



**FURG**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE

**ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS-EQA**  
**CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**Investigação da ocorrência de agrotóxicos, 5-  
hidroximetilfurfural e furfural em amostra de mel**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Luanne Ramos Lima**

Rio Grande

2022

---

**Investigação da ocorrência de agrotóxicos, 5-  
hidroximetilfurfural e furfural em amostra de mel**

**Por**

**Luanne Ramos Lima**

Trabalho apresentado ao curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Química**.

**Orientador(a): Ednei Gilberto Primel**

Rio Grande, RS, Brasil

2022

---

## DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE E AUTENTICIDADE

Eu, **Luanne Ramos Lima**, declaro que este trabalho é de minha autoria, tendo sido elaborado com base nos recursos aos quais faço referência ao longo do texto e experiências no decorrer do referido trabalho.

*Luanne Ramos Lima*

---

Assinatura do Orientando

Rio Grande, 12 de Agosto de 2022.

*“Ainda que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam,  
Deus é a minha força, ele é tudo o que sempre preciso.”*

*Salmos 73:26*

---

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve presente em todo o processo de elaboração, escrita e conclusão desse trabalho. Sua força foi o combustível para concluir essa etapa, sem você nada faria sentido.

A minha família, que sempre acreditou em mim e me deu suporte nos dias maus. Seus ensinamentos me instruem em cada etapa da minha história. Em especial, a minha irmã Larissa, que nunca deixou de dizer palavras de incentivo e fé. Sua ajuda foi essencial para mim.

A meu amigo Gerson, que me auxiliou nas etapas deste trabalho, me trouxe alegria e alívio nos dias mais intensos deste processo.

A minha igreja e amigos, que me trouxeram ânimo nessa caminhada.

A todos os professores e colegas da faculdade, que contribuíram no meu aprendizado e formação. Cada conhecimento passado formaram a base necessária para a realização deste trabalho.

A todos os estudantes, técnicos e professores que fazem e fizeram parte do LACOM, todos vocês contribuíram para minha formação acadêmica e profissional em química. Sou grata pela oportunidade e ensinamentos que fizeram diferença na minha formação. Em especial, agradeço a Sergi que me deu todo o suporte necessário nas análises realizadas no LACOM, você me ensinou muito e colaborou imensamente para o desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço a todos alunos de iniciação científica que me auxiliaram nos dias de análises.

A FURG, por proporcionar um ambiente de crescimento e aprimoramento dos estudantes, essa instituição me deu suporte para estudar e realizar um sonho.

---

## RESUMO

### **Investigação da ocorrência de agrotóxicos, 5-hidroxiacetilfurfural e furfural em amostra de mel**

**Autor: Luanne Ramos Lima**

**Orientador: Ednei Gilberto Primel**

Rio Grande, 12 de agosto de 2022

O mel é um produto alimentício composto por açúcares, água, proteínas, aminoácidos, outros compostos orgânicos, compostos voláteis e minerais. Suas propriedades físico-químicas dependem da flora, clima, região geográfica e espécie de abelha que o produziu. Porém algumas reações químicas podem modificar suas propriedades e formar compostos indesejáveis, como o 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) e furfural alterando o sabor e sua qualidade. O 5-HMF e o furfural são compostos do grupo dos furanos, que são formados no mel quando ele é submetido a tratamento térmico ou passa por longo período de armazenamento. A determinação do 5-HMF é utilizada como parâmetro de qualidade do mel, pois mede o frescor, tempo de armazenamento e uma possível adulteração. Em altas concentrações o 5-HMF se torna tóxico, por esta razão a legislação brasileira determina como quantidade máxima permitida de 5-HMF no mel a concentração de 60 mg kg<sup>-1</sup>. E em altas concentrações o furfural leva ao estresse oxidativo e ocorrência de doenças cardiovasculares. Além disso, a ocorrência de agrotóxicos em amostras de mel também tem sido relatada e a legislação brasileira estabelece o limite máximo de resíduos de agrotóxicos no mel, uma vez que podem ocasionar danos à saúde humana em determinadas concentrações. Então é necessário que a ocorrência dessas substâncias seja analisada para a comercialização de um produto seguro e de qualidade. Para a determinação de compostos em baixas concentrações e minimização de interferentes, é necessário um preparo de amostra antes da determinação. Uma das técnicas de preparo de amostra que se destaca por sua facilidade, utilização de poucas vidrarias, pouca quantidade de amostra e de solventes orgânicos é o método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*). Esse método tem sido empregado na determinação de diversas classes de agrotóxicos em amostras de mel. Por essa razão, este trabalho tem como objetivo analisar e quantificar o 5-HMF, furfural e agrotóxicos presentes em amostras de mel, empregando o método QuEChERS citrato e cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (LC-DAD, do inglês *Liquid Chromatography with Diode Array Detector*), fornecendo dados sobre a qualidade de méis comerciais na região Sul do Rio Grande do Sul.

Palavras chaves: mel; 5-HMF; furfural; agrotóxicos; QuEChERS.

---

## Abstract

Honey is a food product composed of sugars, water, proteins, amino acids, other organic compounds, volatile compounds, and minerals. Its physicochemical properties depend on the flora, climate, geographical region, and the species of bee that produced it. However, some chemical reactions can modify its properties and form undesirable compounds, such as 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and furfural, altering the taste and quality. 5-HMF and furfural are compounds from the furan group, which are formed in honey when it is subjected to heat treatment or goes through a long storage period. The determination of 5-HMF is used as a quality parameter of honey because it measures the freshness, storage time and possible adulteration. In high concentrations, 5-HMF becomes toxic, that's why the Brazilian legislation determines as maximum amount allowed of 5-HMF in honey the concentration of 60 mg kg<sup>-1</sup>. And in high concentrations furfural leads to oxidative stress and cardiovascular diseases. Moreover, the occurrence of pesticides in honey samples has also been reported and the Brazilian legislation establishes the maximum limit of pesticide residues in honey, since they can cause harm to human health in certain concentrations. So it is necessary that the occurrence of these substances is analyzed for the commercialization of a safe and quality product. For the determination of compounds at low concentrations and minimizing interferences, a sample preparation is necessary before the determination. One of the sample preparation techniques that stands out for its ease, use of few glassware, small amount of sample and organic solvents is the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe). This method has been used in the determination of several classes of pesticides in honey samples. For this reason, this work aims to analyze and quantify the 5-HMF, furfural and pesticides present in honey samples, using the QuEChERS citrate method and liquid chromatography with diode array detector (LC-DAD), providing data on the quality of commercial honeys in the southern region of Rio Grande do Sul.

Keywords: honey; 5-HMF; furfural; pesticides; QuEChERS.

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1-</b> Estrutura química do 5-HMF e furfural .....	19
<b>Figura 2-</b> Estrutura química dos agrotóxicos de estudo.....	25
<b>Figura 3-</b> Espectro de absorção característico para cada analito no LC-DAD (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L <sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b).....	41
<b>Figura 4-</b> Espectro de absorção característico dos analitos que eluam no LC-DAD respectivamente, o imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L <sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b).....	42
<b>Figura 5-</b> Espectro de absorção característico dos analitos que eluam no LC-DAD respectivamente, o imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L <sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b).....	43
<b>Figura 6-</b> Espectro de absorção característico dos analitos que eluam no LC-DAD, respectivamente, o imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L <sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b).....	43
<b>Figura 7-</b> Espectro de absorção característico dos analitos que eluam no LC-DAD, respectivamente, o imidacloprido, composto não identificado e azoxistrobina (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L <sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b).....	44
<b>Figura 8-</b> Espectro de absorção característico dos analitos que eluam no LC-DAD, respectivamente, o imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L <sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b).....	45
<b>Figura 9-</b> Separação cromatográfica no LC-DAD dos agrotóxicos estudados.....	46
<b>Figura 10-</b> Espectro obtido por LC-DAD, corresponde à cada analito tiametoxam, imidacloprido, azoxistrobina e fipronil.....	47
<b>Figura 11-</b> Mel de eucalipto (A), nativa (B) e de eucalipto (C), utilizados na aplicabilidade do método e seus respectivos extratos (1,2,3).....	52



---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Informações e parâmetros físico-químicos dos analitos estudados.....	19
<b>Tabela 2-</b> Revisão de artigos que determinam 5-HMF em alimentos, a partir de 2018.....	20
<b>Tabela 3-</b> Informações e parâmetros físico-químicos dos analitos estudados.....	26
<b>Tabela 4-</b> Revisão de artigos que determinaram resíduo de agrotóxico em méis, a partir de 2016.....	28
<b>Tabela 5-</b> Revisão de artigos que usaram LC-DAD para diferentes matrizes, a partir de 2016.....	31
<b>Tabela 6-</b> Características das amostras de mel usadas no trabalho.....	37
<b>Tabela 7-</b> Descrição do gradiente 4.....	45
<b>Tabela 8-</b> Resultados obtidos para as curvas analíticas.....	48
<b>Tabela 9 -</b> LD e LQ para os agrotóxicos, LMR no Brasil e EU.....	48
<b>Tabela 10-</b> Recuperação (R%) do método QuEChERS citrato e LC-DAD para agrotóxicos em amostras de mel fortificadas em diferentes níveis .....	49
<b>Tabela 11 -</b> Precisão instrumental (RSD%) avaliada pela repetibilidade para LC-DAD....	50
<b>Tabela 12 -</b> Resultados obtidos para a curva na FM.....	51

---

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1 -</b> Reclassificação toxicológica dos agrotóxicos.....	22
---	----

---

## LISTA DE SIGLAS

**2,4-D** - 2,4-Diclorofenóxiacético

**5-HMF** - 5-Hiroximetilfurfural

**MeCN** - Acetonitrila

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**AOAC**- Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

**DAD** - Detector por Arranjo de Diodos

**DDT** - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

**DLLME** - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

**D-SPE** - Extração em Fase Sólida Dispersiva, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*

**EPA** - Agência Nacional de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*

**EU** - União Europeia

**FM** - Fase Móvel

**GC** - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

**GHS** - Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

**HPLC-MS/MS** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *High Performance Liquid Chromatography tandem Mass*

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**INMETRO** - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

**Koc** - Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

**Kow** - Coeficiente de partição octanol-água

**LC** - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

**LD** - Limite de Detecção do Método

**LLE** - Extração Líquido-Líquido, do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*

**LMR** - Limite Máximo de Resíduo

**LQ** - Limite de Quantificação do Método

---

**LTP** - Purificação a Baixa Temperatura , do inglês, *Low-Temperature Purification*.

**m/z** - Razão massa carga

**MAE** - Extração Assistida por Microondas, do inglês *Microwave Assisted Extraction*

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MeOH** – Metanol

**MSPE** – Extração Magnética em Fase Sólida, do inglês, *Magnetic Solid-Phase Extraction*

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**pKa** - Potencial de dissociação ácida

**PNCRC** - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

**PNDA** - Programa Nacional de Defensivos Agrícolas

**QuEChERS** - Método rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*

**r** - Coeficiente de correlação

**rpm** - Rotação por minuto

**RSD** - Desvio Padrão Relativo, do inglês, *Relative Standard Deviation*

**SDLLME** - Extração Assistida por sal com Microextração Dispersiva Líquido-Líquido baseada em acetona, do inglês, *Acetone-Based Salting-Out Assisted Extraction With The Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

**SFE** - Fluido Super Crítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*

**SPE** - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

**SPME** - Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

**t<sub>R</sub>** - Tempo de retenção

**UAATPE** - Extração Aquosa Bifásica Assistida por Ultrassom, do inglês, *Ultrasonic-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction*

**UA-CPE** - Extração de Ponto de Nuvem Assistida por Ultrassom, do inglês, *Ultrasonic Assisted Cloud Point Extraction*.

**UV** – Ultravioleta

**VADLLME** - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Assistida por Vórtex, do inglês, *Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

**v/v** - Relação Volume/Volume

---

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
3.1.1 <i>Mel.....</i>	16
3.1.2 <i>5-hidroximetilfurfural e furfural.....</i>	17
3.1.3 <i>Agrotóxicos.....</i>	20
3.1.4 <i>Preparo de amostra.....</i>	26
3.1.5 <i>Técnicas cromatográficas para determinação de agrotóxicos.....</i>	27
3.1.6 <i>Validação.....</i>	32
<b>3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>34</b>
3.2.1 <i>Instrumentação.....</i>	34
3.2.2 <i>Reagentes, solventes e materiais.....</i>	35
3.2.3 <i>Preparo das soluções analíticas.....</i>	35
3.2.4 <i>Amostras de mel e aplicabilidade.....</i>	36
3.2.5 <i>Preparo de amostra.....</i>	36
3.2.6 <i>Otimização do sistema cromatográfico LC-DAD para os agrotóxicos.....</i>	37
3.2.7 <i>Determinação de 5-HMF e furfural.....</i>	37
3.2.8 <i>Curvas analíticas e linearidade.....</i>	38
3.2.9 <i>Limites de detecção e quantificação.....</i>	38
3.2.10 <i>Precisão (Repetibilidade).....</i>	38
3.2.11 <i>Exatidão (Recuperação).....</i>	39
3.2.12 <i>Resíduos.....</i>	39
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 AGROTÓXICOS SELECIONADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO LC-DAD.....</b>	<b>39</b>
4.2.1 <i>Otimização da fase móvel.....</i>	39
4.2.2 <i>Avaliação do comprimento de onda de máxima absorção.....</i>	46
<b>4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....</b>	<b>47</b>
4.3.1 <i>Linearidade e curvas analíticas.....</i>	47
4.3.2 <i>Limites de detecção e quantificação.....</i>	48
4.3.3 <i>Exatidão (recuperação).....</i>	49
4.3.4 <i>Precisão (repetibilidade).....</i>	50
<b>4.4 5-HMF E FURFURAL.....</b>	<b>50</b>
<b>4.5 APLICABILIDADE DO MÉTODO.....</b>	<b>51</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

O mel é um produto alimentício produzido por abelhas ou insetos sugadores, que coletam o néctar de flores, transformam, armazenam e o amadurecem nos favos da colmeia (BRASIL, 2000). O mel é um alimento viscoso, doce, aromático, com cor e propriedades que dependem da flora, do clima, da região geográfica e espécie de abelha produtora do mel (DA SILVA et al., 2016; TURKUT et al., 2018).

No Brasil nos últimos anos houve crescimento na produção de mel de abelhas, esse crescimento foi de aproximadamente 29,82% comparando os anos de 2016 e 2020 (IBGE, 2020). Na região do Rio Grande do Sul nesse mesmo período, o crescimento na produção de mel foi de aproximadamente 18,83%. O Rio Grande do Sul é o 2º estado produtor de mel do país, segundo dados do IBGE (2020).

O mel é constituído principalmente por açúcares, água e outras substâncias em menor proporção, como proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais e compostos voláteis (DA SILVA et al., 2016; DE MELO et al., 2018; MATOVIC et al., 2018). Os principais açúcares presentes nos méis são os monossacarídeos: glicose e frutose. Os açúcares são responsáveis pela viscosidade, valor energético e granulação do mel (DA SILVA et al., 2016).

Os açúcares podem sofrer reações químicas quando passam por tratamento térmico ou por longo período de armazenamento, essas reações podem modificar as propriedades do mel. Essas reações, geralmente, são reações de escurecimento não enzimático como a reação de Maillard, caramelização e degradação do açúcar em meio ácido (DA SILVA et al., 2016).

Na reação de Maillard é formado o 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) e o furfural, o 5-HMF é um intermediário que pode ser formado pela desidratação de açúcares em condições ácidas, e ambos podem ser formados quando o mel passa por tratamento térmico ou longo período de armazenagem (DA SILVA et al., 2016, FOGLIANO et al., 2011, FRANCISQUINI et al., 2017, TURKUT et al., 2018).

O 5-HMF é um dos parâmetros de qualidade do mel. Baixas concentrações de 5-HMF é um indicativo de mel fresco ou com pouco tempo de armazenagem. E altos valores podem indicar adulterações ou longo período de armazenamento do mel. Também altas concentrações de 5-HMF podem torná-lo volátil e tóxico (DA SILVA et al., 2016; KHALIL et al., 2015). No Brasil, a Instrução Normativa N° 11 de 2000 estabelece como quantidade máxima de 5-HMF no mel 60 mg kg<sup>-1</sup>.

---

Outro parâmetro importante de ser investigado no mel é a presença de agrotóxicos. Essas substâncias são utilizadas na agricultura para o controle de pragas e podem atingir o mel, uma vez que as abelhas buscam o néctar das flores, as quais podem estar contaminadas por agrotóxicos, e o utilizam na produção do mel (GAWEL et al., 2019).

A presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos pode gerar alguns malefícios a saúde humana, como distúrbios imunológicos, doenças carcinogênicas e distúrbios neurológicos (ALMEIDA et al, 2020). Alguns estudos recentes relataram a presença de resíduos de agrotóxicos em méis em diversas regiões do mundo, sendo uma delas o Brasil (ALMEIDA et al., 2020; DAL BELLO et al., 2021; GAWEL et al., 2019; KAMMOUN et al., 2019; LASHERAS et al., 2021; MRZLIKARA et al., 2019; ORSO et al., 2016). Esses estudos revelam a importância de investigar a presença de agrotóxicos, bem como, suas concentrações em méis.

As concentrações encontradas de resíduos de agrotóxicos em méis são baixas, por isso é necessário um preparo de amostra antes da quantificação dessas substâncias. Um dos métodos de preparo de amostra que tem sido empregado nos estudos de agrotóxicos no mel, é o método QuEChERS (do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*).

Para a determinação de agrotóxicos, 5-HMF e furfural, uma das técnicas cromatográficas que pode ser empregada é a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (LC-DAD, do inglês *Liquid Chromatography with Diode Array Detector*). A cromatografia líquida é uma técnica muito usada porque consegue determinar ampla faixa de resíduos, tem boa seletividade e sensibilidade e o DAD tem alta resolução espectral, fornecendo informações qualitativas, além de possibilitar a confirmação dos compostos de interesse e a pureza do pico (CALDAS, 2009; ORSO et al., 2016).

Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de agrotóxicos, 5-HMF e furfural nos méis para avaliar a qualidade desse alimento na região Sul do Rio Grande do Sul.

## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho tem como objetivo investigar a presença de agrotóxicos, 5-HMF e furfural e quantificá-los em amostras de méis usando como preparo de amostra o método QuEChERS e detecção por LC-DAD.

### **2.1 Objetivos específicos**

- 
- Avaliar parâmetros de determinação de agrotóxicos por LC-DAD;
  - Validar o método empregando QuEChERS e LC-DAD para determinação de agrotóxicos empregando as figuras de mérito: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão;
    - Aplicar o método QuEChERS citrato para extração dos agrotóxicos azoxistrobina, fipronil, imidacloprido e tiametoxam em méis;
    - Determinar 5-HMF e furfural em méis por LC-DAD usando método validado por Marcolin e colaboradores (2021).



---

### 3. DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 Revisão Bibliográfica

##### 3.1.1 Mel

O mel é um alimento produzido por abelhas e insetos sugadores que tem composição de glicose, frutose e água em maior proporção. Outras substâncias também constituem o mel em menor quantidade, como proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais e compostos voláteis (DA SILVA et al., 2016; MACHADO DE-MELO et al., 2018; MATOVIC et al., 2018).

Os açúcares presentes no mel são principalmente de monossacarídeos, glicose e frutose, cerca de 65% a 80% dos sólidos totais presentes no mel, seguido pelos dissacarídeos e trissacarídeos, que são hidrolisados por enzimas em monossacarídeos (DA SILVA et al., 2016).

O mel tem aroma, cor e sabor que são característicos da região geográfica, espécies de flores, clima e espécie de abelhas produtoras deste mel. Esses parâmetros podem ser alterados pelo processamento, manipulação, embalagens, período de armazenamento e clima produzido (DA SILVA et al., 2016; TURKUT et al., 2018).

O escurecimento do mel pode ser desenvolvido no processo de armazenamento, vinculado com a temperatura de armazenagem e com a composição do mel. Os açúcares são um dos componentes que podem sofrer alteração pelo tempo de armazenamento, como reações de hidrólise enzimática (DA SILVA et al., 2016), também pode ocorrer a variação do conteúdo de açúcares no mel, como o aumento da glicose e frutose e diminuição da sacarose, como indica o estudo de Rybak-Chmielewska (2007). A glicose teve aumento de 8,8%, a frutose aumentou 7% e a sacarose diminuiu em 79% em temperatura ambiente de 20°C em comparação com sua quantidade inicial em 4 °C. Além disso, houve mudanças na cor e sabor do mel.

Para regulamentar e assegurar um produto de qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabeleceu valores para alguns parâmetros físico-químicos que o mel de *Apis mellifera* deve apresentar. Esses requisitos são determinados pela Normativa N°11 de 20 de outubro de 2000, que preconiza as quantidades de açúcares redutores, umidade, sacarose, sólidos solúveis, minerais, acidez, atividade diastásica e 5-HMF. O mel deve apresentar no máximo 60 mg kg<sup>-1</sup> de 5-HMF e deve ter armazenamento apropriada para evitar contaminações (BRASIL, 2000).

---

Além dos parâmetros de identidade do mel, o MAPA estabelece a quantidade de agrotóxicos em mel pelo Limite Máximo de Resíduo (LMR), que está descrito no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). O objetivo do PNCRC é promover a segurança química dos alimentos que tem origem animal (MAPA, 2017). O LMR de agrotóxicos no mel varia de 0,3 a 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (BRASIL, 2013).

### 3.1.2 5-hidroximetilfurfural e furfural

O 5-HMF é um composto do grupo dos furanos, formado como produto intermediário na reação de Maillard. Ele também é formado na reação de caramelização e contribui para sabor, cor e aroma desejado em alimentos aquecidos, porém pode atribuir substâncias marrons e de sabor indesejados nos alimentos. Quando o mel passa por longo período de armazenamento ou é aquecido, as concentrações de produtos da reação de Maillard aumentam (FOGLIANO; CAPUANO, 2011; FRANCISQUINI et al, 2017; NOWAK et al., 2021; RIZELIO et al, 2012; TURKUT et al., 2018).

O 5-HMF é um aldeído cíclico que se forma pela degradação do açúcar e pela desidratação de hexoses em tratamento térmico de alimentos sob condições ácidas (TURKUT et al., 2018). A reação de Maillard foi descoberta por Louis-Camille Maillard em 1912, em uma tentativa de síntese de peptídeo em condições fisiológicas (FRANCISQUINI et al., 2017).

A reação de Maillard é uma reação de escurecimento não enzimática de reações sequenciais, que tem velocidade dependente dos componentes reativos dos alimentos. Ela consiste em três estágios, inicial, intermediário e final, no quais ocorrem diversas reações, podendo ser destacadas as reações de condensação, de desidratação, enolização e retroaldolização (DA SILVA et al., 2016; FRANCISQUINI et al., 2017).

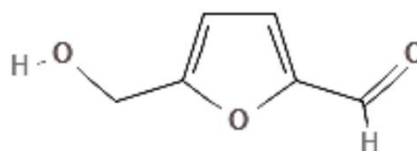
No estágio intermediário da reação de Maillard, é formado o 5-HMF e o furfural. O furfural é um aldeído e faz parte do grupo dos furanos, uma alimentação que tenha altas concentrações deste composto pode levar ao estresse oxidativo, inflamação, incidência de doenças cardiovasculares ou mesmo alteração do metabolismo da glicose (NOWAK et al., 2021).

Outra rota de formação do 5-HMF é pela desidratação direta de açúcares em condições ácidas, ele também pode ser formado pela conversão direta do cátion frutofuranosil em 5-HMF (DA SILVA et al., 2016; FOGLIANO; CAPUANO, 2011; FRANCISQUINI et al., 2011; RIZELIO et al., 2012).

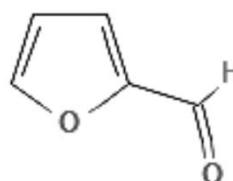
O 5-HMF também é formado quando o mel passa por um tratamento térmico para retardar o processo de cristalização, facilitar a embalagem, diminuir a viscosidade e evitar a reação de fermentação (RIZELIO et al., 2012; TURKUT et al., 2018). O aumento da temperatura, pH ácido, tipo de açúcar, atividade da água e concentrações de cátions bivalentes do meio, são fatores que influenciam a formação do 5-HMF (FOGLIANO; CAPUANO, 2011; RIZELIO et al., 2012; TURKUT et al., 2018).

Mesmo quando o mel está em baixas temperaturas pode ocorrer a formação do 5-HMF, quando ele é submetido a condições ácidas (FOGLIANO; CAPUANO, 2011; RIZELIO et al., 2012). Na Figura 1 é apresentada a estrutura química do 5-HMF e do furfural e suas propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 1.

**Figura 1** - Estrutura química do 5-HMF e furfural



5-HMF



FURFURAL

Fonte: autoria própria.

**Tabela 1** - Propriedades físico-químicas do 5-HMF e furfural

Grupo químico	Solubilidade em água (g mL <sup>-1</sup> )	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Log Kow	pKa
Aldeído	1,29	126,1	-0,09	n.i
Aldeído	0,05-0,1	96,1	0,41	n.i

n.i - não informado.

Fonte: PUBCHEM (2022).

Os estudos de Turkut (2018), analisou o teor de HMF no mel durante 48 horas. A concentração inicial de 5-HMF foi de 2,03, 2,08 e 17,07 mg kg<sup>-1</sup> para méis multifloral, de melão e de castanha, respectivamente. Os valores de 5-HMF não ultrapassaram 40 mg kg<sup>-1</sup> em temperaturas de 50, 70 e 85 °C nas primeiras 5 horas, que é a concentração máxima

permitida pelo Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS, 2019). O aumento foi maior após as 5 horas, onde foram quantificadas concentrações de 143,98, 147,57 e 139,58 mg kg<sup>-1</sup> para méis multifloral, de melão e de castanha, respectivamente, em 70 °C. Na temperatura de 80 °C as concentrações obtidas foram de 881,75, 839,07 e 935,46 mg kg<sup>-1</sup> para méis multifloral, de melão e de castanha, respectivamente.

O 5-HMF é encontrado em diversos alimentos além do mel, principalmente em alimentos ricos em carboidratos e lipídios, alguns alimentos em que foi encontrado foram café, vinagre, produtos de padarias, malte, sucos de frutas, cevada, vinho, biscoitos, torrada, frutas secas, amêndoa torrada, cerveja, geleia, cereais matinais (FOGLIANO; CAPUANO, 2011). Alguns trabalhos quantificam 5-HMF em mel e alimentos, são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Revisão de artigos que determinam 5-HMF em alimentos, a partir de 2018

<b>Amostra</b>	<b>Extração</b>	<b>LD (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQ (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Xarope farmacêutico	Diluição	0,055	0,18	Unuvar, 2018
Suco de maçã	Extração por solvente	n.i	n.i	Li et al., 2019
Mel	Diluição	n.i	0,31	Braghini et al., 2020
Mel	Diluição	n.i	0,62	Da Silva et al., 2020
Comida para bebê	QuEChERS	1,54	4,67	Turkmen, 2020
Mel, melado, geleia, vinagre	UA-CPE	0,018	0,06	Bas; Gurkan, 2021
Mel	Diluição	n.i	n.i	Brugnerotto et al., 2021
Mel e geleia	Extração em banho ultrassônico	127	424	Gurkan, 2021
Molho de tomate	Diluição	0,27	0,93	Marconde et al., 2021
Biscoito para criança	Extração em banho ultrassônico	n.i	n.i	Svecova; Mach, 2021

---

Amostra	Extração	LD (mg kg <sup>-1</sup> )	LQ (mg kg <sup>-1</sup> )	Referência
Pão	Extração por solvente	0,77	2,32	Basaran et al., 2022

---

LD – limite de detecção. LQ – limite de quantificação. n.i – não informado. UA-CPE, do inglês, *ultrasonic assisted cloud point extraction*.

A concentração de 5-HMF e furfural em alimentos é muito importante, visto que em altas concentrações o 5-HMF é citotóxico, irritante para alguns órgãos do corpo como olhos, pele, membranas mucosas e trato respiratório superior. E o fufural pode trazer malefícios a saúde (FOGLIANO; CAPUANO, 2011; NOWAK et al., 2021).

### 3.1.3 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são produtos ou agentes que podem ser físicos, químicos ou biológicos, que tem como função trazer o beneficiamento dos produtos agrícolas, evitando danos a esses produtos causados por seres vivos (BRASIL, 2002). Com o aumento da produção de alimentos devido ao crescimento da população mundial, os agrotóxicos têm sido utilizados extensivamente no mundo, cerca de 3 milhões de toneladas são aplicados anualmente (MARSON et al., 2022).

Os agrotóxicos foram produzidos primeiramente durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918) e usado como arma química na Segunda Guerra Mundial (1939-1945) e posteriormente foi usado como defensivo agrícola. O primeiro agrotóxico utilizado foi o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), que pertence a classe dos organoclorados e era usado como inseticida (RIBEIRO; PEREIRA, 2016).

No Brasil, os agrotóxicos foram introduzidos nos anos 60 para combater pragas nas lavouras e aumentar a produtividade agrícola. E a partir do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA) em 1970, houve o incentivo do uso dos defensivos agrícolas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; RIBEIRO; PEREIRA, 2016), o que levou o Brasil receber o 11º lugar na lista de países que mais usam agrotóxicos na produção agrícola no ano de 2017 (FAO, 2017). E dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), indicam o crescimento dos registros de agrotóxicos por ano no Brasil. Em 2021 foram registrados cerca de 365 agrotóxicos, o maior número registrado desde 1988 (MAPA, 2021).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), lançou em 2002 o decreto N° 4.074 que regulamenta a Lei N° 7.802 de Julho de 1989, que teve como objetivo fazer a pesquisa, experimentação, produção, transporte, inspeção e fiscalização

dos agrotóxicos (AVISA, 2002). A ANVISA é responsável pelas normas e registros de agrotóxicos, juntamente com o MAPA. Esses órgãos fazem o monitoramento, fiscalização, classificação toxicológica, especificação de rotulagem e de bula, determinação do limite máximo de resíduos (LMR) e outras atribuições (BRASIL, 2002).

O MAPA, criou o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), com o intuito de proporcionar alimentos de origem animal seguros para o consumo. Assim, o PNCRC estabelece planos de amostragem e testes que verifiquem os LMR de agrotóxicos, contaminantes inorgânicos, drogas veterinárias, micotoxinas e diotoxinas (ANVISA, 2017).

Atualmente são mais de dois mil registros de agrotóxicos no MAPA, sendo que a maior parte deles são de herbicidas, inseticidas e fungicidas, com cerca de aproximadamente 33,55%, 24,17% e 23,36%, respectivamente (MAPA, 2021).

### 3.1.3.1 *Classificação e toxicidade dos agrotóxicos*

Quanto a toxicidade dos agrotóxicos, a ANVISA fez a reclassificação desses químicos pela resolução – RE N°2.080 em 2019. Essa mudança foi proposta seguindo o padrão do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS, do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*). Dessa forma, adotou-se um padrão de rotulagem para identificar o risco causado a saúde humana diante da exposição a esses químicos (ANVISA, 2019).

Nesse novo padrão foi estabelecido 5 categorias de classificação toxicológica, entre eles foi adotado a categoria de “não classificado”, que é designado a produtos com baixíssimo potencial de danos à saúde e “improvável de causar dano agudo”. Também foi estabelecido cores e pictogramas para cada uma das categorias, facilitando a identificação de produtos mais perigosos (ANVISA, 2019).

A classificação para a rotulagem dos agrotóxicos está de acordo com estudos que comparam a toxicidade entre os produtos e mortalidade, estabelecidos pelo GHS (ANVISA, 2019). Essas mudanças são verificadas no Quadro 1:

**Quadro 1 -** Reclassificação toxicológica dos agrotóxicos

	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5	Não classificado
	Extremamente tóxico	Altamente tóxico	Moderadamente tóxico	Pouco tóxico	Improvável de causar	Não classificado

					dano agudo	
Pictograma					Sem símbolo	Sem símbolo
Palavra de advertência	Perigo	Perigo	Perigo	Cuidado	Cuidado	Sem advertência
Classe de perigo						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
Cor da faixa	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Azul	Azul	Verde

**Fonte:** Adaptado ANVISA (2019).

Os agrotóxicos também são classificados de acordo com seu perigo para o meio ambiente, entre eles estão produtos altamente perigosos, muito perigosos, perigosos, pouco perigosos e de baixo risco (MAPA, 2021). Outra classificação dos agrotóxicos é pela sua estrutura química, que está relacionada com os princípios ativos presente em sua composição. Segundo a Agência Nacional de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*), as principais classes químicas de agrotóxicos são os carbamatos, neonicotinóides, organoclorados, organofosfatos e piretróides (EPA, 2016).

### 3.1.3.2 *Agrotóxicos e danos à saúde humana*

O uso de agrotóxico vem sendo relacionado com efeitos adversos à saúde humana como distúrbios imunológicos, neurológicos, respiratórios, gastrointestinais, alergias, câncer, intoxicação, danos a mecanismos celulares, alterações hormonais, alterações no

---

sistema reprodutor, doenças neurológicas, óbitos e outros (ALMEIDA et al., 2020; GARCIA et al., 2016; LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

Na revisão sobre impactos dos agrotóxicos na saúde humana, Lopes e Albuquerque (2018) relatam estudos de casos, que apresentam sintomas de pessoas expostas a esses químicos, como dor de cabeça, náuseas, dores intestinais, dores no estômago, disúria, dor de estômago e dor na lombar.

No ano de 2017 foram registrados 2.548 casos de intoxicação causadas por agrotóxicos no Brasil, sendo que aproximadamente 47% dos casos eram da região Sul e 33,7% foram registrados como tentativa de suicídio. O número de óbitos nesse período foi de 61 e as regiões sudeste e sul do país apresentaram a maior parte dos óbitos, respectivamente (SINITOX, 2017).

### 3.1.3.3 *Agrotóxicos selecionados*

Após uma revisão bibliográfica de artigos que determinaram agrotóxicos em amostras de mel, foram selecionados quatro agrotóxicos para o estudo: um fungicida (azoxistrobina) e três inseticidas (fipronil, tiametoxam e imidacloprido).

Os fungicidas são substâncias químicas que previnem a infecção dos tecidos de plantas contra fungos fitopatogênicos, bactérias e algas. Eles inibem a germinação dos poros ou previnem a produção dos esporos. Eles são compostos pelo princípio ativo, que determina qual será a ação do fungicida e pelo ingrediente inerte, que age como suporte e diluente do princípio ativo. Os fungicidas são aplicados antes da penetração do patógeno nas plantas, eles funcionam como uma barreira protetora das folhas e sementes (GARCIA, 1999).

Os inseticidas são produtos químicos que foram introduzidos no mercado para o controle de insetos transmissores de doenças e para o controle de pragas nas lavouras. Os inseticidas agem interferindo na transmissão dos impulsos nervosos dos insetos, também podem inibir os processos de desenvolvimento e crescimento dos insetos (MOREIRA et al., 2012).

A azoxistrobina é um fungicida que age como inibidor mitocondrial, sua ação é específica e se degrada facilmente durante o metabolismo das plantas. No entanto, é um fungicida relatado como contaminante ambiental e com toxicidade não-alvo, trazendo risco pois é suscetível a resistência. A azoxistrobina é classificada como categoria 4, “produto pouco tóxico”. Esse fungicida pertence a classe da estrobilurina, sua estrutura química



---

apresenta o grupo éter, éster, uma benzonitrila, uma pirimidina e um benzeno (ANVISA, 2019; CHEN et al., 2020). Nos anos de 2017 e 2018 o Programa de Análise de Resíduos de Alimentos (PARA), determinou a azoxistrobina como um dos agrotóxicos mais detectados nas amostras de abacaxi e goiaba (PARA, 2019).

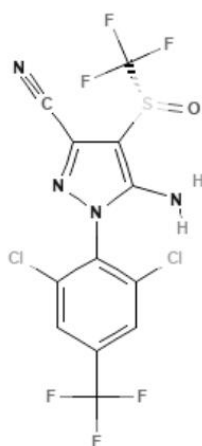
O fipronil é um inseticida que pertence ao grupo dos pirazóis, introduzido no mercado veterinário e na agricultura por volta da década de 90 (SOUZA, 2014). Esse agrotóxico tem sido utilizado para combater grilos, baratas, formigas, cupins, besouros e lagartas. Ele é classificado como altamente tóxico (CELLA, 2009). Sua estrutura química possui anel aromático, grupo amino e cloro.

O tiametoxam é um inseticida do grupo dos neonicotinóides, que tem sido empregado na plantação de soja para controle de insetos e pragas, é um agrotóxico considerado mediamente tóxico. Os neonicotinóides tem sido relatado em estudos que os relacionam com a morte de abelhas (AMARAL, 2017; FAROOQUI, 2012; PORTILHO, JÚNIOR, DORE, 2014). Em sua estrutura química o tiametoxam apresenta grupo nitro, amino, cloro e enxofre.

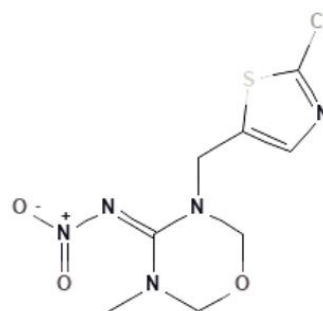
O imidacloprido é um inseticida pertencente ao grupo dos neonicotinóides, que são derivados da molécula de nicotina e provocam o colapso do sistema nervoso dos insetos e conseqüentemente sua morte. Sua estrutura química é constituída por um grupo heterocíclico o 6-cloro-3-metil piridina, uma imizolidina e um grupo nitro. Os neonicotinóides são altamente tóxicos a abelhas e persistentes no meio ambiente (MOREIRA et al., 2012; KAMMOUND et al., 2019). Por essa razão a União Europeia proibiu o uso externo dos neonicotinóides tiametoxam, clotianidina e imidacloprido (EUR-LEX, 2018 a, b, c).

A Figura 2 apresenta as estruturas químicas dos agrotóxicos que serão determinados nesse trabalho.

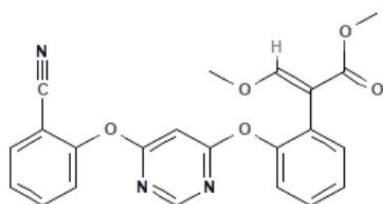
**Figura 2 - Estrutura química dos agrotóxicos de estudo**



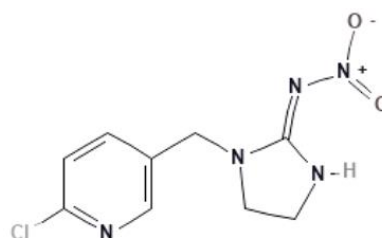
FIPRONIL



TIAMETOXAM



AZOXISTROBINA



IMIDACLOPRIDO

Fonte: PUBCHEM, 2022.

Os parâmetros físico-químicos e informações dos agrotóxicos escolhidos estão contidos na Tabela 3.

**Tabela 3** - Informações e parâmetros físico-químicos dos analitos estudados

Analito	Grupo químico	Classe	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em água a 20 °C (mg L <sup>-1</sup> )	Log kow	pKa	Koc
Fipronil	Pirazóis	Inseticida	437,14	2,0	4,0	n.d	1248
Imidacloprido	Neonicotinóide	Inseticida	255,6	500	0,5	1,5	156-800
Azoxistrobina	Estrobilurina	Fungicida	403,4	6	2,5	1,9	207-594
Tiametoxam	Neonicotinóide	Inseticida	291,7	4,1	0,13	n.d	68,4

n.d - não dissocia

---

**Fonte:** PUBCHEM (2022), DRUGBANK (2022), Tomasini (2011).

### 3.1.4 Preparo de amostra

O preparo de amostra é extremamente importante para a determinação de um analito em amostras complexas, em virtude das baixas concentrações ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  ou  $\text{ng kg}^{-1}$ ), a nível traço, em que o analito é encontrado na amostra. O preparo de amostra auxilia na detecção e seletividade do método cromatográfico usado (DIONÍSIO et al., 2010). Os resíduos de agrotóxicos são geralmente encontrados em baixas concentrações nas amostras de méis, assim é necessário um preparo de amostra adequado para a extração, purificação, concentração e determinação qualitativa e quantitativa dos resíduos de agrotóxicos (LASHERAS et al., 2021).

Entre as técnicas empregadas como preparo de amostra para amostras de mel podem ser destacados o método QuEChERS, a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), Extração em Fase Sólida (SPE do inglês, *Solid Phase Extraction*), Extração com Fluido Supercrítico (SFE do inglês, *Supercritical Fluid Extraction*), Microextração Assistida por Microondas (MAE do inglês, *Microwave Assisted Extraction*), Microextração em Fase Sólida (SPME do inglês, *Solid Phase Micro Extraction*) (LASHERAS et al., 2021).

#### 3.1.4.1 Preparo de amostra usando o método QuEChERS

O método QuEChERS tem sido empregado na extração de resíduos de agrotóxicos em amostras de mel em diversos trabalhos (ALMEIDA et al., 2020; GAWEL et al., 2019; KAMMOUN et al., 2019; LASHERAS et al., 2021; MARCOLIN et al., 2021; MRZLIKAR et al., 2019; ORSO et al., 2016).

O método QuEChERS é um rápido, fácil, barato, robusto e seguro e foi desenvolvido por Anastassiades e colaboradores (2003) para extração de agrotóxicos em alimentos. É um método que utiliza poucas vidrarias, pouca quantidade de amostra e de solventes orgânicos (ARIAS et al., 2019). Em 2007 a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC do inglês, Association of Official Analytical Chemists), estabeleceu o método QuEChERS como método oficial para a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos (AOAC, 2007).

Esse método utiliza 10 g de amostra e 10 mL de acetonitrila para a extração dos analitos, que são colocados em tubo de propileno e são homogeneizados manualmente

---

durante 1 min. Depois, na etapa de partição é adicionado 4 g de MgSO<sub>4</sub> e 1 g de NaCl que vão ser misturados por vórtex durante 1 min. Posteriormente, é adicionado 50 mL de padrão interno na mistura e a mistura vai para o vórtex por 30 min, após esse processo a mistura é centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Então uma alíquota de 1 mL do sobrenadante é transferida para um tubo de propileno para a limpeza que utiliza a extração dispersiva de fase sólida (d-SPE), usando 25 mg do sorvente PSA e 150 mg de MgSO<sub>4</sub> que são agitados em vórtex por 30 s. Após a centrifugação de 1 min a 6000 rpm, uma alíquota de 0,5 mL é retirada e analisada por cromatografia (ANASTASSIADES et al., 2003).

O método QuEChERS sofreu alterações para adequação da extração dos agrotóxicos de acordo com sua estabilidade em pH ácidos. Assim foram criadas modificações do QuEChERS original. Uma das modificações foi o tamponamento do extrato entre pH 4,0 e 5,0 com a adição de ácido acético (1% v/v) em acetonitrila e foi adicionado 1,5 g de acetato de sódio (NaAc) no lugar de NaCl, também foi feito a substituição da agitação por vórtex pela agitação manual, que ficou conhecido como QuEChERS acetato (PRESTES et al., 2009, 2011).

Outra mudança nesse método foi a adição de 1 g de citrato de sódio diidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato sesquihidratado na etapa de partição, esses sais fazem o tamponamento entre pH 5,0 e 5,5, assim foi criado o QuEChERS citrato.

O QuEChERS citrato é um método que tem sido empregado na determinação de agrotóxicos em mel em vários países (KAMMOUND et al., 2019; MARCOLIN et al., 2021; MRZLIKARA et al., 2019; ORSO et al., 2016), assim esse método foi escolhido para determinar os resíduos de agrotóxicos em amostras de mel nesse trabalho.

### 3.1.5 Técnicas cromatográficas para determinação de agrotóxicos

A cromatografia tem sido empregada como técnica para análise de agrotóxicos, por ser uma técnica eficiente na separação de compostos, alto poder de resolução, medidas quantitativas confiáveis, separação rápida, análises reprodutíveis com a mesma coluna, não se limita a amostras voláteis e termicamente estáveis, diversidade de fase móvel e de fase estacionária possíveis de serem usadas (VOGEL, 2017). A cromatografia líquida (LC) é direcionada para análise de compostos não voláteis ou termicamente instáveis, podendo identificar compostos em concentrações extremamente baixas em uma amostra. A separação dos componentes de uma amostra é realizada pela diferença de polaridade entre uma fase móvel líquida e uma fase estacionária (LANÇAS, 2009).

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica de separação que utiliza a partição dos componentes de uma amostra entre uma fase móvel gasosa e a fase estacionária. A limitação dessa técnica é que a amostra deve ser analisada em fase gasosa e os analitos devem ser voláteis ou termicamente estáveis. Para analisar amostras não voláteis é necessário o processo de derivatização (VOGEL, 2017).

A cromatografia líquida e cromatografia gasosa tem sido empregada na determinação de agrotóxicos em mel em vários estudos, como descrito na Tabela 4.

**Tabela 4** - Revisão de artigos que determinaram resíduo de agrotóxico em méis, a partir de 2016

Analitos	Preparo de amostra	Técnica de detecção	Limite de Detecção ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Limite de Quantificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Referência
79 agrotóxicos e 13 antibióticos	<sup>a</sup> QuEChERS citrato	<sup>b</sup> HPLC-MS/MS	0,03-1,51	0,1 -5,0	Orso et al., 2016
5 neonicotinóides	QuEChERS, <sup>c</sup> SPE	HPLC-MS/MS	<sup>d</sup> Q:0,06-0,085 <sup>e</sup> SPE:0,05-0,97	Q:0,19-2,84 SPE:0,15-3,25	Mrzlikar et al., 2019
207 agrotóxicos	QuEChERS citrato modificado	HPLC-MS/MS, <sup>e</sup> GC-MS/MS	10	1-10	Gawel et al., 2019
9 neonicotinóides	QuEChERS	HPLC-MS/MS	<sup>f</sup> n.i.	0,002-0,02	Kammoun et al., 2019
168 agrotóxicos	QuEChERS citrato modificado	HPLC-MS/MS, GC-MS/MS	<sup>g</sup> H:0,1-0,4 <sup>h</sup> G:1-4	H:0,02-0,08 G:2-8	Almeida et al., 2020
5 neonicotinóides	QuEChERS	<sup>i</sup> HPLC-UV	0,0608-0,0808	0,1842-0,2454	Ligor et al., 2020
116 agrotóxicos	QuEChERS acetato modificado	HPLC-MS/MS	n.i.	10	Pinheiro et al., 2020
7 agrotóxicos	QuEChERS acetato	HPLC-MS/MS	n.i.	0,06-4,0	Silva, R.; Faria, A., 2020
2 agrotóxicos e 3 metabólitos	QuEChERS citrato	HPLC-MS/MS	6,5	n.i.	Dal Bello et al., 2021

Analitos	Preparo de amostra	Técnica de detecção	Limite de Detecção ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Limite de Quantificação ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Referência
399 agrotóxicos	QuEChERS	HPLC-MS/MS, GC-MS	n.i.	10-1000	Lasheras et al., 2021
103 agrotóxicos	QuEChERS citrato	GC-MS/MS	n.i.	n.i.	Marcolin et al., 2021

<sup>a</sup>QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*, <sup>b</sup>HPLC-MS/MS – *High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, <sup>c</sup>SPE – *Solid Phase Extraction*, <sup>d</sup>Q – QuEChERS, <sup>e</sup>GC-MS/MS – *Gas Chromatography tandem Mass Spectrometry*, <sup>f</sup>n.i. – não informado, <sup>g</sup>H – HPLC-MS/MS, <sup>h</sup>G – GC-MS/MS, <sup>i</sup>HPLC-UV – *High Performance Liquid Chromatography Ultraviolet*.

### 3.1.5.1 LC-DAD

Dentre as técnicas cromatográficas para determinação de agrotóxicos, temos a cromatografia líquida acoplado com detector de arranjo de diodo (LC-DAD, do inglês *Liquid Chromatography with Diode Array Detector*).

No LC-DAD, a amostra é introduzida no sistema cromatográfico pelo injetor e vai até a coluna, onde os analitos são separados da amostra ficando adsorvidos na fase estacionária. A fase móvel irá eluir primeiramente os analitos com menor afinidade com a fase estacionária e posteriormente eles são direcionados para o detector, que mede a absorção da luz do componente da amostra e gera um sinal quando o eluente chega no detector (SAMPAIO, 2011; VOGEL, 2002).

Os detectores são parte importante na identificação do analito, entre eles estão os detectores de absorção na região do ultravioleta e visível que medem a absorção da energia incidente na amostra, que é gerado pela transição entre os níveis de energia eletrônicos. Quando um átomo ou molécula absorve energia na região do ultravioleta ou visível, um elétron é promovido de um orbital de maior energia ocupado (HOMO) para um orbital de menor energia desocupado (LUMO) (PAVIA, 2010).

A quantidade de moléculas que podem absorver radiação em determinado comprimento de onda determina a extensão da absorção e quanto maior é a eficiência da absorção maior é sua extensão. Então, é necessário ter a presença de grupos funcionais que absorvem nessa região do espectro eletromagnético, os grupos cromóforos (PAVIA, 2010).

Os cromóforos são um grupo de compostos que absorvem na região UV, entre eles estão os compostos com elétrons  $\pi$ , elétrons desemparelhados, todas oleofinas, compostos

aromáticos, composto com iodo, enxofre e bromo, compostos que contém grupo carbonila ( $>C=O$ ), grupo nitro ( $-NO_2$ ), íons inorgânicos ( $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ), duas duplas conjugadas ( $>C=C-C=C<$ ) (CALDAS, 2009; COLLINS et al., 2006).

Entre os detectores espectrofotométricos pode ser destacado o arranjo de diodo, que analisa diferentes comprimentos de ondas na faixa do ultravioleta de 190 a 800 nm em 1 segundo. No DAD, é usada uma fonte de luz de uma lâmpada de deutério ou xenônio, que é colimada por um sistema de lentes sobre a amostra. A luz passa pela amostra e incide sobre uma grade holográfica, essa grade difrata a radiação separando os diferentes comprimentos de onda e cada um deles irá incidir sobre um diodo de arranjo. O diodo produz uma corrente elétrica ao ser irradiado e a magnitude dessa corrente depende da intensidade de emissão. Então, com uma calibração adequada a corrente elétrica é convertida em absorbância nos diferentes comprimentos de onda, resultando no espectro de absorção do analito (CALDAS, 2009; COLLINS et al., 2006; SAMPAIO, 2011).

Podem-se destacar algumas vantagens do DAD em relação a detectores UV convencionais, como ter alta resolução espectral, informação qualitativa sobre a amostra, além disso permite verificar a identidade e pureza do pico do analito. A resolução espectral é necessária para diferenciar moléculas similares do analito, no DAD é possível obter um espectro tridimensional em que é mostrado a absorbância, comprimento de onda e tempo de retenção dos compostos. Também a resolução espectral é útil para comparar os espectros em diversos pontos do pico, assim é possível examinar a pureza do pico cromatográfico (CALDAS, 2009).

A detecção usando DAD para analisar agrotóxicos é vantajosa por ser um detector não destrutivo, pode ser usado para identificar interferentes e picos sobrepostos. Também se pode confirmar a identidade dos compostos presentes na amostra pela comparação do espectro de um padrão ou comparando com uma biblioteca online (CALDAS, 2009; SAMPAIO, 2011).

Além disso, esse detector apresenta uma grande versatilidade de amostras que podem ser analisadas, como é apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Revisão de artigos que usaram LC-DAD para diferentes matrizes, a partir de 2016

Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Limite de Detecção instrumental ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Limite de Quantificação instrumental ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Referência
----------	--------	--------------------	---	--	------------

<b>Analitos</b>	<b>Matriz</b>	<b>Preparo de amostra</b>	<b>Limite de Detecção instrumental (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Limite de Quantificação instrumental (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Referência</b>
30 agrotóxicos	Leite	QuEChERS	0,00002- 0,00006	0,00007- 0,00019	Rejczak; Tuzimski, 2017
2 agrotóxicos	Pimenta	QuEChERS	n.i	0,1	Rabie et al., 2018
5 agrotóxicos	Água	SPE	25-39	83-129	Kumric et al., 2019
3 agrotóxicos	Água	Microextração por solvente supramolecular	230-450	780-150	Scheel; Tarley, 2019
12 agrotóxicos	Água	Extração por pipeta descartável	20-690	60-2300	Corazza et al., 2019
5 agrotóxicos, 2 contaminantes emergentes	Água	Microextração adsortiva em barra	1670-2500	5000-75000	Cancellier et al., 2020
Agrotóxicos	Frutas	UAATPE e VADLLME	0,000005- 0,00001	0,00001- 0,00005	Chen et al., 2020
3 agrotóxicos	Solo, água, soro, urina e tomate	Diluição	0,000068- 0,00011	0,00021- 0,00068	Gebrehiwot; Erkmen; Uslu, 2020
6 agrotóxicos	Água	MSPE	10-30	40-120	Ma et al., 2020
2 agrotóxicos	Polímeros	Imobilização enzimática	8180-3200	1060-2726	Yetim et al., 2020
1 agrotóxico	Água	Extração por solvente	n.i	n.i	Xiaona et al., 2021
6 agrotóxicos	Frutas e vegetais	SADLLME	2,1-4,5	5,7-12,9	Neguessie et al., 2021
1 agrotóxico	Mel	LLE e LTP	4,0	8,0	De Freitas et al., 2021



Analitos	Matriz	Preparo de amostra	Limite de Detecção instrumental ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Limite de Quantificação instrumental ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Referência
Agrotóxicos e medicamentos antibacterianos	Ovos, leite e frango	QuEChERS modificado	4-150	14-45	Akhtar et al., 2021
6 agrotóxicos	Solo	QuEChERS	2,50-15,00	5,0-15,0	Do Amaral, 2020

n.i – não informado. UAATPE, do inglês, *Ultrasonic-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction*. VADLLME, do inglês, *Vortex-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*. MSPE, do inglês, *Magnetic Solid-Phase Extraction*. SDLLME, do inglês, *Acetone-Based Salting-Out Assisted Extraction With The Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*. LLE, do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*. LTP, do inglês, *Low-Temperature Purification*.

### 3.1.6 Validação

Para garantir a confiabilidade de um método analítico é necessário que haja a validação desse método. Então foram desenvolvidos parâmetros de desempenho que assegurem que um método pode ser aplicado, dentre eles estão: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação) (INMETRO, 2020).

No Brasil os órgãos reguladores que geram documentos oficiais e diretrizes a serem seguidas nos laboratórios são a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). A Resolução RE nº166, de 24 de Julho de 2017 da ANVISA e o DOQ-CGRE-008 de Abril de 2020 do INMETRO, trazem as informações e critérios de validação para métodos analíticos (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

#### 3.1.6.1 Seletividade

A seletividade mede o grau em que o método consegue quantificar o analito na presença de outros compostos ou de interferentes, assim o método é seletivo se ele consegue diferenciar a resposta do analito de interesse da resposta de outros analitos presentes na amostra (INMETRO, 2020).

#### 3.1.6.2 Linearidade

Segundo o INMETRO (2020), a linearidade verifica se o procedimento analítico atinge resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra,

---

dentro de uma faixa de concentração, em que a menor concentração dessa faixa corresponde ao limite de quantificação. Se obtém a linearidade pela padronização interna ou externa. A concentração do analito na amostra é encontrada pela equação da reta chamada de curva analítica, essa curva é montada por uma regressão linear e por no mínimo 5 concentrações distintas.

### 3.1.6.3 *Limite de detecção e quantificação*

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que o método consegue detectar na amostra, porém não necessariamente quantificá-lo. O LD pode ser encontrado pela relação sinal/ruído; avaliação/percepção visual; estimativa por meio de curva de desvio padrão (INMETRO, 2020).

O limite de quantificação (LQ) é a concentração mínima que o método consegue quantificar o analito com precisão e exatidão. O LQ pode ser determinado pela relação sinal/ruído; estimativa a partir da curva analítica; estimativa pelo desvio padrão do branco e estimativa por meio da curva de desvio padrão (INMETRO, 2020).

### 3.1.6.4 *Exatidão (Recuperação)*

A exatidão é o grau de concordância entre os resultados determinados em ensaios e o valor de referência que é aceito como verdadeiro, é calculada em termo de porcentagem de recuperação pela adição do analito em concentrações conhecidas na amostra ou pela comparação da concentração média com a concentração teórica correspondente. A faixa de recuperação aceitável é de 40 a 120% quando a concentração do analito é de  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  (INMETRO, 2020).

De acordo com o INMETRO (2020), a recuperação é determinada pela análise de amostras fortificadas com concentrações conhecidas do analito, as fortificações são realizadas com três concentrações diferentes (baixa, média e alta). Ela é calculada pela equação 4, apresentadas a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

C<sub>1</sub>: concentração do analito da amostra fortificada

C<sub>2</sub>: concentração do analito da amostra não fortificada

C<sub>3</sub>: concentração do analito adicionado à amostra fortificada

### 3.1.6.5 Precisão (Repetibilidade)

A precisão representa a dispersão dos resultados da análise de adição do analito ao branco da amostra em concentrações baixas, médias e altas com réplicas em cada nível. O modo em que a precisão é expressa é através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, também é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD do inglês, *Relative Standard Deviation*). O RSD aceitável em relação a repetibilidade é  $\leq 30\%$ , sendo que a repetibilidade é realizado pela análise da amostra sob condições estabelecidas, essas condições são: o mesmo procedimento de medição, mesmo operador, mesmo sistema de medição, mesma condição de operação e mesmo local na análise (INMETRO, 2020). O cálculo para o RSD% é realizado seguindo a equação 5, apresentada a seguir:

$$\text{RSD}(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (5)$$

Sendo:

S = estimativa do desvio padrão absoluto

$X_m$  = média de uma série de medidas (replicatas)

## 3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 3.2.1 Instrumentação

Os instrumentos que serão utilizados para o desenvolvimento do trabalho foram:

- Agitador tipo vórtex modelo Certomat® MV-B. Braun (Bioteck Internacional, Alemmar – Comercial e Industrial S.A.);
- Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa (Curitiba, Brasil);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$  e 5000  $\mu\text{L}$ ) Labmate (Varsóvia, Polônia);
- Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Centrífuga de tubos microprocessada modelo Quimis® Q222T (QUIMIS aparelhos científicos);
- Coluna Kromasil 100 – 3,5 C18 (10 cm x 4,6 mm d.i.);
- Cromatógrafo a Líquido Waters (Milford, MA, USA) equipado com bomba quaternária modelo 600, com sistema de eluição por gradiente, detector por Arranjo de

---

Diodos 2996 PDA, sistema de aquisição de dados “software Empower PDA” e alça de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

- pHmetro Hanna pH20 pH21 – eletrodo de vidro combinado (São Paulo, SP, Brasil);
- Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- Ultrassom Quimis modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);

### 3.2.2 Reagentes, solventes e materiais

- Acetona, PA (Vetec, Brasil);
- Acetonitrila (MeCN), grau HPLC (J.T. Baker, Mallinckrodt, USA);
- Água destilada obtida por sistema de destilação da EQA;
- Água ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ );
- Detergente Extran® neutro (Merck, Brasil);
- Frascos de vidro (vials), capacidade de 2,0 mL
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker, Mallinckrodt, USA);
- Cloreto de sódio (NaCl) anidro (Merck KgaA, Germany)
- Padrões analíticos dos analitos (pureza > 99%)
- Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) anidro (J.T. Baker, Mallinckrodt, USA);
- Tubos de polipropileno, com tampas rosqueáveis, 15 mL de capacidade (Sarstedt, Alemanha);
- Vidraria comum de laboratório (balões volumétricos, bastão de vidro, béquer, espátulas);
- Sódio diidratado (Sigma Aldrich)
- Hidrogenocitrato sesquihidratado (Sigma Aldrich)

### 3.2.3 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas de cada agrotóxicos e compostos de estudo (azoxistrobina, imidacloprido, fipronil, tiametoxam, 5-HMF e furfural) foram preparadas a partir de soluções padrões de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . A partir dessa solução foram preparadas soluções na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para cada um dos analitos. Cada uma das soluções foi preparada em metanol e armazenadas em frascos de vidro âmbar e estocadas a  $-18^\circ\text{C}$ . Também

foram preparadas soluções trabalho de 10 mg L<sup>-1</sup> da mistura dos 4 agrotóxicos e outra solução de 10 mg L<sup>-1</sup> do 5-HMF e furfural, essas soluções foram utilizadas em todo o processo de otimização e validação do método, para obter curvas analíticas e nos ensaios de recuperação.

#### 3.2.4 Amostras de mel e aplicabilidade

A amostra de mel utilizada para a otimização do método era uma amostra da região de Bagé, que foi mantida na embalagem em temperatura ambiente durante todo o processo de otimização.

Para a aplicação do método proposto foi utilizada amostras comerciais de mel da região do Rio Grande do Sul. Foram adquiridas 3 amostras de mel provenientes da cidade de Rio Grande/RS.

As amostras de mel usadas na aplicabilidade do método eram de diferentes origens florais (uma amostra nativa e duas de eucalipto). Essas amostras apresentavam diferenças em suas características, principalmente na coloração (amarelo escuro a claro) e aspecto (líquido e viscoso), as características das amostras são apresentadas na Tabela 6. As amostras foram armazenadas sob refrigeração após serem adquiridas.

**Tabela 6** – Características das amostras de mel usadas no trabalho

<b>Amostra</b>	<b>Florada</b>	<b>Coloração</b>	<b>Viscosidade</b>
1	Eucalipto	Amarelo escuro	Líquido
2	Nativa	Amarelo escuro	Líquido
3	Eucalipto	Amarelo claro	Viscoso

#### 3.2.5 Preparo de amostra

As extrações foram realizadas usando o método QuEChERS citrato como utilizado no trabalho de Marcolin e colaboradores (2021).

Para o método QuEChERS citrato, foi pesado 10 g de amostra em tubo de propileno de 50 mL e adicionado 10 mL de água ultrapura e 10 mL de acetonitrila, foi feita a agitação manual por 20 s e 1 min em vórtex para a extração dos analitos. Na etapa de partição foi adicionado 4 g de MgSO<sub>4</sub>, 1 g de NaCl, 1 g de citrato de sódio diidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato sesquihidratado, que foram agitados manualmente por 20 s e em vórtex por 1 min. Posteriormente, foi centrifugado em 15000 rpm por 10 min, em seguida

---

foi retirado 1 mL da camada superior da acetonitrila e transferido para tubo de propileno de 15 mL, contendo 150 mg MgSO<sub>4</sub> e 25 mg de PSA, foi agitado em vórtex por 1 min e centrifugado em 15000 rpm por 5 min. Em seguida foi retirado 1 mL do extrato para análise cromatográfica.

### 3.2.6 Otimização do sistema cromatográfico LC-DAD para os agrotóxicos

A otimização do sistema cromatográfico iniciou-se por injeções individuais de 20 µL de soluções analíticas dos agrotóxicos selecionados para esse estudo. Tendo como objetivo analisar o tempo de retenção e o espectro de absorção molecular de cada substância no DAD. Dessa maneira, posteriormente, foi feita a comparação dos tempos de retenção ( $t_R$ ) e do espectro dos picos da mistura com o espectro dos padrões, injetados individualmente.

#### 3.2.6.1 *Preparo da fase móvel*

Os solventes utilizados como fase móvel foram filtrados à vácuo através de membrana de nylon 0,45 µm. A água ultrapura foi acidificada em pH 3,0 com uma solução de ácido fosfórico (1:1, v/v). Todos os solventes foram degaseificados em ultrassom durante 30 minutos, à temperatura ambiente. O armazenamento da fase móvel foi realizado em frascos próprios para solvente e identificados a respeito de sua composição e pH.

#### 3.2.6.2 *Escolha da composição da fase móvel*

A composição da fase móvel foi escolhida a partir do trabalho de Sampaio (2011), que fez uso de água ultrapura pH 3,0 e metanol para analitos mediantemente polares. A proporção da FM foi avaliada e escolhida de acordo com a separação para os analitos estudados.

#### 3.2.6.3 *Determinação do comprimento de onda de máxima absorção*

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada agrotóxico, foi injetado a solução padrão individual de 10 mg L<sup>-1</sup> de cada analito. A partir do espectro de absorção molecular, que foi monitorado entre 190 e 400 nm, foi determinado o comprimento de onda de máxima absorção dos agrotóxicos. A confirmação da identidade dos picos nas amostras foi realizada pelo espectro do padrão.

### 3.2.7 Determinação de 5-HMF e furfural

---

Para a determinação de 5-HMF e furfural foi usado o método adaptado de Marcolin e colaboradores (2021), que consiste na solubilização do mel (1:10 g/v) na fase móvel e utiliza o modo de eluição isocrático. A FM foi composta por H<sub>2</sub>O ultrapura: MeCN (90:10, v/v) em uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> e foi usada uma coluna Synergi 4 µm Fusion – RP 80 (250 x 4,60 mm).

Para a quantificação de 5-HMF e furfural foi preparada uma curva na fase móvel a partir da diluição do padrão do 5-HMF e furfural de 10 mg L<sup>-1</sup> na fase móvel H<sub>2</sub>O ultrapura: MeCN (90:10). As diluições foram realizadas nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>. E foi utilizada a coluna Synergi 4 µm Fusion – RP 80 (250 x 4,60 mm) para a quantificação.

### 3.2.8 Curvas analíticas e linearidade

Foi construída uma curva analítica para os agrotóxicos no extrato em 7 níveis de concentração, 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. E foi construída uma curva analítica para os agrotóxicos em MeCN em 6 níveis de concentração, 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

Para o 5-HMF e furfural foi construída uma curva analítica em água ultrapura: MeCN (90:10 v/v) em 6 níveis de concentração, 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Cada solução foi injetada duas vezes no equipamento, o gráfico da área do pico versus a concentração foi obtido com o auxílio do software do equipamento. A linearidade do método foi analisada pela avaliação dos coeficientes de correlação (r) das curvas analíticas.

### 3.2.9 Limites de detecção e quantificação

Os LD e LQ foram estimados pelo método de percepção visual, a partir da adição de concentrações conhecidas dos analitos para distinguir o ruído e o sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável).

Os limites instrumentais foram obtidos pela padronização externa no solvente, a partir de soluções analíticas com diferentes concentrações em MeCN. E os limites do método foram calculados pela injeção de soluções analíticas em diferentes concentrações, preparadas pela diluição da solução padrão no extrato do branco da matriz pelo método QuEChERS citrato.

### 3.2.10 Precisão (Repetibilidade)

---

A precisão foi avaliada em função da repetibilidade, que consistiu na fortificação das amostras em 4 níveis de concentração, 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg kg<sup>-1</sup>. Cada nível de concentração foi extraído em triplicata pelo método QuEChERS citrato, sendo injetado em duplicata pelo mesmo analista, no mesmo dia e nas mesmas condições cromatográficas. A partir das determinações foi calculado o RSD%.

#### 3.2.11 Exatidão (Recuperação)

A exatidão foi calculada a partir de ensaios de recuperação empregando o método QuEChERS citrato e LC-DAD, que consistiu na fortificação de uma amostra de mel em concentrações conhecidas dos analitos em nível alto, dois níveis intermediários e um baixo (0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg kg<sup>-1</sup>). Posteriormente, foi realizada a extração dos analitos pelo método QuEChERS e calculado as recuperações.

#### 3.2.12 Resíduos

Os resíduos gerados nesse trabalho foram armazenados em frascos de vidro âmbar, rotulados segundo o Guia de Gerenciamento de Resíduos Químicos da FURG, para posterior recolhimento e tratamento por empresa autorizada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Agrotóxicos selecionados

Os analitos escolhidos para esse trabalho foram inicialmente 2,4-D, carbendazim, azoxistrobina e imidacloprido. Esses analitos foram selecionados após revisão de artigos e detecção deles em amostras de méis. Os analitos foram estudados nos trabalhos de Almeida e colaboradores (2020), Gawel e colaboradores (2019), Kammoun e colaboradores (2019), Ligor e colaboradores (2020), Marcolin e colaboradores (2021), Mrzlikar e colaboradores (2019), Sampaio (2011), Silva e Faria (2020), Tanner e colaboradores (2021) e Tomasini e colaboradores (2011). Posteriormente, o 2,4-D e carbendazim foram substituídos pelos agrotóxicos fipronil e tiametoxam, que também foram determinados nos artigos citados.

### 4.2 Otimização do sistema cromatográfico LC-DAD

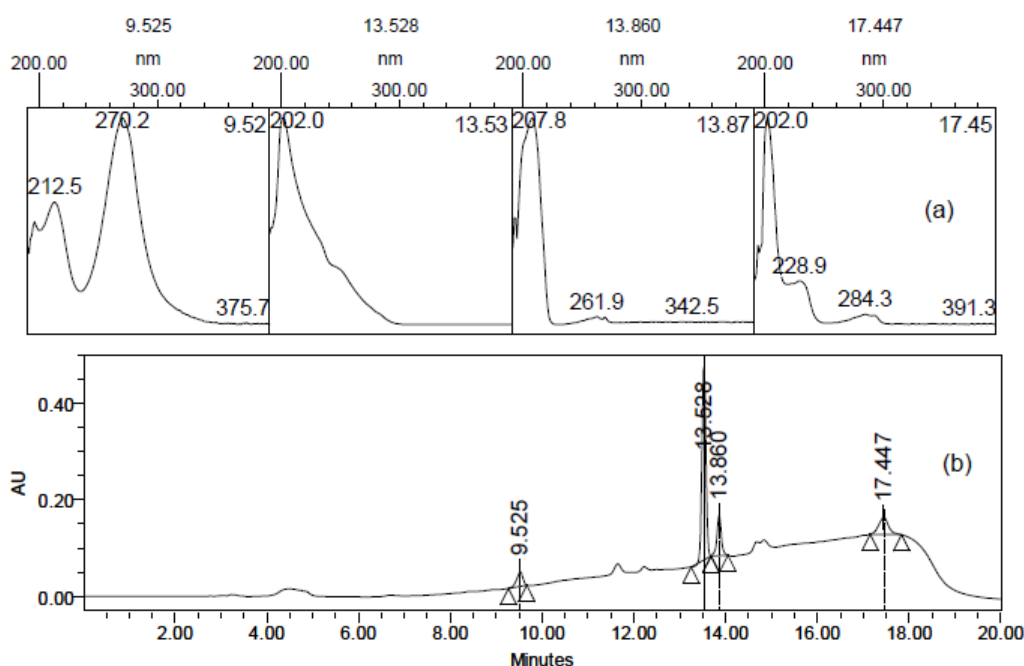
#### 4.2.1 Otimização da fase móvel



As análises iniciais do trabalho foram para otimizar a fase móvel do LC-DAD para os agrotóxicos selecionados. Então partiu-se das condições de FM usadas por Sampaio (2012), que quantificou agrotóxicos em amostras de caldo e melado de cana-de-açúcar por LC-DAD. A eluição era realizada por gradiente, empregando no início H<sub>2</sub>O ultrapura pH 3,0 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1:1 v/v) e MeOH na proporção (35:65, v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, alterando para H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (20:80 v/v) em 8 min; essa condição mantida por 4 min, e retornava as condições iniciais em 1 min, permanecendo nessa condição por 7 min. Esse gradiente foi usado para determinar o tempo de retenção de cada analito, então foi usado padrões individuais de 10 mg L<sup>-1</sup> dos analitos.

A separação nas condições empregadas por Sampaio (2012) não apresentou uma separação eficiente, então, foi testado uma nova condição de gradiente. Usou-se H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (70:30 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, então aumentou-se a força de eluição para H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (10:90 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (0-12 min), em 1 min teve o retorno para a condição inicial até o final da corrida cromatográfica. Porém não houve uma boa separação entre a azoxistrobina (13,5 min) e carbendazim (13,8 min), que coeluíram como mostrado na Figura 3. Então foi necessário alterar as condições da FM.

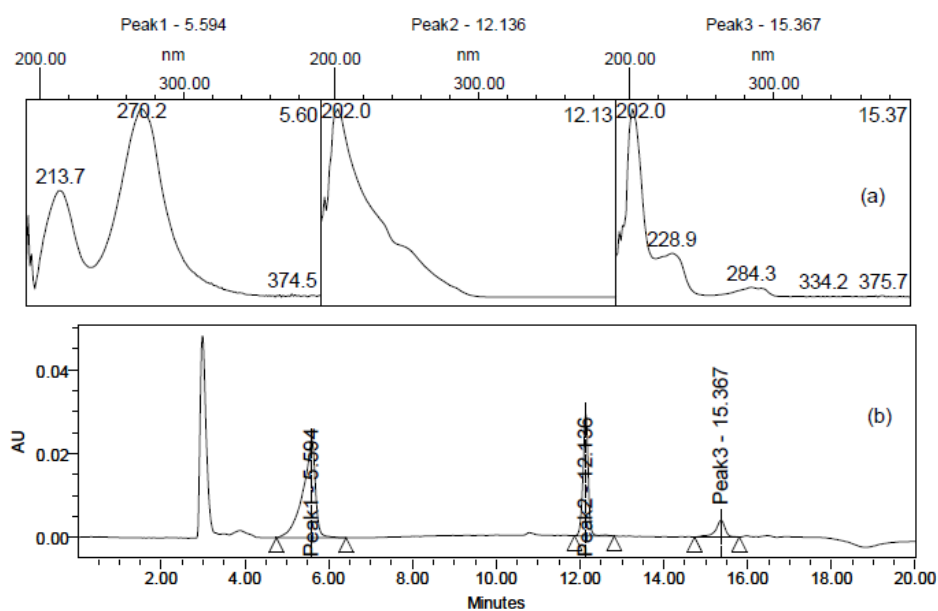
**Figura 3** - Espectro de absorção característico para cada analito no LC-DAD (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b)



Fonte: Software do LC-DAD.

Um novo gradiente foi proposto para melhorar a separação entre os analitos que coeluíram e diminuir o tempo de retenção do 2,4-D, que é um composto mais apolar e tem mais afinidade com a coluna, ficando mais retido. Assim, foi gerado um gradiente para aumentar a força de eluição, então usou-se H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (50:50 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. No entanto, essas condições não foram ideais para os analitos, o pico do imidacloprido ficou mais largo em sua base (5,59 min) e o carbendazim não foi identificado no cromatograma, como mostra a Figura 4.

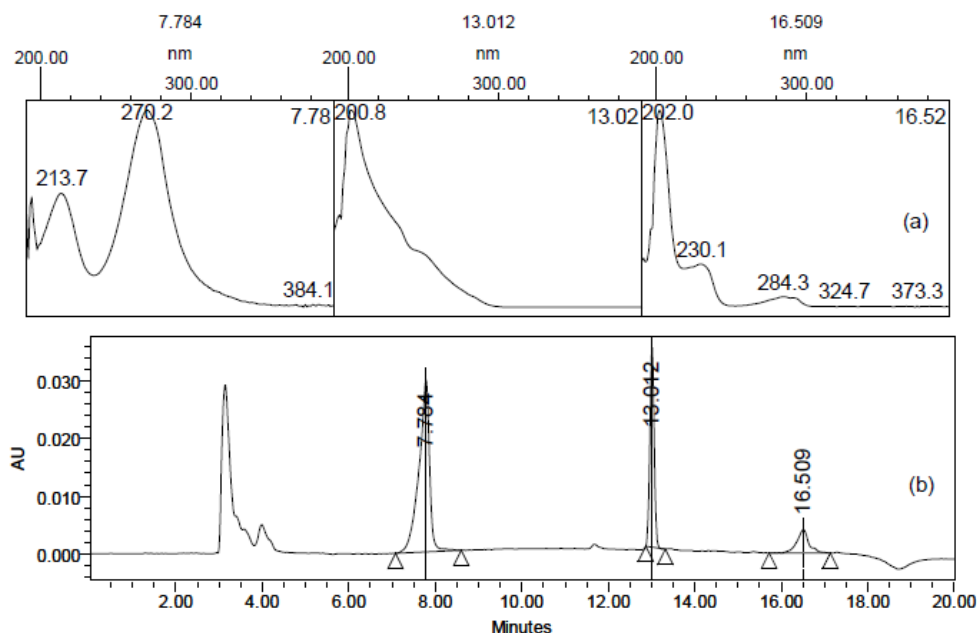
**Figura 4** - Espectro de absorção característico dos analitos que eluíram no LC-DAD respectivamente, o imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b)



**Fonte:** Software do LC-DAD.

Para se ter a separação e eluição de todos os agrotóxicos foi decidido começar com uma FM mais polar e depois aumentar a força de eluição. Então, foi usado se H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (60:40 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, aumentou-se a força de eluição para H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (10:90 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (0-8min) permanecendo nessa condição até 12 min, em 1 min teve o retorno para a condição inicial até o fim da determinação. Nessas condições, houve aumento do tempo de retenção do imidacloprido e do 2,4-D. O carbendazim novamente não foi identificado no cromatograma como mostra a Figura 5, por isso novas condições foram testadas.

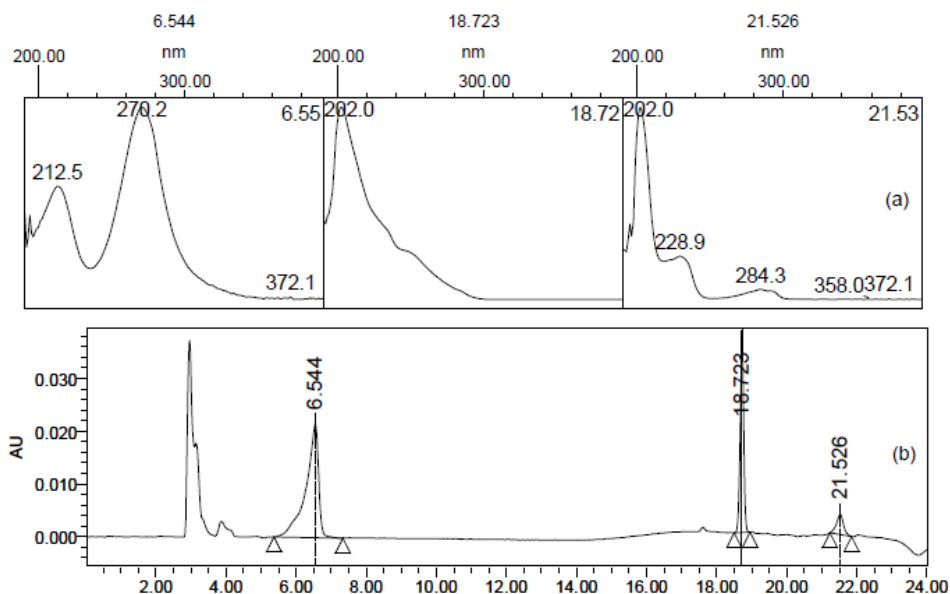
**Figura 5** - Espectro de absorção característico dos analitos que eluam no LC-DAD respectivamente, o imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b)



Fonte: Software do LC-DAD.

Foi necessário testar um novo gradiente para melhora separação cromatográfica, então foi feito um gradiente com H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (55:45 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (0-8 min), aumentou-se a força de eluição para H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (10:90 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (8-13min), mantendo essa condição por 4 min e em 1 min teve o retorno para a condição inicial até 24 min. Contudo, não houve eluição do carbendazim novamente como mostra na Figura 6.

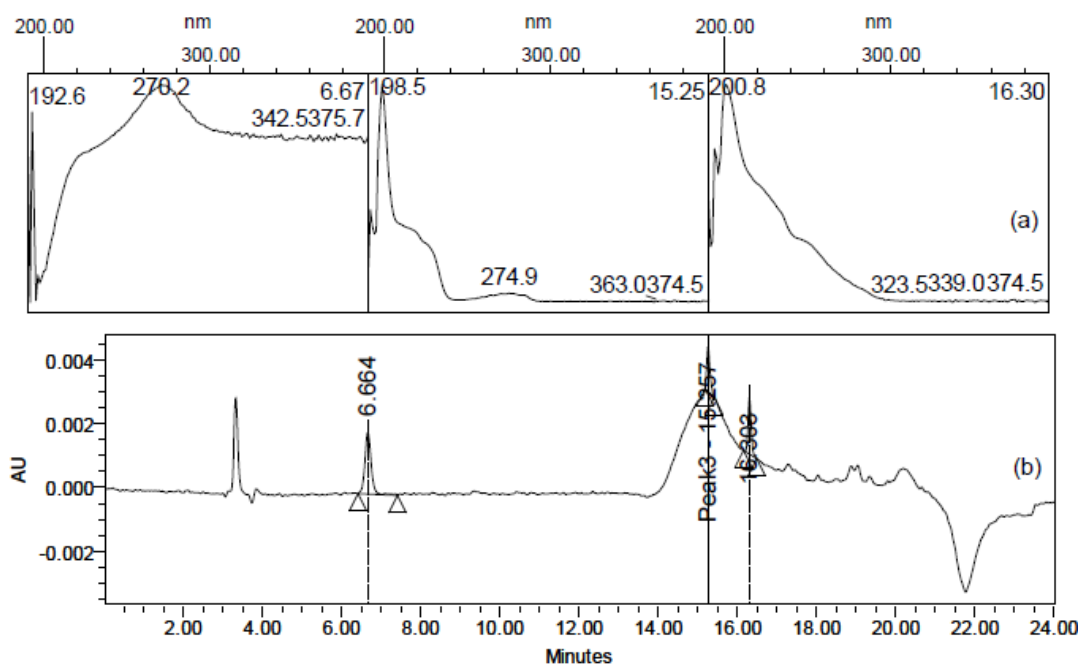
**Figura 6** - Espectro de absorção característico dos analitos que eluam no LC-DAD, respectivamente, o imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b)



Fonte: Software do LC-DAD.

Dessa maneira, foi realizada a modificação do gradiente, iniciou-se com H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (55:45 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (0-8 min), aumentou-se a força de eluição com H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (10:90) em 1 min e permaneceu nessa condição durante 6 min. Retornou-se à condição inicial em 1 min e permaneceu nessa condição até o fim da corrida. Nessas condições, o espectro do imidacloprido ficou distorcido e não foi identificado o carbendazim e o 2,4-D como mostrado na Figura 7.

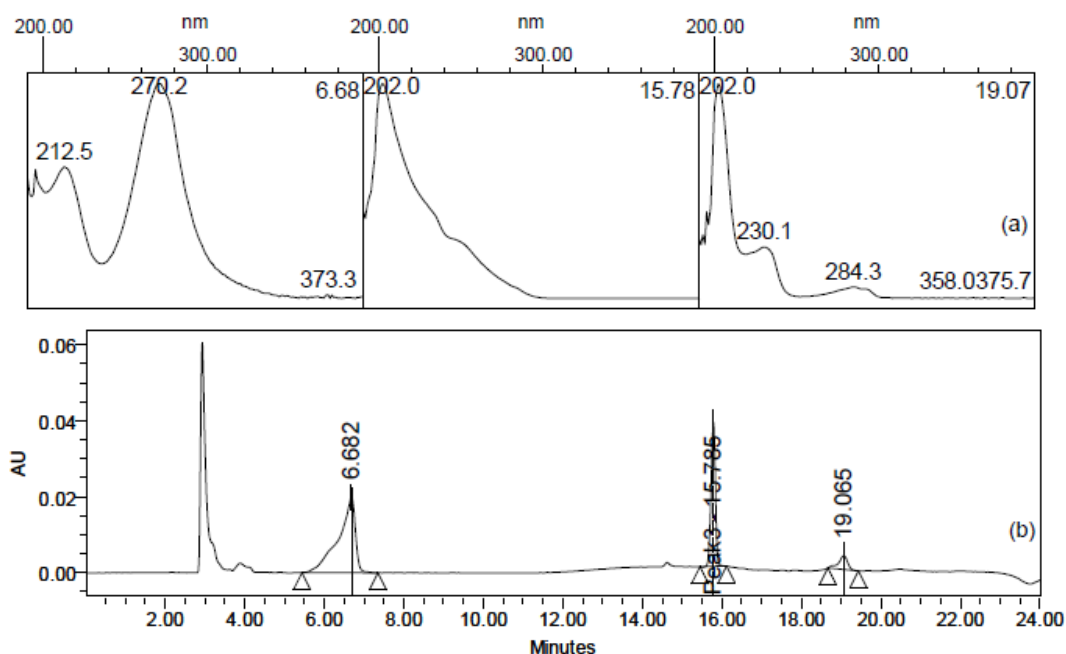
**Figura 7** - Espectro de absorção característico dos analitos que eluíram no LC-DAD, respectivamente, o imidacloprido, composto não identificado e azoxistrobina (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b)



Fonte: Software do LC-DAD.

Foi avaliado então um novo gradiente, empregando H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (55:45 v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> (0-5 min), aumentou-se a força de eluição com H<sub>2</sub>O pH 3,0:MeOH (10:90 v/v) em 5 min e permaneceu nessa condição durante 7 min. Retornou-se para condição inicial até o fim da corrida (18-24 min). Com esse gradiente teve a eluição do imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D. O carbendazim não elui novamente.

**Figura 8** - Espectro de absorção característico dos analitos que eluíram no LC-DAD, respectivamente, o imidacloprido, azoxistrobina e 2,4-D (a) e Cromatograma de uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup> da mistura dos agrotóxicos no LC-DAD (b)



Fonte: Software do LC-DAD.

Foi feito a troca da coluna cromatográfica e colocado a coluna Kromasil 100 – 3,5 C18 (10 cm x 4,6 mm d.i.). Então foi injetado o mix do analitos de 10 mg L<sup>-1</sup> usando o gradiente 4 na vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, como mostrado na Tabela 7.

**Tabela 7** - Descrição do gradiente 4

Tempo (min)	A (H <sub>2</sub> O ultrapura pH3)	C (MeOH)
0	60%	40%
8	10%	90%
12	10%	90%
13	60%	40%
20	60%	40%

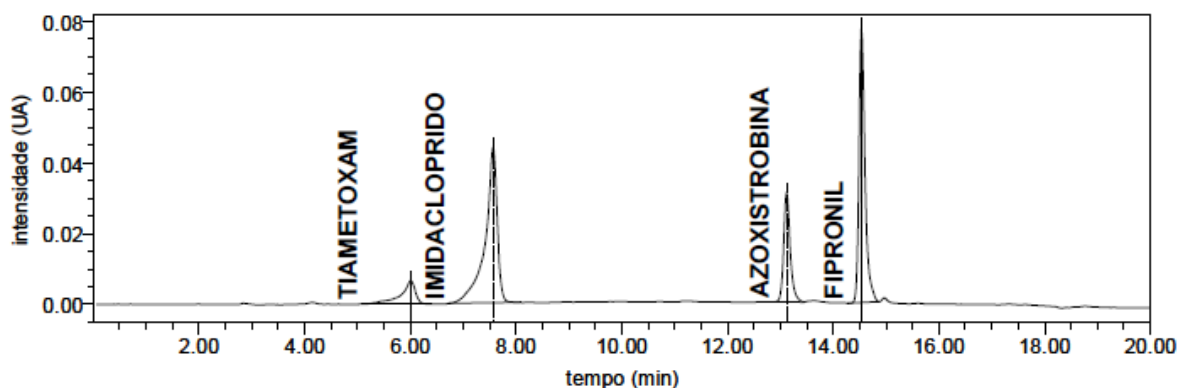
---

Nessas condições, o pico do imidacloprido ficou com cauda, a azoxistrobina e 2,4-D coeluíram e o carbendazim não eluiu. A coluna estava com alta pressão, então foi realizada a troca da coluna por uma coluna Synergi 4  $\mu$ m Fusion – RP 80 (250 x 4,60 mm). Também foi testado o gradiente 4 com H<sub>2</sub>O ultrapura sem acidificação, nessa condição se obteve pouca separação entre os analitos e foram identificados o imidacloprido, azoxistrobina e carbendazim. Porém, o 2,4-D não foi identificado, isso porque ele é um composto ácido ( $pK_a = 2,6$ ) e muito solúvel em água, então era necessário o ajuste de pH para sua identificação.

Depois de tantos testes foi decidido retirar o carbendazim e o 2,4-D do trabalho pela falta de reprodutibilidade desses compostos nas análises. O carbendazim é um composto que sofre reações de protonação-desprotonação em solução aquosa levando a formação de espécies catiônicas, aniônicas e neutras de acordo com o pH do meio. Esse composto é considerado um ácido fraco, quando o carbendazim é encontrado em um meio com pH menor do que a primeira constante de equilíbrio ( $pK_{a1} = 4,2$ ), sua forma predominante é catiônica. Quando o meio tem pH maior do que a segunda constante de equilíbrio ( $pK_{a2} = 9,6$ ), há predominância da forma aniônica e quando o pH está entre as duas constantes o carbendazim é encontrado em sua forma molecular, neutra (SCHEEL; TARLEY, 2020). Por essa razão, ele teve variações nos gradientes com H<sub>2</sub>O acidificada e não acidificada.

Então selecionou-se, de acordo com a revisão bibliográfica, mais dois compostos que são estudados em amostras de mel, o tiametoxam e o fipronil. Foi então injetado individualmente esses dois compostos, e verificado o tempo de retenção. Esses dois compostos não apresentavam co-eluição com os outros compostos de estudo. Então, um novo mix com os 4 agrotóxicos foi injetado três vezes na condição do gradiente 4 para verificar se essa condição era reprodutível. Os analitos foram identificados pelo seu tempo de retenção em todas as injeções, logo, essa condição foi a escolhida para ser usada no presente trabalho. A separação dos analitos deste trabalho é apresentada na Figura 9.

**Figura 9** - Separação cromatográfica no LC-DAD dos agrotóxicos estudados

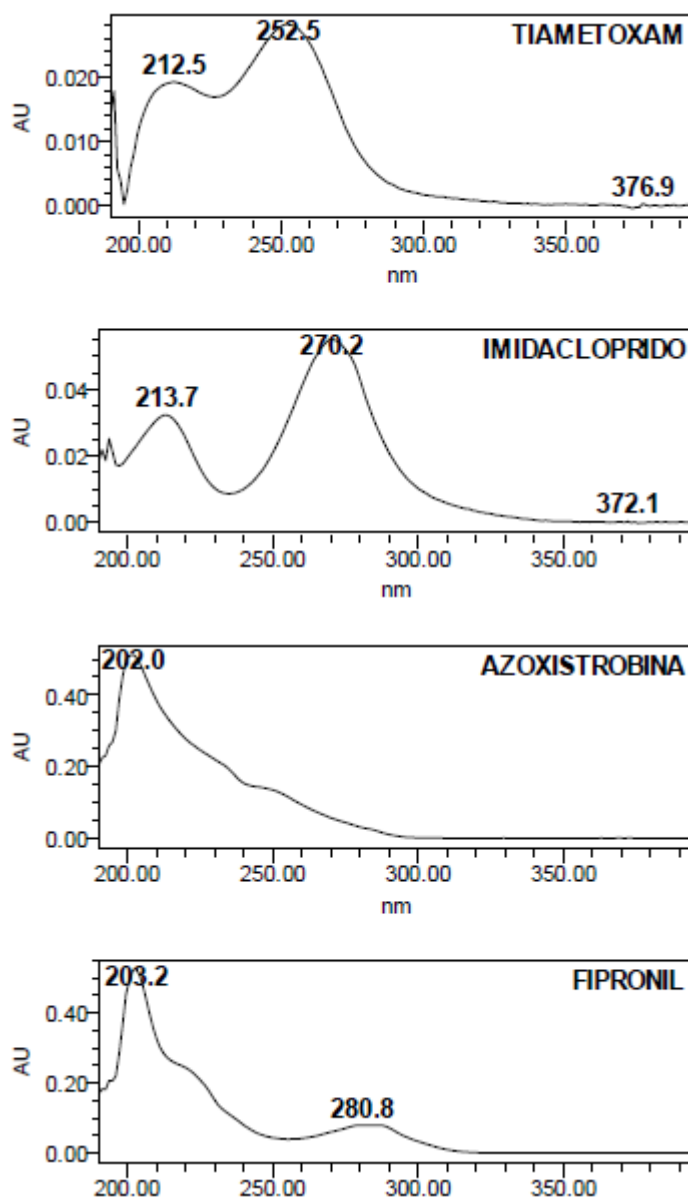


Fonte: LC-DAD.

#### 4.2.2 Avaliação do comprimento de onda de máxima absorção

Para confirmação da identidade dos analitos foi utilizado os tempos de retenção obtido nos espectros de absorção do LC-DAD para soluções individuais de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Além da comparação dos espectros obtidos dos padrões dos analitos na faixa de 190 a 400 nm. A Figura 10 mostra que os analitos possuem máxima absorção em diferentes comprimentos de onda, porém não foi possível usar os comprimentos de onda de máxima absorção para a quantificação dos analitos, pois havia outros compostos da própria amostra que absorviam nesses comprimentos de onda. Então foram escolhidos os seguintes comprimentos de onda para a quantificação dos agrotóxicos na amostra: 275 nm para o tiametoxam; 270 nm para o imidacloprido; 225 nm para a azoxistrobina e fipronil.

**Figura 10** - Espectro obtido por LC-DAD, corresponde à cada analito tiametoxam, imidacloprido, azoxistrobina e fipronil



Fonte: LC-DAD.

### 4.3 Validação do método

#### 4.3.1 Linearidade e curvas analíticas

As equações e coeficientes de correlação ( $r$ ) obtidos a partir das curvas no extrato e no solvente são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** - Resultados obtidos para as curvas analíticas

Analitos	Curva analítica	$r$	Curva no	$r$
	no extrato		solvente	
Tiametoxam	$y=6,07 \cdot 10^3 x +$	0,99	$y=1,21 \cdot 10^5 x +$	0,99



	$2,56.10^2$		$1,49.10^3$	
Imidacloprido	$y=9,02.10^4x +$ $1,89.10^3$	0,99	$y=9,47.10^4x -$ $2,43.10^3$	0,99
Azoxistrobina	$y=2,13.10^5x +$ $8,9.10^3$	0,99	$y=2,19.10^5x -$ $4,57.10^3$	0,99
Fipronil	$y=1,59.10^5x +$ $8,99.10^3$	0,99	$y=1,65.10^5x -$ $2,04.10^3$	0,99

As duas curvas foram analisadas para verificar se havia interferência da matriz. Analisando as curvas analíticas construídas e as equações da reta para o método, se pode concluir que houve interferência da matriz no tiametoxam comparando os coeficientes angulares das curvas. Também que o modelo de regressão linear é pertinente para determinar os agrotóxicos estudados neste trabalho. Os coeficientes de correlação (r) foram iguais a 0,99, que está de acordo com os valores recomendados pela ANVISA e INMETRO, sendo eles 0,99 e 0,90, respectivamente.

#### 4.3.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para o método desenvolvido para LC-DAD, o LMR estabelecido pelo MAPA no Brasil e pela União Europeia (EU), são apresentados na Tabela 9. Os limites instrumentais e do método foram os mesmos, pois não teve pré-concentração ou diluição na etapa de preparo de amostras, a razão amostra: volume de acetonitrila foi 1:1 (m/v).

**Tabela 9** - LD e LQ para os agrotóxicos, LMR no Brasil e EU

<b>Analitos</b>	<b>LD (mg kg<sup>-1</sup>) método proposto</b>	<b>LQ (mg kg<sup>-1</sup>) método proposto</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>) MAPA</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>) EU</b>
Azoxistrobina	0,016	0,05	0,05	0,05
Fipronil	0,016	0,05	n.i	0,01
Imidacloprido	0,016	0,05	0,05	0,05
Tiametoxam	0,083	0,25	n.i	0,01

n.i – não informado

Os valores de LQ obtidos por LC-DAD para os agrotóxicos azoxistrobina, fipronil e imidacloprido estão dentro do esperado para verificação desses compostos em amostras de mel. Porém para o tiametoxam o LQ ficou acima do que o LMR estabelecido pela legislação europeia. Não foi encontrado o valor limite desse composto em mel na legislação brasileira. Para a avaliação dos agrotóxicos em estudo, exceto para o tiametoxam, os valores do limite de quantificação do método atendem as exigências da legislação brasileira. E de acordo com a legislação europeia os valores de LQ da azoxistrobina e imidacloprido são atendidos.

#### 4.3.3 Exatidão (recuperação)

A recuperação foi realizada pela fortificação da amostra com concentrações conhecidas dos analitos e extraída pelo método QuEChERS citrato, seguida pela determinação por LC-DAD. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Recuperação (R%) do método QuEChERS citrato e LC-DAD para agrotóxicos em amostras de mel fortificadas em diferentes níveis

Agrotóxicos	Nível (mg kg <sup>-1</sup> )	R (%)
Azoxistrobina	0,05	79
	0,1	81
	0,25	86
	0,5	70
Fipronil	0,05	95
	0,1	84
	0,25	82
	0,5	70
Imidacloprido	0,05	72
	0,1	74
	0,25	114
	0,5	104
Tiametoxam	0,05	-
	0,1	-
	0,25	103
	0,5	116

- Esses níveis estão abaixo do limite de quantificação desse analito, não sendo avaliados.

As recuperações dos agrotóxicos estudados estão de acordo com a faixa aceitável entre 70 e 120% (INMETRO, 2020; RIBANI et al., 2004). Os valores obtidos nos ensaios de recuperação por QuEChERS citrato ficaram entre 70 e 116%, comprovando a eficiência de extração do método.

#### 4.3.4 Precisão (repetibilidade)

A precisão foi avaliada pela repetibilidade a partir dos ensaios de recuperação, o RSD aceitável para métodos cromatográficos de análise traço, segundo o INMETRO (2020), é  $RSD \leq 20\%$ . Os valores de RSD% obtidos das áreas dos padrões são apresentados na Tabela 11, que ficaram dentro do permitido pelo INMETRO.

**Tabela 11** - Precisão instrumental (RSD%) avaliada pela repetibilidade para LC-DAD

Agrotóxicos	Nível (mg kg <sup>-1</sup> )	R (%)
Azoxistrobina	0,05	18
	0,1	6
	0,25	17
	0,5	10
Fipronil	0,05	18
	0,1	9
	0,25	7
	0,5	6
Imidacloprido	0,05	12
	0,1	9
	0,25	16
	0,5	7
Tiametoxam	0,05	-
	0,1	-
	0,25	20
	0,5	18

- Esses níveis estão abaixo do limite de quantificação desse analito, não sendo avaliados.

#### 4.4 5-HMF e furfural

As curvas obtidas a partir da diluição da solução padrão tiveram coeficiente de correlação maior do que 0,99. As equações da reta e coeficiente de correlação obtidos são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12** - Resultados obtidos para a curva na FM

Analitos	Curva na FM	r
HMF	$y=1,57.10^5x + 6,87.10^2$	0,999
Furfural	$y=1,20.10^5x + 9,32.10^2$	0,999

#### 4.5 Aplicabilidade do método

Após a validação, o método foi aplicado em 3 amostras diferentes de mel (A, B, C), sendo eles de eucalipto, provenientes da mesma localização, porém com origens florais distintas, como apresentado na Figura 11.

**Figura 11** - Mel de eucalipto (A), nativa (B) e de eucalipto (C), utilizados na aplicabilidade do método e seus respectivos extratos (1,2,3)

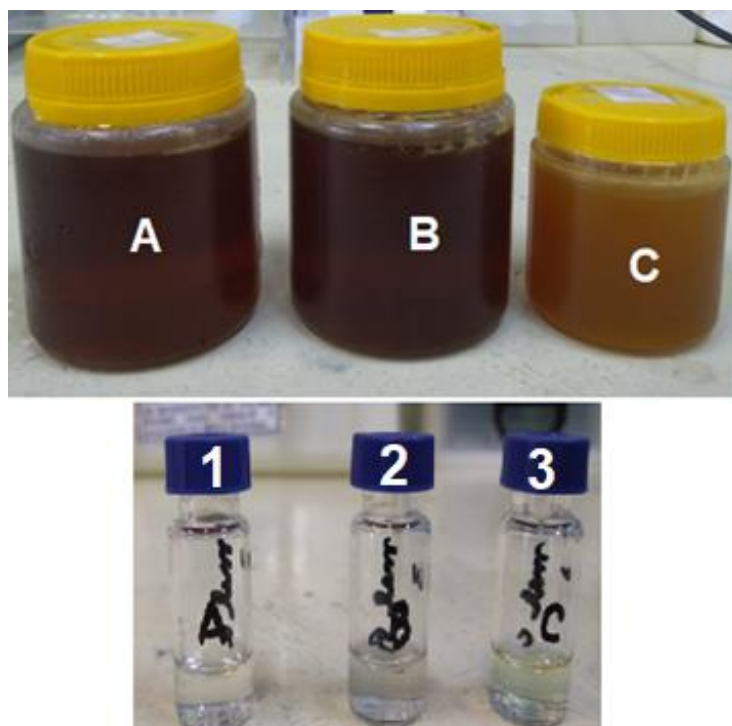


Foto: autoria própria.

Em nenhuma das amostras foi detectado resíduos de agrotóxicos e furfural, porém nenhuma delas estavam isentas de 5-HMF. O estudo de Marcolin et al. (2021) avaliou 20 amostras de méis na região do Rio Grande do Sul, não foi detectado resíduos de agrotóxicos nas amostras. Outros estudos detectaram alguns agrotóxicos em amostras de mel, mas abaixo do LMR estabelecido pela legislação (LASHERAS et al., 2021; MZLIKAR et al., 2019; ORSO et al., 2016). Mesmo com baixos valores de resíduos de agrotóxicos determinados em mel, é necessário a constante avaliação desses contaminantes para disponibilizar um alimento seguro aos consumidores.

Para calcular a concentração de 5-HMF nas amostras de mel foi utilizada a equação da curva na fase móvel. A concentração de 5-HMF encontrada nas amostras não excederam o valor preconizado pela legislação de 60 mg kg<sup>-1</sup>. Concentrações baixas de 5-HMF é uma característica de méis fresco e com pouco período de armazenamento (DA SILVA et al., 2016). Os valores encontrados nas amostras A, B e C, são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Concentração de 5-HMF presentes nas amostras de méis

Amostras	5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> )
A	1,90±0,06
B	1,36±0,22
C	1,82±0,18

Outros estudos determinaram baixas concentrações de 5-HMF, Brugnerotto et al. (2021) observaram concentrações variando de 2,53 a 22,5 mg kg<sup>-1</sup> em 11 amostras de méis na região de Santa Catarina. Marcolin et al. (2021) encontram concentrações de <LOQ (0,00285 mg kg<sup>-1</sup>) a 1,0 mg kg<sup>-1</sup> em 20 amostras de méis na região do Rio Grande do Sul. Braghini et al. (2020) relataram concentrações <LOQ (0,31 mg kg<sup>-1</sup>) em 18 amostra de méis no Estado de Santa Catarina, mesmo após tratamento térmico de 90 °C. Os resultados obtidos nesse estudo concordam com os dados da literatura.

## 5. CONCLUSÃO

O estudo atingiu seu objetivo de aplicar o método QuEChERS e validá-lo para a determinação de azoxistrobina, fipronil, imidacloprido e tiametoxam em amostras de méis. A análise por LC-DAD mostrou-se eficiente na separação cromatográfica.

---

A linearidade foi obtida na faixa de trabalho com coeficientes de correlação maiores do que 0,99. A recuperação foi obtida na faixa de 70 a 114%, com desvio padrão relativo (RSD%) menor do que 20% para todos os agrotóxicos, exceto para o tiametoxam.

Nas três amostras de mel não foram detectados resíduos de agrotóxicos e furfural. A concentração de 5-HMF encontrada para as três amostras, estão abaixo do valor máximo permitido pela legislação brasileira e europeia.

A avaliação de contaminantes em alimentos é importante para garantir a qualidade dos alimentos e segurança para os consumidores. Então, a investigação de contaminantes, como os resíduos de agrotóxicos em méis da região do Rio Grande do Sul é relevante, pois esse estado é um dos maiores produtores de mel no país. Também é necessário avaliar sua qualidade, através da investigação de 5-HMF.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROLINK. Plataforma de consulta para informações dos agrotóxicos. Disponível em: <<https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/>>. Acesso em: 14 de Fev de 2022.

AKHTAR, Shabnam et al. Monitoring of pesticide and antibacterial drug residues in animal products from two states in India by modified multi-residue analytical methods using GC–ECD and HPLC–DAD. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 16, n. 2, p. 171-181, 2021.

ALMEIDA, Mariana O. et al. Optimization of method for pesticide detection in honey by using liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1368, 2020.

AMARAL, Priscila Oliveira. Caracterização química dos neonicotinóides em águas superficiais via cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS). 2017. Dissertação (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) – Autarquia associada à Universidade de São Paulo.

ANASTASSIADES, Michelangelo et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, Michelangelo et al. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety**, v. 46, p. 439-458, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto N° 4.074, 4 de Janeiro de 2002.

---

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria do colegiado RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 ago. 2019. ANVISA. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 22 Jan. 2022.

ANVISA. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/arquivos/reavaliacao-arquivos/4660json-file-1/view>>. Acesso em: 27 Jan. 2022.

BAS, S. Dagdeviren; GURKAN, RAMAZAN. Selective extraction and enrichment of 5-hydroxymethylfurfural from honey, molasses, jam and vinegar samples prior to sensitive determination by micro-volume UV-vis spectrophotometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103664, 2021.

BASARAN, Burhan et al. Risk assessment of acrylamide and 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) exposure from bread consumption: Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 107, p. 104409, 2022.

BRAGHINI, Francieli et al. Effect of different storage conditions on physicochemical and bioactive characteristics of thermally processed stingless bee honeys. **Lwt**, v. 131, p. 109724, 2020.

BRUGNEROTTO, Patricia et al. Physicochemical characterization of honeys from Brazilian monitored beehives. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 11, p. 2709-2719, 2021.

CALDAS, S. S. Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea. 2009. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

CANCILLIER, Michela et al. Application of bar adsorptive microextraction (BA $\mu$ E) for the determination of pesticides and emerging contaminants in water used for rice cultivation in southern Brazil. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 5, p. 1-12, 2020.

CELLA, Ana Lucia. Ecotoxicologia do agrotóxico fipronil em pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Corumbataí. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CODEX ALIMENTARIUS. STANDARD FOR HONEY. Adopted in 1981. Revised in 1987, 2001. **Codex Stan 12-1981**, p. 1-8, 2001.

CHEN, Zhixu et al. Sequential extraction and enrichment of pesticide residues in Longan fruit by ultrasonic-assisted aqueous two-phase extraction linked to vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction prior to high performance liquid chromatography analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1619, p. 460929, 2020.

CORAZZA, Gabriela et al. Assessment of a fully optimized DPX-based procedure for the multiclass determination of pesticides in drinking water using high-performance liquid

---

chromatography with diode array detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 1211-1221, 2019.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

DA SILVA, Priscila Missio et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309-323, 2016.

DAL BELLO, F. et al. Investigation of sulfoxaflor, flupyradifurone and their transformation products in plant-based food matrices. **Food Control**, v. 132, p. 108537, 2022.

DE FREITAS, Lucas Victor Pereira et al. Determination of DDT in honey samples by liquid-liquid extraction with low-temperature purification (LLE-LTP) combined to HPLC-DAD. **Analytical Methods**, v. 13, n. 16, p. 1955-1964, 2021.

DE OLIVEIRA ARIAS, Jean Lucas et al. Fast and simple method of simultaneous preservative determination in different processed foods by QuEChERS and HPLC-UV: Method development, survey and estimate of daily intake. **Food chemistry**, v. 293, p. 112-119, 2019.

DE TOXICOLOGIA, Gerência Geral et al. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos PARA: relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018: **Primeiro ciclo do Plano Plurianual 2017-2020**. 2019.

DIONÍSIO, Amália GG et al. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**. v. 2. pag.19-29, 2010.

DO AMARAL, Bianca; PERALTA-ZAMORA, Patricio; NAGATA, Noemi. Simultaneous multi-residue pesticide analysis in southern Brazilian soil based on chemometric tools and QuEChERS-LC-DAD/FLD method. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 26, p. 39102-39115, 2022.

EPA. Chemically-related Groups of Active Ingredients. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/chemically-related-groups-active-ingredients>>. Acesso em: 24 Jan. 2022.

EQUIPE MAIS SOJA. Deriva volta a causar problemas entre sojicultores e vitivinicultores no RS. Disponível em: <<https://maissoja.com.br/deriva-de-24-d-volta-a-causar-problemas-entre-sojicultores-e-vitivinicultores-no-rs/>>. Acesso em: 14 de Fev de 2022.

EU. União Européia. Banco de dados de pesticidas. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eupesticidesdatabase/products/?event=details&p=375>. Acesso em: 20 jun. 2022.

EUROPEAN COMMISSION, E. U. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/784 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance clothianidin. **Official J Eur Union L**. v. 61, p. 35-9, 2018.



---

EUROPEAN COMMISSION. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/783 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance imidacloprid. **Official J Eur Union L**, v. 132, p. 31-34, 2018.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/785 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance thiamethoxam Text with EEA relevance. **Official J Eur Union L**, v. 61, p. 40-4, 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Estudo revela que Brasil é um dos países mais eficientes no uso da terra e insumos agrícolas em função de sua alta produção. Disponível em: <<https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1070557/>>. Acesso em: 21 de Jan. de 2022.

FAROOQUI, Tahira. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 1, p. 122-136, 2013.

FOGLIANO, Vincenzo; EDOARDO, Capuano, Acrilamida e 5-hidroximetilfurfural (HMF): Uma revisão sobre metabolismo, toxicidade, ocorrência em alimentos e estratégias de mitigação. **LWT - Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 44, p. 793-810, 2011.

FRANCISQUINI, Júlia d'Almeida et al. Reação de maillard: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 48-57, 2017.

GARCIA, A. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E), 1999.

GARCÍA-GARCÍA, Carmen R. et al. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. **Life sciences**. v. 145, p. 274-283, 2016.

GAWEL, Marta et al. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 282, p. 36-47, 2019.

GEBREHIWOT, Weldejeworgis Hndeya; ERKMEN, Cem; USLU, Bengi. A novel HPLC-DAD method with dilute-and-shoot sample preparation technique for the determination of buprofezin, dinobuton and chlorothalonil in food, environmental and biological samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 101, n. 14, p. 2339-2353, 2021.

GURKAN, Ramazan. A New Enrichment Method for Quantification of 5-Hydroxymethylfurfural by Indirect Flame Atomic Absorption Spectrometry in Honey and Jam Samples. **Journal of AOAC International**, v. 104, n. 3, p. 682-692, 2021.

INMETRO. Brasília: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos analíticos, 2020.

---

KAMMOUN, Souad et al. Ultra-trace level determination of neonicotinoids in honey as a tool for assessing environmental contamination. **Environmental Pollution**, v. 247, p. 964-972, 2019.

KHALIL, Md Ibrahim et al. Irradiation and evaporation enhance physicochemical characteristics, AEAC, FRAP, protein and proline contents of tualang honey. **Journal of Food Biochemistry**. v. 39, n. 6, p. 742-753, 2015.

KUMRIĆ, Ksenija et al. Coconut shell activated carbon as solid-phase extraction adsorbent for preconcentration of selected pesticides from water samples. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 12, p. 1-10, 2019.

LANÇAS, Fernando M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**. v.1, p. 36-60, 2009.

LANÇAS, Fernando M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**. v.5, p. 27-46, 2013.

LASHERAS, Roberto Jesús et al. Occurrence of Pesticide Residues in Spanish Honey Measured by QuEChERS Method Followed by Liquid and Gas Chromatography –Tandem Mass Spectrometry. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2262, 2021.

LEHOTAY, Steven J. AOAC official method 2007.01 pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with Magnesium Sulfate. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p. 485-520, 2007.

LI, Zhao et al. Formation of 5-hydroxymethylfurfural in industrial-scale apple juice concentrate processing. **Food control**, v. 102, p. 56-68, 2019.

LIGOR, Magdalena et al. Determination of neonicotinoids in honey samples originated from Poland and other world countries. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5817, 2020.

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.

MA, Jiping et al. Multi-walled carbon nanotubes for magnetic solid-phase extraction of six heterocyclic pesticides in environmental water samples followed by HPLC-DAD determination. **Materials**, v. 13, n. 24, p. 5729, 2020.

MACHADO DE-MELO, Adriane Alexandre et al. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. **Journal of apicultural research**. v. 57, n. 1, p. 5-37, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Normativa nº11 de 20 de Outubro de 2000. Preconiza as quantidades de açúcares redutores, umidade, sacarose, sólidos solúveis, minerais, acidez, atividade diastásica e 5-HMF. Disponível em: <<https://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>>. Acesso em: 22 Jan 2022.

---

MARCOLIN, Lucas Cavagnoli et al. Meliponinae and Apis mellifera honey in southern Brazil: Physicochemical characterization and determination of pesticides. **Food Chemistry**, v. 363, p. 130175, 2021.

MARCONDES, Melissa Moliterno et al. Determination of 5-hydroxymethylfurfural in tomato-based products by MEKC method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 100, p. 103927, 2021.

MOREIRA, Mônica Ferreira; MANSUR, Juliana Figueira; MANSUR, J. F. Resistência e inseticidas: estratégias, desafios e perspectivas no controle de insetos. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. 1 ed. Rio de Janeiro: INCT-EM, p. 1-23, 2012.

MRZLIKAR, Miha et al. Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC-MS/MS. **Lwt**, v. 104, p. 45-52, 2019.

NEGUSSIE, Bezuayehu Tadesse; DUBE, Simiso; NINDI, Mathew Muzi. Multiclass Pesticide Residue Analysis in Fruit and Vegetable Samples by Combining Acetone-Based Salting-Out Assisted Extraction with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **Journal of Chemistry**, v. 2021, 2021.

NOWAK, Agnieszka et al. Furfural, hydroxymethylfurfural and furosine as maillard reaction markers in fruit based foods including jams and baby food. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 11, n. 3, p. 1384-1384, 2021.

ORSO, Débora et al. Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1638-1653, 2016.

PAVIA, Donald L. et al. Introdução à espectroscopia: Tradução da 4ª edição norte-americana. **São Paulo: Cengage Learning**, 2010.

PINHEIRO, Carolina de Gouveia MDE et al. Pesticide residues in honey from stingless bee *Melipona subnitida* (Meliponini, Apidae). **Journal of apicultural science**, 2020.

PORTILHO, Irzo Isaac Rosa; JÚNIOR, Rômulo Penna Scorza; DORES, Eliana Freire Gaspar De Carvalho. Determinação de resíduos dos agrotóxicos tiametoxam, bifentrina e permetrina em amostras de solo. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 24, 2014.

PRESTES, Osmar D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRESTES, Osmar Damian; ADAIME, Martha Bohrer; ZANELLA, Renato. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

RABIE, Mansour et al. Determination of dinotefuran and thiamethoxam residues in pepper fruits under greenhouse conditions using the QuEChERS method and HPLC/DAD. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 249-257, 2018.

---

REJCZAK, Tomasz; TUZIMSKI, Tomasz. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO<sub>2</sub>-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. **Food chemistry**, v. 217, p. 225-233, 2017.

RIBEIRO, Dayane Santos; DA SILVA PEREIRA, Tatiana. O agrotóxico nosso de cada dia. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 28, p. 14-26, 2016.

RIZELIO, Viviane Maria et al. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1640-1645, 2012.

ROMAN, Erivelton; Scherer, VARGAS, Leandro. Como funciona os herbicidas: da biologia à aplicação. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2005.

RYBAK-CHMIELEWSKA, Helena. Changes in the carbohydrate composition of honey undergoing during storage. **Journal of Apicultural Science**, v. 51, n. 1, 2007.

SAMPAIO, M. R. F. Otimização e validação de métodos empregando QuEChERS modificado, LC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em derivados de cana de açúcar. 2011. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

SCHEEL, Guilherme Luiz; TARLEY, César Ricardo Teixeira. Simultaneous microextraction of carbendazim, fipronil and picoxystrobin in naturally and artificial occurring water bodies by water-induced supramolecular solvent and determination by HPLC-DAD. **Journal of Molecular Liquids**, v. 297, p. 111897, 2020.

SIDRA IBGE. Tabela 74 – Produção de origem animal, por tipo de produto. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/74>>. Acesso em: 10 Jan. 2022.

SILVA, Renata AG; FARIA, Anizio M. Determinação de multirresíduos de agrotóxicos em méis produzidos na região do triângulo mineiro por UHPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 43, p. 307-313, 2020.

SOUZA, A. P. et al. Avaliação da eficácia do fipronil em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em tratamentos consecutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 55-60, 2014.

SVECOVÁ, Blanka; MOJMÍR, M. A. C. H. Content of 5-hydroxymethyl-2-furfural in biscuits for kids. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 10, n. 2, p. 66, 2017.

TANNER, Gina; CZERWENKA, Christoph. LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12271-12277, 2011.

TESSARO, L. Gonçalves. Determinação do pesticida 2,4-d e produtos de degradação de herbicidas ácidos em águas superficiais e subterrâneas: desenvolvimento, validação e aplicação. Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Mato Grosso. Cuiabá, p. 74. 2020.

---

TOMASSINI, D. Otimização e validação de método de extração (QuEChERS) e de análise (LC-DAD e LC-APCI-MS/MS) para determinação simultânea de agrotóxicos e hidroximetilfurfural em mel. 2011. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

TURKMEN, Zeynep. Development of a densitometric HPTLC method for determination of 5-HMF in fruit-based baby foods in Turkey. **Journal of Chemical Metrology**, v. 14, n. 1, 2020.

TURKUT, G. Merve et al. Investigating 5-hydroxymethylfurfural formation kinetic and antioxidant activity in heat treated honey from different floral sources. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 4, p. 2358-2365, 2018.

UNUVAR, Songül. Determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in expired pharmaceutical syrups by using HPLC-DAD method. Journal of the Turkish. **Chemical Society Section A: Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 1431-1440, 2018.

VOGEL, A. I. Análise química quantitativa. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

XIAONA, J. I. et al. Detection of the Carbaryl in Wastewater by HPLC-DAD. In: IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2021. p. 012004.

YETIM, Nurdan Kurnaz et al. Preparation of AChE immobilized microspheres containing thiophene and furan for the determination of pesticides by the HPLC-DAD method. **Journal of Molecular Structure**, v. 1222, p. 128931, 2020.