 6 - Esquema do cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas em tandem.....	26
FIGURA 7 - Esquema do espectrômetro de massas em tandem. Q1 e Q3 são quadrupolos analisadores e Q2 é a célula de colisão [Tsipi et al., 2015].	27
FIGURA 8 - Esquema do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas.....	30
FIGURA 9 - Esquema do cromatógrafo a gás acoplado ao detector de captura de elétrons	31
FIGURA 10 - Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro massas 3200 QTRAP (HPLC – MS/MS) localizado no CEMSA.....	40
FIGURA 11 - Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro massas tandem (HPLC-MS/MS) localizado no CEMSA.....	41
FIGURA 12 - Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC/MS) com injetor automático localizado no CQMA.	41
FIGURA 13 - Cromatógrafo a gás acoplado ao detector de captura de elétrons (GC/ECD) localizado no CQMA.	42
FIGURA 14 - Região da coleta de amostras de águas superficiais no estado de São Paulo Fonte: Google Maps	43
FIGURA 15 - Lago utilizado nas coletas de água superficiais. Fonte: Google Maps	43
FIGURA 16 - Margens do lago onde foi realizada a coleta de águas superficiais.....	44
FIGURA 17 - Vidros âmbar com as amostras de água coletadas.....	44
FIGURA 18 - Sistema de filtração a vácuo	45
FIGURA 19 - Sistema de extração em fase sólida.....	47
FIGURA 20 - Sistema de secagem das amostras.....	47
FIGURA 21 - pHmetro e agitador magnético utilizados para os testes de alteração do pH das amostras.	49
FIGURA 22 - Sistema para a extração líquido – líquido.....	50
FIGURA 23 - Comparação dos cromatogramas: da mistura padrão dos analitos com a extração com cartuchos C18 e Strata X.....	63
FIGURA 24 - Comparação dos cromatogramas dos quatro diferentes testes de extração. Teste 1: 5 mL de MeOH + 5mL de H ₂ O e 3 mL de ACN/MeOH (2:1). Teste 2: 3 mL de MeOH + 3mL de H ₂ O e 3 mL de AcOEt/MeOH (1:1). Teste 3: 5	

mL de MeOH/DCM (1:1) + 5mL de H ₂ O e 10 mL de MeOH/ DCM (1:1). Teste 4: 3 mL de MeOH + 3mL de H ₂ O e 2,5 mL de MeOH.....	64
FIGURA 25 - Comparação dos cromatogramas com diferentes faixas de pH.	65
FIGURA 26 - Comparação dos cromatogramas com melhor recuperação com o cromatograma de um padrão de 500 µg L ⁻¹	66
FIGURA 27 - Comparação entre as extrações com água ultrapura e amostra com e sem a adição de analito.	68
FIGURA 28 - Comparação entre a análise de uma mistura padrão de 60 µg L ⁻¹ com as extrações realizadas com água ultrapura e a água coletada com a adição de uma concentração de 60 µg L ⁻¹ dos analitos de interesse.	69
FIGURA 29 - Cromatograma da Clotianidina	71
FIGURA 30 - Espectro de massas da Clotianidina	71
FIGURA 31 - Cromatograma do Imidacloprido	71
FIGURA 32 - Comparação entre o espectro obtido na análise e o espectro gerado na biblioteca NIST	71
FIGURA 33 - Comparação dos cromatogramas para cada pesticida por GC/ECD	72
FIGURA 34 - Curva de calibração para a Clotianidina em solvente.....	74
FIGURA 35 - Curva de calibração para o Imidacloprido em solvente	74
FIGURA 36 - Curva de calibração para o Tiametoxam em solvente.....	75
FIGURA 37 - Curva de calibração para a Clotianidina em matriz	75
FIGURA 38 - Curva de calibração do Imidacloprido em matriz.....	76
FIGURA 39 - Curva de Calibração do Tiametoxam em matriz.....	76
FIGURA 40 - Análise dos compostos Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam em solvente nas concentrações de 48, 80 e 32 µg mL ⁻¹ respectivamente.	77
FIGURA 41 - Análise dos compostos Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam em matriz nas concentrações de 48, 80 e 32 µg mL ⁻¹ respectivamente.....	78
FIGURA 42 - Análise dos compostos Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam em matriz nas concentrações de 48, 80 e 32 µg mL ⁻¹ respectivamente após a realização da curva de calibração com a matriz.	79
FIGURA 43 - Análise de uma mistura padrão com 50 µg mL ⁻¹ no equipamento Q - TRAP 3200.....	80
FIGURA 44 - Teste de Youden para a Clotianidina	97
FIGURA 45 - Teste de Youden para o Imidacloprido.....	97
FIGURA 46 - Teste de Youden para o Tiametoxam	98
FIGURA 47 - Cromatograma das análises de águas superficiais coletadas no verão	99
FIGURA 48 - Cromatograma das análises de águas superficiais coletadas no inverno	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPV	<i>Acute Bee Paralysis Virus</i> (Vírus da paralisia aguda)
ACN	Acetonitrila
BQCV	<i>Black Queen Cell Virus</i> (Vírus da realeira negra)
CBPV	<i>Chronic Bee Paralysis Virus</i> (Vírus de paralisia crônica)
CCD	<i>Colony Collapse Disorder</i> (Colapso de desordem das colônias)
CE	<i>Collision Energy</i> (Energia de colisão)
CEMSA	Centro de Espectrometria de Massas Aplicada
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
COLOSS	<i>Prevention of Honey Bee Colony Losses</i> (Prevenção da perda de colônias de abelhas)
CQMA	Centro de Química e Meio Ambiente
CXP	<i>Collision Exit Potential</i> (Potencial de saída da célula de colisão)
DCM	Diclorometano
DP	<i>Declustering Potential</i> (Potencial de orifício)
DWV	<i>Deformed Wing Virus</i> (Vírus da asa deformada)
EtOAc	Acetato de Etila
EP	<i>Entrance Potential</i> (Potencial de entrada)
EPA	<i>Enviroimental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental)
GC/ECD	<i>Gás Chromatography / Electron Capture Detector</i> (Cromatógrafo a gás / Detector de captura de elétrons)
GC/MS	<i>Gás Chromatography / Mass Spectrometry</i> (Cromatógrafo a gás/ Espectrômetro de massas)
GF – AAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite)

GPS	<i>Global Positioning System</i> (Sistema de posicionamento global)
HPLC – MS/MS	<i>High Performance Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência / Espectrômetro de massas em tandem)
IAPV	<i>Israeli Acute Paralysis Virus</i> (Vírus israelense de paralisia aguda)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICP – EOS	<i>Inductively Coupled Plasma / Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de emissão ótica acoplada ao plasma induzido)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
KBV	<i>Kashmir bee virus</i> (Vírus caxemira)
LAQA	Laboratório de Análises Química e Ambiental
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (Monitoramento de reações múltiplas)
MeOH	Metanol
nAChR	<i>Nicotinic Acetylcholine Receptor</i> (Receptor de acetilcolina nicotínico)
Q1	1º Quadrupolo
Q2	2º Quadrupolo / Célula de colisão
Q3	3º Quadrupolo
SBV	<i>Sacbrood Virus</i> (vírus da cria ensacada)
S/N	<i>Signal to Noise</i> (Razão sinal / ruído)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em fase sólida)

1. INTRODUÇÃO

O desaparecimento súbito de colônias de abelhas em diversos países tem chamado a atenção dos cientistas, do público e da imprensa mundial [Neumann et al., 2010]. Os primeiros indícios surgiram em outubro de 2006 quando alguns apicultores reportaram uma perda de 30 a 90% de suas colônias nos Estados Unidos. Os sintomas dessas perdas não se pareciam com nada já conhecido, portanto, a comunidade de apicultores dos Estados Unidos denominou este fenômeno de Colapso de Desordem das Colônias (*Colony Collapse Disorder* - CCD) [Ellis et al., 2010]. No início de 2007, apicultores europeus observaram um fenômeno semelhante na Bélgica, França, Holanda, Grécia, Itália, Portugal e Espanha com perdas contínuas ao longo dos anos seguintes [Lima; Rocha, 2012].

O CCD é caracterizado por uma rápida perda da população adulta de abelhas e a ausência de abelhas mortas no interior ou próxima a colônia. Nestas colônias a rainha ainda está viva e acompanhada de poucas abelhas adultas, apesar de ainda haver crias e alimento na colmeia [Cox Foster et al., 2007].

Este fenômeno repercutiu em todo o mundo com publicações na revista *Time* [Walsh, 2013], *Nature* [Cressey, 2015] e na revista brasileira *Veja* [Beer, 2016]. Também foram produzidos dois documentários sobre o assunto, o “*Vanishing of the bees*” lançado no Reino Unido em 2009 e o “*What is killing our bees?*” da rede BBC do Reino Unido lançado em 2013.

As abelhas são fundamentais para alimentação no mundo. Elas são responsáveis pela polinização e pela produção de produtos como: mel, própolis, geléia real e cera de abelha [Farooqui, 2012]. Apesar de não serem os únicos animais polinizadores, as abelhas contribuem com 40% da polinização do planeta [Lima; Rocha, 2012]. Nossa alimentação se tornaria menos nutritiva sem mirtilos, cerejas, melancia, alface e dezenas de outras plantas que seriam muito difíceis de cultivar sem a polinização [Walsh, 2013]. Este serviço é importante para o ecossistema, pois quase 90% das plantas com flores e 75% das culturas mais comuns do mundo se beneficiam da polinização animal [Lundin et al., 2015].

Mais de 1200 espécies de vertebrados e cerca de 100.000 espécies de invertebrados polinizadores estão envolvidos na polinização animal. As abelhas

ganham destaque por serem os principais polinizadores da maioria dos ecossistemas do mundo e por essa polinização ser realizada por um total de 40.000 espécies diferentes [Lima; Rocha, 2012].

A partir dessa grande comoção, foi criada uma rede internacional para coordenar os esforços que explicam e previnem as grandes perdas de colônias em escala global: a Prevenção de Perdas de Colônias de Abelhas (*Prevention of Honey Bee Colony Losses* – COLOSS). A rede COLOSS interliga as partes interessadas: apicultores, cientistas e indústria, além de coordenar atividades de investigações em todo o mundo [Neumann et al., 2010]. Curiosamente, uma citação atribuída a Albert Einstein tornou-se o slogan da causa: “Se as abelhas desaparecerem da superfície do globo, a humanidade não terá mais quatro anos de existência” [Walsh, 2013].

Apesar de já existirem diversos estudos sobre o assunto, ainda não existe uma resposta definitiva para este problema. As seguintes hipóteses são as mais aceitas [Kaplan, 2012] [Ellis et al., 2010]:

- Patogêneses: como o vírus israelense de paralisia aguda (*Israeli acute paralysis virus* – IAPV), o vírus da realeira negra (*Black Queen cell virus*– BQCV), vírus da asa deformada (*Deformed wing virus*– DWV) entre outros;
- Parasitas: espécies de fungos e ácaros que aparecem em abundância em colmeias com CCD;
- Pestes ou doenças não descobertas ou recém descobertas;
- Estresse relacionado ao gerenciamento ou ao transporte de abelhas;
- Produtos químicos presentes no meio ambiente: como a contaminação de pesticidas em água, solo e plantas;
- Monoculturas: a plantação de um único tipo de cultura pode estar gerando uma deficiência nutricional e afetando o sistema imunológico das abelhas;
- Interações potenciais entre duas ou mais destas hipóteses.

Anteriormente aos casos de CCD nos Estados Unidos, em 1993, o pesticida Imidacloprido, foi introduzido na França para tratar sementes de girassol e milho contra as principais pragas. Algum tempo depois, os apicultores

franceses culpavam o Imidacloprido pela “doença da abelha louca” (*Mad bee disease*) que diminuiu drasticamente a população de abelhas no país. Devido a isso, o Imidacloprido passou a ser proibido para sementes de girassol em 1999, e para sementes de milho, cinco anos mais tarde [Farooqui, 2012].

Com receio de que os pesticidas tivessem participação no CCD, em 24 de maio de 2013 a União Europeia editou o Regulamento de Execução n.º 540/2011 proibindo a utilização e comercialização de sementes tratadas com as substâncias ativas Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam. Estes pesticidas são de uma classe de compostos denominada Neonicotinóides.

Os Neonicotinóides são um grupo de pesticidas com base na molécula da nicotina amplamente utilizados em culturas agrícolas polinizadas [Farooqui, 2012]. Estes compostos foram introduzidos no mercado de pesticidas em 1991 com o lançamento do Imidacloprido e no ano de 2008 já possuíam uma cota de 24% do mercado de pesticidas mundial [Jeschke et al., 2011]. Os Neonicotinóides são pesticidas sistemáticos utilizados para o revestimento de sementes, o que significa que existem vestígios destas substâncias químicas em todas as partes da planta, incluindo o pólen e o néctar [Walsh, 2013].

Os Neonicotinóides têm alta toxicidade para uma grande quantidade de artrópodes, especialmente insetos e crustáceos. Isso ocorre porque os Neonicotinóides conseguem se ligar aos receptores de acetilcolina nicotínico (*Nicotinic acetylcholine receptor* - nAChR) no sistema nervoso central destes animais causando uma estimulação contínua dos sistema nervoso. Estudos de toxicidade com artrópodes sugerem que a ligação com estes receptores é de longa duração e que exposições crônicas podem ter efeitos acumulativos com o tempo. Mamíferos e outros vertebrados possuem menor afinidade aos Neonicotinóides devido a uma configuração diferente de seu sistema nervoso central, o que faz com que essa ligação do inseticida seja fraca e de curta duração [Morrissey et al., 2015].

A ativação crônica dos receptores de nAChR por Neonicotinóides em concentrações baixas causa uma persistente estimulação do sistema nervoso e altas concentrações destes compostos podem causar o bloqueio do receptor, paralisia e morte [Goulson, 2013]. Devido a sua grande abundância no cérebro

do inseto, nAChRs são alvos de desenvolvimento de inseticidas, pois a sua indução contínua pode afetar a aprendizagem e a memória dos insetos [Farooqui, 2012].

A grande dificuldade de relacionar os pesticidas ao CCD é que a exposição das abelhas para resíduos químicos é geralmente a níveis subletais e os efeitos induzidos podem ser variáveis, dependendo da presença e da intensidade dos agentes de estresse de cada colmeia [Sánchez-Bayo et al., 2016]. A situação é ainda mais delicada, pois os apicultores na Austrália têm sido poupados do CCD apesar de ainda usar Neonicotinóides em suas plantações, enquanto a França continuou a sofrer perdas de abelhas mesmo após a proibição destes pesticidas em 1999 [Walsh, 2013].

Embora haja poucas provas sobre a ação dos Neonicotinóides na mortalidade direta de abelhas, existem fortes evidências sobre importantes efeitos subletais [Goulson, 2013]. Estudos em laboratórios na Europa e nos Estados Unidos mostram que pequenas quantidades de Neonicotinóides causam desorientação, comunicação reduzida, prejuízo no aprendizado e memória, longevidade reduzida e perturbação dos ciclos de cria das abelhas [Farooqui, 2012]. Outra teoria que liga os Neonicotinóides ao CCD é que estes compostos podem estar agravando infecções e viroses que já estão relacionadas ao CCD, enfraquecendo o sistema imunológico das abelhas e tornando-as suscetíveis a outras doenças [Sánchez-Bayo et al., 2016].

Os Neonicotinóides também podem gerar problemas de contaminação ambiental por serem compostos com alta solubilidade em água e longa persistência no solo. Um estudo sobre a contaminação ambiental de Neonicotinóides afirma que estes compostos foram detectados na água em 29 estudos de nove países. Estes pesticidas foram encontrados em amostras de águas superficiais, canais de irrigação, córregos, rios e zonas úmidas próximas de cultivos agrícolas [Morrissey et al., 2015]. Os Neonicotinóides também estão sendo encontrados no pólen, no néctar, na vegetação adjacente, em águas consumidas pelas abelhas, em mais de 50% dos rios em áreas agrícolas dos Estados Unidos e outros países [Sánchez-Bayo et al., 2016].

No Brasil, existe pouca informação sobre o CCD e fenômenos semelhantes. Apesar de haver uma lei federal com a intenção de proteger e conservar as abelhas [CONAMA, 2004], já existem relatos sobre mortes nas colmeias devido à contaminação por pesticidas em várias regiões do país como Piauí, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo [Lima; Rocha, 2012].

Recentemente, foi criado no estado de São Paulo o Projeto Colmeia Viva esse projeto foi idealizado pelo Sindicato de Produtos para a Defesa Vegetal (Sindiveg) com a intenção de promover o uso correto de defensivos agrícolas na agricultura brasileira, respeitando as abelhas, a apicultura e o meio ambiente.

Com a intenção de mapear a mortalidade de abelhas e suas causas, os pesquisadores da UNESP e UFSCar criaram uma iniciativa de pesquisa chamada MAP (Monitoramento de Abelhas Participativo). O MAP funciona com um canal de comunicação para agricultores, apicultores e suas associações sinalizarem os casos de perdas de abelhas em sua região.

Este projeto também disponibiliza visitas de campo de profissionais especializados em abelhas na agricultura para avaliar a condição das colmeias, o estado das abelhas, o histórico do lugar, o manejo do apiário e a identificação das atividades agrícolas. Essa visita também pretende realizar a amostragem de abelhas mortas nas últimas 24 horas para determinar se existem resíduos de pesticidas nas abelhas mortas. Esta análise é realizada por uma equipe técnica de profissionais da área de toxicologia de abelhas e das indústrias associadas.

Diante disso, o controle destes pesticidas em corpos de água é fundamental para relacionar as mortes de abelhas com os Neonicotinóides. A água é um elemento vital para os processos fisiológicos de digestão e metabolismo das abelhas além de ser utilizada para manter a temperatura e a umidade dentro da colmeia, portanto a utilização de uma água com neonicotinóides poderia comprometer toda a saúde da colônia.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver e validar uma metodologia para detecção dos Neonicotinóides – Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam – em água via cromatografia a gás acoplada ao detector de captura de elétrons (GC/ECD), cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC/MS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC –MS/MS).

Os objetivos específicos são:

- (a) Desenvolvimento de um método de extração dos analitos Neonicotinóides em amostras de águas superficiais.
- (b) Elaboração de metodologia para a detecção de Neonicotinóides em água via GC/ECD e GC/MS.
- (c) Otimização da metodologia para a detecção e quantificação de Neonicotinóides em água via HPLC – MS/MS.
- (d) Validação da metodologia para a quantificação de Neonicotinóides em água via HPLC – MS/MS.
- (e) Aplicação e avaliação em mananciais de água próximos as culturas onde os Neonicotinóides são usados como pesticida no Estado de São Paulo.

3. COLAPSO DE DESORDEM DAS COLONIAS E A PERDA DE ABELHAS

Neste capítulo estão descritas as causas do Colapso de Desordem das Colônias, os estudos sobre esse assunto e uma revisão sobre a perda de abelhas no Brasil e no mundo.

3.1 Colapso de Desordem das Colônias - CCD

O CCD é caracterizado por um rápido declínio da população adulta de abelhas de uma colônia, apesar de ainda haver ninhada e alimento na colmeia [Cox Foster et al., 2007]. Sem as abelhas adultas, as colônias entram em colapso por não haver mais ninguém para fazer o forrageamento e manter a colmeia [Farooqui, 2012].

Existem diversas discussões sobre as causas do CCD. A maior parte dos estudos sobre o assunto acredita que sua causa ocorra pelo efeito de múltiplos fatores [Farooqui, 2012]. Apesar desses fatores de estresse reduzirem o desenvolvimento, desempenho e sobrevivência das colônias, nenhum fator parece dar conta de todos os declínios observados [Doublet et al., 2015].

Os principais fatores discutidos são: infecções causadas por fungos ou ácaros, viroses transmitidas pelo ácaro *Varroa destructor* (*V. destructor*), estresse nutricional devido a sua polinização em monoculturas, falta de diversidade genética e sensibilidade a pesticidas [Farooqui, 2012]. Estudos recentes já identificaram interações sinérgicas entre diferentes fatores de estresse. A interação entre o acaro *V. destructor* e os vírus que ela transmite, aumentam a mortalidade de colônias. Combinações de pesticidas também têm demonstrado um aumento na mortalidade e no desenvolvimento de abelhas [Doublet et al., 2015].

Perdas de abelhas em grande escala não são incomuns. Nos Estados Unidos existe um aumento na mortalidade das abelhas desde a introdução do ácaro *V. destructor* no final de 1980 [Cox Foster et al., 2007]. Antes disso, as populações de abelhas eram exterminadas devido a condições meteorológicas extremas, exposições a pesticidas e infestação de pragas. O CCD se difere das perdas passadas por ser uma perda repentina que resulta em uma perda

completa de abelhas forrageiras, com poucas ou nenhuma abelha morta perto da colônia [Farooqui, 2012].

3.2A morte das abelhas no mundo

Como o agente polinizador mais importante nos Estados Unidos, as abelhas contribuem com mais de 14 bilhões de dólares para a agricultura por ano [Johnson et al., 2009]. Apesar da descoberta do CCD ter sido em 2006, aproximadamente 23% das operações de apicultura nos Estados Unidos já sofria com o CCD durante o inverno de 2006-2007 [Cox Foster et al., 2007] e 36% das colônias sofria com CCD durante o inverno de 2007-2008 [Johnson et al., 2009].

A União Europeia estima que 84% das culturas dependem da polinização de insetos. Porém ao contrário dos Estados Unidos, onde as perdas são claras, as evidências de perdas na Europa são irregulares e muitas vezes mal documentadas [Potts et al., 2010]. Este fato foi o precursor de uma avaliação em larga escalada perda de colônias na Europa.

Potts (2010) realizou uma revisão com os dados de perdas das colônias de 18 países europeus. O estudo do número de colônias se concentra entre os anos de 1965 a 2005. Não houve uma diminuição líquida para os anos de 1965 – 1985, porém houve um declínio geral de 16% entre os anos de 1985 – 2005.

Estes dados sugerem declínios consistentes no número de colônias em países da Europa Central e no número de apicultores de todos os países europeus examinados. Também foi comprovado um declínio no número de colônias na Áustria, Bélgica, Dinamarca, Inglaterra, Alemanha, Luxemburgo, Países Baixos, Polônia, Escócia e País de Gales, República Tcheca, Noruega, Eslováquia e Suécia [Potts et al., 2010].

Nos Países Baixos, as perdas de abelhas nas colônias foram acima de 20% durante o período 2006 – 2013. Os fatores mais significativos para esta perda foram: a taxa de ácaro *V. destructor*, presença ou ausência dos Neonicotinóides Acetamiprido ou Tiacloprido no mel, pólen ou abelhas e presença ou ausência de mostarda pão de abelha [Zee et al., 2015].

A partir do inverno de 2003-2004, os apicultores na Grécia passaram a relatar perdas superiores a 10%, sem sintomas aparentes. A maior parte das perdas relatadas foram em áreas com infecções por *N. ceranae*, aonde as perdas

excederam 30% e não foram associadas apenas aos meses de inverno. Nos anos seguintes houveram perdas relatadas em outras áreas da Grécia e associadas com a infecção por *N. ceranae* [Hatjina et al., 2010].

Para conciliar os estudos sobre as perdas de colônias e coordenar os próximos passos para a prevenção deste problema, a associação COLOSS foi criada. A rede COLOSS (*Prevention of Honey Bee Colony Losses*) é a maior rede de estudos de abelhas na história e atualmente é composta de mais de 150 parceiros em 41 países (A maior parte da Europa, Austrália, Canadá, Chile, Israel, Jordânia, Peru, China, Coreia do Sul, República da África do Sul e os Estados Unidos). O principal objetivo do COLOSS é produzir conhecimento e evitar um aumento nas perdas de colônias de abelhas [Potts et al., 2010].

Uma dificuldade encontrada para determinar a perda das colônias no mundo é que para compensar as perdas, os apicultores passaram a dividir as colônias saudáveis, ou passaram a exportar novas colônias [van Engelsdorp, 2010]. Isso diminui a possibilidade de realizar uma determinação mais precisa sobre as perdas de colônias no mundo.

A maneira encontrada para quantificar a mortalidade de abelhas nos Estados Unidos foi a realização de um estudo [van Engelsdorp, 2010] que compara as taxas de perda de colônias no inverno e quantifica as razões para esta perda e seus suspeitos.

O número total de colônias geridas pelos apicultores entrevistados neste estudo foi de 461.980, o que representa um total de 20,1% das colônias dos Estados Unidos no verão de 2008. Apesar do acréscimo de 160.616 novas colônias, foi determinada uma perda total de 28,6% do total de colônias na primavera de 2009. Caso esse inquérito seja o representativo das perdas em todo o país, isso sugere o número de colmeias mortas nos Estados Unidos durante o inverno de 2008 a 2009 foram entre 584.000 a 771.000 colmeias [van Engelsdorp, 2010].

3.3 Morte de abelhas no Brasil

No Brasil, existem vários relatos sobre a morte de abelhas relacionadas devido a contaminação pelo uso inadequado de pesticidas. A literatura brasileira

é omissa em relação aos efeitos provocados por essas substâncias nas abelhas, pois os trabalhos com pesticidas abordam sua eficiência no controle de pestes sem investigar sua relação com os polinizadores [Lima; Rocha, 2012].

A espécie de abelha predominante no Brasil é a abelha africanizada (AHB) que foi gerada de um cruzamento natural entre as espécies europeias *Apis mellifera mellifera* e a espécie africana *Apis mellifera scutellata* [Oliveira et al., 2014]. Estudos sobre a produção apícola no Brasil mostram dados conflitantes quanto ao número de apicultores de colmeias, e à sua produção e a produtividade. Pesquisas apontam extremos entre 26.315 e 300.000 apicultores do país e entre 1.315.790 e 2.500.000 colmeias e um faturamento anual entre R\$ 84.740.000,00 e R\$ 506.250.000 [Lima; Rocha, 2012]. Não há estatísticas nem dados oficiais e precisos sobre o consumo e venda do mel, devido a informalidade do mercado, em sua maioria, sem comprovação fiscal.

Lima e Rocha (2012) citam diversos relatos sobre a morte súbita de abelhas em diversas regiões do país como Piauí, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Esses apiários estavam próximos a culturas de grande importância econômica como laranja, soja e tabaco [Lima; Rocha, 2012]. Recentemente, cerca de 10 milhões de abelhas morreram em menos de uma semana em um apiário próximo a região de São Carlos no estado de São Paulo. Segundo o proprietário, o apiário se localiza dentro de um canavial e o que provocou a morte das abelhas foi o agrotóxico despejado por um avião com a intenção de matar os insetos que afetam a plantação de cana de açúcar [G1, 2017].

Atualmente existem diversos estudos toxicológicos sobre a interação do Tiametoxam e Imidacloprido com abelhas africanizadas no Brasil [Gregorc et al., 2016]; [Rossi et al., 2013]; [Oliveira et al., 2013]; [Tavares et al. 2015]. Além destes estudos, o MAP (Monitoramento de Abelhas Participativo) mapeia as perdas nas colmeias e seus fatores no estado de São Paulo. Recentemente foram divulgados os resultados da primeira fase deste estudo que foi realizada entre junho de 2015 e maio de 2016.

Entre os resultados divulgados, quase 30% das colmeias analisadas apresentaram resultados negativos para defensivos agrícolas. Para as amostras

com resultados positivos foram identificados três grupos de pesticidas diferentes (neonicotinóides, pirazol+triazol, pirazol) e foram encontrados neonicotinóides em 29,4 % das colmeias analisadas. Estas amostras estão relacionadas a cultivos de cana de açúcar e em nenhum dos casos de perdas de abelhas foram observadas características relacionadas ao CCD.

3.4 *Varroa destructor*

O ácaro do gênero *Varroa* foi descoberto há 100 anos, enquanto atuava como um parasita em uma abelha asiática. Este gênero foi rotulado e atualmente contem quatro espécies [Dietemann et al., 2013]. Entre os ácaros deste gênero, o *Varroa destructor* (*V. destructor*) é o mais importante, pois este acaro tem atacado colmeias em diversos lugares e é uma das principais causas de perdas de colônias em todo o mundo.

O *V. destructor* é um acaro microscópico que além de perfurar o exoesqueleto de uma abelha e sugar sua hemolinfa, também pode espalhar uma série de doenças virais que podem destruir uma colônia em pouco tempo [Walsh, 2013]. Esse parasita é um vetor para vários vírus que afetam o desenvolvimento de uma colônia como, por exemplo, o IAPV, DWV entre outros.

Os apicultores holandeses que realizaram tratamento contra o *V. destructor* no verão e no inverno tiveram menos risco de perdas do que os apicultores que realizaram esse tratamento apenas no verão. Um estudo alemão encontrou uma forte relação positiva entre a ocorrência do *Varroa* e o vírus DWV e ABPV [Zee et al., 2015].

3.5 Viroses que afetam a colônia

Outro fator muito considerado para a diminuição de colônias de abelhas no mundo são as doenças transmitidas por vírus. Existem muitos tipos de vírus diferentes para as abelhas, e a intensidade dos danos para a colônia depende do vírus e o modo de transmissão do patógeno. Na maior parte dos casos os sintomas aparecem apenas nas larvas e não são visíveis na população adulta [Santillán-Galicia et al., 2010].

A morte de colônias causada por infecções virais não é comum, porém existem casos de perdas de colônias relacionadas a viroses juntamente com infestações do ácaro *V. destructor*. Estudos comprovam que o *V. destructor* serve como um vetor para a transmissão de viroses, pois ele adquire o vírus de abelhas ou pupas infectadas e transmite o vírus a pupas saudáveis [Santillán-Galicia et al., 2010].

Atualmente existem cerca de 24 vírus identificados em abelhas [Miranda et al., 2013]. Neste trabalho estão descritas as principais viroses em estudo e seus efeitos em colônias de abelhas.

O vírus da paralisia aguda (*Acute bee paralysis virus* - ABPV), o vírus caxemira (*Kashimir bee virus* - KBV), e o vírus israelense de paralisia aguda (*Israeli acute paralysis virus* - IAPV) são vírus intimamente relacionados e assintomáticos, mas podem ser letais em indivíduos e colônias quando transmitido pelo *V. destructor*. Estes vírus são caracterizados pela capacidade de matar as pupas e as abelhas adultas [Miranda et al., 2013].

O vírus de paralisia crônica (*Chronic bee paralysis virus* - CBPV) manifesta-se em abelhas adultas por dois conjuntos de sintomas distintos. Um deles consiste em tremor das asas e corpos e uma falha ao voar e o outro consiste em abelhas pretas gordurosas, sem pelos. Elas logo se tornam incapazes de voar, tremem e morrem. Este vírus pode ser detectado no material fecal e transmitido a partir do contato e da alimentação [Miranda et al., 2013].

O vírus da realeira negra (*Black Queen cell virus* - BQCV) tem como principais sintomas as paredes de células enegrecidas de células rachadas e seladas, contendo pupas mortas. As larvas doentes têm uma aparência amarela pálida e uma pele dura semelhante aos sintomas do vírus da cria ensacada (*Sacbrood Virus* - SBV). Este vírus está presente em abelhas adultas, mas sem sintomas visíveis [Miranda et al., 2013].

O vírus da cria ensacada (*Sacbrood Virus* – SBV) tem sintomas que aparecem alguns dias depois da infecção e consistem em larvas amarelo pálido que não amadurecem para pupa. Ao redor das larvas aparece um saco com um líquido e as larvas mudam de amarelo para marrom quando morrem. Este vírus

também está presente em abelhas adultas, mas sem sintomas [Miranda et al., 2013].

Os sintomas para o vírus de asa deformada (*Deformed wing virus* - DWV) consistem em abelhas com asas amassadas e/ou abdômen inchado. O vírus também é detectado em todos os outros estádios de vida, mas sem sintomas identificáveis. O DWV também afeta a resposta sensorial, o aprendizado e a memória em adultos [Miranda et al., 2013].

O IAPV foi descrito pela primeira vez em 2004 em Israel, onde as abelhas passaram a apresentar tremores nas asas, paralisia e morte fora da colmeia. Ainda não é possível ter certeza se o IAPV pode ser considerado um bom marcador para o CCD, pois existem estudos que comprovam a existência deste vírus em colmeias com CCD [Cox Foster et al., 2007] e estudos que encontraram este vírus em colmeias assintomáticas [Farooqui, 2012].

Cox Foster et al., (2007) identificou o RNA dos vírus IAPV e KBV em amostras com CCD. Johnson et al., (2009) encontrou vírus DWV em colmeias com CCD. Zee et al., (2015) encontrou os vírus BQCV, SBV, DWV e ABPV em amostras de colônias nos Países Baixos, porém não encontrou associações destes vírus com a perda de colônias.

3.6 Infecções por fungos que afetam a colônia.

O CCD também vem sendo relacionado a recente descoberta de um fungo que vem destruindo diversas colônias em todo o mundo. Em 1994, foi detectado um fungo que estava infectando as abelhas asiáticas próximas a cidade de Pequim, na China. Este fungo foi chamado de *Nosema ceranae* (*N. ceranae*) [Paxton, 2010].

A infecção por *N. ceranae* ocorre quando os esporos são ingeridos pelas abelhas durante o processo de forrageamento ou o consumo de alimentos contaminados. Este microorganismo entra no trato digestório, e germina nas células epiteliais aonde se reproduz e libera os esporos maduros juntamente com as fezes. Estes esporos podem facilmente contaminar toda a colônia. Esta infecção pode danificar o sistema digestivo das abelhas e reduzir a longevidade

das abelhas, a produção de mel e a atividade de polinização [Teixeira et al., 2013].

Atualmente, existem casos de infecções de abelhas por *N. ceranae* nos cinco continentes. Na América do Sul estudos confirmam a presença de *N. ceranae* no Brasil, Uruguai, Argentina e no Chile [Teixeira et al., 2013]. Chauzat et al., (2010) encontrou esporos de *N. ceranae* em um nível acima de 106 esporos por abelha em colmeias na França, próximo à fronteira com a Alemanha. Publicações sobre as colônias de abelhas espanholas sugerem que o *N. ceranae* pode causar o colapso da colônia 18 meses após a infecção [Paxton, 2010].

Cox Foster et al., (2007) identificaram oitenta e uma sequências de RNA de fungos em amostras com CCD. Os principais gêneros encontrados foram: *Saccharomycotina*, *Microsporidia* (*N. apis* e *N. ceranae*), *Entomophthorales* e *Mucorales*. Entre esses gêneros, o gênero de fungo mais encontrado em amostras com CCD é o *Microsporidia* com os fungos *N. apis* e *N. ceranae*. Neste mesmo estudo, Cox Foster afirma que a ocorrência destes fungos não está associada ao CCD, pois é possível encontrar fungos em amostras com e sem CCD.

3.7 Neonicotinóides

Os Neonicotinóides são inseticidas que foram descobertos em 1985 e têm como base a molécula da nicotina. Atualmente, os Neonicotinóides pertencem à classe química mais importante de inseticidas introduzidos no mercado mundial desde o piretróide sintético [Jeschke et al., 2011]. Nesta classe química existem sete compostos comercialmente disponíveis: Acetamiprido, Clotianidina, Dinotefuran, Imidacloprido, Nitempiram, Tiacloprido e Tiametoxam [Uneme, 2011]. Este trabalho terá ênfase nos compostos Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam, devido ao impedimento de sua utilização pela União Europeia.

Estes inseticidas são utilizados no controle de insetos sugadores e mastigadores devido à sua baixa toxicidade em mamíferos, peixes e aves além de alta toxicidade para insetos e crustáceos. Isso ocorre devido à capacidade dos neonicotinóides de se conectar aos receptores de acetilcolina nicotínico (nAChR)

no sistema nervoso central de insetos causando uma estimulação contínua do sistema nervoso [Morrissey et al., 2015].

3.7.1 Clotianidina

A Clotianidina ((*E*)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine) é um Neonicotinóide de fórmula molecular $C_6H_8ClN_5O_2S$ com massa molecular de 250, 1 g mol^{-1} . A Clotianidina foi criada a partir de uma melhoria no desenvolvimento do Nitenpyram, um inseticida que estava sendo previamente desenvolvido para a utilização em culturas de arroz. Ela foi registrada em dezembro de 2001 para gramado e em abril de 2002 para culturas [Uneme, 2011]. No Brasil este composto é utilizado em culturas de algodão [Lima et al, 2012].

Esta molécula tem alta atividade contra os insetos da ordem *Diptera*, *Coleoptera*, *Lepidopteros*, *Hemiptera* e *Thysanoptera* com um efeito a longo prazo, ação sistêmica e ampla variedade de métodos de tratamento das culturas. Atualmente, a Clotianidina está registrada em mais de 40 países pelo mundo sendo comercializada por diferentes nomes dependendo dos métodos de aplicação, tais como: *Dantotsu*, *Belay* e *Valent* usadas em culturas por todo o mundo, e o *Poncho* que é utilizado para tratamento de sementes [Uneme, 2011]. A estrutura molecular da Clotianidina é apresentada na FIG. 1.

FIGURA 1 - Estrutura molecular da Clotianidina.

3.7.2 Imidacloprido

O Imidacloprido (*1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine*) é um inseticida de fórmula molecular $C_9H_{10}ClN_5O_2$ com massa molecular de $256,1 \text{ g mol}^{-1}$. Este inseticida foi o primeiro inseticida Neonicotinóide a ser comercializado, e ainda é o Neonicotinóide mais utilizado em todo o mundo [Uneme, 2011]. O Imidacloprido é amplamente utilizado para o controle de insetos nocivos para as culturas [Kagabu, 2011] e é comercializado sob os nomes *Gaucho*, *Nuprid*, *Confidor*, entre outros. Este composto é muito utilizado no Brasil em culturas de soja, maracujá, café, algodão e tomate e sua estrutura molecular está apresentada na FIG. 2.

FIGURA 2 - Estrutura molecular do Imidacloprido.

3.7.3 Tiametoxam

O inseticida Tiametoxam (*3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine*) tem fórmula molecular $C_8H_{10}ClN_5O_3S$ e uma massa molecular de $292,2 \text{ g mol}^{-1}$. Este composto foi sintetizado em 1991 como um pró-fármaco para a produção da Clotianidina [Thany, 2011]. O mesmo é considerado medianamente tóxico e está sendo comercializado no Brasil sob os produtos comerciais *Actara* para aplicação no solo e pulverização foliar e *Cruiser* para o tratamento de sementes [Pereira, 2010]. O Tiametoxam é utilizado no Brasil em culturas de café e laranja e a sua molécula é apresentada na FIG 3.

FIGURA 3 - Estrutura molecular do Tiametoxam.

3.7.4 Modo de ação dos Neonicotinóides em insetos

Os Neonicotinóides interferem na transmissão de mensagens em insetos de maneira muito eficiente. As amins nestes compostos modificam a saída sináptica de neurônios relevantes e estão envolvidas na regulação dos sistemas endócrinos e de secreção exócrina, geração de padrões motores, agressão, comportamento de forrageamento, contração muscular e as diferentes formas de formação de aprendizagem e memória. A ativação crônica dos NACHRs por Neonicotinóides provoca a ativação persistente de receptores, o que resulta em uma diminuição das funções celulares [Farooqui, 2012].

3.7.5 Como eles afetam o meio ambiente?

Foram encontrados resíduos de Neonicotinóides não só no pólen e néctar de culturas tratadas, mas na vegetação adjacente, em poços e outras águas superficiais que são consumidas pelas abelhas e em mais de 50% dos rios em áreas de agriculturas nos Estados Unidos e em muitos outros países [Sánchez - Bayo et al., 2016].

De acordo com a revisão de Morrissey et al. (2015) sobre a contaminação de Neonicotinóides em água, estes inseticidas foram encontrados em amostras de água superficial, canais de irrigação, córregos, rios e zonas úmidas próximas de cultivos agrícola em 29 estudos de nove países.

Outro agravante da contaminação refere-se a meia vida destes compostos em solo. Dependendo das condições encontradas em solo, a meia vida dos Neonicotinóides pode variar em um intervalo de 148 a 1155 dias [Farooqui, 2012].

3.7.6 Estudos sobre Neonicotinóides e abelhas

Desde que os pesticidas começaram a ser utilizados no controle de pragas e ervas daninhas na produção agrícola, havia uma preocupação com o impacto que isso poderia ter sobre as abelhas e outros tipos de polinizadores. [Sánchez-Bayo et al., 2016]. Já foi possível comprovar que doses subletais de pesticidas afetam o comportamento de abelhas melíferas, o sucesso do forrageamento, aprendizagem e o desenvolvimento da colônia [Doublet et al., 2015].

Estudos de laboratório na Europa e nos Estados Unidos têm demonstrado que pequenas quantidades de Neonicotinóides (sozinhos ou combinados a outros pesticidas) podem causar desorientação, comunicação reduzida, prejuízo no aprendizado e memória, redução de longevidade e perturbação dos ciclos de cria de abelhas. [Farooqui, 2012]

A dose letal de Neonicotinóides para matar 50% de uma população de abelhas (DL50) também foi determinada. Os valores encontrados são de 22 ng por abelha para a Clotianidina, 18 ng por abelha para o Imidacloprido e 30 ng por abelha para o Tiametoxam [Farooqui, 2012].

Alguns comportamentos das abelhas podem fornecer indícios de que a colmeia está sendo afetada por substâncias tóxicas, tais como [Lima; Rocha, 2012]:

- Grande número de abelhas mortas nas proximidades das colônias;
- Decréscimo na produção de larvas e pupas;
- Diminuição da atividade de forrageamento;
- Irritabilidade excessiva;
- Auto limpeza excessiva;
- Incapacidade de substituição da rainha;
- Má formação das larvas.

Farooqui (2012) criou uma hipótese na qual a exposição crônica aos pesticidas com amins biogênicas (Neonicotinóides e Formamidinas) contribui para uma deficiência na aprendizagem olfativa e memória, afetando a orientação e a capacidade de navegação das abelhas.

O Imidacloprido é altamente tóxico para as abelhas. Em doses subletais, este composto altera o forrageamento, a aprendizagem e a capacidade olfativa para a discriminação de locais. Doses subletais de Tiametoxam diminuem significativamente a memória olfativa e prejudica o desempenho de aprendizagem. Além disso, a exposição a pesticidas aumenta a susceptibilidade a infecções por *N. ceranae* e contribui para o declínio da saúde nas colmeias [Farooqui, 2012].

Chauzat et al. (2010) realizou análises para detectar resíduos de Neonicotinóides em colônias com CCD na França. Em uma das cinco colmeias estudadas ele encontrou resíduos de Clotianidina, porém, nos outros quatro pontos não havia resíduos de nenhum Neonicotinóide.

Zee et al. (2015) encontrou Imidacloprido, Acetamiprido e Tiacloprido em pão de abelha, mel e abelhas de 37 colônias em estudo.

Sánchez – Bayo et al.(2016) afirma que abelhas contaminadas com Imidacloprido aumentam a disseminação de *N. ceranae* na colônia e a exposição de abelhas infectadas com o fungo, a doses de Fipronil ou Tiaclopride, resultou em uma mortalidade de abelhas maior do que a de colmeias não expostas.

Doublet et al. (2015) testou a combinação de três tipos de estressores comuns em doses subletais: um pesticida (Tiacloprid) e dois patógenos (*N. ceranae* e BQCV) para identificar suas interações potenciais. Foram realizados três experimentos: a interação entre o BQCV e o Tiacloprido em larvas, a interação entre o *N. ceranae* e o BQCV em adultos e a interações entre o *N. ceranae*, BQCV e Tiacloprido em adultos.

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos desses fatores em duplas, e em trio. Entre os três fatores de estresse, o fator com maior impacto sobre a mortalidade é o *N. ceranae*, em seguida o BQCV e por fim o Tiacloprido. Os impactos do BQCV e Tiacloprido são altamente variáveis

enquanto o *N. ceranae* teve um efeito mais pronunciado na mortalidade de abelhas adultas [Doublet et al., 2015].

Gregorc et al., (2016) comprovou que a ingestão de valores iguais a 1/50 e 1/500 do DL50 de Tiametoxam por abelha resultam em mortes após um período de 24 horas. Este estudo também comprovou que as abelhas carnicas resistem a doses mais elevadas de Tiametoxam do que as abelhas africanizadas e que o número de abelhas sobreviventes aumenta conforme a concentração de Tiametoxam diminui.

Lima e Rocha, (2012) descrevem um estudo onde o Imidacloprido afeta o padrão da dança do oito, dificultando na comunicação sobre direção das fontes de alimento encontradas. O Imidacloprido também pode dificultar o retorno das abelhas forrageiras à colônia reduzindo a movimentação, mobilidade e a capacidade de comunicação das abelhas, o que interfere em suas atividades sociais.

Rossi et al. (2013), detectou que os valores de 1/10, 1/50 e 1/100 do DL50 do Imidacloprido por abelha geram alterações morfológicas, histoquímicas e imunocitoquímicas nos túbulos de Malpighi (órgãos excretores dos artrópodes) de abelhas africanizadas no Brasil. Este estudo também sugere que a exposição de doses subletais de Imidacloprido podem induzir a morte celular nos túbulos de Malpighi afetando o processo de excreção destes insetos, o que pode causar intoxicação ou até mesmo a morte.

Oliveira et al. (2014), realizou um trabalho para avaliar os efeitos tóxicos do Tiametoxam em abelhas africanizadas operárias. Essas abelhas foram expostas a valores iguais a 1/10 e 1/100 da DL50. As células digestivas e regenerativas do intestino das abelhas expostas mostraram alterações morfológicas e histoquímicas o que contribui para a redução da vida útil das abelhas expostas.

Tavares et al. (2015), avaliou os efeitos subletais do Tiametoxam para larvas de abelhas africanizadas. Este estudo demonstra que concentrações subletais de Tiametoxam são tóxicas para as larvas e podem modular seu desenvolvimento e afetar a manutenção e sobrevivência da colônia.

3.8 Legislação

Existem normas e procedimentos que garantem uma aplicação correta e segura de pesticidas para prevenir seus efeitos sobre as abelhas e humanos. A principal delas é a lei 7.802/89 e o decreto 4.074/02 que determinam que um agrotóxico só pode ser produzido, exportado, importado, comercializado e utilizado no Brasil, se estiver devidamente registrado em um órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos locais responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura.

O IBAMA está realizando um processo de reavaliação ambiental de neonicotinóides que são o foco da discussão internacional sobre o desaparecimento de abelhas e o fipronil que será reavaliado devido ao número de incidentes com abelhas já registrados.

No Brasil, a Instrução Normativa Conjunta nº 1 do dia 28 de dezembro de 2012, proibiu a utilização dos Neonicotinóides Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam durante a floração de qualquer cultura independentemente da tecnologia aplicada até o encerramento da reavaliação ambiental destes compostos. Essa proibição foi revogada apenas para as culturas de algodão e culturas de inverno no dia 4 de dezembro de 2013 na instrução normativa conjunta nº 30.

Atualmente, está em vigor a Instrução Normativa nº 1 de 31 de dezembro de 2014, que proíbe a utilização destes pesticidas em culturas de algodão até a reavaliação ambiental implementada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), nas seguintes situações:

- No período de floração;
- No horário de maior visitação das abelhas, das 10 às 15 horas;
- Em distância menor que 300 m da divisa com áreas de vegetação natural e culturas agrícolas em fase de florescimento.

Quanto à presença deste inseticida como resíduo em águas, não existe legislação no Brasil que determine este valor para nenhum destes

pesticidas. Devido a esse fato, serão utilizados os valores determinados pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA - *Environmental Protection Agency*) como um referencial para este estudo. O limite residual para exposições crônicas em água superficiais é de $2,14 \mu\text{g L}^{-1}$ para a Clotianidina [EPA, 2003], $15,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Imidacloprido [EPA, 2001] e $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Tiametoxam [EPA, 2000].

4. METODOS CROMATOGRÁFICOS E PREPARAÇÃO DE AMOSTRA

Para a realização deste estudo foi utilizado a extração em fase sólida em amostras de água superficial. As técnicas analíticas: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas em tandem (HPLC - MS/MS), Cromatografia a gás acoplada ao detector de captura de elétrons (GC/ECD) e a Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC/MS) foram empregadas para a separação e identificação de Neonicotinóides.

O GC/MS foi utilizado para a detecção dos inseticidas em estudo devido a sua capacidade de realizar a varredura de uma grande quantidade de compostos ao mesmo tempo. A utilização do GC/ECD ocorre devido à alta sensibilidade desta técnica a compostos clorados como os Neonicotinóides. A técnica de HPLC - MS/MS foi utilizada devido a sua sensibilidade da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ para compostos orgânicos.

4.1 Extração em fase sólida

Atualmente uma das técnicas mais aplicadas no pré-tratamento de amostras é a extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE). Esta técnica consiste em uma separação líquida – sólida baseada em mecanismos de separação da cromatografia líquida. A solução contendo o analito de interesse é colocada na parte superior do cartucho sendo aspirada à vácuo ou pressionada levemente para ingresso do analito no interior do cartucho. Após toda a solução ser drenada, o analito retido é eluído com um pequeno volume de solvente e coletado para posterior análise. As principais funções de um SPE são: concentração ou enriquecimento do analito, isolamento do analito, isolamento da matriz e estocagem de amostra [Lanças, 2009]. A FIG. 4 apresenta o esquema de uma extração em fase sólida que se divide em três etapas principais: condicionamento, extração e eluição dos analitos.

FIGURA 4 - Esquema de extração por fase sólida (SPE).

4.2 Extração líquido - líquido

A extração líquido - líquido (*Liquid – Liquid Extraction – LLE*) é uma técnica de separação de duas fases que não se misturam quando empregadas em um mesmo recipiente. Nesta extração, um líquido contendo o soluto de interesse é agitado com um segundo líquido imiscível, em um recipiente fechado, até que o equilíbrio seja estabelecido. A mistura é colocada em repouso e então as duas fases se separam mecanicamente. A fase em que o analito estava inicialmente é descartada e a fase com o analito de interesse será encaminhada para uma posterior análise [Lanças, 2009].

Entre as principais vantagens da técnica se encontram a simplicidade, pequeno investimento na aquisição de dispositivos de vidro necessários para a extração, boa recuperação do analito de interesse e pequena especialização do operador. Entre as desvantagens encontram-se o grande volume de solventes tóxicos utilizado e a exposição do operador aos seus vapores, o tempo de extração geralmente é longo, dificuldade em uniformizar a técnica e baixa seletividade [Lanças, 2009].

A extração líquido – líquido tem sido amplamente utilizada para a extração de pesticidas em amostras líquidas e em purificação de extratos. A eficiência no processo de extração depende da afinidade do analito com o solvente, proporção de volumes de cada fase e número de extrações.

Também é possível aumentar a eficiência das extrações utilizando misturas de solventes, alterando o pH, ou realizando adição de sais (efeito *salting out*) [Tadeo, 2008]. Um esquema do aparato utilizado para extrações líquido - líquido esta apresentado na FIG. 5.

FIGURA 5 - Esquema de extração líquido- líquido.

4.3 Técnicas cromatográficas

A cromatografia é uma técnica de separação em que os componentes de uma mistura são separados entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial chamada de fase estacionária, e um fluido que interage com essa fase fixa, chamado de fase móvel [Lanças, 2009].

Existem diversos tipos de cromatografia, porem as mais utilizadas são a cromatografia líquida (*Liquid Chromatography* – LC) e a cromatografia a gás (*Gas Chromatography* – GC) e a principal diferença entre as duas técnicas se encontra no estado físico da fase móvel. A cromatografia líquida utiliza solventes para interagir com a fase estacionária, enquanto que a cromatografia a gás utiliza um gás inerte para auxiliar a interação entre os analitos e fase estacionária. Independente da fase móvel, as principais partes de um cromatógrafo são: o injetor, coluna e detector.

4.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas em tandem

O fundamento de uma separação por cromatografia líquida é a interação dos compostos de uma mistura com a fase estacionária (sólido) e a fase móvel (líquido). O termo *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ou sua versão em português, chamada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), é uma expressão criada para enfatizar a importância das altas pressões na separação dos compostos [Lanças, 2009]. Na FIG. 6 está apresentado o esquema de um cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas.

FIGURA 6 - Esquema do cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas em tandem

A introdução da amostra é realizada pelo injetor e direcionada para a coluna cromatográfica contendo a fase estacionária. A separação dos compostos depende da sua interação com a coluna e com os solventes usados na fase móvel. Após a separação, os componentes da amostra passam pelo detector, que identifica a presença dos compostos e gera um sinal. O conjunto destes sinais é representado por um cromatograma.

O espectrômetro de massas está entre os detectores mais utilizados em conjunto com a cromatografia líquida. Esta técnica foi acoplada à cromatografia a gás com grande eficiência, porém, sua união com a cromatografia líquida precisou passar por um longo processo de desenvolvimento devido à dificuldade de acoplar a cromatografia líquida, que é uma técnica que opera em

altas pressões, com a espectrometria de massas, realizada em pressões negativas ou vácuo [Lanças, 2009]. As principais partes de um espectrômetro de massas são a fonte de íons, o analisador de massas e o detector. O esquema de um espectrômetro de massas tandem está apresentado na FIG. 7.

FIGURA 7 - Esquema do espectrômetro de massas em tandem. Q1 e Q3 são quadrupolos analisadores e Q2 é a célula de colisão [Tsipi et al., 2015].

A ionização a pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization* - API) é uma técnica muito utilizada entre as fontes de ionização para a cromatografia líquida. Neste caso, a ionização dos compostos é realizada à pressão atmosférica no exterior da câmara de vácuo, e estes íons são transferidos diretamente para o analisador de massas. Os principais métodos de API são a ionização por *electrospray* (ESI), a ionização química por pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* - APCI) e a fotoionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Photolionization* - APPI) [Greaves;Roboz, 2014]. A ionização do analitos por meio do método de API é obtida pela protonação do analito. Esse fenômeno é constituído de um íon protonado $(M+H)^+$.

A ionização por *electrospray* (ESI) consiste em aplicar uma voltagem elevada no solvente condutor em que o analito é dissolvido e pulverizar esta solução através de uma agulha oca. Essas gotículas nebulizadas são evaporadas em pressão atmosférica e em seguida seguem por uma série de câmaras que ligam a fonte ao analisador de massas que está sob vácuo. A densidade de carga dessas gotículas aumenta conforme a gota evapora, e

quando as gotas evaporam por completo, os íons são libertados para a fase gasosa [Greaves; Roboz, 2014].

O termo “tandem” refere-se a instrumentos que têm o mesmo analisador acoplado em sequência. O triplo quadrupolo consiste de dois analisadores quadrupolos (Q1 e Q3) e uma célula de colisão também chamada de Q2. A célula central (Q2) é o local aonde ocorre a dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation* - CID) do íon precursor (analito). Os íons produtos gerados por esta dissociação são analisados no terceiro quadrupolo (Q3) que pode varrer espectros completos ou registros de intensidade de um íon específico [Graves;Roboz, 2014]. Os principais modos de varredura para o triplo quadrupolo são o íon produto, íon precursor, perda neutra e o monitoramento de reações múltiplas (MRM) [Tsipi et al., 2015].

O modo de varredura (*Scan*) realiza uma varredura de todos os íons obtidos pela ionização em *eletrospray*. Este modo de análise não utiliza a da célula de colisão (Q2), por tanto pode ocorrer tanto em Q1 quanto em Q3 [Tsipi et al., 2015].

O modo de varredura do Íon Produto (*Product Ion Scan*) seleciona um íon de interesse no Q1, para que ele seja fragmentado no Q2 e todos os seus íons produtos sejam escaneados em Q3, deste modo é possível determinar os fragmentos de maior intensidade para o composto selecionado [Tsipi et al., 2015].

O modo de varredura do Íon Precursor (*Precursor Ion Scan*) seleciona um íon produto em Q3 e realiza uma varredura de seu íon precursor em Q1. Esse modo de análise permite uma confirmação de que o íon produto escolhido é realmente gerado pelo composto de interesse [Tsipi et al., 2015].

O modo de varredura de Perda Neutra (*Neutral Loss Scan*) mantém Q1 e Q3 fazendo uma varredura simultânea, porém com um deslocamento de massa constante. Isso permite o reconhecimento de todos os íons que perderam um fragmento neutro durante a sua passagem por Q2 [Tsipi et al., 2015].

O modo de análise de Monitoramento de Reações Múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring* - MRM) é o modo de análise mais utilizado para a uma

análise com muitos compostos. O MRM pode selecionar o íon precursor e os íons produtos de vários compostos gerando um espectro para cada composto durante uma única análise [Tsipi et al., 2015].

4.3.2 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia a gás é uma técnica baseada na distribuição dos componentes de uma amostra entre uma fase estacionária (sólida) e uma fase móvel (gás). Esta técnica é utilizada para a análise de gases ou substâncias volatilizáveis [Collins et al., 1995].

A introdução da amostra é realizada por meio de um sistema de injeção em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de altas temperaturas no injetor e na coluna torna possível a vaporização dos componentes que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidos e chegam à saída da coluna em tempos diferentes [Collins et al., 1995]. A seguir, a amostra passa por um detector que identifica a presença do composto e gera o cromatograma.

A espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo (*Gas Chromatography / Mass Spectrometry – GC/MS*) é amplamente usada para a quantificação e determinação de compostos orgânicos. Essa técnica baseia-se na ionização das moléculas do analito para produzir íons, estes íons são separados pelo analisador de quadrupolo segundo a razão massa/carga (m/z). Em seguida estes íons são selecionados e atingem o coletor gerando um sinal [Bustillos et al., 2003]. O modo de ionização mais utilizado, em conjunto com a cromatografia a gás, é a ionização por impacto de elétrons. Neste caso, as moléculas analisadas são bombardeadas por elétrons de alta energia (70 eV) tornando-se instáveis e liberando o excesso de energia por meio de sua fragmentação. Essa fragmentação produz um conjunto de íons característicos para cada composto [Tsipi et al., 2015].

O analisador de massas quadrupolar é o mais utilizado para a espectrometria de massas acoplado a cromatografia a gás. Este analisador consiste de quatro cilindros metálicos paralelos no qual se aplica uma corrente elétrica contínua (DC) e uma corrente alternada (AC) com potência de rádio

frequência (RF). A trajetória destes íons dentro do quadrupolo depende do campo elétrico produzido, fazendo com que apenas alguns íons tenham uma trajetória estável e cheguem ao detector [Bustillos et al., 2003]. Um esquema de um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas pode ser visto na FIG.8.

FIGURA 8 - Esquema do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas

4.3.3 Cromatógrafo a gás acoplado ao detector de captura de elétrons

Outro equipamento que foi utilizado na identificação de Neonicotinóides é o cromatógrafo a gás acoplado ao detector de captura de elétrons (*Gas Chromatography/ Eletron Capture Detector – ECD*). A introdução da amostra e a retenção dos componentes são realizadas da mesma maneira que o GC/MS, a diferença ocorre na detecção dos compostos que é realizada pelo detector de captura de elétrons.

O ECD é um dispositivo de detecção de compostos que utiliza elétrons gerados por uma fonte radioativa, em geral níquel-63, para liberar elétrons que se aderem ao composto e produz uma corrente que é registrada pelo detector [Collins et al., 1995]. Este detector é sensível a moléculas halogenadas (moléculas com flúor, cloro, bromo ou iodo), carbonilas conjugadas, nitrocompostos e organometálicos. O esquema do detector ECD é apresentado na FIG. 9.

FIGURA 9 - Esquema do cromatógrafo a gás acoplado ao detector de captura de elétrons

5. VALIDAÇÃO

Neste capítulo são descritos alguns dos documentos que podem ser utilizados para a validação de métodos analíticos e os parâmetros que devem ser considerados para isso.

A validação é uma verificação na qual os requisitos especificados são adequados para um uso pretendido [VIM, 2012].

5.1 Documentos utilizados para a validação

Existem diversos documentos que podem ser utilizados para avaliar a validação de um método. Os documentos discutidos neste trabalho foram o DOQ CGCRE 008 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e a decisão de comissão 2002/657/CE da União Europeia.

O DOQ CGCRE 008 disponibilizado pelo INMETRO tem como objetivo auxiliar os laboratórios na tarefa de demonstrar que um método analítico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

A decisão da comissão 2002/657/CE delimita normas para métodos analíticos utilizados na análise de amostras oficiais e especifica critérios comuns para a interpretação dos resultados analíticos do laboratório oficiais de controle relativamente às referidas amostras.

5.2 Figuras de mérito

Essa validação pode ser determinada através de uma determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito. Esses parâmetros dependem do método aplicado, de seu propósito e do órgão de fiscalização utilizado [Valderrama, 2009]. Apesar do documento DOQ CGCRE 008 ser o mais utilizado para a validação de métodos analíticos no Brasil, os procedimentos utilizados neste trabalho serão as figuras de mérito determinadas pela Decisão da Comissão 2002/657/CE da União Européia. Os parâmetros avaliados foram: curva de calibração, especificidade, limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$), veracidade, repetitividade, reprodutibilidade, recuperação e

robustez. As semelhanças e diferenças entre as figuras de mérito utilizadas na decisão de comissão 2002/657/CE e no documento DOQ CGCRE 008 do INMETRO estão apresentados na TAB.1.

TABELA 1 - Figuras de mérito para DOQ CGCRE 008 e a 2002/657/CE.

2002/657/CE	DOQ CGCRE 008
Curva de calibração	Linearidade
Especificidade	Seletividade
Limite de decisão	Limite de detecção
Capacidade de detecção	Limite de Quantificação
Veracidade	Exatidão
Repetibilidade/ Reprodutividade	Precisão
Recuperação	Recuperação
Robustez	Robustez

5.2.1 Curva de calibração

A curva de calibração é a relação matemática entre o sinal do equipamento e uma concentração de analito conhecida [Ribani et al., 2004]. De acordo com a decisão da comissão 2002/657/CE, a construção desta curva deve-se utilizar pelo menos cinco níveis de concentração (incluindo o zero), indicar a equação da curva e o grau de ajuste dos dados e mencionar os intervalos de aceitabilidade e de trabalho para cada curva de calibração.

5.2.2 Especificidade

A especificidade é a capacidade de um método de distinguir o analito de outras substâncias. Isso depende da técnica de medição descrita e pode variar de acordo com o tipo de composto ou matriz. Para determinar a discriminação entre o analito e as substâncias aparentadas (isômeros, metabolitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz e etc.) deve se selecionar as substâncias potencialmente interferentes e amostras em branco relevantes para detectar a presença de possíveis interferentes e estimar o efeito das interferências.

Além disso, para a confirmação das substancias analisadas via HPLC – MS/MS são necessários quatro pontos de identificação, o que significa um íon precursor e dois íons produto para cada analito.

5.2.3 Limite de decisão ($CC\alpha$)

O limite de decisão ($CC\alpha$) é o limite pelo qual se pode concluir que uma amostra não é conforme com uma probabilidade de erro de α . Este limite deve ser estabelecido analisando pelo menos 20 materiais em branco por matriz fortificada com as substancias a serem analisadas no limite permitido. O limite de decisão ($\alpha = 5\%$) é igual à concentração correspondente ao limite permitido mais 1,64 vezes o desvio padrão.

5.2.4 Capacidade de detecção ($CC\beta$)

A capacidade de detecção ($CC\beta$) é o teor mais baixo que uma substância pode ser detectada, identificada e / ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade de erro de β . Caso não se encontre um limite permitido para o analito a ser identificado, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa que o método pode detectar com uma certeza estatística de $1-\beta$.

Para determinar a capacidade de detecção é necessário analisar 20 materiais em branco por matriz fortificada com as substancias a serem analisadas no limite de decisão. A capacidade de detecção ($\beta = 5\%$) é igual ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão.

5.2.5 Veracidade

A veracidade é o grau de concordância entre o valor médio de uma longa serie de resultados de ensaios e um valor de referencia aceito. Para determinar a veracidade é necessário analisar seis amostras idênticas de um material de referencia certificado (MRC) e determinar a concentração de analito presente em cada amostra. A veracidade é calculada dividindo a concentração média detectada pelo valor certificado e multiplicando por 100, para apresentar um resultado em forma de percentagem. Este cálculo está apresentado na Eq. 1.

$$Veracidade = \left(\frac{Concentração\ média\ detectada}{Valor\ encontrado\ no\ MRC} \right) \times 100 \quad (1)$$

De acordo com a decisão da comissão 2002/657/CE a veracidade mínima aceita para os métodos quantitativos varia conforme a concentração do analito estudado. Para concentrações inferiores a $1\mu\text{g kg}^{-1}$ o intervalo aceito é de -50% até +20%, para concentrações entre $1\mu\text{g kg}^{-1}$ e $10\mu\text{g kg}^{-1}$ o intervalo aceito varia entre -30% até +10% e para concentrações superiores a $10\mu\text{g kg}^{-1}$ a veracidade pode variar entre -20% até +10%.

5.2.6 Repetibilidade

A repetibilidade é a máxima diferença aceitável entre dois resultados independentes, do mesmo ensaio e no mesmo laboratório, sob as mesmas condições [Leite,2008]. Para determinar a repetibilidade é necessário preparar um conjunto de amostras com matrizes idênticas, fortificadas com o analito para obter concentrações equivalentes a 1, 1,5 e 2 vezes o limite permitido. Cada nível de concentração deve ser analisado seis vezes e estas análises devem ser repetidas outras duas vezes. Estes resultados serão utilizados para calcular a concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) das amostras fortificadas.

A determinação da repetibilidade deve ser considerada a partir do coeficiente de variação calculado para cada um dos níveis de concentração estudados.

5.2.7 Reprodutividade

A reprodutividade é a máxima diferença aceitável entre dois resultados obtidos em laboratórios diferentes, para um mesmo processo e condições específicas [Leite, 2008]. Para determinar a reprodutividade é necessário preparar um conjunto de amostras com matrizes idênticas, fortificadas com o analito para obter concentrações equivalentes a 1; 1,5 e 2 vezes o limite permitido. Cada nível de concentração deve ser analisado seis vezes e estas análises devem ser repetidas outras duas vezes com operadores diferentes e condições ambientais diferentes. Estes resultados serão utilizados para calcular a

concentração média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) das amostras fortificadas.

A determinação da reprodutividade deve ser considerada a partir do coeficiente de variação calculado para cada um dos níveis de concentração estudados. De acordo com a decisão da comissão 2002/657/CE a reprodutibilidade aceita para os métodos quantitativos varia conforme a concentração do analito estudado. Para concentrações superiores a $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ o coeficiente de variação aceito não deve ultrapassar os 16%, para concentrações entre $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ coeficiente de variação aceito não deve ultrapassar os 23%, e para concentrações inferiores a $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ a equação utilizada para o calculo do coeficiente de variação resulta em valores inaceitavelmente elevados, portanto esses valores devem ser os menores possíveis.

5.2.8 Recuperação

De acordo com a decisão da comissão 2002/657/CE, a recuperação é a porcentagem da concentração real de uma substância recuperada durante o processo analítico. Ela é determinada quando não é possível encontrar um material de referencia certificado para o analito em estudo e é realizada a partir da preparação de dezoito alíquotas de um material em branco, fortificadas com o analito para obter concentrações equivalentes a 1, 1,5 e 2 vezes o limite permitido. Cada nível de concentração deve ser analisado seis vezes e ter a sua concentração determinada. A recuperação deve ser calculada a partir da equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{Teor medido}}{\text{Nível de fortificação}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Os resultados aceitos para a recuperação são os mesmo intervalos descritos para a veracidade. Para concentrações inferiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ o intervalo aceito é de -50% até +20%, para concentrações entre $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ o intervalo aceito varia entre -30% ate +10% e para concentrações superiores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ a veracidade pode variar entre -20% até +10%.

5.2.9 Robustez

Para a decisão da comissão 2002/657/CE, a robustez é a susceptibilidade de um método a alterações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como uma lista dos materiais das amostras, das substâncias a analisar, das condições de armazenamento, das condições ambientais e/ou de preparação da amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas.

Para a determinação da robustez é necessário identificar os possíveis fatores que podem influenciar os resultados de uma análise e testar o método analítico em diferentes condições experimentais que incluem, por exemplo, o analista, a fonte, idade dos reagentes, solvente, padrões, a taxa de aquecimento, a temperatura, o pH, e extratos de amostra.

O teste de Youden foi o escolhido para realizar uma avaliação combinada destes fatores. Este teste seleciona sete parâmetros agrupados em oito experimentos diferentes onde as letras maiúsculas indicam os valores nominais e as letras minúsculas, suas variações. A TAB. 2 descreve o planeamento fatorial utilizado para determinar a robustez.

TABELA 2 - Planejamento fatorial utilizado pelo teste de Youden para a determinação da robustez

Combinação ensaiada								
Valor da variável	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	B	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	D	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	E	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Para determinar a influência da variação de cada parâmetro no resultado final, é necessário comparar a média dos quatro valores

correspondentes às letras maiúsculas com a média dos quatro valores correspondentes às letras minúsculas usando a equação 3 [INMETRO, 2003].

$$Efeito = \frac{s+u+w+y}{4} - \frac{t+v+x+z}{4} \quad (3)$$

Após o cálculo do efeito (E_i) a estimativa inicial do erro é obtida pela equação 4.

$$S_0 = 1,5 \times média |E_i| \quad (4)$$

A estimativa final do erro padrão em um efeito (S_1) é obtida pela equação 5:

$$S_1 = \sqrt{m^{-1} \sum E_i^2} \quad (5)$$

onde m é o número de efeitos absolutos menores que $2,5 S_0$. Este valor de S_1 é usado para calcular a margem de erro (ME) por meio da equação 6:

$$ME = t_{(1-\frac{\alpha}{2}; df)} \times S_1 \quad (6)$$

A ME é estatisticamente um critério de teste de significância quando somente um efeito tem de ser testado. Quando efeitos múltiplos são testados a probabilidade de efeitos não significantes tem de ser ajustado e um segundo limite definido, a margem de erro simultâneo (SME) é dada pela equação 7:

$$SME = t_{(1-\alpha*2; df)} \times S_1 \quad (7)$$

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item estão descritos os materiais e equipamentos utilizados neste estudo, a estratégia para a obtenção das amostras de água superficial, as etapas para a preparação das amostras e o procedimento para a validação das metodologias.

6.1 Materiais e reagentes

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

- a. Vidrarias de laboratório: béqueres, pipeta de Pasteur, balões volumétricos, funis de separação, provetas;
- b. Filtro com membrana em ésteres de celulose 0,45 micra da marca Millipore;
- c. Cartuchos de SPE de 3 mL preenchidos com 500 mg de pirrolidona e benzila (Strata X) da marca Phenomenex;
- d. Cartuchos de SPE de 6 mL preenchidos com 500 mg de octadecil (C18) da marca Applied Separations.

Os solventes utilizados neste estudo foram: acetonitrila – ACN (Sigma Aldrich), metanol – MeOH (J.T. Baker), diclorometano – DCM (OmniSolv) e acetato de etila – EtOAc (Vetec), todos com grau cromatográfico. O equipamento Elix 3 da Millipore foi utilizado para a purificação de água por osmose reversa, e a água ultrapura de baixa condutância (tipo 1) foi obtida através do equipamento Ultra Purificador da Gehara localizado no laboratório do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) e do Milli Q Integral 3 da Millipore localizado no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada (CEMSA).

Os padrões analíticos de Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam usados neste estudo foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich, com pureza de 99,9%, 99,9% e 99,6%, respectivamente. Uma solução de ácido nítrico PA e ácido sulfúrico PA ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) de procedência Merck, foi utilizada para a descontaminação das vidrarias e o ácido fórmico de procedência Sigma Aldrich foi adicionado nas fases móveis para auxiliar a ionização dos compostos analisados via HPLC – MS/MS. Para a alcalinização das amostras de água foi utilizada uma

solução de hidróxido de sódio (NaOH) com pH 12,80. E para a secagem dos analitos extraídos foi utilizado gás nitrogênio comprimido da marca White Martins.

6.2 Equipamentos

Além dos reagentes e materiais já mencionados, também foram utilizados os seguintes equipamentos:

- a. Cromatógrafo líquido de alta eficiência serie 1200 da marca Agilent acoplado ao espectrômetro de massas tandem Q TRAP 3200 da marca Sciex (HPLC-MS/MS) apresentado na FIG. 10;

FIGURA 10 - Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro massas 3200 QTRAP (HPLC – MS/MS) localizado no CEMSA.

- b. Cromatógrafo líquido de alta eficiência serie 1100 da marca Agilent acoplado ao espectrômetro de massas tandem API 2000 da marca Sciex (HPLC-MS/MS) apresentado na FIG. 11;

FIGURA 11 - Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro massas tandem (HPLC-MS/MS) localizado no CEMSA.

c. Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas modelo GC/MS-QP 2010 da marca Shimadzu com injetor automático AOC – 20I; (FIG. 12)

FIGURA 12 - Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC/MS) com injetor automático localizado no CQMA.

d. Cromatógrafo a gás da marca Shimadzu modelo 17 A, acoplado ao detector de captura de elétrons (GC/ECD) apresentado na FIG. 13;

FIGURA 13 - Cromatógrafo a gás acoplado ao detector de captura de elétrons (GC/ECD) localizado no CQMA.

- e. Espectrômetro de Emissão Ótica com Plasma (ICP-OES) modelo Spectro Arcos da marca Spectro;
- f. Espectrômetro de absorção atômica (AAS) modelo AAnalyst 800 da marca Perkin Elmer;
- g. Balança analítica da marca Shimadzu modelo AX200;
- h. Agitador magnético da marca Quimis;
- i. pHmetro da marca Micronal, modelo B474;
- j. Cuba para SPE modelo Visiprep da marca Supelco;
- k. Compressor usado na filtração a vácuo e na extração de fase sólida modelo 089 cal da marca FANEM;
- l. Equipamento de purificação de água por osmose reversa modelo ELIX 3 da marca Millipore;
- m. Equipamento de purificação de água ultrapura da marca Gehara;
- n. Equipamento de purificação de água Milli Q Integral 3 da marca Millipore.

6.3 Amostragem

As amostras utilizadas para este estudo foram águas superficiais coletadas em um lago no município de Piratininga no estado de São Paulo. Este lago está localizado no sistema de posicionamento global (GPS) a 22°45' 51.38" ao sul e 49°13' 62.50" a oeste. Essas coletas foram realizadas no verão de 2016

durante um período de grande volume de chuvas e no inverno de 2016 durante um período de secas. A região da coleta está apresentada na FIG. 14.

FIGURA 14 - Região da coleta de amostras de águas superficiais no estado de São Paulo Fonte: Google Maps

A escolha deste local ocorre devido a sua proximidade com plantações de cana de açúcar, laranja, café e melancia, onde existe a possibilidade da utilização dos pesticidas estudados. O lago onde as amostras foram coletadas está apresentado na FIG. 15.

FIGURA 15 - Lago utilizado nas coletas de água superficiais. Fonte: Google Maps

Uma fotografia das margens do lago no município de Piratininga onde as águas superficiais foram coletadas esta apresentada na FIG. 16.

FIGURA 16 - Margens do lago onde foi realizada a coleta de águas superficiais.

O método de coleta das águas seguiu as recomendações do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras. As amostras de água superficial foram coletadas em dois frascos de vidro âmbar de 4 L (FIG. 17) e encaminhadas ao laboratório em sacolas térmicas com gelo para serem armazenadas sob refrigeração em torno de 4°C até a realização das análises (CETESB, 2011).

FIGURA 17 - Vidros âmbar com as amostras de água coletadas

Após a coleta, essas amostras passaram por um processo de filtração para eliminar sólidos em suspensão. A filtração ocorreu utilizando um filtro membrana em ésteres de celulose com 0,45 μm em um sistema de filtração a vácuo. Em seguida, as amostras voltam para a refrigeração até o momento da extração. O sistema de filtração das amostras esta apresentado na FIG. 18.

FIGURA 18 - Sistema de filtração a vácuo

6.4 Metodologia analítica

A metodologia proposta para a caracterização química dos neonicotinóides consiste na concentração dos analitos nas amostras de água por meio de uma extração em fase sólida (SPE) ou uma extração líquido – líquido (LLE) seguida da análise por HPLC - MS/MS, GC/ECD e GC/MS. As amostras de água também passaram por uma análise de elementos químicos.

6.4.1 Análise de metais em águas superficiais

Inicialmente, as amostras de água passaram por uma série de análises para determinação de elementos inorgânicos com o objetivo de verificar se existe algum tipo de contaminação por metais nas amostras de água coletadas. A determinação de As, Se, Cd e Pb foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com atomização por forno de grafite (*Graphite furnace atomic absorption spectrometry* – GF - AAS), a determinação de

Hg foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica com geração de vapor frio (*Cold vapor atomic absorption spectrometry* – CV - AAS) e os outros elementos foram analisados por espectrometria de emissão ótica acoplada ao plasma induzido (*Inductively coupled plasma with optical emission spectrometry* – ICP - OES). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análises Química e Ambiental (LAQA) localizado no CQMA/IPEN.

6.4.2 Extração em fase sólida (SPE)

A otimização da técnica de extração em fase sólida (SPE) foi realizada para determinar a melhor metodologia para a concentração das amostras analisadas neste estudo.

6.4.2.1 Definição de cartuchos de extração

Para iniciar os estudos de extração em fase sólida, foram realizados testes que compararam a extração de um mesmo analito realizada com cartuchos com empacotamentos diferentes: o C18, um cartucho preenchido com octadecil, e o Strata X, que é preenchido com pirrolidona e benzila. Para realizar esta extração é necessária a utilização de uma cuba para o encaixe dos cartuchos e uma bomba compressora para produzir o vácuo necessário para a percolação da água pelo cartucho.

As primeiras extrações usam como base o artigo de Dujakovic et al. (2010) que descreve os testes realizados para determinar as melhores condições de uma extração em fase sólida para um grupo de inseticidas e herbicidas variando os fatores: pH, mistura de solventes e volume de amostra eluído no cartucho. As melhores condições obtidas nestes experimentos foram: condicionamento dos cartuchos usando 5 mL de uma mistura de metanol-diclorometano (1:1) e 10 mL de água deionizada. Em seguida foram percolados 250 mL da amostra de água com a posterior secagem à vácuo do cartucho por 10 min. Após esse procedimento, os analitos foram eluídos com 10 mL de metanol - diclorometano (1:1). O sistema utilizado para essa extração está apresentado na FIG. 19.

FIGURA 19 - Sistema de extração em fase sólida.

Após a extração, as amostras foram secas em um fluxo suave de nitrogênio até a total evaporação do solvente. A secagem dos analitos é feita com um sistema adaptado para o encaixe dos vials de modo que o analito possa ser seco no mesmo recipiente onde será feita a retomada de solvente, evitando perdas. Por fim, o analito foi retomado com 250 μL de uma mistura acetonitrila - água (1:4) e injetado no HPLC-MS/MS. O sistema utilizado para a secagem das amostras esta apresentado na FIG. 20.

FIGURA 20 - Sistema de secagem das amostras.

6.4.2.2 Definição da metodologia de extração

Após a escolha do cartucho, foram testadas quatro diferentes metodologias a fim de determinar o procedimento de extração mais adequado para a análise de neonicotinóides em amostras de água superficial. Para realizar este teste foram preparados quatro balões volumétricos de 250 mL de água ultrapura de baixa condutância fortificada com uma solução dos três padrões. A TAB. 3 resume as metodologias empregadas e suas respectivas referências:

TABELA 3 - Testes de extração realizados para definir a metodologia de extração em fase sólida com as respectivas referências.

Teste	Condicionamento	Eluição	Referência
1	5 mL de MeOH + 5 mL de água ultrapura	3 mL de ACN/MeOH (2:1)	Sánchez – Bayo et al., 2014
2	3 mL de MeOH + 3 mL de água ultrapura	3 mL de AcOEt/MeOH (1:1)	Seccia et al, 2005
3	5 mL de MeOH/DCM (1:1) + 10 mL de água ultrapura	10 mL de MeOH/DCM (1:1)	Dujakovic et al, 2010
4	1 mL de MeOH + 1 mL de água ultrapura (três vezes)	2,5 mL de MeOH	Ettiene et al, 2012

Nas quatro metodologias testadas, as amostras foram secas com um fluxo suave de nitrogênio para evaporar o solvente usado em cada extração. Os analitos foram retomados com 250 µL de acetonitrila - água (1:4) e em seguida foram analisados via HPLC - MS/MS.

6.4.2.3 Definição da faixa de pH da amostra

Também foram realizados testes em amostras com diferentes pHs para determinar se haveria melhora nos resultados das extrações. Foram realizados quatro testes com a metodologia de extração definida, o primeiro deles manteve o pH inicial da amostra de 6,40 e os demais foram estabelecidos segundo as seguintes faixas de pH: de 7,90 a 8,10; de 8,90 a 9,10 e de 9,90 a

10,10. A alcalinização destas amostras foi realizada com uma solução de NaOH em pH 12,80 e para garantir a estabilidade destas medidas, as faixas de pH foram medidas com um pHmetro e um agitador magnético na velocidade de 200 rpm. Estas amostras foram extraídas normalmente, secas no fluxo de nitrogênio, retomadas com uma mistura de acetonitrila - água (1:4) e injetadas no HPLC-MS/MS. A FIG. 21 apresenta os equipamentos utilizados para a alteração do pH das amostras.

FIGURA 21 - pHmetro e agitador magnético utilizados para os testes de alteração do pH das amostras.

6.4.3 Extração Líquido - Líquido (LLE)

Além dos testes de extração em fase sólida, houve o interesse de testar a extração líquido - líquido devido a sua praticidade agregada a uma boa recuperação dos analitos. Para essa extração foram adicionados 10 mL de amostra e 10 mL de acetato de etila em um funil de separação com 60 mL de volume. Este funil foi agitado vigorosamente por dois minutos e o deixado em repouso por cinco minutos para que a fase orgânica e a fase aquosa se separem completamente. Por fim, a parte aquosa foi descartada e a parte orgânica passou por um funil com sulfato de sódio, um agente secante que absorve traços de água na fase orgânica, e foi armazenada em um tubo de ensaio. Este tubo foi levado para um concentrador de amostras onde foi completamente seco e retomado com 100 μ L de uma mistura acetonitrila - água (1:4) e injetado no HPLC-MS/MS. O sistema utilizado para a extração líquido - líquido esta apresentado na FIG. 22.

FIGURA 22 - Sistema para a extração líquido – líquido

6.4.4 Condições analíticas do HPLC- MS/MS

Após um estudo sobre a polaridade dos compostos em estudo, foi determinada a possibilidade de realizar a validação destes pesticidas via HPLC – MS/MS usando uma fonte de íons *eletrospray*. Para a preparação da metodologia, foi feita uma infusão direta com cada composto individualmente. A infusão direta é um método que injeta o composto de interesse diretamente no espectrômetro de massas para otimizar os parâmetros do analisador de massas utilizados nas análises. Para esta infusão, os compostos são injetados na fonte de íons *eletrospray* e caracterizados no triplo quadrupolo nos modos *Scan*, *Product Ion Scan*, *Precursor Ion Scan* e *Neutral Loss Scan*.

Após a realização destes modos de análise, foi possível determinar o íon precursor e os íons produtos para cada um dos Neonicotinóides em estudo. Estes íons foram utilizados para analisar os analitos desejados numa determinada matriz [Tsipi et al., 2015].

O modo de varredura utilizado neste estudo será o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Neste método, os quadrupolos Q1 e Q3 estão definidos com uma massa selecionada, permitindo a análise de dois íons produto para cada íon precursor [Tsipi et al., 2015].

Com a definição do modo de análise e dos íons analisados, foram realizados testes para determinar os parâmetros utilizados no analisador de massas. Para uma análise por MRM são avaliados os fatores: *Dwell time*, *Declustering potential* (DP), *Entrance potential* (EP), *Collision energy* (CE) e *Collision exit potential* (CXP).

- a. *Declustering potential* (potencial de orifício) é a melhor energia para quebrar o agregado entre o solvente e o analito.
- b. *Entrance potential* (potencial de entrada) é a melhor energia para entrar no Q1.
- c. *Collision energy* (energia de colisão) é a melhor energia para entrar no Q2.
- d. *Collision exit potential* (potencial de saída da célula de colisão) é a melhor energia para entrar no Q3.

A infusão direta foi realizada com uma solução com os três analitos em uma de concentração 5 mg L⁻¹. O tempo de permanência dos íons no analisador (*Dwell time*) é de 50 ms e os parâmetros definidos a partir das infusões diretas estão descritos na TAB. 4.

TABELA 4 - Resultados da otimização do modo MRM.

Analito	Transição (m/z)	Propósito	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Clotianidina	250,1 > 132,1	Quantificação	26	7,5	15	4
	250,1 > 169,2	Confirmação	26	7,5	19	4
Imidacloprido	256,1 > 209,1	Quantificação	34	6	19	4
	256,1 > 175,1	Confirmação	34	6	21	4
Tiametoxam	292,2 > 211,1	Quantificação	26	8	15	4
	292,2 > 181,2	Confirmação	26	8	25	4

Após definir as configurações dos quadrupolos, foi realizada uma otimização da fonte de íons por uma análise chamada FIA (*Flow injection Analysis*) que varia diversos parâmetros da fonte de íons para determinar as melhores condições para a ionização dos analitos de interesse. Esta análise foi realizada utilizando o Imidacloprido e os parâmetros alterados nesta análise estão apresentados na TAB. 5.

TABELA 5 – Parâmetros avaliados na análise por FIA.

Parâmetros	1	2	3	4
Curtain Gas (u. a.) *	15,0	20,0	25,0	30,0
Ion Source Gas 1 (u. a.)*	45,0	50,0	55,0	60,0
Ion Source Gas 2 (u. a.)*	50,0	55,0	60,0	65,0
Ion Spray Voltage (V)	5000	5200	5500	-
Temperatura (°C)	500	550	600	-

* (u.a.) = unidade arbitrária

6.4.4.1 Condições analíticas para o HPLC – MS/MS API 2000

Com a configuração do espectrômetro de massas definida, foram testadas várias colunas e solventes para determinar a melhor metodologia para a separação destes compostos por cromatografia líquida. A metodologia final utiliza uma coluna Luna 3u C18 (2) 100 A de 50 X 2 mm e 3 micron da marca Phenomenex. A fase móvel utilizada nestas análises foi uma eluição por gradiente onde o solvente A é uma solução de água ultrapura com a adição de 0,1% de ácido fórmico e o solvente B é uma solução de acetonitrila com a adição de 0,1% de ácido fórmico. A programação do gradiente de eluição e os fluxos utilizados na fase móvel deste método estão descritos na TAB. 6.

TABELA 6 - Programação do gradiente de eluição para as análises de água via HPLC – MS/MS utilizando o equipamento API 2000. A e B são solventes utilizados na eluição das amostras.

Instante	Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	A (%)	B (%)
0	3,00	300	100	0
1	0,80	300	100	0
2	0,81	400	5	95
3	5,00	400	5	95
4	5,01	400	100	0
5	6,00	400	100	0

6.4.4.2 Condições analíticas para o HPLC – MS/MS Q TRAP 3200

Devido a interação da fase móvel com a matriz em estudo, foi necessária a utilização de um equipamento mais sensível e a preparação de um novo método para a análise de Neonicotinóides. O cromatógrafo líquido de alta eficiência serie 1200 ao espectrômetro de massas tandem Q TRAP 3200 foi utilizado devido ao fato manter as mesmas configurações utilizadas nas análises anteriores, porem em um equipamento mais sensível. A nova metodologia manteve as mesmas configurações para a fonte de íons, analisador de massas e a mesma coluna utilizada nas análises anteriores. A fase móvel é uma eluição

por gradiente, onde o solvente A é uma solução de água ultrapura com a adição de 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de acetato de amônio e o solvente B é uma mistura metanol – água (4:1) com a adição de 0,1% de ácido fórmico e 0,5 mM de acetato de amônio. A programação do gradiente de eluição e os fluxos utilizados na fase móvel deste método estão descritos na TAB. 7.

TABELA 7 - Programação do gradiente de eluição para as análises de água via HPLC – MS/MS utilizando o equipamento QTRAP 3200. A e B são solventes utilizados na eluição das amostras.

Instante	Tempo (min)	Vazão (mL min⁻¹)	A (%)	B (%)
0	0,00	500	90	10
1	0,50	500	90	10
2	0,51	500	0	100
3	6,00	500	0	100
4	6,01	500	90	10
5	9,00	500	90	10

6.4.5 Condições analíticas para GC/MS

Inicialmente, as análises por GC/MS foram baseadas na dissertação de Oliveira (2011) que valida pesticidas organoclorados no solo de regiões industriais via cromatografia a gás. Para definir a metodologia foram analisados padrões de Imidacloprido e Clotianidina em uma concentração de 100 mg L⁻¹. As configurações para este equipamento estão descritas na TAB. 8 e na TAB. 9 onde se encontra a programação da coluna cromatográfica.

TABELA 8 - Configurações analíticas do GC/MS.

Coluna DB5	30m X 0,25 μ m
Gás de Arraste	Hélio
Pressão	12 psi
Fluxo	0,9 mL min ⁻¹
Modo de Injeção	"Splitless"
Volume de Injeção	1 μ L de 100 mg L ⁻¹
Modo de Varredura	50 até 300 m/z

TABELA 9 - Programação da temperatura da coluna do GC/MS

Rampa (°C min⁻¹)	Temperatura (° C)	Isoterma (min)
-	80	1
40	270	5
10	280	2

6.4.6 Condições analíticas para GC/ ECD

Outra técnica utilizada para a validação desta metodologia foi o GC/ECD. Para definir a metodologia foram utilizadas soluções individuais de cada composto com uma concentração de 10 mg L⁻¹ diluída em acetonitrila. As configurações para este equipamento estão descritas na TAB. 10 e na TAB. 11 onde se encontra a programação da coluna cromatográfica.

TABELA 10 - Configurações analíticas do GC/ECD

Coluna DB5	30m X 0,25µm
Gás de Arraste	Hélio
Pressão	100 kPa
Fluxo	0,9 mL min ⁻¹
Modo de Injeção	“Split” 1:10
Volume de Injeção	3 µL de 10mg L ⁻¹
Temperatura do Detector	280°C

TABELA 11 - Programação da temperatura da coluna do GC/ ECD

Rampa (°C min⁻¹)	Temperatura (° C)	Isoterma (min)
-	50	2
10	60	4
10	100	1
30	280	2

6.5 Ensaio de validação

Após a determinação de um método de preparo da amostra foi realizada a construção de uma curva analítica para a validação da Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam. As primeiras curvas de calibração foram realizadas para se adequar ao documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 redigido em 2003.

Devido a sua grande utilização e praticidade, a decisão de comissão 2002/657/CE da União Européia foi utilizada para validar a metodologia para a análise de Neonicotinóides em águas superficiais.

A decisão da comissão 2002/657/CE delimita normas para métodos analíticos utilizados na análise de amostras e especifica critérios comuns para a

interpretação dos resultados analíticos do laboratório de controle das amostras. Os parâmetros avaliados na decisão de comissão 2002/657/CE são: especificidade, veracidade, robustez, recuperação, reprodutividade, repetitividade, limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$).

Para a realização da validação nestes parâmetros será utilizada uma planilha chama *ResVal*. O *ResVal* é um software que utiliza uma planilha de dados utilizada para realizar a validação de um método segundo a resolução 2002/657/CE da União Européia. Esta planilha é dividida em quatro experimentos que determinam a maior parte dos parâmetros requeridos em uma validação.

6.6 Preparação das amostras segundo os experimentos do ResVal

Para a realização dos experimentos descritos pelo *ResVal*, é necessário determinar uma concentração limite permitida para cada analito. Estes experimentos são realizados com a preparação de seis amostras com volumes de 0,5; 1; 1,5; 2 e 5 vezes o limite permitido, repetidas em três dias diferentes para realizar uma comparação dos resultados de linearidade, recuperação, precisão, exatidão, repetitividade, reprodutividade e limite de decisão e capacidade de detecção. O ultimo experimento é realizado para determinar a interferência de matriz. A robustez não é um parâmetro determinado pelo *ResVal* e deve ser avaliada em um teste separadamente.

6.6.1 Limites de validação permitidos para cada analito

O limite residual estabelecido pelo EPA é de $2,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para a Clotianidina, $15,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Imidacloprido e $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Tiametoxam. Com um preparo de amostra que concentra essas amostras em 100 vezes, os limites que serão avaliados pelo equipamento são $210 \mu\text{g L}^{-1}$ para a Clotianidina, $1580 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Imidacloprido e $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Tiametoxam.

6.6.2 Curva de calibração

Para realizar a curva de calibração para todos os compostos, será avaliado o menor limite entre os três analitos ($0,6 \mu\text{g L}^{-1}$) e sua sensibilidade para o método proposto. Como o Tiametoxam é o composto mais sensível a este método, sua curva de calibração é mais baixa do que a dos outros compostos. A curva de calibração esta apresentada na TAB.12.

TABELA 12 - Curva de calibração para cada Neonicotinóide

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Clotianidina	0	20	40	80	160	320	640
Imidacloprido	0	20	40	80	160	320	640
Tiametoxam	0	15	30	60	120	240	480

6.6.3 Experimento 1

O primeiro experimento será utilizado para determinar o efeito de matriz para cada um dos analitos estudados. Para isso serão preparados os pontos da curva de calibração e os treze pontos de confirmação proporcionais ao limite de validação (LV) e apresentados na TAB.13. Esses pontos serão preparados com a adição destas concentrações após a extração da matriz em branco. Todos os pontos serão analisados via HPLC – MS/MS.

TABELA 13 - Amostras que serão preparadas para os experimentos do ResVal.

LV = $60 \mu\text{g L}^{-1}$	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Numero de preparos
0,5 LV	30	3
1,0 LV	60	3
1,5 LV	90	3
2,0 LV	120	2
5,0 LV	300	2

6.6.4 Experimento 2

Para o segundo experimento serão preparados mais treze pontos de confirmação de acordo com a TAB. 13. Esses pontos serão preparados com a adição das concentrações de interesse na matriz antes da extração das amostras. Para a determinação do experimento 2 foram feitas as análises da curva de calibração e os treze pontos de confirmação preparados.

6.6.5 Experimento 3

Para o terceiro experimento serão preparados os treze pontos de confirmação com a adição destas concentrações descritas na TAB. 13 em uma mistura de acetonitrila - água (1:4). Para a determinação do experimento 3 foram analisados a curva de calibração e os treze pontos de confirmação preparados com solvente.

6.6.6 Experimento 4

Para o quarto experimento foram preparadas seis extrações em branco utilizando as amostras de água coletadas. Três delas foram retomadas com solvente e consideradas como branco da amostra e outras três amostras foram retomadas uma solução de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ em solvente. Essas extrações serão analisadas 10 vezes (quadruplicata de um dos pontos e triplicata dos outros dois) via HPLC – MS/MS.

6.7 Determinação da Robustez

De acordo com a decisão da comissão 2002/657/CE a determinação da robustez deve ser realizada de acordo com o teste de Youden, que determina sete parâmetros que devem ser alterados em oito experimentos diferentes de acordo com a TAB. 1 descrita no capítulo 5. Os testes realizados serão baseados apenas em alterações do equipamento que estão descritas na TAB. 14.

TABELA 14 - Fatores selecionados para a determinação da robustez.

Fator	Nominal	Variação
Coluna	C18 Luna	C18 Agilent
Solvente	20% ACN	50% ACN
Vazão HPLC	500 µL/min	400 µL/min
Temperatura da coluna	35°C	30°C
Volume de injeção	5 µL	10 µL
Fase orgânica (H₂O/ MeOH)	90% - 10%	80% - 20%
Temperatura da fonte	600° C	550° C

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão descritos e discutidos os resultados obtidos nas análises dos metais em água, a extração de neonicotinóides por SPE e LLE e as análises via HPLC - MS/MS, GC/MS e GC/ECD.

7.1 Análise de metais em amostras de água

Para a determinação de metais em amostras de água, foram analisados 29 metais por três técnicas diferentes. A concentração de cada um dos metais encontrados esta apresentada na TAB. 15.

TABELA 15 - Resultados da análise de metais em amostras de água

Elemento	Técnica analítica	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CONAMA 430 / 357 (mg mL^{-1})
Al	ICP – OES	<0,010	0,1
As	GF – AAS	<0,006	0,5
Ba	ICP – OES	$0,163 \pm 0,001$	5
B	ICP – OES	<0,200	0,2
Cd	GF – AAS	<0,0015	0,5
Pb	GF – AAS	<0,004	1
Co	ICP – OES	$0,0108 \pm 0,0001$	15
Cu	ICP – OES	<0,020	1
Cr	ICP – OES	<0,040	1
Fe	ICP – OES	<0,050	15
Mn	ICP – OES	<0,020	1
Hg	CV – AAS	<0,001	0,01
Mo	ICP – OES	<0,020	1
Ni	ICP – OES	<0,010	0,025
Ag	ICP – OES	<0,020	0,1
Se	GF – AAS	<0,004	0,3
V	ICP – OES	<0,020	0,1
Zn	ICP – OES	<0,010	5,0
Be	ICP – OES	<0,020	0,04
Li	ICP – OES	<0,010	2,5
P	ICP – OES	$0,037 \pm 0,004$	0,1

Os dados obtidos pela análise em metais quando comparados com a resolução n° 357 e n° 430 do CONAMA comprovam que os valores descritos na TAB. 15 estão dentro do permitido pela legislação. Isso demonstra que as águas coletadas não têm nenhum tipo de contaminação por metal.

7.2 Extração em fase sólida

Neste tópico estão descritos os resultados dos testes de cartucho, de metodologias e faixas de pH.

7.2.1 Escolha do cartucho

Os cromatogramas de uma mistura dos três Neonicotinóides com concentrações de $700 \mu\text{g L}^{-1}$ e as análises de recuperação utilizando o cartucho C18 e Strata X estão representadas na FIG. 23. A partir da figura é possível constatar que nenhuma das duas extrações obteve uma recuperação que pudesse ser comparada com o cromatograma do padrão e isso ocorre devido ao fato de essas análises ainda não terem sido otimizadas. Porém, a extração realizada pelo Strata X gerou um cromatograma com sinal em torno de 1080 mA, e a extração pelo cartucho C18 gerou um sinal de aproximadamente 470 mA. Devido ao fato do Strata X obter um sinal mais intenso quando comparado ao obtido a partir da amostra extraída com o cartucho C18, foi estabelecido que o cartucho Strata X seria o mais recomendado para a realização das extrações.

FIGURA 23 - Comparação dos cromatogramas: da mistura padrão dos analitos com a extração com cartuchos C18 e Strata X.

7.2.2 Escolha da metodologia

Os quatro métodos testados para a extração dos analitos estão descritos na TAB. 2 (pág. 48) inserida no capítulo de materiais e métodos. A FIG.24 representa os resultados dos analitos extraídos utilizando os testes 1, 2, 3 e 4. A partir da comparação entre os cromatogramas foi possível determinar que o método 3 [Dujakovic et al., 2010] consegue identificar os três analitos e produz um sinal mais intenso do que as outras metodologias utilizadas. Em todos os testes realizados o único analito que foi extraído foi o Imidacloprido, o que prova a necessidade de melhorias na metodologia.

FIGURA 24 - Comparação dos cromatogramas dos quatro diferentes testes de extração. Teste 1: 5 mL de MeOH + 5mL de H₂O e 3 mL de ACN/MeOH (2:1). Teste 2: 3 mL de MeOH + 3mL de H₂O e 3 mL de AcOEt/MeOH (1:1). Teste 3: 5 mL de MeOH/DCM (1:1) + 5mL de H₂O e 10 mL de MeOH/ DCM (1:1). Teste 4: 3 mL de MeOH + 3mL de H₂O e 2,5 mL de MeOH.

7.2.3 Escolha da faixa de pH

Na FIG. 25 são apresentados os cromatogramas dos analitos extraídos utilizando o pH 6,40 e as faixas de pH: 7,90 a 8,10; 8,90 a 9,10 e 9,90 a 10,10. A partir da comparação entre os cromatogramas de diferentes faixas de pH é possível determinar que apesar do cromatograma na faixa de pH 7,90 a 8,10 produzirem um resultado mais intenso para o Tiametoxam, a faixa de pH de 9,90 a 10,10 obteve picos mais intensos para a Clotianidina e o Imidacloprido. A comparação destes cromatogramas com o cromatograma de um padrão de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (FIG. 26) comprova que a extração na faixa de pH 9,90 a 10,10 tem uma recuperação melhor para o Imidacloprido e o Tiametoxam e por isso essa faixa de pH foi escolhida para a extração dos neonicotinóides.

FIGURA 25 - Comparação dos cromatogramas com diferentes faixas de pH.

FIGURA 26 - Comparação dos cromatogramas com melhor recuperação com o cromatograma de um padrão de 500 µg L⁻¹

Após a definição dos parâmetros de extração, a metodologia final para a extração em fase sólida foi a seguinte: os cartuchos de extração Strata X foram condicionados com 5mL de uma solução de metanol: diclorometano (1:1) e 10 mL de água ultrapura. Em seguida são eluidos 250 mL de amostra de água alcalinizada (pH 10) com a adição de hidróxido de sódio. A percolação da amostra ocorre com vazão de 2 mL min^{-1} por sucção em função do vácuo aplicado ao sistema. A eluição dos analitos de interesse é realizada com 10 mL de uma solução metanol:diclorometano (1:1). O eluato foi seco por um fluxo de nitrogênio, retomado com 250 μL de um solvente acetonitrila:água (1:4) e em seguida injetado no HPLC.

7.3 Extração líquido líquido

A extração líquido líquido surgiu como uma alternativa para a extração de neonicotinóides em água. A eficiência dessa extração foi confirmada com quatro extrações comparativas: a primeira extração foi realizada com água de ultrapura; a segunda utilizava a água ultrapura e a adição de uma concentração de $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$; a terceira extração utilizou uma amostra de água em branco e a última extração utilizou uma amostra de água com a adição de uma concentração de $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Essas extrações foram realizadas de acordo com o método descrito no tópico 6.4.3. (Pág. 49) no capítulo de materiais e métodos. Estes resultados estão apresentados na FIG. 27 e a comparação do padrão com a matriz está apresentada na FIG. 28.

FIGURA 27 - Comparação entre as extrações com água ultrapura e amostra com e sem a adição de analito.

FIGURA 28 - Comparação entre a análise de uma mistura padrão de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ com as extrações realizadas com água ultrapura e a água coletada com a adição de uma concentração de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos de interesse.

De acordo com os cromatogramas apresentados na FIG. 27 que comparam as extrações em água ultrapura e nas águas coletadas é possível verificar que as extrações em branco não tiveram sinal de analito e que as extrações com a adição de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ produziram picos identificáveis e com boa resolução o que confirma que a extração líquido - líquido pode ser utilizada para a extração de neonicotinóides em água.

A partir da comparação entre a análise do analito em solvente (FIG. 28) e as extrações realizadas com água ultrapura e água coletada é possível observar que a água ultrapura obtém um sinal parecido com o obtido pela análise do padrão com solvente. No caso da análise da água coletada, existe um sinal mais intenso do que o obtido pela análise do padrão com solvente. Isso pode ocorrer devido a uma interferência de matriz ou algum erro de diluição. Isso será investigado durante a validação.

7.4 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (GC/MS)

Para verificar se os neonicotinóides poderiam ser analisados via GC/MS, foram realizadas análises individuais com padrões de Clotianidina e Imidacloprido. O cromatograma e espectro de massa produzidos na análise da Clotianidina estão representados nas FIG. 29 e 30 e o cromatograma e espectro de massa referente a análises do Imidacloprido estão apresentados nas FIG. 31 e 32. De acordo com o DOQ- CGCRE 008 (INMETRO), a razão sinal / ruído (*signal to noise* - S/N) necessária para a quantificação dos analitos é de 10. Levando isso em consideração, estes resultados tiveram intensidade suficiente para a quantificação. O que inviabiliza esta técnica de GC/MS para a análise de água é o fato de que as amostras que obtiveram esse pico estão em concentrações de 100 mg L^{-1} o que significa que elas são maiores do que as necessárias para a quantificação baseada no que estabelece a EPA, que determina concentrações entre $0,6$ e $15,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Outro fator a ser considerado em análises de GC/MS é que apesar do composto Imidacloprido obter uma similaridade de 81% com a biblioteca do equipamento da NIST (National Institute of Standards and Technology), o espectro de massas da Clotianidina não pôde ser confirmado,

devido à grande quantidade de interferentes em seu cromatograma e o fato do mesmo não constar na biblioteca do equipamento.

FIGURA 29 - Cromatograma da Clotianidina

FIGURA 30 - Espectro de massas da Clotianidina

FIGURA 31 - Cromatograma do Imidacloprido

FIGURA 32 - Comparação entre o espectro obtido na análise e o espectro gerado na biblioteca NIST

7.5 Cromatografia a gás acoplada detector de captura de elétrons (GC/ ECD)

A comparação das análises realizadas no GC/ECD é descrita na FIG. 33. Estes cromatogramas apresentaram sinais com intensidade e S/N adequados para a quantificação, porém, sua concentração de 10 mg L^{-1} é maior do que a requerida nos documentos do EPA que varia na ordem de $0,6$ e $15,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para os três compostos estudados. Portanto a técnica de GC/ECD não pode ser utilizada na quantificação dos neonicotinóides em águas superficiais.

FIGURA 33 - Comparação dos cromatogramas para cada pesticida por GC/ECD

7.6 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC – MS/MS)

A otimização da metodologia de HPLC – MS/MS foi realizada a partir dos resultados da infusão que determinam os parâmetros utilizados no quadrupolo e os resultados do FIA que determinam os melhores parâmetros para a fonte de íons. Os resultados da infusão já estão descritos na TAB. 5 (Pág. 52) e os melhores valores para os parâmetros da fonte de íons estão descritos na TAB. 16.

TABELA 16 - Parâmetros utilizados na fonte de íons do HPLC - MS/MS

Parâmetros	
Curtain Gas (u.a.)*	30,0
Ion Source Gas 1 (u. a.)*	60,0
Ion Source Gas 2 (u. a.)*	65,0
Ion Spray Voltage (V)	5500
Temperatura (°C)	600

* (u. a.) = unidade arbitraria

7.6.1 Análises via HPLC – MS/MS API 2000

Inicialmente as análises via HPLC - MS/MS foram realizadas no equipamento API 2000 utilizando água e acetonitrila como fases móveis e o DOQ CRE 008 para a validação do método proposto. Para o início da validação foram preparadas duas curvas com as mesmas concentrações: uma delas com solvente e a outra utilizando a matriz. As três curvas de calibração para solvente estão apresentadas na FIG. 34, 35 e 36 e as três curvas para matriz estão apresentadas na FIG. 37, 38 e 39. Estas curvas foram realizadas com a setuplicada de cada um dos pontos da curva e utilizando o íon mais intenso para cada composto.

FIGURA 34 - Curva de calibração para a Clotianidina em solvente

FIGURA 35 - Curva de calibração para o Imidacloprido em solvente

FIGURA 36 - Curva de calibração para o Tiametoxam em solvente

FIGURA 37 - Curva de calibração para a Clotianidina em matriz

FIGURA 38 - Curva de calibração do Imidacloprido em matriz

FIGURA 39 - Curva de Calibração do Tiametoxam em matriz

As curvas de calibração que foram geradas a partir destas análises podem ser adequadas para a confirmação da seletividade e da linearidade de acordo com o DOQ 008 do INMETRO. Para todas as curvas obtidas foram determinadas a regressão linear e o coeficiente de determinação (r^2), que determina a variabilidade dos dados. A regressão linear e o coeficiente de determinação para cada composto estão apresentados nas TAB. 17 e 18.

TABELA 17 - Regressão linear e coeficiente de determinação das curvas de calibração realizadas com solvente

Composto	Regressão Linear	r^2
Clotianidina	$y = 753 x + 131$	0,9911
Imidacloprido	$y = 795 x + 429$	0,9967
Tiametoxam	$y = 1020 x + 492$	0,9918

TABELA 18 - Regressão linear e coeficiente de determinação das curvas de calibração realizadas com matriz

Composto	Regressão Linear	r^2
Clotianidina	$y = 174 x + 1050$	0,9970
Imidacloprido	$y = 214 x + 13900$	0,9912
Tiametoxam	$y = 172 x + 126$	0,9940

Apesar dos dados de seletividade e linearidade estarem de acordo com o documento do INMETRO, esta metodologia precisou ser descartada devido a alta interferência de matriz nas análises. Esta interferência pode ser observada nas FIG. 40 e 41 onde existe uma comparação entre a análise feita com a mistura dos analitos em solvente e uma análise destes analitos em matriz.

FIGURA 40 - Análise dos compostos Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam em solvente nas concentrações de 48, 80 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

FIGURA 41 - Análise dos compostos Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam em matriz nas concentrações de 48, 80 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

A comparação entre as FIG 40 e 41 demonstra o efeito de matriz para todos os compostos, principalmente para o Tiametoxam. Este efeito de matriz também alterou levemente o tempo de retenção dos compostos, porém este fato não interfere na identificação dos analitos.

Após a realização das análises em matriz, a coluna passou a apresentar problemas na separação dos compostos e na resolução dos analitos (FIG. 42) o que inviabilizou a continuidade da validação da metodologia utilizando este método. A presença contínua de bolhas na bomba utilizada para a mistura das fases móveis também acabou sendo um importante fator para a decisão de mudar de equipamento.

FIGURA 42 - Análise dos compostos Clotianidina, Imidacloprido e Tiametoxam em matriz nas concentrações de 48, 80 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente após a realização da curva de calibração com a matriz.

7.6.2 Análises via HPLC – MS/MS API 3200

Devido à dificuldade de realizar as análises no HPLC – MS/MS no equipamento API 2000, uma nova metodologia foi proposta para o HPLC – MS/MS Q- TRAP 3200 utilizando como fase móvel água ultrapura e uma mistura de metanol:água ultrapura (4:1). Este método manteve a coluna usada no outro equipamento, pois a utilização de outra fase móvel fez com que estes analitos interagissem de maneira diferente a coluna, mudando seu tempo de retenção (FIG. 43).

FIGURA 43 - Análise de uma mistura padrão com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ no equipamento Q - TRAP 3200

7.7 Validação de acordo com o documento 2002/657/CE utilizando o ResVal

A planilha de dados ResVal foi utilizada para avaliar os dados obtidos em cada um dos experimentos. Esta planilha utiliza dados realizados em quatro dias diferentes (experimentos 1, 2, 3 e 4) para determinar os cálculos de repetitividade, reprodutividade e variância para cada um dos experimentos.

7.7.1 Curva de calibração

Para a realização da curva de calibração foram analisados seis pontos para cada curva com as concentrações descritas na TAB. 13 (Pág. 58). Cada um destes pontos foi repetido duas vezes para cada experimento e a média dos dois pontos foi utilizada para gerar a curva de calibração para cada experimento. Nas TAB.19, 20 e 21 apresentam as curvas de calibração e o coeficiente de determinação para cada composto durante os quatro experimentos.

TABELA 19 - Curvas de calibração e coeficiente de determinação para a Clotianidina

Experimento	Regressão Linear	r^2
1	$y = 156,029 x - 1088,045$	0,9990
2	$y = 168,672 x - 1250,244$	0,9991
3	$y = 199,376 x - 1681,955$	0,9988
4	$y = 174,692 x - 1340,064$	0,9990

TABELA 20 - Curvas de calibração e coeficiente de determinação para o Imidacloprido

Experimento	Regressão Linear	r^2
1	$y = 310,411 x - 4048,327$	0,9975
2	$y = 332,775 x - 3600,226$	0,9984
3	$y = 357,509 x - 5351,692$	0,9963
4	$y = 328,135 x - 4006,259$	0,9978

TABELA 21 - Curvas de calibração e coeficiente de determinação para o Tiametoxam

Experimento	Regressão Linear	r^2
1	$y = 480,124 x - 3078,233$	0,9986
2	$y = 492,680 x - 2716,805$	0,9989
3	$y = 568,344 x - 4013,609$	0,9984
4	$y = 468,889 x - 2098,068$	0,9993

7.7.2 Experimento 1

O primeiro experimento foi realizado para determinar o efeito de matriz para cada um dos analitos estudados. Este efeito foi calculado pela planilha do ResVal utilizando a curva de calibração analisada no mesmo dia como um parâmetro de comparação para os pontos de confirmação preparados com matriz. A precisão calculada para cada um dos analitos está apresentada nas TAB. 22, 23 e 24.

TABELA 22 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 1 (adição de padrão após a extração).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	—	—
30	2630	23,83	79,4
30	2630	23,83	79,4
30	2690	24,21	80,7
30	3590	29,98	99,9
30	3010	26,26	87,5
30	2640	23,89	79,6
60	6550	48,95	81,6
60	6320	47,48	79,1
60	6300	47,35	78,9
60	6100	46,07	76,8
60	6320	47,48	79,1
60	6310	47,41	79,0
90	9330	66,77	74,2
90	9430	67,41	74,9
90	9270	66,39	73,8
90	9180	65,81	73,1
90	9790	69,72	77,5
90	7780	56,84	63,2
120	14450	99,58	83,0
300	31200	206,94	69,0

TABELA 23 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 1 (adição de padrão após a extração).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	—	—
30	4390	27,18	90,6
30	4370	27,12	90,4
30	4550	27,70	92,3
30	5690	31,37	104,6

TABELA 23 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 1 (adição de padrão após a extração) - Continuação

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
30	4150	26,41	88,0
30	4340	27,02	90,1
60	11200	49,12	81,9
60	10900	48,16	80,3
60	10900	48,16	80,3
60	10900	48,16	80,3
60	10700	47,51	79,2
60	10600	47,19	78,7
90	15800	63,94	71,0
90	15400	62,65	69,6
90	16500	66,20	73,6
90	16300	65,55	72,8
90	15600	63,30	70,3
90	13100	55,24	61,4
120	25650	95,67	79,7
300	55850	195,96	64,3

TABELA 24 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 1 (adição de padrão após a extração).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	—	—
30	9650	26,51	88,4
30	9760	26,74	89,1
30	9520	26,24	87,5
30	9800	27,01	90,0
30	9790	26,80	89,3
30	9500	26,20	87,3
60	20600	49,32	82,2
60	21100	50,36	83,9

TABELA 24 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 1 (adição de padrão após a extração) – Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	21200	50,57	84,3
60	20000	48,07	80,1
60	20700	49,53	82,5
60	20000	48,07	80,1
90	31700	72,44	80,5
90	32800	74,73	83,0
90	32600	74,31	82,6
90	30700	70,35	78,2
90	29500	67,85	75,4
90	29200	67,23	74,7
120	45300	100,76	84,0
300	110500	236,56	78,9

7.7.3 Experimento 2

O segundo experimento foi realizado para determinar a recuperação para cada um dos analitos estudados. Este efeito foi calculado pela planilha do ResVal utilizando a curva de calibração analisada no mesmo dia como um parâmetro de comparação para os pontos de confirmação preparados para determinar a recuperação. A precisão calculada para cada um dos analitos esta apresentada nas TAB. 25, 26 e 27.

TABELA 25 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	—	—
30	2600	22,83	76,1
30	2570	22,65	75,5
30	2380	21,52	71,7

TABELA 25 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração) – Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
30	2650	23,12	77,1
30	2340	21,29	71,0
30	2640	23,06	76,9
60	5280	38,72	64,5
60	5480	39,90	66,5
60	5350	39,13	65,2
60	4310	32,96	54,9
60	4650	34,98	58,3
60	4390	33,44	55,7
90	6640	46,78	52,0
90	6890	48,26	53,6
90	7130	49,68	55,2
90	6630	46,72	51,9
90	6660	46,90	52,1
90	7170	49,92	55,5
120	8990	60,70	50,6
300	20900	131,32	43,8

TABELA 26 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	—	—
30	4020	22,90	76,3
30	4290	23,71	79,0
30	4250	23,59	78,6
30	4190	23,41	78,0
30	4510	24,37	81,2
30	4510	24,37	81,2

TABELA 26 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração) – Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	8860	37,44	62,4
60	9620	39,73	66,2
60	9270	38,68	64,5
60	9970	40,78	68,0
60	6800	31,25	52,1
60	7190	32,42	51,1
90	12000	46,88	52,1
90	11700	45,98	51,1
90	11800	46,28	51,4
90	12100	47,18	52,4
90	11800	46,28	51,4
90	12700	48,98	54,4
120	14600	54,69	45,6
300	35950	118,85	39,6

TABELA 27 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	—	—
30	4680	15,01	50,0
30	5480	16,64	55,5
30	5590	16,86	56,2
30	5120	15,91	53,0
30	5020	15,70	52,3
30	4780	15,22	50,7
60	12000	29,87	49,8
60	11200	28,25	47,1
60	11900	29,67	49,4

TABELA 27 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 2 (adição de padrão antes da concentração) – Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	11200	28,25	47,1
60	8300	22,36	37,3
60	8610	22,99	38,3
90	14300	34,54	38,4
90	15000	35,96	40,0
90	15000	35,96	40,0
90	14400	34,74	38,6
90	15600	37,18	41,3
90	15900	37,79	42,0
120	19250	44,59	37,2
300	46600	100,10	33,4

7.7.4 Experimento 3

O terceiro experimento foi realizado para determinar o comportamento em solvente de cada um dos analitos estudados. Este efeito foi calculado pela planilha do ResVal utilizando a curva de calibração analisada no mesmo dia como um parâmetro de comparação para os pontos de confirmação preparados para determinar a recuperação. A precisão calculada para cada um dos analitos esta apresentada nas TAB. 28, 29 e 30.

TABELA 28 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 3 (níveis de validação em solvente).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	—	—
30	4940	33,21	110,7
30	4750	32,26	107,5
30	4620	31,61	105,4

TABELA 28 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 3 (níveis de validação em solvente) – Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
30	4800	32,51	108,4
30	4770	32,36	107,9
30	4620	31,61	105,4
60	9400	55,58	92,6
60	9350	55,33	92,2
60	9320	55,18	92,0
60	9250	54,83	91,4
60	9340	55,28	92,1
60	9510	56,13	93,6
90	13700	77,15	85,7
90	12700	72,13	80,1
90	12500	71,13	79,0
90	12500	71,13	79,0
90	13000	73,64	81,8
90	12700	72,13	80,1
120	18700	102,23	85,2
300	46900	243,67	81,2

TABELA 29 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 3 (níveis de validação em solvente).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	—	—
30	7890	37,04	123,5
30	7550	36,09	120,3
30	7510	35,98	119,9
30	7470	35,86	119,5
30	7720	36,56	121,9
30	7800	36,79	122,6
60	15600	58,60	97,7

TABELA 29 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 3 (níveis de validação em solvente) - Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	15100	57,21	95,3
60	14600	55,81	93,0
60	14900	56,65	94,4
60	14900	56,65	94,4
60	15000	56,93	94,9
90	21800	75,95	84,4
90	21100	73,99	82,2
90	19800	70,35	78,2
90	21400	74,83	83,1
90	22000	76,51	85,0
90	21600	75,39	83,8
120	29900	98,60	82,2
300	79050	236,08	78,7

TABELA 30 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 3 (níveis de validação em solvente).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
0	0	0	-
30	13100	30,11	100,4
30	12700	29,41	98,0
30	12900	29,79	99,2
30	12900	29,79	99,2
30	12600	29,23	97,4
30	12600	29,23	97,4
60	23800	48,94	81,6
60	25200	51,40	85,7
60	24300	49,82	83,0
60	24100	49,47	82,4
60	25000	51,05	85,1

TABELA 30 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 3 (níveis de validação em solvente) - Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	24600	50,35	83,9
90	34000	66,88	74,3
90	34300	67,41	74,9
90	33800	66,53	73,9
90	33300	65,65	72,9
90	35600	69,70	77,4
90	35500	69,53	77,2
120	49250	93,72	78,1
300	122500	222,60	74,2

7.7.5 Experimento 4

O quarto experimento foi realizado para determinar alterações nas extrações da matriz em branco e da matriz com o limite de validação ($60 \mu\text{g L}^{-1}$) e cada um dos analitos estudados. Este efeito foi calculado pela planilha do ResVal utilizando a curva de calibração analisada no mesmo dia como um parâmetro de comparação para os pontos de confirmação preparados para determinar a recuperação. Os resultados da matriz em branco não gerar nenhum sinal no equipamento e a precisão obtida para as análises para cada um dos analitos esta apresentada nas TAB. 31, 32 e 33.

TABELA 31 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 4 (adição de padrão após a extração) .

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	4950	28,34	47,2
60	4810	27,53	45,9
60	4720	27,02	45,0
60	6080	34,80	58,0
60	4870	27,88	46,5

TABELA 31 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação da Clotianidina no experimento 4 (adição de padrão após a extração) – Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	5080	29,08	48,5
60	4760	27,25	45,4
60	6080	34,80	58,0
60	5860	33,54	55,9
60	5930	33,67	56,1

TABELA 32 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Imidacloprido no experimento 4 (adição de padrão após a extração).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	8600	22,21	43,7
60	8450	25,75	42,9
60	7960	24,26	40,4
60	8850	26,97	45,0
60	8410	25,63	42,7
60	8170	24,90	41,5
60	9490	28,92	48,2
60	9220	28,10	46,8
60	9030	27,52	45,9
60	8490	28,87	43,1

TABELA 33 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 4 (adição de padrão após a extração).

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	15200	32,42	54,0
60	16100	34,34	57,2
60	14200	30,28	50,5
60	14500	30,92	51,5
60	14700	30,67	51,1

TABELA 33 - Intensidade e precisão para os pontos de confirmação do Tiametoxam no experimento 4 (adição de padrão após a extração) – Continuação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intensidade (cps)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)
60	15000	31,38	52,3
60	15700	32,93	54,9
60	14700	31,01	51,7
60	14400	30,0	50,0
60	15100	31,47	52,5

7.7.6 Resultados do ResVal

Após a realização dos quatro experimentos é possível determinar todos os parâmetros pedidos em uma validação como a especificidade, limite de decisão, capacidade de detecção, veracidade, repetibilidade, reprodutibilidade e recuperação.

A linearidade da curva de calibração foi comprovada com a análise das curvas em quatro dias diferentes e apresentadas na TAB. 18 (Pág. 77) para as análises da Clotianidina, na TAB. 19 para as análises do Imidacloprido e na TAB. 20 para as análises do Tiametoxam. Todas as curvas apresentaram coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99.

De acordo com a decisão de comissão 2002/657/CE, a especificidade deve ser confirmada com técnica de LC- MS/MS utilizando uma separação cromatográfica e utilizando pelo menos quatro pontos de identificação. A separação cromatográfica pode ser comprovada na FIG. 43 (Pág. 76) e os valores do íon precursor e dos íons produto para cada analito estão descritos na TAB.3 (Pág. 51) que é apresentada no capítulo de materiais e métodos deste trabalho.

O limite de decisão e capacidade de detecção foram calculados para pelo ResVal a partir dos três primeiros experimentos de cada analito. Os resultados para os três experimentos e a média deles para cada analito estão apresentados nas TAB. 34, 35 e 36.

TABELA 34 - Limite de decisão e capacidade de detecção para a Clotianidina.

Experimento	Limite de decisão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Capacidade de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	4,79	8,16
2	4,28	7,29
3	3,23	5,50
Média	4,10	6,98

TABELA 35 - Limite de decisão e capacidade de detecção para o Imidacloprido.

Experimento	Limite de decisão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Capacidade de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	5,16	8,79
2	5,78	9,84
3	3,26	5,55
Média	4,73	8,06

TABELA 36 - Limite de decisão e capacidade de detecção para o Tiametoxam.

Experimento	Limite de decisão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Capacidade de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	2,47	4,21
2	5,26	8,97
3	2,63	4,48
Média	3,45	5,89

A precisão do método foi determinada a partir dos valores de desvio padrão, coeficiente de variação, repetitividade e reprodutividade. O coeficiente de variação (CV) e o desvio padrão (DP) foram calculados para os três experimentos a partir dos níveis de validação de 30, 60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estes valores foram calculados em porcentagem e apresentados nas TAB. 37, 38 e 39.

TABELA 37 - Desvio padrão e coeficiente de variação para a Clotianidina.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
Níveis de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DP (%)	CV(%)	DP (%)	CV(%)	DP (%)	CV(%)
30	8,2	9,7	2,7	3,6	2,0	1,9
60	1,5	1,9	5,1	8,4	0,7	0,8
90	4,9	6,8	1,6	3,1	2,5	3,1

TABELA 38 - Desvio padrão e coeficiente de variação para o Imidacloprido.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
Níveis de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DP (%)	CV(%)	DP (%)	CV(%)	DP (%)	CV(%)
30	6,0	6,5	1,9	2,4	1,6	1,3
60	1,1	1,4	6,6	10,8	1,5	1,6
90	4,4	1,2	1,2	2,3	2,5	3,0

TABELA 39 - Desvio padrão e coeficiente de variação para o Tiametoxam.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
Níveis de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DP (%)	CV(%)	DP (%)	CV(%)	DP (%)	CV(%)
30	1,1	1,2	2,5	4,7	1,2	1,2
60	1,8	2,2	5,6	12,4	1,6	1,9
90	3,6	4,5	1,4	3,6	1,8	2,4

Os resultados de repetitividade e reprodutibilidade para os níveis de validação de 30, 60 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da planilha do ResVal. Estes resultados estão apresentados nas TAB. 40 e 41.

TABELA 40 – Resultados do coeficiente de variação para a repetitividade dos compostos em estudo.

Níveis de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Clotianidina	Imidacloprido	Tiametoxam
30	2,14	1,15	0,08
60	3,51	5,65	4,42
90	9,06	7,22	4,88

TABELA 41 - Resultados do coeficiente de variação para a reprodutividade dos compostos em estudo.

Níveis de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Clotianidina	Imidacloprido	Tiametoxam
30	27,37	42,73	51,88
60	92,69	107,76	177,84
90	170,27	197,54	378,08

Os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade foram comparados com os critérios de desempenho determinados pela decisão de comissão 2002/657/CE que considera esses valores apropriados para a validação de métodos quantitativos. Ela também aceita coeficientes de variação inaceitavelmente elevados para a reprodutividade em concentrações menores que $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

A exatidão pode ser determinada a partir dos resultados de recuperação do método. A recuperação foi determinada a partir da comparação entre o experimento 1 que determina a interferência de matriz e o experimento 2 que determina a recuperação do analito após a extração. Esta comparação foi realizada usando a média dos sinais para cada uma das concentrações em estudo (30, 60, 90, 120 e $300 \mu\text{g L}^{-1}$) para o experimento 1 e 2. Estes valores são utilizados na equação 2 (Pág 36), apresentada no capítulo de validação deste trabalho, para determinar a recuperação. O teor medido é a média obtida pelo experimento 2 e o nível de fortificação é a média obtida pelo experimento 1. Os resultados para a recuperação e as médias para cada experimento estão apresentadas nas TAB. 42, 43 e 44.

TABELA 42 - Resultados de recuperação para a Clotianidina.

Níveis de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	30	60	90	120	300
Intensidade (cps) Experimento 1	2865	6317	9130	13500	29750
Intensidade (cps) Experimento 2	2530	5122	6853	8790	19075
Recuperação (%)	88,31	81,08	75,06	65,11	64,12

TABELA 43 - Resultados de recuperação para o Imidacloprido.

Níveis de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	30	60	90	120	300
Intensidade (cps) Experimento 1	4582	10866	15450	23700	53100
Intensidade (cps) Experimento 2	4295	8085	12016	14525	31825
Recuperação (%)	93,74	74,40	77,77	61,29	59,93

TABELA 44 - Resultados de recuperação para o Tiametoxam.

Níveis de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	30	60	90	120	300
Intensidade (cps) Experimento 1	9685	20600	31083	43325	104500
Intensidade (cps) Experimento 2	5108	10535	15033	18850	43625
Recuperação (%)	52,74	51,14	48,36	43,51	41,75

De acordo com a decisão de comissão 2002/657/CE, a porcentagem de recuperação aceita depende da concentração adicionada do analito. Para valores inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ a recuperação aceita pode variar entre -50% a +20%, e para valores entre 1 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ a recuperação deve variar entre -30% a 10%.

Neste experimento, os valores adicionados para a recuperação foram 100 vezes menores do que os níveis de validação (0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e $3 \mu\text{g L}^{-1}$) isso ocorre pois a extração líquido - líquido é utilizada para concentrar o analito 100 vezes.

A partir da comparação das recuperações obtidas com a decisão de comissão 2002/657/CE, só podem ser aceitos as recuperações realizadas para os níveis de validação de 30, 60 e $90 \mu\text{g L}^{-1}$ para a Clotianidina e Imidacloprido, e para os níveis de validação de 30 e $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Tiametoxam.

7.8 Resultados da Robustez

Os resultados de robustez foram determinados separadamente do ResVal® utilizando o teste de Youden e a planilha de “Validação de Ensaios Químicos” [Furusawa, 2007] para os parâmetros descritos na TAB. 2 (Pág. 37).

Os resultados produzidos sobre a forma de gráficos de barras estão apresentados nas FIG. 44, 45 e 46 mostram os efeitos dessas variações sobre o método.

FIGURA 44 - Teste de Youden para a Clotianidina

FIGURA 45 - Teste de Youden para o Imidacloprido

FIGURA 46 - Teste de Youden para o Tiametoxam

De acordo com os gráficos de significância dos efeitos é possível observar que para as análises de Clotianidina e Imidacloprido o solvente e a temperatura da coluna não interferem no método, a temperatura da fonte e a fase orgânica produzem uma pequena interferência negativa, o volume de injeção e a vazão do HPLC criam uma interferência negativa média e a utilização de outra coluna produz uma grande interferência positiva. Isso comprova que a troca da coluna é o fator que mais interfere na análise de neonicotinóides.

Os gráficos de significância dos efeitos para o Tiametoxam demonstram que a temperatura da fonte e a fase orgânica produzem uma pequena negativa, a temperatura da coluna e o solvente utilizado criam uma pequena interferência positiva, a vazão do HPLC e o volume de injeção fornecem uma interferência negativa média e a utilização de outra coluna produz uma grande interferência positiva. A troca da coluna é o fator que mais interfere nas análises.

7.9 Análises de água superficial

Após a validação do método foram realizadas as análises das amostras de água superficiais coletadas no inverno e no verão de 2016 no município de Piratininga no estado de São Paulo. As FIG. 47 e 48 apresentam as análises da água superficial coletada no verão. A FIG. 47 apresenta o cromatograma completo das análises das águas superficiais coletadas no verão e a FIG. 48

apresenta o cromatograma completo das análises das águas superficiais coletadas no inverno.

FIGURA 47 - Cromatograma das análises de águas superficiais coletadas no verão

FIGURA 48 - Cromatograma das análises de águas superficiais coletadas no inverno

A partir das análises apresentadas é possível identificar que nenhum analito foi identificado nas amostras de água. Isso pode ter ocorrido por duas razões: a primeira delas envolve a ausência deste analito nas águas analisadas e a outra ocorre pelo fato do analito estar em concentrações inferiores ao limite

detectável. Conclui-se que não existe contaminação de Neonicotinóides nas amostras de água coletadas.

8. CONCLUSOES

As seguintes conclusões podem ser extraídas do presente trabalho:

- 1) Foram estudados três diferentes métodos para análise do pesticida Neonicotinóides em águas superficiais, via extração do analito da matriz água e posterior análise via GC/MS, GC/FID e HPLC-MS/MS
- 2) Com relação às análises realizadas por GC/MS e GC/ECD, foi possível comprovar que nenhuma das duas técnicas tem sensibilidade suficiente para analisar as concentrações requeridas pelo EPA.
- 3) Este trabalho também demonstra o GC/ECD pode ser uma alternativa válida para análises na ordem de 1 mg L^{-1} , porém o GC/MS não deve ser usado para este tipo de análise.
- 4) A partir dos diferentes métodos de extração em fase sólida estudados para os pesticidas pode-se concluir que o cartucho Strata X e a elevação do pH para uma faixa de 9,90 a 10,10 foram as melhores condições para a extração.
- 5) Este trabalho também comprova que a extração líquido- líquido pode ser utilizada para concentrar e extrair neonicotinóides de águas superficiais.
- 6) O HPLC – MS/MS foi o analisador mais adequado para análises de neonicotinóides em águas superficiais por ter uma sensibilidade em torno de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, o necessário para a validação deste método com base no limite residual estabelecido pelo EPA de $2,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para a Clotianidina, $15,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para o Imidacloprido e $0,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para o Tiametoxam.
- 7) A recuperação dos analitos via extração líquido –líquido não apresenta bons resultados para as concentrações superiores a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.
- 8) A planilha do ResVal fornece um estudo de diferentes fatores a serem considerados em uma validação ao mesmo tempo. Isso nos fornece uma informação mais completa sobre os analitos avaliados.

9) Com esta metodologia definida, não foi possível detectar a existência de neonicotinóides nas amostras de água coletadas.

10) As análises das águas superficiais da região de Piratininga demonstram que os três Neonicotinóides estudados, Imidacloprido, Clotianidina e Tiametoxam estão abaixo dos teores permitidos pela EPA americana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEER, Raquel. Porque salvar as abelhas. **Veja**, e. 2466 v. 8 p.84 – 87, 2016.

BRASIL. Decreto nº 4.070 de 04 de janeiro de 2002.Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.**Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 jan. 2002.

BRASIL. Instrução Normativa nº 1 de 28 de dezembro de 2012.Dispõe sobre a aplicação dos ingredientes ativos Imidacloprido, Clotianidina, Tiametoxam e Fipronil.**Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 jan. 2013.

BRASIL. Instrução Normativa nº 1 de 31 de dezembro de 2014.Estabelece condições para a aplicação dos ingredientes ativos Imidacloprido, Clotianidina, Tiametoxam e Fipronil na cultura do algodão em conformidade com a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 e a Instrução Normativa Conjunta MAPA/IBAMA nº 01, de 28 de dezembro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 jan. 2015.

BRASIL. Instrução Normativa nº30 de 04 de dezembro de 2013. Promove alteração na Instrução Normativa Conjunta SDA/IBAMA n. 01, de 28 de dezembro de 2012.**Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 dez. 2013.

BRASIL. Lei nº7.802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 jul. 1989.

BUSTILLOS, OSCAR; SASSINE, ANDRE; MARCH, RAYMOND. **A espectrometria de massas quadrupolar**. São Paulo: Editora Scortecci, 2003.

CHAUZAT, Marie-Pierre; MARTEL, Anne-Claire; BLANCHARD, Philippe; CLÉMENT, Marie-Claude; SCHURR, Frank; LAIR, Cosette; RIBIERE, Magali; WALLNER, Klaus; ROSENKRANZ, Peter; FAUCON, Jean-Paul. A case report of a honeybee colony poisoning incident in France. **Journal of Apicultural Research**. v. 49, p. 113 - 115, 2010.Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

COLLINS, CAROL H.; BONATO, PIERINA S.; BRAGA, GILBERTO L. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campinas: Editora Unicamp, 1995.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Disciplina a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários. Ago. 16, 2004. (CONAMA 346).

COX-FOSTER, Diana L.; CONLAN, Sean; HOLMES, Edward C.; PALACIOS, Gustavo; EVANS, Jay D.; MORAN, Nancy A.; QUAN, Phenix-Lan; BRIESE, Thomas; HORNIG, Mady; GEISER, David M.; MARTINSON, Vince; VANENGELSDORP, Dennis; KALKSTEIN, Abby L.; DRYSDALE, Andrew; HUI, Jeffrey; ZHAI, Junhui; CUI, Liwang; HUTCHISON, Stepehn K.; SIMONS, Jan F.; EGHOLM, Michael; PETTIS Jeffery S.; LIPKIN, W. Ian. A metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. **Science**, v. 318, p. 283-287, 2007. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 28 janeiro 2015.

CRESSEY, Daniel. Bee studies stir up pesticide debate. **Nature**. v. 520 p. 416, 2015. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 09Setembro 2016.

DIETEMANN, Vicent; NAZZI, Francesco; MARTIN, Stephen J. ; ANDERSON, Denis L., LOCKE, Barbara; DELAPLANE, Keith S.; WAUQUIEZ, Quentin; TANNAHILL, Cindy; FREY, Eva; ZIEGELMANN, Betina; ROSENKRANZ, Peter; ELLIS, James D. Standard methods for varroa research. **Journal of apicultural research**, v. 52 (1), 2013. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

DOUBLET, Vicent; LABARUSSIAS, Maureen; MIRANDA, Joachim R. de; MORITZ, Robin F. A.; PAXTON, Robert J. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honeybee mortality across the life cycle. **Environmental Microbiology**, v. 17(4), p. 969-983, 2015. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

DUJAKOVIĆ, Nikolina; GRUJIĆ, Svetlana; RADIŠIĆ, Marina; VASILJEVIĆ, Tatjana; LAUŠEVIĆ, Mila. Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 678, p. 63-72, 2010. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 18 janeiro 2015.

ELLIS, James D.; EVANS, Jay D.; PETTIS, Jeff. Colony losses, managed colony population decline and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**. v.49, p.134 -136, 2010. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

EPA – United States Environmental Protection Agency. Pesticides Fact Sheet: Clothianidin, 2003. Disponível em: <http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-044309_30-May-03.pdf> Acesso em: 15 mar 2016

EPA – United States Environmental Protection Agency. Imidacloprid PesticideTolerance 3/01, 2001. Disponível em: <http://pmp.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/fenitrothion-methylpara/imidacloprid/imidac_tol_0301.html> Acesso em: 15 mar 2016

EPA – United States Environmental Protection Agency. Thiamethoxam Pesticide Tolerance 12/00, 2000. Disponível em: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/propetamphos-zetacyperm/thiamethoxam/thiameth_tol_1200.html> Acesso em: 15 mar 2016

ETTIENE, Gretty; BAUZA, Roberto; PLATA, Maria R.; CONTENTO, Ana M.; RIOS, Angel. Determination of neonicotinoid insecticides in environmental samples by micellar electrokinetic chromatography using solid-phase treatments. **Electrophoresis**. v. 33, p. 2969 – 2977, 2012. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 28 janeiro 2015.

FAROOQUI, Tahira. A potential link among amines-based pesticides, learning and memory and colony collapse disorder: A unique hypothesis. **Neurochemistry International**. v. 62 p.122-136, 2012. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

FURUSAWA, H.A. Validação de Ensaios Químicos. IPEN-CNEN-SP, (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 DE 01/03/2003 do INMETRO). São Paulo, 2007.

G1 São Carlos e Araraquara. Cerca de 10 milhões de abelhas morrem em apiário de Porto Ferreira. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sp/sao-carlos-regiao/noticia/2017/01/cerca-de-10-milhoes-de-abelhas-morrem-em-apiario-de-porto-ferreira.html>> Acesso em: 10 Janeiro 2017

GOULSON, Dave. An overview of the environmental risks poses by neonicotinoid insecticides. **Journal of applied Ecology**. v. 50, p. 977-987, 2013. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 09 Setembro 2016.

GREAVES, JOHN; ROBOZ, JOHN. **Mass Spectrometry for the novice**. Boca Raton: CRC Press, 2014

GREGORC, Ales; SILVA-ZACARIN, Elaine C.M.; CARVALHO, Stephan M.; KRANBERGER, Doris; TEIXEIRA, Erica W.; MALASPINA, Osmar. Effects of *Nosema ceranae* and Thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honeybees. **Chemosphere**. v.147, p328-336, 2016. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 30 Janeiro 2017.

Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos / Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus Brandão... [et al.]. -- São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

HATJINA, Fani; BOUGA Maria; KARATASOU, Aikaterini; KONTITHANASI, Aglaya; CHARISTOS, Leonidas; EMMANOUIL, Christina; EMMANOUIL, Nikolaos; MAISTROS, Anastasios – Damianos. Data on honeybee losses in Greece: a preliminary note. **Journal of apicultural research**, v. 49 (1), p. 116- 118, 2010. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JESCHKE, Peter; NAUEN, Ralf; SCHINDLER, Michael; ELBERT, Alfred. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 2897-2908, 2011. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 26 junho 2015.

JOHNSON, Reed M.; EVANS, Jay D.; ROBINSON, Gene E.; BERENBAUM, May R. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honeybees (*Apis mellifera*). **Pnas (Proceedings of the National Academy of Science)**. v.106, n. 35, p. 14790-14795, 2009. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 27 janeiro 2016.

Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento de Execução N° 485/2013 da comissão de 24 de maio de 2013.

KAGABU, Shinzo. Discovery of Imidacloprid and Further Developments from Strategic Molecular Designs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 2887-2896, 2011. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 08 fevereiro 2016.

KAPLAN, J. Kim. Colony Collapse Disorder: na incomplete puzzle. **Agriculture Research**. v. 60 p. 4 – 8, 2012. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 16Junho 2016.

LANÇAS, Fernando. **Cromatografia líquida Moderna: HPLC / CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LEITE, Flavio. **Validação em Análise Química**. Campinas: Editora Átomo, 2008.

LIMA, Maria C.; ROCHA, Sá de A. **Efeitos toxicológicos sobre as abelhas silvestres no Brasil**. Brasília: IBAMA, 2012.

LUNDIN, Ola; SMITH, Henrik G.; FRIES, Ingemar; BOMMARCO, Riccardo. Neonicotinoid Insecticides and Their Impacts on Bees: A Systematic Review of Research Approaches and Identification of Knowledge Gaps. **Plos One**. v.10 p.1 – 20, 2015.

MIRANDA, Joachim R. de; BAILEY, Lesley; BALL, Brenda V.; BLANCHARD, Philippe; BUDGE, Giles; CHEJANOVSKY, Nor; CHEN, Yan- Ping; GAUTHIER, Laurent; GENERSCH, Elke; GRAAF, Dirk C. de; RIBIÉRE, Magali; RYABOV, Eugene; SMET, Lina de; STEEN, Jozef J. M. van der. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 52 (4), 2013. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

MORRISSEY, Christy A.; MINEAU, Pierre; DEVRIES, James H.; SANCHEZ-BAYO, Francisco; LIESS, Matthias; CAVALLARO, Michael C.; LIBER, Karsten. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. **Environment International**. v.74, p. 291-303,

2015. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 24 Fevereiro 2015.

NEUMANN, Peter; CARRECK, Norman L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, v.49, p.1-6, 2010. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 17 Junho 2016.

OLIVEIRA, Justine P. R. **Estudo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) em regiões industriais da Grande São Paulo – via cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e captura de elétrons (GC-ECD)**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEM/SP, São Paulo. 209 p. Disponível em: <www.teses.usp.br> Acesso em 15 março 2016.

OLIVEIRA, Regiane A.; ROAT, Thaisa C.; CARVALHO, Stephan M.; MALASPINA, Osmar. Side Effects of Thiametoxam on the Brain and Midgut of the Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v.29, p. 1122-1133, 2013. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 30 Janeiro 2017.

PAXTON, Robert J. Does infection by *nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honeybees (*Apis mellifera*)? **Journal of Apicultural Research**, v.49 (1), p.80-84, 2010. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

PEREIRA, M. **Tiametoxam em plantas de cana-de-açúcar, feijoeiro, soja, laranja e café: parâmetros de desenvolvimento e aspectos bioquímicos**. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 125p. Disponível em: <www.teses.usp.br> Acesso em 15 março 2016.

POTTS, Simon G.; ROBERTS, Stuart P. M.; DEAN, Robin; MARRIS, Gay; BROWN, Mike A.; JONES, Richard; NEUMANN, Peter; SETTELE, Josef. Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe. **Journal of apicultural research**, v. 49 (1), p. 15-22, 2010. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

Projeto Colmeia Viva – MAP divulga os primeiros resultados. Disponível em: <<http://projctocolmeiaviva.org.br/noticias/map-divulga-primeiros-resultados/>> Acesso em: 10 janeiro 2017.

RIBANI, Marcelo; BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes; MELO, Lucio Flavio Costa. Validação em métodos cromatográficos e eletroforeticos. **Química Nova**, v. 5, p. 771- 780, 2004. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

ROSSI, Carolina de A.; ROAT, Thaisa C.; TAVARES, Daiana A.; CINTRA-SOLOWSKI, Priscila; MALASPINA, Osmar. Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid in Malpighian Tubules of Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v.76, p.552-558,

2013. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 30 Janeiro 2017.

SANCHEZ – BAYO, Francisco; GOULSON, Dave; PENNACCHIO, Francesco; NAZZI, Francesco; GOKA, Koichi; DESNEUX, Nicolas. Are the bees liked to pesticides? – A brief review. **Environment International**, v. 89 – 90, p. 7 – 11, 2016. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 09 Setembro 2016.

SANCHEZ- BAYO, Francisco; HYNE, Ross V. Detection and analysis of neonicotinoids in river waters – Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. **Chemosphere**, v 99, p.143 – 151, 2014.

SANTILLAN-GALICIA, M. Tereza; BALL, Brenda V.; CLARK, Suzanne J.; ALDERSON, Peter G. Transmission of deformed wing and slow paralysis virus to adult bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. **Journal of Apicultural Research**, v. 49 (2), p. 141-148, 2010. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

SECCIA, Serenella; FIDENTE, Paola; BARBINI, Danilo A.; MORRICA, Patrizia. Multiresidue determination of neonicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 553, p.21-26, 2005. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 24 Fevereiro 2015.

TADEO, JOSÉ L. **Analysis of Pesticides in food and Environmental Samples**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2008.

TAVARES, Daiana A.; ROAT, Thaisa C.; CARVALHO, Stephan M. SILVA-ZACARIN, Elaine C.M., MALASPINA, Osmar. In vitro effects of Thiametoxam on Larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera*(Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v.135, p.370-378, 2015. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 30 Janeiro 2017.

TEIXEIRA, Erica Weinstein; SANTOS, Luciane Guimarães do; SATTTLER, Aroni; MESSAGE, Dejair; ALVES, Maria Luisa Teles Marques Florencio; MARTINS, Marta Fonseca; GRASSI-SELLA Marina Lopes; FRANCOY, Tiago Mauricio. Nosema Ceranae has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honeybees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114 p. 250-254, 2013. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 08 Fevereiro 2016.

THANY, Steeve H. Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, acts as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 587-592, 2011. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 08 Fevereiro 2016.

TSIPI, DESPINA; BOTITSI, HELEN; ECONOMOU,ANASTACIOS. **Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and their Metabolites**, Hokoken: Wiley, 2015.

UNEME, Hideki. Chemistry of Clothianidin and Related Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2932-2937, 2011. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 24 Fevereiro 2015.

UNIÃO EUROPEIA. Commission Decision 2002/657/EC, **Official Journal of the European Communities**, L221, 8, 2002.

VALDERRAMA, Patrícia; BRAGA, Jez W. B.; POPPI, Ronei J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278 – 1287, 2009. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 10 Março 2017.

VANENGELSDORP, Dennis; HAYES JR., Jerry; UNDERWOOD, Robyn M.; PETTIS, Jeffery S. A survey of honeybee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. **Journal of Apicultural Research**, v.49, p. 7-14, 2010. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.

Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012.

WALSH Bryan. The Plight of the Honeybee. **Time Magazine**, v. 182, p. 24 – 30, 2013.

ZEE, Romée van der; GRAY, Alison; PISA, Lennard; RIJK, Theo de. An observational study of honeybee colony winter losses and their association with varroa destructor, neonicotinoids and other risk factors. **Plos one**, v.10 (7), p.1-25, 2015. Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em: 20 Junho 2016.