



DOI: <http://dx.doi.org/10.18378/aab.v2i2.3738>

Franciédna Maria da Silva^{1*}

Débora Cristina Coelho²

Antônio Vitor Machado³

Rubenia de Oliveira Costa⁴

¹Mestranda em Sistemas Agroindustriais – UFCG – Universidade Federal de Campina Grande – Campus Pombal.

²Mestranda em Sistemas Agroindustriais – UFCG – Universidade Federal de Campina Grande – Pombal. E-mail: debora.coelho@hotmail.com

³ Dr. Sc., Professor Adjunto da Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Mossoró-RN.

⁴Mestranda em Sistemas Agroindustriais – UFCG – Universidade Federal de Campina Grande – Campus Pombal.

Autor Correspondente:

***E-mail: edna.ufcg@hotmail.com**

Palavras-chaves: contaminação, produto, métodos e análises.

KEY WORDS: contamination, Product, Methods and Analysis.

Recebido: 20/08/2014

Aceito: 10/12/2014

Detecção de Resíduos de Agrotóxicos no Mel de Abelha

RESUMO

As abelhas *A. mellifera* são uns dos mais importantes polinizadores de culturas, além disso, elas produzem mel, própolis, geleia real e cera. O mel, principal produto da atividade apícola, utilizado como alimento, adoçante e para fins terapêuticos (apiterapia), tem a imagem de ser natural, saudável e limpo sendo esse um produto muito valorizado no mercado externo por isso, a busca por rigorosos padrões de qualidade se torna necessária para atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente. Dessa forma a identificação da origem floral e geográfica, a ocorrência de adulterações e as contaminações, principalmente com antibióticos e agrotóxicos no mel tem se tornado uma rota importante devido os quais podem acarretar problemas de saúde ao consumidor. A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) combinada às técnicas cromatográficas modernas como cromatografia a gás (GC) e cromatografia a líquido (HPLC) é uma alternativa para evitar os diversos inconvenientes encontrados nos métodos clássicos de extração. A proposta desse trabalho foi pesquisar os diferentes tipos de Análises e metodologias de detecção de resíduos de agrotóxicos no mel de abelha Apresentando diferentes metodologias para a execução de estudos para validação de metodologia em métodos analítico, utilizando as técnicas de dispersão da matriz em fase sólida, cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos.

Pesticide Residues in Honey Pesticide Residues detection in Bee honey

ABSTRACT

A. mellifera bees are one of the most important pollinators of crops in addition they produce honey, propolis, royal jelly and wax. Honey, the main product of beekeeping, used as food, sweetener and in therapy (apitherapy), has the image of being natural, healthy and clean making a highly valued product in the foreign market so the search for rigorous standards of quality is needed to meet a consumer market increasingly demanding. Thus the identification of floral and geographical origin, the occurrence of tampering and contamination, especially with antibiotics and pesticides in honey has become an important route because which can cause health problems to consumers. The dispersion of the solid phase matrix (PDDM) combined with modern chromatographic techniques as gas chromatography (GC) and liquid chromatography (HPLC) is an alternative to avoid the various drawbacks found in classical extraction methods. The purpose of this study was to investigate the different types of analyzes and pesticide residue detection methodologies in honey Introducing different methodologies for carrying out studies for validation of a method in analytical methods, using the matrix dispersion techniques in solid phase, gas chromatography coupled to mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with UV detector with diode array.

INTRODUÇÃO

A atividade polinizadora das abelhas é indispensável para a produção de frutas e sementes de alto valor comercial.

O produto principal da atividade das abelhas é o mel, muito valorizado no mercado externo e seu preço oscila em níveis altos se comparado a outros produtos, inúmeros efeitos benéficos em várias condições patológicas, é um alimento de alto potencial energético que contém diversos elementos complementares, importantes nutricionalmente. Por isso, a procura por rigorosos padrões de qualidade torna-se necessária para suprir ao mercado consumidor cada vez mais exigente.

Em relação à qualidade do mel, estão a identificação da origem floral e geográfica, a ocorrência de adulterações e as contaminações, principalmente com antibióticos e agrotóxicos. Assim, o consumo do mel se torna uma rota importante para exposição humana aos resíduos de pesticidas, os quais podem acarretar problemas de saúde ao consumidor.

Os resíduos de agrotóxicos estão entre os compostos de importância devido aos riscos à saúde humana e à saúde das abelhas. Apesar do desacordo entre produtores de defensivos e cientistas, acredita-se que os agrotóxicos podem ser responsáveis pelo detrimento de grande número de abelhas em algumas áreas estudadas.

A mortalidade das abelhas está proporcionalmente relacionada à presença de agrotóxicos no pólen, no favo, nas próprias abelhas e no mel (RIAL-OTERO ET AL., 2007).

A superioridade dos métodos de preparo de amostra desenvolvidos envolve a extração líquido (LLE, do inglês liquid - liquid extraction), extração por ultrassom (UE, do inglês ultrasonic extraction) ou extração em fase sólida (SPE, do inglês solid phase extraction) que em sua maioria abrange grandes quantidades de solvente e tempo requerido para extração.

A proposta desse trabalho foi pesquisar os diferentes tipos de Análises e metodologias de detecção de resíduos de agrotóxicos no mel de abelha, apresentando diferentes metodologias para a execução de estudos para validação de metodologia em métodos analíticos, utilizando as técnicas de dispersão da matriz em fase sólida, cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho está baseado em uma pesquisa bibliográfica realizada em artigos eletrônicos sobre análises e metodologias para detecção de resíduos de agrotóxicos no mel de abelha.

ABELHAS (*Apis mellifera*)

O princípio da atividade apícola no Brasil ocorreu a partir de 1845 com a introdução da *Apis mellifera* no estado do Rio de Janeiro. A partir dessa data, várias outras iniciações foram feitas, principalmente espécies europeias como *A. mellifera ligustica* e *Apis mellifera carnica*. Em 1956 foi feita a importação da abelha africana, o que resultou na africanização de toda apicultura brasileira (NOGUEIRA-NETO, 1972).

Abelhas são insetos polinizadores avaliados como os mais importantes na execução desta tarefa, em correspondência os vegetais produzem substâncias adocicadas que os atraem, arrastando em seus pêlos o pólen da planta florífera. Sendo o pólen indispensável para o desenvolvimento da colmeia, pois é a fonte básica de proteína das abelhas, com essa ação garantem sua sobrevivência e também colonização das espécies vegetais (NOGUEIRA-COUTO e COUTO, 2002).

Estima-se que nos Estados Unidos, as abelhas *Apis Mellifera* sejam responsáveis por um acréscimo da ordem de 14,6 bilhões de dólares/ano na produção de alimentos através da polinização de culturas de interesse econômico (MORSE; CALDERONE, 2000).

Devido à disponibilidade de um número alto de colônias de abelhas *A. mellifera* ao tamanho dos exames e por polinizarem inúmeras culturas de valor econômico, elas são usadas para polinização de cultivos comerciais em todo mundo (BENEDEK; GAL, 1972).

De acordo com Genersh (2010), as abelhas *A. mellifera* são uns dos mais responsáveis polinizadores de culturas que dependem de agentes polinizadores e colaboram com aproximadamente 35% da polinização global de alimentos. Seus produtos têm como matéria-prima recursos vegetais, principalmente obtida das flores, para que esses indivíduos produzam mel, própolis, geleia real e cera, são necessárias que haja a disponibilidade de floradas, logo, há uma vinculação entre a atividade das abelhas e os recursos vegetais disponíveis, sobretudo floradas, não há produtos apícolas sem pasto apícola (COSTA; OLIVEIRA, 2005).

A florada é indispensável para a manutenção e produção das colmeias, entretanto, podem apresentar perigo para as abelhas, em algumas regiões certas plantas apresentam toxicidade que podem causar a morte das crias e abelhas adultas (PEREIRA et al, 2004; PERREIRA et al., 2014).

A conduta defensiva que as abelhas utilizam para a proteção da colônia é uma precisão básica para a sua sobrevivência. Pela comunicação entre as abelhas, por meio de feromônios de alarme lançados pelas células da glândula de veneno (isopentilacetato) e das glândulas mandibulares (2-heptanona) das operárias, esta defesa se torna tão eficiente (BOCH; SHEARER, 1966; NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002).

DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO MEL

O mel é um alimento admirado por seu sabor característico e pelo seu abundante valor nutritivo. De acordo com a legislação vigente no Brasil, entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções consequentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

O mel é classificado de acordo com sua origem em mel floral quando as abelhas aproveitam o néctar das plantas e mel de melato quando esse é adquirido de secreções de líquidos açucarados, procurados e colhidos pelas abelhas como se fosse néctar (ANKLAM, 1998).

Os dois tipos de méis advêm de processos enzimáticos semelhantes, porém, suas características físico-químicas são diferentes quando se tornam o produto final.

O mel floral é chamado monofloral, quando o néctar é coletado predominantemente de uma espécie floral e multifloral ou silvestre, quando é obtido a partir de diferentes origens florais (CAMPOS, 1998).

O néctar é coletado pelas abelhas operárias coletoras e carregado na vesícula nectarífera para a colônia, repassado a outra operária ou depositado diretamente no favo. Durante o transporte, é diluído por saliva onde são acrescentadas enzimas (invertase, diastase e glicoseoxidase) provenientes das glândulas hipofaríngeas das abelhas. As enzimas agem no processamento do néctar para transformá-lo em mel (ARAUCO, 2005).

De acordo com Crane (1998), o mel é o resultado da desidratação e da transformação desse néctar, assim, a quantidade da substância formada a partir de uma determinada planta varia de acordo com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, com a concentração e as proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e até com o número de dias que as flores estão secretando néctar. Desta forma, a composição do néctar de uma espécie produtora, que foi recolhido pelas abelhas, colabora diretamente na composição do mel elaborado, atribuindo-lhe características específicas.

De acordo com Marchini e colaboradores (2004) as condições climáticas e o manejo do apicultor têm menos controle sobre essas características. O mel de melato difere do mel floral em sua composição química; eles são mais escuros, tem pH mais alto, menor teor de glicose, razão pela qual usualmente não cristaliza e maior acidez (CAMPOS, 1998; CASTROVAZQUEZ ET AL., 2006).

Existem vários tipos de méis no mundo, no que se trata à espécie de abelha coletora. As abelhas do gênero *Apis* chamadas africanizadas são as principais: *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*.

No Brasil, existem outras espécies, como as abelhas sem ferrão (meliponídeos) do gênero *Melipona*, conhecidas popularmente como urucu (*Melipona scutellaris*), tiúba (*Melipona compressipes*), jandaíra (*Melipona subnitida*), mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) (VARGAS, 2006).

De maneira geral, o mel das espécies de meliponídeos tem como característica fundamental a diferenciação nos teores da sua composição, destacando-se o teor de água (umidade), que o torna menos denso que o mel das abelhas africanizadas (CAMPOS, 1998).

PRODUÇÃO E EXPORTAÇÃO DE MEL NO BRASIL E NO MUNDO

A produção mundial de mel teve um aumento nos últimos 20 anos. O consumo também cresceu, sendo atribuído ao aumento geral nos padrões de vida e também a um empenho maior da população por produtos naturais e saudáveis.

Advertências atribuídas ao produto dos dois maiores exportadores mundiais, China e Argentina, proporcionaram uma abrupta demanda pelo produto brasileiro nos últimos anos (RELATÓRIO ADECA, 2005).

De acordo com Faostat (2006), o Brasil representa 2,5 % da produção mundial em 2005. A busca por produtos naturais sem contaminações de qualquer espécie posiciona o Brasil como potencialidade para fornecedor de mel no mercado

internacional. A biodiversidade de flora, a rusticidade das abelhas e as características do clima são condições adequadas à produção de mel de qualidade.

Outra característica que posiciona o Brasil em vantagem é a possibilidade de produção de mel durante todo o ano, enquanto que em outros países as condições climáticas são limitantes.

No Brasil, o progresso das técnicas de apicultura e a melhoria na qualidade do produto se tornaram necessárias diante das exigências do mercado de exportação. Em março de 2006, a União Européia (UE) interrompeu a compra do mel brasileiro. A medida foi fundamentada em decisão da Federação Européia de Comércio de Produtos do Agronegócio, que teria constatado a perseverança de falhas no sistema de monitoramento de resíduos no mel brasileiro que já tinham sido marcadas por outra missão técnica em 2003 (IEA, 2006).

LEGISLAÇÃO

Os parâmetros físico-químicos para méis brasileiros estão bem definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel, revoga a Portaria nº 367 de 04/09/1997. O regulamento estabelece a definição, a classificação, a designação, a composição, e os requisitos quanto às características físico-químicas, sensoriais, condições de acondicionamento, aditivos, contaminantes, condições higiênicas - critérios macroscópicos e microscópicos - pesos e medidas, rotulagem, amostragem e definição de métodos de análises que deverão ser seguidos (BRASIL, 2000).

A Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando a rotulagem nutricional obrigatória, inclusive para o mel (BRASIL, 2003).

A Portaria nº 50 de 20 de fevereiro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprova os programas de controle de resíduos em vários produtos. O programa inclui o monitoramento de resíduos de vários antibióticos no mel (BRASIL, 2006).

A Instrução Normativa nº 9, de 30 de março de 2007 do MAPA aprova os programas para o ano de 2007 e prevê a execução de análises e, além dos antibióticos, determina o limite máximo de resíduos (LMR) para vários tipos de agrotóxicos como compostos halogenados, organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados (BRASIL, 2007).

A composição e o beneficiamento do mel na UE são regulamentados pela Diretiva 2001/110/EC de 20 de Dezembro de 2001.

A Diretiva estabelece os tipos de méis que podem ser comercializados na UE e dá informações sobre os níveis de umidade, hidroximetilfurfural, atividade enzimática e agrotóxico. Ainda exige que a origem floral e geográfica do mel seja indicada na sua embalagem (NOZAL ET AL., 2005).

COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL

Os parâmetros físico-químicos de amostras de méis são essenciais para a sua caracterização e são primordiais para garantir a qualidade desse produto. Dessa forma, a

caracterização regional de méis é de essencial importância levando-se em consideração a grande diversidade botânica e variação do solo e do clima das distintas regiões.

As análises físico-químicas e polínicas cooperam na fiscalização de méis importados e na influência da qualidade do mel produzido no país. Seus resultados devem ser confrontáveis aos padrões estabelecidos por organismos internacionais protegendo o consumidor de apanhar um produto adulterado (MARCHINI ET AL, 2004).

Análises quantitativas dos elementos do mel que se apresentam em menores teores vêm ganhando maior importância atualmente, dado que, variações nos teores desses componentes são mais adequadas para diferenciar tipos de méis, quando comparado com as variações nos principais componentes (NOZAL ET AL., 2005).

Os métodos de análises para os parâmetros apropriadas às características físico químicas do produto são determinados pela legislação vigente.

A legislação vigente (Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000) constitui como parâmetros mínimos de qualidade físico-química a determinação de indicativos de maturidade (açúcares redutores, sacarose aparente e umidade), de pureza (sólidos insolúveis em água e minerais) e de deterioração (acidez, atividade diastásica e hidroximetilfurfural) (BRASIL, 2000).

AGROTÓXICO NO MEL

Os resíduos de agrotóxicos além de danos à população das abelhas, podem ocasionar danos à saúde humana. Desde a antiguidade quando o homem começou as primeiras atividades agrícolas cultivando plantas de uma mesma espécie ao seu redor deu-se o início, também, do incremento das pragas e das doenças.

Segundo Newman (1979), os primeiros esforços para controlar quimicamente as pragas se deram pelo uso de substâncias tóxicas de ocorrência natural como mercúrio, enxofre e extratos de plantas como nicotina e piretro.

Os agrotóxicos têm um uso bastante amplo, incluindo herbicidas, inseticidas, acaricidas, nematocidas, raticidas, fungicidas e bactericidas (NEWMAN, 1979 citado por VAZ, 1996).

O Decreto nº 4.074, regulamenta a Lei nº 7802/1989 do Ministério da Agricultura e Pecuária, e institui que os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Toxicidade

Fundamentalmente, os agrotóxicos são empregados na agricultura com três objetivos:

- (i) Obtenção de cultivos com alta produtividade,
- (ii) Obtenção de produtos com boa qualidade,
- (iii) Redução do trabalho e gastos com energia.

Desta forma, esses objetivos têm sido alcançados nessas últimas décadas. No entanto, o uso indiscriminado, sem discernimentos e sem conhecimento aprofundado de sua ação e efeitos, trouxe problemas muito sérios ao meio ambiente e, logo, à qualidade de vida do ser humano (VAZ, 1996).

No Brasil, as formulações de agrotóxicos são forçadas a expor, no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade.

Os agrotóxicos estão divididos em quatro classes toxicológicas onde:

- I= rótulo vermelho (extremamente tóxico),
- II= rótulo amarelo (altamente tóxico),
- III= rótulo azul (medianamente tóxico)
- IV= rótulo verde (pouco tóxicos) (ANVISA, 2006).

Resíduos de Agrotóxicos em Mel

A preocupação da população crescente sobre os riscos dos resíduos de agrotóxicos para a dieta tem alterado, profundamente, a estratégia para proteção da colheita, com ênfase na qualidade e segurança alimentar (RISSATO, 2004).

Ao longo das duas últimas décadas, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos no Brasil foi caracterizado por uma série de esforços isolados de órgãos estaduais de saúde, agricultura e instituições de pesquisas. Esse fato sempre evitou que o País tivesse uma noção clara dos níveis de agrotóxicos encontrados em seus produtos agrícolas (ANVISA, 2006).

A utilização dos agrotóxicos na agricultura é aplicada em áreas muito extensas. A contaminação por resíduos de agrotóxicos pode advir acidentalmente, devido a manejo impróprio de agrotóxicos utilizados na agricultura em geral. Por esse motivo, esta prática pode causar poluição e sua presença pode ser mascarada pela dispersão em diferentes locais no ambiente (FERNÁNDEZ, 2001).

Em alguns casos, os produtos químicos usados na influência das pragas fixam nas plantas e afetam outros insetos, diferentes daqueles para os quais os produtos químicos foram desenvolvidos. Desta maneira, distintos agrotóxicos podem ser introduzidos na cadeia alimentar pelas abelhas produtoras de mel, afetando a saúde humana (RIAL-OTERO, 2007).

O uso de agrotóxicos é a principal estratégia empregada no campo para a prevenção e o controle de pragas. Estes compostos, porém, são potencialmente tóxicos ao homem e às abelhas, além de ser uma enorme fonte de contaminação em alimentos.

O controle de agrotóxicos em mel é necessário devido as suas implicações para a saúde humana. Apesar da discordância entre produtores de defensivos e cientistas, acredita-se que os agrotóxicos são culpados pela perda de abelhas em algumas áreas.

A mortalidade das abelhas está proporcionalmente relacionada com a presença de agrotóxicos no pólen, no favo, nas próprias abelhas e no mel (RIAL-OTERO ET AL., 2007).

A fabricação de mel oriundo de florada silvestre está se tornando cada vez mais escassa no Brasil e no mundo. Por esse motivo, recentemente o desenvolvimento da apicultura está cada vez mais dependente das culturas agrícolas e florestais nas quais, em alguns casos, são utilizados agrotóxicos de maneira inadequada (RISSATO, 2006).

Em seu vôo, as abelhas viajam aproximadamente 7 km² para o recolhimento de néctar e do pólen. Durante este processo, diferentes microrganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados ficando armazenados nos pêlos superficiais de seu corpo ou são inalados e unidos em seu aparelho respiratório. Devido a estes fatores, as abelhas podem ser usadas como bioindicadores para monitoramento de impacto ambiental ocasionado por fatores biológicos, químicos e físicos, tais como, parasitas, contaminações industriais ou agrotóxicos (RISSATO, 2006).

Os resíduos de agrotóxicos podem ser localizados no mel preferencialmente por duas rotas de contaminação, indireta e direta. De maneira indireta, quando as abelhas entram em contato com o néctar e com o pólen de flores provenientes de terras antecipadamente pulverizadas. Se a abelha morrer e não retornar à colméia, a rainha e as outras abelhas não estarão contaminadas e a colméia sobreviverá.

Por outro lado, quando as abelhas entram em contato com o agrotóxico e o conduzem para a colméia no seu próprio corpo ou em forma de néctar e pólen contaminados, pode ocorrer à contaminação do mel. De forma direta, por tratamento das colméias para controlar pestes e doenças que elas sofrem (ALBERO, 2004; RISSATO, 2004).

Limites Máximos de Resíduos (LMR'S)

Devido ao risco em possível desses resíduos para a saúde humana, a determinação de um limite máximo de resíduos (LMR) tornou-se necessária a fim de garantir a segurança alimentar.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), LMR é a quantidade máxima de agrotóxico legalmente aceito no alimento, em decorrência da aplicação adaptada numa fase específica, desde sua produção até o consumo. É expressa em miligramas de resíduos por quilograma de alimento (mg kg⁻¹).

A concentração máxima de resíduos de agrotóxicos admitida legalmente no mel, LMR, foi estabelecida por regulamentos de diferentes países. Alemanha, Itália, e Suíça ajustaram o LMR para amitraz, bromopropilato, coumafós, ciamizol, flumetrina e fluvalinato, que oscilaram entre 0,01 e 0,1 mg kg⁻¹ na Alemanha, 5 e 500 mg kg⁻¹ na Suíça, e 10 mg kg⁻¹ na Itália.

A legislação da união européia (EU) regulou o LMR para três acaricidas, amitraz, coumafós e ciamizol, em 0,2, 0,1, e 1 mg kg⁻¹, respectivamente, e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA estabeleceu LMR para amitraz (1 mg kg⁻¹), coumafós (0,1 mg kg⁻¹) e fluvalinato (0,05 mg kg⁻¹). Até agora, os limites máximos de resíduos de agrotóxicos no mel não foram incluídos no Codex Alimentarius (RISSATO, 2006).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), incluiu o mel no Programa de controle de resíduos e contaminantes (PNCR) no ano de 2014. O programa, que foi regulamentado pela Instrução Normativa n° 9 de 30 de março de 2007, prevê a execução de análises e determina o LMR para vários tipos de compostos halogenados, organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados (BRASIL, 2007).

Análises Multirresíduo para Detecção de Agrotóxicos

O uso de agrotóxicos na agricultura tem consequência na ocorrência destes compostos em produtos agrícolas.

O monitoramento destes produtos quanto à presença de contaminantes se torna indispensável devido aos riscos à saúde do consumidor. Apesar disso, para um determinado número de produtos como o mel, há uma limitação no número de métodos de análise multirresíduo de agrotóxicos.

Um dos fatores limitantes para que isso advenha, é a grande diversidade de propriedades físico-químicas proporcionada pelos agrotóxicos, assim como a complexidade da matriz a ser analisada.

Vários métodos para a análise multirresíduos já foram desenvolvidos, porém muitos destes apresentam etapas laboriosas que exigem tempo, dinheiro e acabam gerando uma grande quantidade de resíduos tóxicos (LEHOTAY, 2004).

Os extratos derivados de alimentos são normalmente matrizes muito complexas por possuírem um grande número de interferentes que resultam em problemas durante as análises. Sendo assim, a etapa de preparação das amostras é de vital importância para a afirmação da metodologia. Etapas de pré-tratamento e "clean up" das amostras são laboriosas e exigem uma grande demanda de tempo, uso de grandes quantidades de solventes (CAMPILO, 2006; RIAL-OTERO, 2007).

Técnicas de Extração e Concentração

A extração e a concentração dos analitos das amostras para as análises cromatográficas são de vital importância para o desempenho dos métodos, pois propiciam a concentração dos analitos e a eliminação de possíveis interferentes da matriz. Rial-Otero et al. (2007) apresentam, em uma revisão, o estado da arte para a determinação de agrotóxicos em mel, focalizado no tratamento das amostras e na instrumentação usada.

Para o tratamento das amostras, são descritas várias técnicas como o uso de extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) entre outras. A extração do tipo LLE é também conhecida como extração com solvente ou particionamento. É um método para separar compostos fundamentados nas suas afinidades por dois diferentes líquidos imiscíveis que são, normalmente, a água e um solvente orgânico. O processo incide na extração de uma substância de uma fase líquida para outra de maior semelhança físico - química.

A extração LLE é um método básico em laboratórios químicos e é realizado usando funis de separação. É, também, usada em escala industrial para a separação de compostos derivados de reações químicas.

Segundo Rial-Otero (2007), o método de extração em fase sólida (SPE) é um procedimento de separação que utiliza uma fase sólida ou uma fase líquida sob um suporte sólido para isolar um determinado analito de uma solução.

A SPE é fundamentada na afinidade preferencial dos solutos desejáveis e indesejáveis por um material sólido ou um sólido revestido com um filme líquido ou que apresente cargas superficiais.

A SPE pode ser usada nas etapas de concentração e "clean up" de uma amostra antes da análise cromatográfica ou outros métodos analíticos para quantificar os analitos presentes. A fase sólida adsorvente deve ser condicionada e ativada com um solvente apropriado para que os analitos sejam efetivamente separados da fase líquida.

Para a extração e concentração de compostos hidrofóbicos, usam-se normalmente fases sólidas revestidas com compostos contendo 8, 12 ou 18 átomos de carbono (cartuchos C-8, C-12 ou C-18). Além destas, várias outras fases sólidas são disponíveis, dentre elas as de resinas de troca iônica para a separação de cátions e ânions fracos e fortes.

Fases sólidas de sílica gel ativada e alumina são usadas para a retenção de compostos polares na etapa de limpeza de extratos.

Uma metodologia para extração de resíduos de agrotóxicos empregando fase sólida dispersiva, denominado "QuEChERS (do inglês, quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) foi desenvolvida entre 2000 e 2002 e foi introduzida recentemente por Anastassiades e colaboradores (2003). Embora seja um método muito novo, já foi amplamente aceito pela comunidade internacional de analistas de resíduos de agrotóxicos e uma série de publicações já reportam este método na sua forma original ou com modificações (LEHOTAY, 2004).

O procedimento envolve uma extração inicial com acetonitrila seguido por uma extração / separação após a adição de uma mistura de sais – sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Uma alíquota é transferida para um novo tubo e o procedimento é repetido.

O extrato final em acetonitrila poderá ser analisado por LC ou GC. O "QuEChERS" tem alcance amplo, incluindo agrotóxicos altamente polares bem como altamente ácidos e básicos. Como vantagens, estão a baixa quantidade de solvente, vidraria, bancada e espaços necessários (PAYÁ, 2007).

TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS

Várias tecnologias são utilizadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos são baseadas em métodos cromatográficos. Cromatografia é uma técnica utilizada para a separação dos componentes de uma mistura.

A separação cromatográfica é fundamentada na distribuição dos componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Esta separação procede das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel devido às diferentes interações com a fase estacionária (PERES, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) são técnicas tradicionalmente empregadas nas análises de resíduos de agrotóxicos. São utilizadas para separação e quantificação de substâncias diversas, podendo também ser utilizadas como técnica de identificação quando acopladas a um espectrômetro de massas ou outro detector qualitativo. Suas resoluções são excelentes, sendo possível analisar várias substâncias em uma mesma amostra (multirresíduos).

A sensibilidade da cromatografia é bastante elevada. Dependendo do tipo de substância analisada e detector empregado, podem-se obter resultados quantitativos em valores que variam de picogramas a miligramas (COLLINS, 1997).

Os agrotóxicos são agrupados por técnicas de análise e detecção sendo os organoclorados normalmente analisados por cromatografia gasosa e detector de captura de elétrons (GC-ECD), os organofosforados e nitrogenados por

cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama (GCFPD) ou nitrogênio-fósforo (NPD) e para os carbamatos o uso de HPLC com detector no UV/Vis ou fluorescência (RIAL-OTERO, 2007).

Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é frequentemente empregada para análise de componentes não voláteis e foi utilizada por alguns autores para análise de resíduos de agrotóxicos. A separação por HPLC é baseada na interação e na partição diferencial da amostra entre uma fase líquida móvel e uma fase estacionária.

Os métodos cromatográficos frequentemente utilizados podem ser classificados como: quiral, troca iônica, afinidade/íon par, fase normal, fase reversa e exclusão molecular (US-FDA, 1994).

Para determinação de resíduos de agrotóxicos em mel são utilizadas técnicas de HPLC em fase reversa utilizando colunas do tipo C18 ou octadecilsilano.

A cromatografia em fase reversa com detector ultravioleta-visível (UV-Vis) é a técnica mais comum de detecção de analitos, em que a fase normal usa água como solvente básico. Normalmente, o componente mais polar elui mais depressa que o componente menos polar.

A detecção por UV-Vis pode ser utilizada para todas as técnicas cromatográficas. No entanto, a sensibilidade depende da absorvidade molar dos analitos.

Bernal (1997) adaptou procedimentos utilizados para análise de resíduos em vegetais com extração com solventes e "clean up" para análises em produtos de apiários como mel, cera de abelha, larvas e pólen.

Dois tipos de detectores foram utilizados para determinar e confirmar a presença dos resíduos de um tipo de fungicida nas amostras previamente contaminadas, detector de fluorescência e espectrometria de massas.

Outros tipos de detectores foram utilizados como detector de ultravioleta/visível (UV/vis) na faixa de 210 nm. (JIMÉNEZ, 2000) e 210 a 250nm (KORTA, 2001), arranjo de diodos (MARTEL, 2002), espectrometria de massas com ionização química em pressão atmosférica (APCI-MS) (BLASCO, 2003, BLASCO, 2004a).

Para o estudo de estabilidade de alguns tipos de acaricidas, Korta (2001) utilizou amostras contaminadas com soluções em concentrações de 10 a 25 µg g⁻¹ que ficaram estocadas em temperatura ambiente por nove meses sem exposição direta ao sol.

O HPLC/UV-vis foi utilizado no estudo da cinética para mensurar a diminuição da área do pico dos acaricidas em função do tempo. De acordo com Martel (2002), o HPLC em fase reversa mostrou ser uma alternativa rápida, econômica e simples se comparada ao GC para separação e determinação de acaricidas.

Com o uso da coluna C18 e detector de arranjo de diodos, o autor obteve limites de detecção comparados aos obtidos por GC com detectores de captura de elétrons, nitrogênio-fósforo ou ionização de chama.

Os sistemas de análise de multirresíduos, baseados no uso de HPLC com detectores específicos têm a grande vantagem de proporcionarem evidências de identidade e meios de medir um ou mais agrotóxicos de uma ampla gama de resíduos. Pirard (2007) utilizou a técnica de extração líquido-líquido em

coluna de terra diatomácea seguida da análise por HPLC e espectrometria de massas/massas.

A técnica foi desenvolvida e validada segundo os critérios da ISO 17025 para a identificação e quantificação de 17 diferentes inseticidas em méis da Bélgica.

Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é utilizada por vários autores para análise de resíduos de agrotóxicos em mel. O nitrogênio e o hélio são usados como gás de arraste e as rampas de temperatura variaram de acordo com a coluna escolhida. As colunas comumente utilizadas para determinação dos resíduos são de média e baixa polaridade.

Apesar das variações em comprimento, diâmetro interno e espessura dos filmes os autores utilizam colunas capilares com fases estacionárias com 5% fenilmetilpolisiloxano ou 50% fenilmetilpolisiloxano na maioria dos trabalhos (BERNAL, 1996; LANÇAS, 1997; JIMENEZ, 1998A, 1998B; BERNAL, 2000; RUSSO, 2002; BLASCO, 2003; ALBERO, 2004; BLASCO, 2004B; CAMPILLO, 2006; RISSATO, 2006).

De acordo com Blasco (2004b) a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons tem sido aplicada como técnica preferencial para identificação e quantificação de agrotóxicos organoclorados devido a sua alta sensibilidade por moléculas que contém átomos eletronegativos, entretanto, a técnica requer subsequente confirmação por um detector de espectrometria de massas.

A utilização de detector de captura de elétrons requer atenção na etapa de extração e concentração das amostras. A etapa de “clean-up” ou limpeza das amostras para análises de resíduos de agrotóxicos é muito importante devido à presença de compostos com alto peso molecular que podem contaminar os sistemas cromatográficos quando é utilizado esse tipo de detector. Os interferentes tornam a interpretação dos cromatogramas difícil por causa dos picos sobrepostos (RISSATO, 2004).

Detecção por Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas pode ser considerada como uma das técnicas analíticas de maior importância por permitir a elucidação estrutural de compostos desconhecidos pelos espectros de massas característicos e a quantificação de moléculas conhecidas pelas intensidades dos íons produzidos.

Os detectores por espectrometria de massas são usados para a produção de íons (positivos ou negativos) e a subsequente separação dos íons de acordo com a relação entre suas massas/cargas (m/z).

Os espectrômetros de massas podem ser usados em combinação com as técnicas de separação do tipo cromatografia gasosa e líquida (GC e HPLC). Estes instrumentos combinados são chamados de instrumentos acoplados (hyphenates); por exemplo, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) ou cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

Os espectrômetros de massas consistem de uma interface para a introdução dos analitos, uma região de produção de íons (ionização), uma região de separação dos íons – analisador (m/z) e um detector.

As regiões do analisador e do detector trabalham sobre pressões reduzidas (vácuo). Em alguns casos, a interface e a região de ionização são localizadas no mesmo espaço, particularmente verdadeiro para as técnicas acopladas à cromatografia líquida - “electrospray, Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)”.

A fonte de ionização mais comum em espectrometria de massas é a ionização por elétrons (EI - electrons ionization), a qual emprega um filamento aquecido para gerar elétrons com energia suficiente para provocar ionização nos analitos de interesse. Os íons formados são direcionados para o analisador, cuja função é separá-los de acordo com sua relação massa/carga (m/z).

Os analisadores de massas mais utilizados no presente são os quadrupolos e os íons “trap”, sendo que analisadores do tipo “time-of-flight” começaram a se tornar mais popular (LANÇAS, 2004).

Em equipamentos de cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas, utilizam-se como interfaces e fonte de ionização técnicas de ionização em pressão atmosférica (API) Dentre elas, a ionização por “electrospray”, onde para a formação dos íons em fase gasosa, uma solução contendo os analitos é bombeada por um capilar muito fino e, na sua extremidade, uma alta voltagem (em torno de 4000 V) é aplicada.

Há a formação de gotas (spray eletrolítico), contendo um excesso de cargas positivas (analito ionizado). As gotas são atraídas para o contra eletrodo e diminuem de tamanho, devido à evaporação do solvente pela passagem de um gás inerte aquecido como o nitrogênio.

As moléculas ionizadas, protonadas ou deprotonadas, são introduzidas no analisador de massas e suas razões m/z determinadas. Poderão ser analisados íons positivos ou negativos. Espectros de massas obtidos nos modos positivo e negativo são representados pelas siglas ESI(+)-MS e ESI(-)-MS, respectivamente.

Rissato (2006) desenvolveu um método multiresíduo para determinação e confirmação de 48 agrotóxicos de diferentes classes (organoalogenados, organofosforados, piretróides e organonitrogenados) em mel utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, operando em modo de íon seletivo (GC-MS-SIM) para monitoramento da contaminação regional usando o mel como bioindicador.

Na literatura são descritas várias metodologias baseadas em análises cromatográficas objetivando a determinação de teores de agrotóxicos em mel.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mel é um alimento e a sua contaminação com agrotóxico torna o produto impróprio o consumo humano. É necessário que haja um cuidado com o seu manejo do mel e na aplicação correta de agrotóxico, diminuindo os riscos de contaminação e proporcionando a proteção ao indivíduo e ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERO, B., SANCHEZ-BRUNETE, C. e TADEO, J. L. Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.*, v.52, p.5828-5835, 2004.

- ALMEIDA, D. **Espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em área de cerrado do município de Pirassununga, Estado de São Paulo.** 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., ŠTAJNBAHER, D., et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **J. AOAC.** v. 86, p 412-431. 2003.
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chem.**, v.63, p. 549-562, 1998.
- ANVISA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos Pesticide residues in food. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, p. 361-363, 2006.
- ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; et al. **Residue analysis of 500 high priority pesticides Better** by GC–MS or LC–MS/MS?. *Mass Spectrom. Rev.* v.25, p. 838– 865. 2006.
- ARAUCO, E.M.R. **Avaliação da qualidade do mel e atividade da enzima invertase em Apis mellifera L. africanizada.** 2005. 109 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu, Botucatu.
- ARRUDA, C.M.F. **Características físico-químicas e polínicas de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) da região da Chapada do Araripe, município de Santana do Cariri, Estado do Ceará.** 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; CHALHOUB, C.; GOTSIOU, P.; et al. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.45, p.193-203, 2005.
- AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A., SOUZA, S. R.; et al. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of Apis mellifera of different floral origins. **Food Chem.**, v.80, p.249-254, 2003.
- BALAYIANNIS, G.E BALAYIANNIS, P. **Bee Honey as an Environmental Bioindicator of Pesticides’ Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece.** *Arch Environ Contam. Toxicol.* 2007.
- BARAKAT A. A.; BADAWY H. M. A.; SALAMA E.; et al. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. **J. Food Agr. Environ.**, v.5, p.97-100, 2007
- BARONI, M. V.; CHIABRANDO, G. A.; COSTA, C.; et al. Assessment of the floral origin of honey by SDS-page immunoblot techniques. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.1362-1367, 2002.
- BARONI, M. V.; NORES, M. L.; DIAZ, M. D.; et al. Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, p.7235-7241, 2006.
- BASTOS, D. H. M.; FRANCO, M.; SILVA, M. et al. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.22, p.2002.
- BENETTI, C.; PIRO, R.; BINATO, G.; et al. Simultaneous determination of lincomycin and five macrolide antibiotic residues in honey by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS/MS).. **Food Addit. Contam.**, v.23, p.1099-1108, 2006.
- BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J. A.; RTVERA, J.M et al. Determination of the fungicide vinclozolin in honey and bee larvae by solid-phase and solvent extraction with gas chromatography and electroncapture and mass spectrometric detection. **J. Chromatogr.** v.754, p.507-513, 1996.
- BERNAL, J. L.; JIMÈNEZ, J. J. DEL NOZAL, M. J. A et al. Gas chromatographic determination of acrinathrine and 3- phenoxybenzaldehyde residues in honey. **J. Chromatogr.**, v.882, p.239-243, 2000.
- BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; TORIBIO, L.; et al. High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples. **J. Chromatogr.** , v.787, p.129- 136, 1997.
- BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; TORIBIO, L.; et al. A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. **J. Sep. Sci.**, v.28, p.1039-1047, 2005.
- BLASCO, C.; FERNNDEZ, M.; PENA, A.; et al. Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.8132-8138, 2003.
- BLASCO, C.; LINO C.M.; PICÓ, Y.; et al. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1030, p.77-85, 2004a.
- BLASCO, C.; LINO C.M.; PICÓ, Y; et al. Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. **J. Chromatogr. A**, v.1049, p.155- 160, 2004b.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a **Lei nº 7.802**, de 11/07/1989.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 360**. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 11 de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 50**. Programas de Controle de Resíduos em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 9 de 30 de março de 2007**. Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2007. 1, p. 7, 2007.
- CAMPILLO, N.; PENALVER, R.; AGUINAGA, N.; ET.AL. Solid-phase microextraction and gas chromatography with atomic emission detection for multiresidue determination of pesticides in honey. **Analytica Chimica Acta**, v. 562, p. 9–15, 2006.
- CAMPOS, G. **Melato no mel e sua determinação através de diferentes metodologias**. 1998. 178 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CASTRO-VAZQUEZ, L., DIÁZMAROTO, M. C.e REZ-COELLO, S. P. Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 4809-4813, 2006.
- COLLINS, C. H. **Introdução a métodos cromatográficos**. Ed.UNICAMP, Campinas, 1997.
- CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; et al. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.1844-1849, 1998.
- CRANE, E. **O livro do mel**. 2a ed. São Paulo: Nobel, 1998.
- CODEX ALIMENTARIUS METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2001.
- ERNEY, D. R.; GILLESPIE, A. M E GILVYDIS D. M. Matrix-induced peak enhancement of pesticides in gas chromatography: Is there a solution. **Journal of Chromatography A**, v. 638, p.57- 63, 1993.
- FERNÁNDEZ, M., et al Determination of organophosphorus pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. **J. Chromatogr. A**, p. 257–265, 2001.
- FERNÁNDEZ M.; PICÓ, Y.; MANES, J. Rapid Screening of Organophosphorus Pesticides in Honey and Bees by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Chromatographia**, v., 56, p. 577-583, 2002.
- FERNÁNDEZ, M. SANCHO, M. T.; GÁNDARA, J S.; et al. Organochlorine pesticide residues in Galician (NW Spain) **Honeys Apidologie**. v.26. p. 33 – 38. 1995.
- HERMOSIN, I.; CHICON, R. M. e CABEZUDO, M. D. Free amino acid composition and botanical origin of honey. **Food Chem.**, v.83, p.263-268, 2003.
- HASSANI, A. K. E.; DACHER M. ; GAUTHIER M.; et al. Effects os sublethal doses of fipronil on the bahavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharm. Biochem. Behav.**, **Oxford**, v. 82, n. 1, p. 30- 39. 2005.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQCGCRE- 008, 2003.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. 2nd Edition, 1997. JIMÈNEZ J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M.J.; et al. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. **J. Chromatogr. A**, v.829, p. 269– 277,1998a.
- JIMÈNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; et al. Capillary gas chromatography with mass spectrometric and atomic emission detection for characterization and monitoring chlordimeform degradation in honey. **J. Chromatogr. A**, v. 946, p.247-253, 2002.
- JIMÈNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M.J.; et al. Determination of rotenone residues in raw honey by solidphase extraction and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, v.871, p.67-73, 2000.
- JIMÈNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M.J.;et al. Gas chromatography with electron-capture and nitrogenphosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil column. Influence of the honey matrix on the quantitative results. **J. Chromatogr. A**, v.823, p.381-387, 1998b.
- JÚNIOR, H. A. M.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. P.; et al. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). **Quim. Nova**, v.29, p.2006.
- KAROUI, R.; DUFOUR, E.; BOSSET, J. O.; et al. J. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. **Food Chem.**, v.101, p.314- 323, 2007.
- KORTA, E.; BAKKALI, A. L.; BERRUETA, A.; et al. Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.5835-5842, 2001.

- LANÇAS, F. M., **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, v.6, São Carlos, Editora RiMa, 2004.
- LEOTHAY, S. J. **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticide Residues**. In Press *Pesticide Analysis in Methods in Biotechnology*, Eds. J.L. Vidal Martinez and A. Garrido Frenich, Humana Press, USA. Nov, 2004.
- LOPEZ, M.; FELDLAUFER, M.; WILLIAMS, A. D.; et al. Determination and confirmation of Nitrofurans Residues in Honey Using LC-MS/MS. **J. Agric. Food Chem.** v. 55, p. 1103-1108, 2007.
- MALASPINA, O.; SOUZA, T. F. et al. **Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a agricultura brasileira**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 17 E DE MELIPONICULTURA, 3, Belo Horizonte, MG, CD-ROM .2008.
- MARCHINI, L.C., SODRÉ, G. S.; MORETI, A. C.; et al. Composição físico-química de amostras de méis de Apis melifera L. do Estado do Tocantins, Brasil. *Bol. Ind. Anim.*, p.101-114, 2004..
- MOELLER, N.; MUELLER-SEITZ, E.; SCHOLZ, O.; et al. A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor. *Eur. Food Res. Technol.*, v.224, p.285-292, 2007.
- NEWMAN, J.F. Pesticides. In: *Pesticides application methods*. Singapore: Logman & Technical. Cap.1, p.1-16, 1979.
- NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; et al. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.3095- 3100, 2005.
- PANG, G. F; et al. Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Addit. Contam.**, v. 23, No 8, p. 777–810, 2006.
- PATZOLD, R. e BRUCKNER, H. Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as result of the Maillard reaction. *Eur. Food Res. Technol.*, v.223, p.347-354, 2006.
- PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MARK, D.; et. Al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. **Anal Bioanal Chem.** v. 389:1697–1714, 2007.
- PEREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; et al. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p.360-365, 2007.
- PICO, Y, BLASCO, C. E FONT, G. Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide residue analysis: an overview. **Mass Spec. Rev.**, v. 23, p, 45–85, 2004.
- PIRARD, C.; WIDART J.; NGUYENB, B.K.; et al. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v.1152, p.116-123, 2007.
- PIRINI, A.; CONTE, L. S.; FRANCIOSO, O. et al. Capillary Gas-Chromatographic Determination of Free Amino-Acids in Honey As A Means of Discrimination Between Different Botanical Sources. *Hrc- J. High Res. Chrom.*, v.15, p.165-170, 1992.
- POOLE, C. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1158, p. 241–250, 2007.
- RIAL-OTERO, R.; et al. Chromatographic based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Talanta**, v.71, p.503-514, 2007.
- RISSATO, S, GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N. et al. Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de agrotóxicos na região de Bauru (SP) usando mel como bioindicador. **Quim. Nova**, v. 29, No. 5, p.950- 955, 2006.
- RISSATO, S. LIBÂNIO, M., GIAFFERIS, G. P.; et al. Determinação de agrotóxicos organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP) **Quim. Nova**, v. 27, No. 5, 739-743, 2004b.
- RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N.; et al. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. **J. Chromatogr. A**, v.1048, p.153-159, 2004a.
- SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO B.; MARTÍN G.; et al. Determination of Pesticide Residues by GC-MS Using Analyte Protectants to Counteract the Matrix Effect **Anal.Sci.**, v. 21, p. 1291- 1296, 2005.
- SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; ALBERO, B. et al. Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography. *Spa. J. Agr. Res.*, v. 6 (Special issue), p. 7-14, 2008.
- SHEN, H. Y. e JIANG, H. L. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UV, GCECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCISIM methods. **Anal. Chim. Acta**, v.535, p.33-41, 2005.

SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias. **Normas de uso de praguicidas da Sucen**. Sorocaba, SUCEN, Serviço Regional, 1990.

US-FDA Confirmation Of Multiple Phenicol Residues In Honey By Electrospray LC/MS. **Laboratory Information Bulletin**, v.18, n. 5,2002.

VARGAS, T. **Avaliação da qualidade de mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná**. 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de

Alimentos) Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

VAZ, C. M, R, et al Análise de agrotóxicos por técnicas eletroanalíticas. Comunicado técnico. **Embrapa** Nº 7, p.1-12, 1996.

VOLANTE, M.; GALARINI, R.; MIANO, V.; et al. A SPME-GC-MS Approach for Antivarroa and Pesticide Residues Analysis in Honey. **Chromatographia**, v. 54, p. 241-246, 2001.