UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

LENITA PESSÔA ALTOÉ GUINThER

Análise de resíduo de pesticidas em amostras de mel da região de São
Carlos-SP

São Carlos
2021

Exemplar revisado

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

LENITA PESSÔA ALTOÉ GUINTHER

Análise de resíduo de pesticidas em amostras de mel da região de São
Carlos-SP

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica
e Inorgânica

Orientadora: Prof^a. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Guinther, Lenita Pessoa Altoé

Análise de resíduos de pesticidas em amostras de mel da região de São Carlos - SP / Lenita Pessoa Altoé Guinther. — São Carlos, 2021.
65 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

1. Mel. 2. Agrotóxico. 3. QuEChERS. 4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a oportunidade de concluir essa pesquisa sob a orientação da Professora Doutora Eny Maria Vieira e à banca examinadora por ter aceitado o convite para fazer parte dessa etapa tão importante da minha vida acadêmica.

Agradeço a empresa de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) que me patrocinou durante o meu mestrado, nos dois primeiros anos de pesquisa.

Agradeço também a Dra. Waléria Ferreira Rabêlo, pós doutoranda do grupo de pesquisa a qual fazia parte, o LAQUAAE, e aos demais integrantes do laboratório, que me auxiliaram nas minhas dúvidas e promoveram tempos agradáveis durante a minha estadia no laboratório. Agradeço também as minhas colegas de graduação Pamela e Rhaissa ao quais mantivemos a parceria e troca de experiências na pós.

E, para finalizar, agradeço ao meu marido, com quem me casei durante o mestrado, por ter me apoiado e ter feito todos os momentos difíceis em que estava prestes a desistir mais suportáveis. Foi ele quem me deu mais apoio e incentivo para terminar minha pesquisa diante de tantos obstáculos encontrados nesses anos.

Nada disso seria possível sem essas pessoas maravilhosas enviadas por Deus em minha vida, fazendo com que eu conseguisse seguir em frente e superar minhas dificuldades.

RESUMO

As abelhas são, sem dúvida, insetos de grande utilidade para o homem, já que promovem a polinização das flores e ainda fornecem mel, cera, geleia real, pólen, produtos amplamente aproveitados como alimento natural ou ainda com finalidades medicinais preventivas e curativas. O mel é um produto exclusivo das abelhas, um adoçante natural rico em substâncias nutritivas, o mesmo é resultado da ação das abelhas sobre o néctar retirado de flores ou das secreções provenientes de plantas e das excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas. As abelhas recolhem, transformam e combinam estas matérias-primas com substâncias específicas e próprias, armazenando e deixando-os maturar nos favos da colmeia. Os resíduos de agrotóxicos estão entre os compostos de interesse devido aos riscos à saúde humana e à saúde das abelhas. Os agrotóxicos imidacloprida e tiametoxam são utilizados em diversos monocultivos, como por exemplo: batata, algodão, soja, café, entre outros, já que esses cultivos são muitos vulneráveis a pragas e requerem fumigações intensas. Consequentemente, o mel produzido pelas abelhas pode ser também contaminado por esses agrotóxicos e seus possíveis produtos de degradação. As amostras de mel da região de São Carlos-SP foram estudadas, sendo grande parte delas produzidas pela abelha *Apis mellifera*, africanizada. Nesse estudo foi usado o método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) para a extração do tiametoxam e imidacloprida em amostras de mel, no intuito de quantificação desses neonicotinóides. Para o desenvolvimento e validação do método analítico foram usadas amostras de mel do meliponário do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais, da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) - USP e para a aplicação do método desenvolvido, amostras de mel adquiridas no comércio de São Carlos-SP. A fase móvel utilizada foi de acetonitrila e água, ambas acidificadas com 0.1% de ácido fórmico. Os parâmetros analíticos de validação do método desenvolvido incluíram faixa linear de trabalho 400 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, os limites de detecção e quantificação encontrados na validação foram de 0,02 e 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os analitos e uma recuperação do método em torno de 83 a 110%. Apenas o mel de jataí apresentou 215,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprida. Os agrotóxicos não foram detectados nas demais amostras utilizadas neste estudo.

Palavras-chave: mel, tiametoxam, imidacloprida, QuEChERS, agrotóxicos, HPLC-DAD.

ABSTRACT

Bees are undoubtedly insects of great use to humans, as they promote the pollination of flowers and also provide honey, wax, royal jelly, pollen, products widely used as natural food or even with preventive and curative medicinal purposes. Honey is a product exclusive to bees, a natural sweetener rich in nutritive substances, it is the result of the action of bees on the nectar taken from flowers or the secretions from plants and the excretions of plant-sucking insects that remain on living parts of plants. Bees collect, transform and combine these raw materials with specific substances, storing them and letting them mature in the combs of the hive. Pesticide residues are among the compounds of interest due to risks to human health and the health of bees. Imidacloprid and thiamethoxam pesticides are used in several monocultures, such as: potatoes, cotton, soybeans, coffee, among others, as these crops are very vulnerable to pests and require intense fumigation. Consequently, honey produced by bees can also be contaminated by these pesticides and their possible degradation products. Honey samples from the region of São Carlos-SP were studied, and most of them were produced by the Africanized honey bee *Apis*. In this study, the QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) was used for the extraction of thiamethoxam and imidacloprid in honey samples, in order to quantify these neonicotinoids. For the development and validation of the analytical method, honey samples from the meliponary of the Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais, at the Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) - USP were used and for the application of the developed method, honey samples purchased in commerce of São Carlos-SP. The mobile phase used was acetonitrile and water, both acidified with 0.1% formic acid. The analytical parameters of validation of the developed method included linear working range 400 to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, the detection and quantification limits found in the validation were 0.02 and 0.09 $\mu\text{g L}^{-1}$ for both analytes and a recovery of the method in around 83 to 110%. Only jataí honey presented 215.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ of imidacloprid. Pesticides were not detected in the other samples used in this study.

Keywords: honey, thiamethoxam, imidaclopride, QuEChERS, agrotoxic, HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do imidacloprida.	17
Figura 2. Estrutura química do tiametoxam.	18
Figura 3. Estrutura química da clotianidina, produto de degradação do tiametoxam.	18
Figura 4. Espectro de absorção de imidacloprida e tiametoxam em acetonitrila (10 mg L^{-1}) na região do UV (200 - 320 nm).	33
Figura 5. Tempos de retenção para o imidacloprida e o tiametoxam nos comprimentos de onda de 267nm e 253nm.	34
Figura 6. Colmeias do meliponário do CRHEA.	35
Figura 7. Curva analítica do imidacloprida no solvente.	37
Figura 8. Curva do solvente para o tiametoxam.	38
Figura 9. Linearidade do Imidacloprida.	38
Figura 10. Linearidade do Tiametoxam.	39
Figura 11. Curva na matriz de mel do meliponário para o imidacloprida.	41
Figura 12. Curva na matriz de mel do meliponário para o tiametoxam.	41
Figura 13. Análise do mel contaminado antes do processo de extração por $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprida e tiametoxam.	44
Figura 14. Análise do mel contaminado antes do processo de extração por $700 \mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprida e tiametoxam.	44
Figura 15. Análise do mel contaminado antes do processo de extração por $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprida e tiametoxam.	45
Figura 16. Análise do branco do mel do Broa.	45
Figura 17. Análise do mel contaminado depois do processo de extração por $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprida e tiametoxam.	46
Figura 18. Análise do mel contaminado depois do processo de extração por $700 \mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprida e tiametoxam.	46
Figura 19. Análise do mel contaminado depois do processo de extração por $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprida e tiametoxam.	47
Figura 20. Vias de degradação do composto tiametoxam.	48
Figura 21. Padrão 1 mg L^{-1} para a comparação de tempos de retenção dos agrotóxicos estudados.	52
Figura 22. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Apis do município de Ribeirão Preto.	53
Figura 23. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Apis mellifera do município de Santa Eudóxia.	53
Figura 24. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Jataí.	54
Figura 25. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Jataí do município de Indaiatuba.	55
Figura 26. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Tiúba do município de Vargem Grande.	55
Figura 27. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel adquirida no município de Santa Eudóxia.	56
Figura 28. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Tiúba do Maranhão.	56

Figura 29. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Tubuna.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes principais presentes no mel.....	24
Tabela 2. Padrões analíticos utilizados no desenvolvimento do método analítico. ...	27
Tabela 3. Dados para a confecção da curva analítica do imidacloprida no solvente.	36
Tabela 4. Dados para a confecção da curva analítica do tiametoxam no solvente. ...	37
Tabela 5. Limite de detecção e de quantificação do imidacloprida e do tiametoxam.	40
Tabela 6. Efeito matriz para as concentrações dadas do tiametoxam e do imidacloprida.	42
Tabela 7. Valores da área obtidos para o mel contaminado antes e depois do processo de extração por imidacloprida e tiametoxam e a respectiva recuperação em %.	47
Tabela 8. Exatidão para o tiametoxam testada em um dia.	50
Tabela 9. Exatidão para o imidacloprida testada em um dia.	50
Tabela 10. Exatidão para o tiametoxam testada em 3 dias.	51
Tabela 11. Exatidão para o imidacloprida testada em 3 dias.	51
Tabela 12. Resultados obtidos para o imidacloprida no mel de Jataí.	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Os agrotóxicos e as abelhas	16
1.1.1	Imidacloprida	17
1.1.2	Tiametoxam	18
1.2	Mel	19
1.3	Método de extração QuEChERS	20
1.4	Cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (HPLC-DAD)	21
1.4.1	Validação do método analítico	21
1.4.2	Pré-tratamento da amostra	24
2	OBJETIVO GERAL	25
2.1	Objetivos específicos	25
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	26
3.1	Reagentes e Soluções	26
3.2	Amostras de mel	26
3.2.1	Preparo das soluções	26
3.2.2	Instrumentação e condições cromatográficas	27
3.2.3	Extração	29
3.3	Validação do método	30
3.4	Aplicação do método analítico	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Determinações das condições cromatográficas	33
4.2	Aplicação do método analítico para mel	51
5	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Para a permanência e manutenção de um ecossistema, faz-se necessário a existência de diversas comunidades, cada uma com sua função e interagindo com as demais, constituindo assim um sistema estável e equilibrado. Dentre as espécies existentes em um ecossistema, pode-se destacar os polinizadores, fundamentais para a reprodução das plantas. Esses agentes podem ser fatores abióticos, como o vento, a água ou ainda podem ser chamados de bióticos, que é o caso dos animais, como por exemplo, as abelhas (Silberbauer-Gottsberger et al. 1988).

As abelhas são polinizadoras e por meio do trabalho exercido por elas é possível a manutenção de várias espécies vegetais que são utilizadas na alimentação humana.

O pólen, elemento fornecido pelas estruturas masculinas da flor, é a principal fonte de alimento não líquido para as abelhas. Ele contém diversos nutrientes que são importantes para a produção de geleia real, com a qual são nutridas as larvas de rainha e as larvas jovens de operárias nas espécies de *Apis* (Schlindwein et al., 2005).

Assim, observa-se a grande importância da polinização na manutenção e preservação da vida das abelhas. Por serem numerosas e por apresentarem estilo de vida que favorece a polinização, as abelhas são os insetos mais adequados para esse trabalho, apresentando melhor adaptação de sua estrutura corporal.

No Brasil, são encontradas 1678 espécies de abelhas (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002) das 3000 existentes na região neotropical.

As abelhas são responsáveis por uma parte da polinização cruzada, gerando uma adaptação para a evolução dos vegetais, aumentando a produção de frutos e sementes (COUTO e COUTO, 2002; FAO, 2004).

A apicultura e a meliponicultura são importantes atividades que movem o setor agropecuário do Brasil em nível internacional (ABADIO FINCO et al. 2010), sendo o país o sexto maior produtor de mel no mundo (BACAXIXI et al. 2011). Entretanto, sabe-se que ainda há um grande potencial apícola que pode ser explorado devido ao bom clima e uma flora repleta. Para isso faz-se necessário investimentos em técnicas

de manejo por parte dos apicultores, conhecendo melhor como se dá a colheita, as pragas que podem estar envolvidas no processo, e também conhecimentos sobre o mercado e a economia do mel (EMBRAPA, 2003).

A meliponicultura não é recente no Brasil, ela tem início com os povos indígenas que se relacionavam com meliponários estudando, criando e explorando de forma rústica, antes da chegada dos portugueses (VILAS-BÔAS, J. 2012).

Em 1839, o padre Antônio Carneiro importou de Portugal algumas colônias de abelhas e as trouxe para o Rio de Janeiro. Outras subespécies de abelhas foram introduzidas por imigrantes alemães e italianos entre os anos de 1845 e 1880, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (VILAS-BÔAS, J. 2012). Porém, as raças europeias não se adaptaram facilmente às condições climáticas do país.

Com o passar do tempo, a fim de aumentar a produção no país, foram inseridas algumas espécies de abelhas em nossa fauna. Com o apoio do Ministério da Agricultura, o professor Warwick Estevan Kerr introduziu a subespécie africana *Apis Mellifera Scutellata*. Como resultado da reprodução dos zangões das abelhas africanas e as abelhas europeias, surgiu um híbrido chamado abelha africanizada (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

As abelhas presentes na fauna geral, concentradas em várias localidades pelo mundo, estão suscetíveis à exposição de agrotóxicos, que causam danos irreversíveis a essas populações (Biesmeijer et al., 2006).

Os neonicotinóides são inseticidas neuromusculares que estão incluídos no grupo de moduladores que competem com os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR). Esses receptores são sensíveis à nicotina, pois ela apresenta uma molécula estruturalmente semelhante à acetilcolina (ACh). Sendo um inseticida natural, a nicotina é produzida pelas plantas de tabaco (JESCHKE et al., 2011).

A acetilcolina é o neurotransmissor principal e mais rápido de excitação nos insetos. Esses compostos têm a ação semelhante à da acetilcolina, que estimula as células nervosas repetidamente. Ligando-se aos receptores nicotínicos, a acetilcolinesterase (AChE), uma enzima que é responsável por degradar moléculas de acetilcolina interrompendo os sinais nervosos, não atua sobre esses receptores,

levando o inseto à morte por hiperexcitação nervosa (TOMIZAWA; YAMAMOTO, 1993; GOULSON, 2013).

Os neonicotinóides com porções de N-ciano-amidina (acetamiprida e tiaclopride) são atóxicos para as abelhas (JESCHKE; NAUEN, 2008). Porém, os neonicotinóides que apresentam N-nitro-guanidina (tiametoxam, imidacloprida e clotianidina) são seletivos para ligação aos nAChRs dos insetos. Por esse motivo, são considerados extremamente nocivos para as abelhas. Como consequência das suas propriedades químicas, esses agrotóxicos apresentam potencial de se acumular nos solos e conseguem persistir por anos, pois são altamente solúveis em água e se encontram em todas as plantas em que se utiliza esses agrotóxicos, desde a semente até a colheita (PANNA, 2012).

1.1 Os agrotóxicos e as abelhas

Com o objetivo de aumentar a produtividade agrícola, os agricultores lançam mão do uso de agrotóxicos nas plantações devido à expansão do agronegócio (Aizen et al., 2008). Esses agrotóxicos estão sendo amplamente utilizados e isso resulta na grande distribuição desses compostos no meio ambiente. Apesar de contribuírem com a produção agrícola, esses agrotóxicos causam danos ao meio ambiente e consequentemente aos homens, causando contaminação aguda ou crônica (FONG et al., 1999; BLASCO et al., 2003). Com isso, as abelhas, que não são o alvo principal, acabam sendo afetadas, por isso pode ocorrer o declínio das espécies de abelhas no mundo todo (Biesmeijer et al., 2006). Atualmente, a mortalidade das abelhas nunca foi tão relatada, e esse declínio da população se dá principalmente devido ao uso dos compostos (WIEST et al., 2011), além de outros fatores ambientais.

Quando as abelhas são expostas a esse tipo de produto, podem ser contaminadas, causando a morte, ou a alteração de seu comportamento. Entre os impactos negativos causados por agrotóxicos às abelhas, pode-se observar a diminuição da longevidade e de suas taxas de sobrevivência (WU et al., 2011), dificuldades nos processos de desintoxicação (BERENBAUM; JOHNSON, 2015) e na

atividade de forrageio da colônia (SCHNEIDER et al., 2012), decréscimo na produção de progênes, mudança na capacidade da abelha rainha em produzir feromônios cuja função é inibir a produção de novas rainhas (DUSSAUBAT et al., 2016), e além disso, as abelhas podem então produzir mel contaminado com os agrotóxicos aos quais elas foram expostas.

Pode-se citar alguns dos agrotóxicos como a imidacloprida e tiametoxam, que serão discutidos nos parágrafos que seguem.

1.1.1 Imidacloprida

O agrotóxico imidacloprida pertence à família dos neocotinóides e é um inseticida que age no sistema nervoso dos insetos. É usado em sementes e aplicações foliares para o controle de insetos sugadores como, tremonhas de arroz, pulgões, moscas brancas, térmitas, insetos de solo e alguns besouros, atuando no receptor nicotínico da acetilcolina, lesando o sistema nervoso, levando-os à morte. Isto prejudica o forrageamento de abelhas, a localização, a locomoção, a navegação e a saúde das colônias (GAZZONI, 2008).

Muito utilizado nas culturas de algodão, batata, citrus, milho, feijão, soja e muitas outras, o imidacloprida é uma suspensão concentrada de um inseticida sistêmico. Deve ser utilizado com uso obrigatório de equipamento de proteção individual, de classificação toxicológica de categoria 5, sendo perigoso ao meio ambiente (MAPA, 2020).

O imidacloprida é um inseticida perigoso para as abelhas, não podendo ser aplicado na época das floradas. Também é utilizado em cães e gatos para tratamento de pulgas. A estrutura do composto está descrita na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química do imidacloprida.

Fonte: Autoria própria.

1.1.2 Tiametoxam

O tiametoxam é um agrotóxico pertencente à família dos neonicotinóides, é um inseticida sistêmico que é absorvido rapidamente e transportado a toda a planta, impedindo assim que os insetos se alimentem dela.

Este inseticida pode estar presente no pólen das plantas, afetando principalmente as abelhas e outros seres polinizadores. É amplamente utilizado em culturas como batata, arroz, algodão, café, citrus, entre outras, para controle de insetos no geral (MacBean, 2010).

A estrutura química do composto está descrita na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química do tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Um produto da degradação do tiametoxam, é a clotianidina, podendo ser encontrada nas amostras onde o tiametoxam está presente, como no mel por exemplo. A estrutura da clotianidina está descrita na Figura 3.

Figura 3. Estrutura química da clotianidina, produto de degradação do tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

1.2 Mel

O mel é um líquido viscoso produzido a partir de néctar de flores que é transformado no sistema digestivo das abelhas através da invertase e a sacarase que são enzimas que transformam o néctar em mel (ALMEIDA, 2010).

Ele pode ser usado de diversas formas e possui benefícios para a saúde humana, pois é um alimento nutritivo, sendo utilizado na culinária de diversas formas (ALMEIDA, 2010). É conhecido desde os primórdios da humanidade, sendo anteriormente a única forma de adoçante utilizada pelo homem (ALMEIDA, 2010), existem registros da utilização do mel desde a Mesopotâmia, inclusive, podemos encontrar menções desse uso na Bíblia (CRANE, 1999).

Para o homem primitivo conseguir mel não era fácil, era necessário retirar os ninhos das abelhas das árvores ocas ou cavidades das rochas, porém, nem sempre essas colmeias se encontravam em lugares acessíveis (SOEIRO, 2006).

Os méis de diferentes floradas apresentam cores e propriedades diferentes, as composições físicas e químicas do produto, além de outras características, podem apresentar variação de acordo com sua origem, podendo ser classificado para fins de comercialização (CRANE, 1983). Os méis podem ser produzidos a partir de flores de laranjeiras, de eucaliptos, de flores silvestres, entre outras, suas características dependem do clima e condições ambientais (AZEREDO et. Al, 2003, ÖZCAN et al, 2006).

O mel é um alimento rico em hidratos de carbono (ALMEIDA, 2010), com propriedades benéficas, como: ação antibacteriana, antibiótica, anticárie, anti-inflamatória, antimicrobiana, bioestimulante, depurativa, emoliente, energética, imunoestimulante e cicatrizante (MATSUNO, 1997; MOTHERSHAW; JAFFER, 2004; HORIE et al., 2004; BEKERS et al., 2004; WAILI-AL, 2004; AL et al., 2009).

Além do seu uso na culinária, o mel também é utilizado na área cosmética, porém é no ramo culinário em que se encontra a maior utilização desse produto, sendo possível aplicá-lo na preparação de doces, bebidas (alcóolicas e não alcóolicas), além de outros usos (OLAITAN et al. 2007). Tudo isso graças à sua propriedade energética, podendo fornecer 309 kcal por 100g de ingestão (INSA, 2006).

O mel é constituído basicamente de açúcares (frutose e glucose), além de substâncias como enzimas, ácidos orgânicos e outras partículas sólidas que são provenientes da colheita (DECRETO-LEI nº 214/2003) e água. A quantidade de água presente no mel determina a duração do produto (BOGDANOV et al. 2004).

Por ser um produto de origem natural, o mel está sujeito a contaminações do ambiente, de fonte agrícola ou ambiental, dependendo do local onde a colmeia se encontra e das práticas apícolas (BOGDANOV, 2006., RISSATO et al. 2007., RIAL-OTERO et al. 2007., KUJAWSKI et al. 2008). Há publicações recentes sobre análises de pólenes de abelhas localizadas próximos de ambientes agrícolas demonstrando que muitos agrotóxicos (incluindo inseticidas, fungicidas e herbicidas) são encontrados em mel de abelhas e em pólenes (MULLIN, 2010).

1.3 Método de extração QuEChERS

O método QuEChERS vem das palavras em inglês: rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro. É um método de extração introduzido por Anastassiades et al. para retirada de resíduos de agrotóxicos em frutas e legumes, como método de preparo de amostra.

No método original desenvolvido, é feita a extração sólida com acetonitrila seguida da partição adicionando-se sais e posteriormente uma limpeza usando uma amina primária-secundária e sal para remover a água (ANASTASSIADES et al., 2003). O método pode ser adaptado a fim de facilitar a extração de algumas amostras em que isso é necessário (ANASTASSIADES et al., 2007).

Os sais de extração podem ser utilizados em maior ou menor quantidade, dependendo do nível de limpeza em que se espera da amostra. Quanto maior a quantidade de sais, maior a limpeza, porém maior o risco de se encontrar sal na amostra ao passar pelo método de classificação dos compostos, como o HPLC. Com isso, é preciso determinar a quantidade exata de sais a serem adicionados na amostra para a limpeza.

1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos (HPLC-DAD)

A cromatografia de alta eficiência (em inglês HPLC) é um método analítico para separar e quantificar analitos em amostras. A separação acontece a partir da afinidade que o analito apresenta com a fase estacionária da coluna cromatográfica, separando primeiramente a parte com menos afinidade e depois as que apresentam maior afinidade.

A intensidade do sinal é utilizada para quantificar o analito e é fornecida pela altura do pico máximo, levando em consideração a área do pico.

1.4.1 Validação do método analítico

Para uma análise de substâncias químicas, é realizada a avaliação dos parâmetros de qualidade do método para garantir que este seja exato, reprodutível, flexível e seja adequado seguindo as condições nas quais uma substância será analisada. Para assegurar que a metodologia analítica seja exata, a validação do método é utilizada em um sistema de análises de substâncias químicas.

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método proposto atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003).

Os parâmetros de qualidade do método são variáveis de acordo com cada guia, no entanto, as principais figuras de mérito para a validação de todos os métodos são praticamente as mesmas. No Brasil, podem ser encontrados vários guias de validação, entre eles, se destacassem os fornecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020; MAPA, 2011).

O procedimento utilizado para a validação foi o método de adição-padrão. Nele, é preparada uma solução-padrão de uma concentração conhecida dos compostos a serem analisados e a partir dela é preparada uma diluição para se construir a curva analítica (RIBANI, M. et al., 2004).

Em relação a validação do método, vale ressaltar que para um bom desempenho das técnicas analíticas dois pontos são cruciais: a qualidade dos dados instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no processamento. As ferramentas necessárias para a validação de um método são: curva analítica e determinação de sua faixa de linearidade, limite de detecção e quantificação, efeito matriz e recuperação do método.

- Linearidade: a linearidade representa a habilidade do método em fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações dos analitos nas amostras (INMETRO,2007). A linearidade foi considerada aceitável quando o r obtido foi maior que 0,90 de acordo com INMETRO.
- Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ): quando são analisadas concentrações de analitos muito baixas é importante determinar qual o menor valor de concentração que pode ser determinado pelo método utilizado. O LQ representa à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada. Já o LD corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão. Podem ser determinados da seguinte forma:

LQ: Primeiro ponto dentro da linearidade

$$LQ = (\text{Coeficiente angular} * 10) / \text{Coeficiente linear} \quad (1)$$

LD: primeiro ponto fora de linearidade

$$LD = (3,3 * \text{Coeficiente angular}) / \text{Coeficiente linear} \quad (2)$$

- Efeito matriz: é definido pela IUPAC como “o efeito combinado de todos os componentes presentes na amostra, exceto o analito em estudo”, para o nosso estudo específico, essa análise foi extremamente necessária, uma vez que o mel apresenta uma vasta gama de componentes e com isso se fez necessário mudar algumas otimizações no meio do processo de extração para diminuir o efeito de intensificação nos picos dos analitos em estudo.

Para avaliar a existência do efeito matriz nos sinais analíticos dos agrotóxicos no HPLC-DAD comparou-se as inclinações das curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato de mel, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Efeito matriz (\%)} = ((x_1 - x_2) / x_2) * 100 \quad (3)$$

X1=coeficiente angular da curva analítica preparada na matriz

X2=coeficiente angular da curva analítica preparada em solvente

- Precisão: A precisão demonstra a dispersão de resultados entre ensaios realizados de forma independente em condições operacionais parecidas. Ela é calculada por meio do desvio padrão relativo (RSD).
- Exatidão: A exatidão indica a proximidade entre a média de vários resultados de um ensaio de amostras certificadas. A recuperação (RE) se relaciona com a exatidão, devido à referência quanto a quantidade do analito extraído durante o processo junto com a quantidade real que está presente na amostra. Assim, a recuperação é estimada pela relação da porcentagem entre a concentração das amostras fortificadas antes e após o processo de extração.

Como pré-requisitos, os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas responsáveis devem ser qualificados e adequadamente treinados. Atualmente, é seguido o guia da Comissão Europeia SANTE/11813/2017 durante a análise de resíduos de agrotóxicos em mel e outros produtos relacionados às abelhas.

1.4.2 Pré-tratamento da amostra

Para a análise de amostras ambientais, é necessário um pré-tratamento devido à baixa concentração dos compostos de interesse. Esses compostos devem ser isolados para depois serem estudados.

O mel estudado, além dos agrotóxicos de interesse, obtinha ácidos graxos, açúcares e gordura, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Componentes principais presentes no mel.

Componentes	Média	Desvio padrão	Variação
Água (%)	17,2	1,46	13,4 - 22,9
Frutose (%)	38,19	2,07	27,25 - 44,26
Glicose (%)	31,28	3,03	22,03 - 40,75
Sacarose (%)	1,31	0,95	0,25 - 7,57
Maltose (%)	7,31	2,09	2,74 - 15,98
Açúcares totais (%)	1,50	1,03	0,13 - 8,49
Outros (%)	3,1	1,97	0,0 - 13,2
pH	3,91	-	3,42 - 6,10
Acidez livre (meq/Kg)	22,03	8,22	6,75 - 47,19
Lactose (meq/Kg)	7,11	3,52	0,00 - 18,76
Acidez total (meq/Kg)	29,12	10,33	8,68 - 59,49
Lactose/Acidez livre	0,335	0,135	0,00 - 0,950
Cinzas (%)	0,169	0,15	0,020 - 1,028
Nitrogenio (%)	0,041	0,026	0,00 - 0,133
Diastase	20,8	9,76	2,1 - 61,2

Fonte: EMBRAPA.

Com pré-tratamento da amostra, tem-se as técnicas de extração. No caso, o método de extração utilizado foi o QuEChERS (original); sendo adicionado sais de limpeza, além de solventes apropriados; dessa forma, foi possível tratar a amostra a fim de eliminar os compostos que não são de interesse no estudo.

2 OBJETIVO GERAL

O estudo tem como objetivo a quantificação dos agrotóxicos tiametoxam e imidacloprida em amostras de mel coletadas majoritariamente na região de São Carlos, SP, com o devido método analítico validado.

2.1 Objetivos específicos

- I. Desenvolver e otimizar o preparo de amostra sendo utilizado o método QuEChERS na extração resíduos dos agrotóxicos imidacloprida e tiametoxam em mel de abelhas africanizadas e outras espécies.
- II. Estabelecer condições cromatográficas ótimas para a análise de resíduos dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam em mel por cromatografia líquida;
- III. Otimizar o método de extração além do método de análise por cromatografia líquida;
- IV. Realizar a validação do método desenvolvido através da extração por QuEChERS de forma mais eficiente e seletiva para os analitos;
- V. Aplicação do método validado para a quantificação dos agrotóxicos tiametoxam e imidacloprida em amostras de mel comercial oriundos da região próximo a São Carlos- SP.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Soluções

Os Reagentes utilizados no processo de extração dos analitos presentes nas amostras de mel do CRHEA e dos demais méis comerciais, foram os seguintes: Acetona (Honeywell-Grau HPLC), Acetonitrila (Tedia- grau HPLC), Ácido fórmico (Synth) e Ácido acético (Synth) que foram adquiridos da empresa São Carlos Química (São Carlos, SP), utilizados no preparo das amostras e separação no HPLC-DAD. Os reagentes que foram utilizados no método de extração QuEChERS foram os seguintes: Acetato de sódio (JTBaker), Citrato de sódio (Synth), Cloreto de sódio (Synth), Sulfato de magnésio (JTBaker), PSA (amina primária e secundária) (Cromabond, Macherey-Nagel) e C18 (Bakerbond), também, de elevada pureza analítica e os filtros Chromafil® politetrafluoretileno (PTFE) (0,20 µm-15 mm) foram obtidos da Macherey-Nagel.

3.2 Amostras de mel

As amostras de mel utilizadas no estudo para a validação do método foram coletas no meliponário experimental do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais da Escola de Engenharia de São Carlos (CRHEA). As amostras de mel para a aplicação do estudo foram adquiridas da região próxima à São Carlos no estado de São Paulo, além de uma amostra do Maranhão disponível.

3.2.1 *Preparo das soluções*

Os padrões analíticos do imidacloprida e tiametoxam foram obtidos da Sigma-Aldrich. De acordo, com os dados descritos na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Padrões analíticos utilizados no desenvolvimento do método analítico.

ANALITO	CAS	Fórmula	Grupo Químico	Classe	Pureza (%)
Tiametoxam	153719-23-4	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	Neonicotinóide	Inseticida	99,3
Imidacloprida	138261-41-3	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	Neonicotinóide	Inseticida	98,0

Fonte: Autoria própria.

Primeiramente foi preparada uma solução-estoque de 1000 mg L⁻¹ de cada composto estudado em ACN. A balança utilizada para a pesagem dos agrotóxicos puros a serem utilizados para as soluções foi uma BEL Engineering M214Ai da Delpho.

A partir da solução-estoque, foi preparada uma solução de trabalho de 10 mg L⁻¹ de cada composto em ACN: H₂O (1:1 v/v) e também da mistura dos dois agrotóxicos estudados (chamada de mix) na mesma concentração.

As soluções dos padrões a serem utilizadas na validação do método foram preparadas a partir da solução trabalho e misturas dos dois compostos estudados o imidacloprida e tiametoxam. Foram feitas soluções em concentrações mais altas devido ao efeito de matriz elevado quando trabalhado em concentrações abaixo de 250 µg L⁻¹, portanto após novas otimizações do método analítico as concentrações para a faixa linear da construção da curva analítica e das matrizes foram de 400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 µg L⁻¹.

3.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas

Para determinar as condições cromatográficas de análise selecionou-se primeiramente um cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a um detector com arranjos de diodos (HPLC-DAD) para encontrar as condições melhores de trabalho.

HPLC-DAD, marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series (USA), com detector de arranjo de diodos (DAD) G1315D, desgaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, amostrador automático ALS G1329A e compartimento da coluna

termostatizado G1315A, com o objetivo de estabelecer as condições cromatográficas e avaliar as variáveis do método de preparo de amostra.

A seleção dos comprimentos de onda foi feita por meio da análise de amostras individuais dos padrões, na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a varredura foi feita em 267 e 253 nm para o imidacloprida e tiametoxam respectivamente. Os comprimentos de onda monitorados variaram conforme a máxima absorbância dos analitos.

Em seguida, foi preparada uma solução de trabalho contendo a mistura dos dois analitos na concentração de 10 mg L^{-1} em água: acetonitrila (ACN) (1:1, v/v), com a qual foram feitas as primeiras diluições testes de 50; 100; 250; 500; 750 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ em água: ACN (1:1, v/v) para a elaboração das curvas analíticas e fortificação das amostras, durante a avaliação das principais variáveis do método de preparo de amostra no CLAE-DAD.

A princípio das análises a otimização de método se iniciou com condições cromatográficas de análise variando a fase móvel composta de 40% acetonitrila e 60% água milli-Q, com apenas a acetonitrila acidificada a 0.1% com ácido fórmico. A coluna utilizada foi a Zorbax SB-C18 4,6 x 250 mm 5-microns e a corrida cromatográfica foi de 12 minutos, a temperatura da coluna foi de 20°C e vazão foi de $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$, onde no decorrer da validação devido ao efeito de matriz elevado, foi feito ajustes utilizou-se uma fase móvel composta por água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico e acetonitrila (75:25 v/v). O volume de injeção foi de $20 \mu\text{L}$.

Foram feitas análises de cada composto em estudo para verificar a performance dos picos cromatográficos. Após essa etapa, foi feita a análise da mistura dos compostos para verificar a separação dos picos cromatográficos.

Nessa etapa, foi feita a curva analítica dos agrotóxicos no solvente, em que concentrações conhecidas de imidacloprida e tiametoxam foram analisadas pelo equipamento, para a construção da curva analítica.

A curva analítica feita no solvente segundo recomendações da ANVISA 2003 e SANTE apresentando um coeficiente r^2 bom para as duas curvas.

Com isso, foi determinado o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método, podendo ser utilizado para analisar a amostra de mel comercial.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a -4 °C, preparando uma nova solução de trabalho a cada semana.

3.2.3 Extração

Para a extração dos analitos de interesse, foi utilizada a princípio a metodologia QuEChERS original na etapa de limpeza – clean up (10 mL de solvente para extração + 25mg de PSA e 25mg de C18), onde foram feitos alguns ajustes em decorrer das análises do mel de *A.mellifera*.

Foram pesados 1g da amostra de mel e diluída em 2mL de água e 6mL de acetonitrila para totalizar 8mL de solvente total para a extração efetiva. Essa solução foi utilizada no método como apresentado no quadro a seguir.

Quadro 1. Método de preparo de amostra QuEChERS otimizado

	QuEChERS otimizado
EXTRAÇÃO	1g de mel + 2mL de água + 6mL de acetonitrila Vórtex 1 minuto
PARTIÇÃO	0,4g de MgSO ₄ + 0,1g de NaCl Vórtex 1 minuto 15 minutos na centrífuga a 4000 rpm
LIMPEZA	Retirar 5 mL do sobrenadante 15mg de MgSO ₄ + 75mg de PSA + 75mg de C18 Vórtex 1 minuto 5 minutos na centrífuga a 4000 rpm

Fonte: Autoria própria.

As quantidades de PSA e C18 foram ajustadas, pois segundo o método original, eram utilizadas apenas 25 mg de cada composto. Foram feitos estudos de 25; 50; 75 e 100 mg de PSA e C18 a fim de se obter o melhor resultado em relação a

recuperação, exatidão e efeito matriz. Com isso, observou-se que 75 mg ocorria uma boa limpeza e uma boa separação dos picos cromatográficos dos agrotóxicos estudados.

Após a extração, o extrato das amostras foi seco por 1 hora e meia com fluxo suave de N_2 e ressuspendido com solução 50% água e 50% acetonitrila (1:1 v/v) e analisado por cromatografia líquida. Antes de ser transferido para o vial o extrato foi filtrado com filtro de seringa de celulose ChromafilXtra 0,45 μm . O extrato foi analisado nas condições cromatográficas determinadas no início dos estudos.

3.3 Validação do método

Após conseguir as melhores condições de análise cromatográfica dos compostos em estudo, tais como separação e resolução dos picos cromatográficos fizeram-se as curvas analíticas dos agrotóxicos estudados.

Para a confecção das curvas analíticas na matriz foram feitas soluções a partir da solução de trabalho nas seguintes concentrações: 400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 $\mu g L^{-1}$ para o imidacloprida e para o tiametoxam.

A solução estoque preparada obteve concentração nominal de 1000 $\mu g mL^{-1}$ e a faixa linear de trabalho foi estabelecida entre 10 e 1000 $\mu g mL^{-1}$. Através das soluções do padrão de cada amostra, foram preparadas soluções para a construção das curvas de calibração. As soluções finais para este trabalho foram preparadas nas seguintes concentrações mais altas: 400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 $\mu g mL^{-1}$. As soluções preparadas para as curvas foram realizadas em triplicatas.

Para as outras etapas contaminaram-se amostras de mel coletadas no meliponário localizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais da Escola de Engenharia de São Carlos.

Assim que a curva analítica feita nas melhores condições de separação em 75% de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e 25% de acetonitrila também acidificada com 0.1% de ácido fórmico, apresentou condições que estivesse de acordo com os guias de regulamentação com r^2 e boa linearidade, foi determinado o limite de

quantificação e de detecção segundo Hübber (VALENTE, et. al, 2006) e os parâmetros de linearidade de acordo com o INMETRO e IUPAC (THOMPSON et. al., 2002, INMETRO, 2003).

A validação do método então foi feita, utilizando-se os parâmetros anteriormente descritos, sendo estudados a partir do controle de qualidade analítica das análises de resíduos e contaminantes em alimentos, sendo analisadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, sensibilidade (LOD e LOQ), linearidade, efeito matriz, precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e exatidão (percentual de recuperação). Para esta etapa foram consideradas como amostras branco, o mel de um apiário ecológico, uma vez que foram previamente analisadas para verificar a presença ou não dos analitos. A seletividade do método foi avaliada através da comparação entre os cromatogramas de amostras branco (n=10), versus os cromatogramas de amostras fortificadas no segundo nível da curva analítica. Os LOD e LOQ foram determinados por meio de amostras de mel fortificadas com diluições sucessivas de 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos padrões até conseguir uma relação sinal/ruído de 3 e 10 vezes, respectivamente.

A curva na matriz foi realizada utilizando as mesmas concentrações estudadas na curva do solvente, para determinar o efeito que a matriz do mel apresentava com os agrotóxicos. Com a curva obtida, os resultados em cada ponto puderam ser comparados para quantificar a porcentagem desse efeito na matriz.

Também foram feitas outras três soluções padrão de tiametoxam e imidacloprida (400,0; 700,0 e 1000,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) para cada uma das substâncias e foram preparadas independentemente, utilizando a solução de trabalho das amostras estoque de cada padrão (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), seguindo o procedimento descrito anteriormente para representação do controle a baixa, média e alta qualidade (LQC, MQC e HQC, respectivamente), para avaliar a exatidão e precisão do método.

Para determinar a precisão e exatidão do método, foi realizada uma análise inter dias e intra dia, em que uma concentração mais baixa, uma média e uma alta, de acordo com as concentrações utilizadas para a construção das curvas, foram utilizados para determinar esses parâmetros. Na análise intra dia, foram feitas injeções em triplicata para as concentrações propostas, e na análise inter dias, foram

feitas durante três dias, em triplicata a cada dia para cada concentração e assim observar o efeito do ($RSD \leq 20\%$).

A linearidade foi avaliada através de curvas analíticas utilizando o método de superposição de matriz ("matrix-matched"), a partir do preparo de amostras fortificadas conforme o método QuEChERS para os três níveis de concentração de acordo com os LOD e LOQ. Cada nível de concentração da curva foi preparado em quintuplicata ($n=3$).

Para a determinação do efeito matriz foram comparadas as curvas analíticas de soluções preparadas no solvente, nas concentrações de 400 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, e também nos extratos da matriz fortificada pelas mesmas concentrações em triplicata. Após ser avaliado o efeito matriz, foi realizada a sua quantificação calculada pelas inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente e na matriz fortificada.

3.4 Aplicação do método analítico

Para a aplicação do método em estudo, as amostras de mel foram extraídas pela mesma metodologia utilizada na validação. Foi utilizado o QuEChERS modificado, 8mL de solvente (2mL de água e 6mL de acetonitrila) e os sais foram adicionados como foi descrito em cada etapa.

Posteriormente, o extrato foi seco em fluxo de nitrogênio por aproximadamente 3 horas. A amostra foi ressuspendido com solução 1:1(v/v) de água mili-Q e acetonitrila grau cromatográfico.

Os resultados obtidos foram utilizados para a quantificação dessas amostras. Os agrotóxicos estudados foram tiametoxam, imidacloprida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinações das condições cromatográficas

A primeira etapa do desenvolvimento do método cromatográfico, tais como as condições de separação dos neonicotinóides foi feita em um cromatógrafo à líquido de alta eficiência com detector UV-Visível com arranjos de diodos (HPLC-DAD). Deste modo, foram feitas análises espectrofotométricas para determinar os comprimentos de onda máximos dos analitos, usando soluções em acetonitrila com concentrações de 10 mg L^{-1} de cada um deles. Assim, no espectro UV-Visível (Figura 4) pode se observar uma banda intensa a 253 nm para o tiametoxam e a 267 nm para o imidacloprida. O tempo em que cada um deles sai é de aproximadamente 5,8min para o tiametoxam e 8,2min para o imidacloprida como visto na Figura 4.

Figura 4. Espectro de absorção de imidacloprida e tiametoxam em acetonitrila (10 mg L^{-1}) na região do UV (200 - 320 nm).

Fonte: Autoria própria.

Os comprimentos de onda obtidos foram utilizados nos testes para escolha da coluna e a fase móvel.

Nos testes das modificações da fase móvel, os melhores resultados observados foram aqueles com a utilização do ácido fórmico. Geralmente, a acidificação da fase móvel é realizada quando se deseja separar compostos com

hidrogênios ionizáveis, assim é possível obter picos mais finos e intensos, como mostra a Figura 5.

Figura 5. Tempos de retenção para o imidacloprida e o tiametoxam nos comprimentos de onda de 267nm e 253nm.

Fonte: Autoria própria.

A escolha do ácido vai depender da força ácida do analito que está sendo analisado, assim quanto menor o pKa do analito, menor tem que ser o pKa do modificador, ou seja, mais forte terá que ser o ácido.

Para o estudo dos agrotóxicos tiametoxam e imidacloprida em amostras de mel, foi necessário primeiro fazer a validação do método. A validação foi feita com as amostras de mel do meliponário do CRHEA, como pode ser visto na Figura 6. O meliponário do qual as amostras de mel foram coletadas, encontra-se em uma área que fica distante de áreas cultivadas. O fato de as colmeias estarem em uma área protegida (proteção ambiental) e ser uma área natural, pode garantir a não contaminação das amostras de mel.

Figura 6. Colmeias do meliponário do CRHEA.

Fonte: Autoria própria.

Posteriormente, foram ajustadas as condições cromatográficas pré-estabelecidas no início CLAE-DAD, com o intuito de avaliar as figuras de mérito

do método de análise dos neonicotinóides em mel de abelhas africanizadas, além de melhorar a sensibilidade e a seletividade do método analítico.

Logo a validação seguiu com a construção de uma curva no solvente, nas concentrações anteriormente descritas. Com essas concentrações, determinou-se a área dos picos para o imidacloprida e para o tiametoxam comparando os tempos de retenção com os padrões em 1000 mg L⁻¹ e a curva no solvente foi testada para os parâmetros linearidade e repetibilidade.

O imidacloprida aparece no cromatograma em aproximadamente 8 min e o tiametoxam em 5 min. Para esses resultados, a fase móvel utilizada foi de 75% água acidificada com 0.1% de ácido fórmico e 25% acetonitrila acidificada com 0.1% de ácido fórmico em modo isocrático.

Com resultado da validação, é preciso observar a curva do solvente e se essa curva apresenta o R² o mais próximo possível do valor de 1,0.

Para ser realizada a curva do solvente, é necessário fazer soluções com uma ampla faixa linear de trabalho, as concentrações para esse estudo foi de 400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 μgL^{-1} . Essas soluções são feitas a partir da solução estoque de 10mgL^{-1} e dissolvidas em água e acetonitrila 1:1(v/v).

A seletividade durante a comparação entre os cromatogramas do extrato da amostra “branco” e do extrato da amostra fortificada, não foram observados picos interferentes no tempo de retenção dos analitos, sugerindo o método como seletivo.

A Tabela 3 representa os resultados obtidos para a confecção da curva analítica do imidacloprida no solvente e a Figura 7 o gráfico com o R^2 calculado para a curva do solvente.

Tabela 3. Dados para a confecção da curva analítica do imidacloprida no solvente.

Concentração (μgL^{-1})	1	2	3	Média	SD	RSD
400	48,66782	48,38818	48,7396	49	0	0
500	56,99881	56,41686	56,76856	57	0	1
600	66,28022	66,09364	66,34815	66	0	0
700	75,01455	74,76886	74,97192	75	0	0
800	85,26909	84,64523	86,4302	85	1	1
900	93,66405	93,04288	93,71877	93	0	0
1000	102,00127	101,07993	101,6477	102	0	0

Fonte: Autoria própria.

Figura 7. Curva analítica do imidacloprida no solvente

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado, o R^2 foi de 0,9989, sendo um bom resultado para prosseguir com a validação. Ele está de acordo as recomendações da ANVISA e SANTE.

Para o tiametoxam, tem-se a Tabela 4 com os dados para a confecção da curva analítica no solvente. A Figura 8 contém a curva analítica no solvente.

Tabela 4. Dados para a confecção da curva analítica do tiametoxam no solvente.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1	2	3	Média	SD	RSD
400	42,19286	48,50643	49,16832	47	0	0
500	57,2721	57,33866	57,60522	57	0	0
600	66,67207	65,73814	66,7689	66	0	0
700	75,6161	75,25491	75,04153	75	0	0
800	86,61241	85,92332	87,0249	87	0	0
900	99,113	99,7498	95,705	98	0	0
1000	103,47861	102,00127	101,7392	102	0	0

Fonte: Autoria própria.

Figura 8. Curva do solvente para o tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar que o R² para a curva do tiametoxam está de acordo com os guias de regulamentação da ANVISA 2003 e SANTE 2017. Assim sendo prosseguiu-se com a validação.

As Figuras 9 e 10 apresentam a linearidade dos resultados obtidos para as curvas do tiametoxam e do imidacloprida.

Figura 9. Linearidade do Imidacloprida.

Fonte: Autoria própria.

Figura 10. Linearidade do Tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Com esses resultados, foi possível observar que de acordo com a faixa linear de trabalho o primeiro ponto dentro da reta para o tiametoxam e o imidacloprida segundo Hubber tem-se a valores para ambos de $\leq 400 \mu\text{g/L}$. Ele é dado pelo menor valor que se encontra no estudo de linearidade.

Com o método cromatográfico desenvolvido foi possível a quantificação e detecção dos analitos presentes em amostras de mel de abelhas *A.mellifera* em baixa concentração. Os LOD e LOQ foram determinados segundo o método da relação sinal/ruído fazendo a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas de tiametoxam e imidacloprida na matriz e um branco destas amostras até obter um sinal 3 e 10 vezes maior do que a relação sinal/ruído, respectivamente. Assim, obteve-se entre um LOD de $0,02 \mu\text{g/L}$ e um LOQ de $0.09 \mu\text{g/L}$ para ambos os analitos.

A Tabela 5 apresenta o limite de detecção e de quantificação do método para o imidacloprida e para o tiametoxam.

Tabela 5. Limite de detecção e de quantificação do imidacloprida e do tiametoxam.

Agrotóxico	LD	LQ	a	b
Imidacloprida	0,02	0,07	0,0898	12,405
Tiametoxam	0,03	0,09	0,0943	10,506

Fonte: Autoria própria.

Para verificar a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas de 5 níveis de concentração em triplicata do extrato da matriz pós-fortificada, estabelecendo como primeiro nível o LOQ anteriormente calculado (0.07 μgL^{-1} e 0.09 μgL^{-1}) imidacloprida e tiametoxam, respectivamente. A faixa de trabalho para ambos os analitos foi de LOQ a $\leq 400 \mu\text{gL}^{-1}$.

Os valores encontrados de LD e LQ estão satisfatórios devido à baixa concentração encontrada para esses limites, sendo bons em relação à concentração utilizada para testes. Esses valores são diferentes do teste de Hubber devido à aplicação da equação para estudo, sendo os limites determinados por Hubber muito maiores frente ao limite real determinado, pois esses valores são encontrados pela menor concentração utilizada.

Com isso pode-se observar que apesar da validação ter sido feita com concentrações acima de 400 μgL^{-1} , os valores que podem ser encontrados nas amostras desconhecidas tanto no LD e no LQ são muito pequenos, podendo ser feita a análise com concentrações muito baixas dos agrotóxicos.

Porém, durante as análises, foi observado que concentrações menores que 300 μgL^{-1} de imidacloprida e de tiametoxam contidas no mesmo vial, ao serem analisadas por HPLC-DAD as concentrações não eram muito bem descritas no cromatograma devido a interferências entre os analitos, obtendo assim coeluições, picos alargados, aumento de ionização e baixa linearidade, principalmente em matriz pós-fortificadas.

Após obter os resultados de limite de detecção e de quantificação, foi feita a curva na matriz do mel do meliponário do CRHEA. Em seguida aplicou-se o método QuEChERS para o processo de extração do mel.

O método consiste em separar a matriz e posteriormente ressuspender com 1mL nas mesmas concentrações utilizadas na curva do solvente com o mix dos padrões de tiametoxam e imidacloprida (matriz pós-fortificada). Esse método garante que os resultados obtidos do mel comercial sejam os mais próximos possíveis do real, simulando a matriz do mel nas concentrações conhecidas de agrotóxicos.

Nas figuras 11 e 12 pode-se observar os gráficos comparativos das curvas analíticas no solvente com a curva na matriz do imidacloprida e do tiametoxam respectivamente.

Figura 11. Curva na matriz de mel do meliponário para o imidacloprida.

Fonte: Autoria própria.

Figura 12. Curva na matriz de mel do meliponário para o tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Nas figuras 11 e 12, após a intersecção das retas, em vermelho estão descritas as curvas na matriz e em azul a curva no solvente. Assim, o tiametoxam e o imidacloprida apresentaram R^2 adequados de 0,9954 e 0,9909, respectivamente.

As curvas da matriz apresentaram bom R^2 e os valores estão próximos aos encontrados para a curva no solvente. O efeito matriz pode ser calculado a partir dos dados obtidos das áreas dos picos para o solvente e para a curva na matriz. Na Tabela 6 tem-se o efeito matriz do imidacloprida e do tiametoxam.

Tabela 6. Efeito matriz para as concentrações dadas do tiametoxam e do imidacloprida.

Concentração do agrotóxico (μgL^{-1})	Efeito matriz para o imidacloprida (%)	Efeito matriz para o tiametoxam (%)
400	-8,84087	-3,83287
500	-7,40035	-7,10565
600	-8,41578	-0,26961
700	-7,04158	-3,56422
800	-4,09498	-0,22885
900	-5,77825	2,289462
1000	-6,57269	5,975236

Fonte: Autoria própria.

O estudo desse efeito é realizado para verificar as possíveis interferências causadas pelas inúmeras substâncias que a matriz apresenta, o que causa a variação do sinal instrumental. Para determinar o EM, compara-se as curvas analíticas de soluções preparadas no solvente com as curvas de soluções que foram preparadas em extratos da matriz fortificada nas mesmas concentrações com no mínimo três réplicas para cada concentração utilizada nos diferentes níveis.

Sendo observado o efeito matriz, realiza-se a sua quantificação pela razão entre as inclinações das curvas analíticas no solvente e no extrato da matriz fortificada. A percentagem de efeito matriz (EM %) é estimado com a seguinte EQUAÇÃO:

$$\text{EM (\%)} = (\text{SINAL NA MATRIZ/SINAL DO SOLVENTE} - 1) \times 100$$

Depois de verificar a presença do efeito matriz, foi realizada a sua quantificação para cada analito, pela razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz pós-fortificada como percentual (EM, %). Obtiveram-se valores de 5,975 % na concentração mais alta da curva para o tiametoxam e -6,572 % para o imidacloprida.

Classifica-se o EM através da variação do sinal analítico. Assim valores inferiores a ± 20 % são considerados baixos, faixas de ± 20 % e ± 50 % possuem um efeito moderado, e valores superiores a 50 % ou inferiores a -50 % significam um elevado efeito de matriz. Essa diminuição ou amplificação do sinal se relaciona com a resposta instrumental no efeito matriz, em que foi possível avaliar que para ambos os analitos obteve-se um efeito considerado baixo e está dentro dos valores esperados entre $\leq 20\%$, como visto na tabela acima.

De acordo com os novos processos de extração na fase sólida dispersiva (d SPE) e na miniaturização do método para o mel, foi possível observar um efeito de matriz pouco acentuado, onde são considerados baixos quase nulos, havendo apenas em alguns pontos na curva analítica uma pequena supressão de ionização, levando a uma boa seletividade no método, mostrando ausência de co-eluição entre os interferentes da matriz e os analitos.

Também foi feita a análise do mel contaminado antes e depois da extração para comparação de resultados e estudo da recuperação do método. Os resultados que foram obtidos estão apresentados nas figuras 13 a 19 e na Tabela 7.

Figura 13. Análise do mel contaminado antes do processo de extração por 500 $\mu\text{g/L}$ -1 de imidacloprida e tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Figura 14. Análise do mel contaminado antes do processo de extração por 700 $\mu\text{g/L}$ -1 de imidacloprida e tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Figura 15. Análise do mel contaminado antes do processo de extração por 1000 µg/L-1 de imidacloprida e tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Figura 16. Análise do branco do mel do Broa

Fonte: Autoria própria.

Figura 17. Análise do mel contaminado depois do processo de extração por 500 $\mu\text{g/L}$ -1 de imidacloprida e tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Figura 18. Análise do mel contaminado depois do processo de extração por 700 $\mu\text{g/L}$ -1 de imidacloprida e tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

Figura 19. Análise do mel contaminado depois do processo de extração por 1000 μgL^{-1} de imidacloprida e tiametoxam.

Fonte: Autoria própria.

A medida da eficiência do método de extração dos analitos de interesse da matriz foi determinada em triplicata através da fortificação de três diferentes níveis.

Tabela 7. Valores da área obtidos para o mel contaminado antes e depois do processo de extração por imidacloprida e tiametoxam e a respectiva recuperação em %.

Mel contaminado	500 μgL^{-1} imidacloprida	500 μgL^{-1} tiametoxam	700 μgL^{-1} imidacloprida	700 μgL^{-1} tiametoxam	1000 μgL^{-1} imidacloprida	1000 μgL^{-1} tiametoxam
Antes	57,50843	60,37663	70,59179	70,1711	94,35147	118,735
Depois	52,203005	66,00524	71,39553	68,4373	112,7929	109,831
Recuperação (%)	110,16303	91,47248	98,87424	102,533	83,65020	108,107

Fonte: Autoria própria.

Observa-se uma boa recuperação do método quando se estuda a imidacloprida. A recuperação é melhor em concentrações mais baixas (500 μgL^{-1}) em relação ao tiametoxam. Acontece o inverso com o tiametoxam em que a recuperação é melhor em concentrações mais altas por estar mais próximo de picos interferentes

entre 2 e 4 minutos e possíveis produtos de degradação, onde o mesmo não foi possível retirar com a otimização na limpeza dos sais de clean-up. Estima-se que nessa região esteja a formação da clotianidina à qual é um inseticida neonicotinóides de segunda geração assim como seu precursor, suprimindo principalmente a resposta do nosso analito tiametoxam, dificultando a quantificação e identificação na matriz. Essa degradação pode ocorrer através de um próton livre, presente na água utilizada no preparo das amostras ou advinda dos solventes utilizados no equipamento (HPLC-DAD), que interage com a molécula de tiametoxam removendo o substituinte metila do anel oxadiazine, formando o composto desmetilado, como pode ser observado na Figura 20.

Figura 20. Vias de degradação do composto tiametoxam.

Os valores de recuperação foram satisfatórios e variaram entre 83,65 a 110,16 %, com um RSD associado menor à 20%.

Toda a validação do método foi feita seguindo as instruções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e SANTE/11813/2017, observando os parâmetros de estabilidade da amostra, seletividade do método, a recuperação, o efeito da matriz, os limites de detecção e de quantificação (LOQ), linearidade e precisão.

Através da linearidade da curva analítica foi possível obter o cálculo da análise da regressão linear, usando a sua área, mediante a integração dos picos dos cromatogramas dos agrotóxicos nas diferentes concentrações das soluções versus a concentração nominal, e, para tanto, utilizou-se a metodologia linear dos mínimos

quadrados. A regressão linear ponderada foi utilizada para diminuir a variação entre os valores mais altos. A linearidade foi estudada através dos coeficientes linear de correlação (R^2), e também as análises dos seus fatores de resposta, obtida através do quociente entre a área do pico e a concentração de cada uma da amostra padrão.

O limite de quantificação foi obtido através da diluição da solução estoque dos padrões das amostras ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) até conseguir uma relação sinal/ruído (S/N) de 10. Em relação por exemplo ao limite de detecção (LOD), foi utilizada uma proporção de três vezes a relação sinal/ ruído. Quanto a precisão, esta foram avaliadas para cada amostra de interesse, como intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Analisadas em quintuplicata as soluções de interesse em concentrações baixas, médias e altas (400 ; 700 e $1000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), relacionando a curva de calibração de cada substância, dessa maneira foram utilizadas como padrões para avaliação. Através do desvio padrão relativo (RSD), foi possível determinar a precisão, sendo um dia dos resultados utilizado para avaliar pela repetibilidade e três dias consecutivos para precisão intermediária. A exatidão foi medida através da aplicação do método de quantificação das amostras e avaliando o percentual de tendência. Utilizou-se as mesmas concentrações para avaliar esses dois parâmetros.

As análises estatísticas das quantificações do método proposto para a análise das amostras de mel comercial e para confirmar a validação do método analítico, foi realizado o estudo da variância de um único fator seguindo a (ANOVA) com os resultados da regressão linear para avaliar o significado do método de proposta. A significância estatística foi definida em $p\text{-valor} < 0,05$, sendo o modelo explicado pela regressão proposta em um intervalo de confiança de 95%.

Dentro do esperado, as curvas dos agrotóxicos em estudo obtiveram o coeficiente de correlação (R) de todas as curvas dentro da relação dos eixos X e Y com um valor de aproximadamente 1,000. O coeficiente de relação (R^2) em 0,99 indica a confiabilidade no método matemático aplicado. As análises de variância, com uma probabilidade ou valor-p de 0,01, onde o valor-p é menor a $p > 0,05$.

O estudo da exatidão do método foi responsável por indicar a correlação avaliada através dos resultados obtidos com os aceitos como verdadeiros, onde os

verdadeiros são calculados pelo percentual médio de recuperação para os analitos em três concentrações diferentes, bem como os valores de seu desvio padrão relativo para cada amostra. As concentrações utilizadas para os agrotóxicos tiametoxam e imidacloprida como controle de qualidade (baixa, média e alta) foram as seguintes: 400; 700; 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as análises foram preparadas e analisadas em três ($n=3$) dias diferentes, onde estas foram escolhidas devido à faixa de trabalho da construção da curva de calibração.

A primeira concentração das soluções padrão dos neonicotinóides em estudo (400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi selecionada para serem 400% maior que o ponto no intervalo de resposta linear. O segundo (700,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e terceiro ponto (1000,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), referem-se a 700 e 1000% dos pontos de concentração mais altos na curva de calibração, respectivamente. A exatidão total média e desvio padrão (DP) encontrados foram de $91,0 \pm 0,97\%$ para o tiametoxam e $116,0 \pm 0,86\%$ para o imidacloprida, o que mostra a relação entre os valores teóricos e experimentais. Pode-se observar que os valores encontrados estão entre 70% e 120%, seguindo os valores de acordo com a SANTE 11813/2017/2019. Os resultados detalhados dos níveis de concentração escolhidos e posteriormente testados para os agrotóxicos até agora quantificados estão apresentados nas tabelas 8, 9, 10 e 11.

Tabela 8. Exatidão para o tiametoxam testada em um dia.

Concentração	A1	A2	A3	Média	SD	CV%	FR	Exatidão %
400	46,17375	45,57824	46,17375	45,97525	0,343818	0,747832	0,114938	102
700	71,35999	71,62989	46,17375	63,05454	14,61982	23,18589	0,090078	82
1000	95,228	95,25972	71,35999	87,28257	13,78937	15,79854	0,087283	79
média								88

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9. Exatidão para o imidacloprida testada em um dia.

Concentração	A1	A2	A3	Média	SD	CV%	FR	Exatidão %
400	62,71029	66,38078	62,71029	63,93379	2,119158	3,31464	0,159834	120
700	99,50779	97,35295	62,71029	86,52368	20,65112	23,8676	0,123605	112
1000	130,0979	129,9105	99,50779	119,8387	17,60736	14,69255	0,119839	116
média								116

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10. Exatidão para o tiametoxam testada em 3 dias.

Concentração	A1	A2	A3	Média	SD	CV%	FR	Exatidão %
400	46,30152	46,2428	46,75993	46,43475	0,283140	0,609760	0,116087	103
700	71,44281	71,47825	71,71776	71,54607	0,149565	0,209047	0,102209	83
1000	95,3653	95,46698	95,69828	95,51018	0,170643	0,178665	0,09551	86
média								91

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11. Exatidão para o imidacloprida testada em 3 dias.

Concentração	A1	A2	A3	Média	SD	CV%	FR	Exatidão %
400	62,78855	62,77011	63,24811	62,93559	0,270808	0,430294	0,157339	118
700	97,25364	97,34144	97,78074	97,45861	0,282405	0,28977	0,139227	116
1000	130,7579	130,168	130,5029	130,4763	0,295871	0,226762	0,130476	117
média								117

Fonte: Autoria própria.

As soluções padrões dos agrotóxicos usadas para a determinar a precisão foram estudadas na faixa do intervalo linear de trabalho. A precisão intermediária, inter-dia, foi obtida analisando os três níveis diferentes de concentrações utilizadas em três dias não consecutivos, para cada agrotóxico analisado, imidacloprida e tiametoxam.

O limite de quantificação nas matrizes, foi menor do que o ponto da curva de calibração (LQ real) para o tiametoxam e imidacloprida; sendo possível observar que é linear, exato e preciso, dentro da faixa de trabalho utilizada na avaliação do método analítico.

4.2 Aplicação do método analítico para mel

Feita a validação, utilizou-se o método para analisar amostras de mel comercial. As amostras de mel foram adquiridas no comércio local da região de São

Carlos, dos municípios de Santa Eudóxia, Ribeirão Preto, Indaiatuba, entre outros, além de uma amostra adquirida do Maranhão.

A Figura 21 apresenta o cromatograma dos agrotóxicos estudados para a comparação do tempo de retenção no dia em que as análises foram feitas, para minimizar possíveis diferenças de valores encontrados pela diferença de temperatura, umidade, entre outras variações no equipamento.

Figura 21. Padrão 1 mgL⁻¹ para a comparação de tempos de retenção dos agrotóxicos estudados.

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado, o pico referente ao imidacloprida saiu em aproximadamente 8,00 minutos e o do tiametoxam em 5,66 minutos.

O cromatograma referente à amostra de mel de apis de Ribeirão Preto está apresentado na Figura 22.

Figura 22. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Apis do município de Ribeirão Preto.

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado, não existem analitos com os tempos de retenção do tiametoxam e do imidacloprida. Pelo método aplicado nesse estudo não foi possível observar pico cromatográfico no tempo de retenção referente aos agrotóxicos estudados. Sendo assim presume-se que esses agrotóxicos não estão presentes nas referidas amostras. O cromatograma da amostra de mel de Apis oriundo do meliponário do município de Santa Eudóxia, está descrito na Figura 23.

Figura 23. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Apis mellifera do município de Santa Eudóxia.

Fonte: Autoria própria.

Não existem analitos de tempos de retenção referentes aos agrotóxicos estudados. O cromatograma do mel de Jataí está representado na Figura 24.

Figura 24. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Jataí.

Fonte: Autoria própria.

Nesse cromatograma, podemos ver o tempo de retenção de 7,88 minutos, que pode indicar a presença de imidacloprida. Na Tabela 12 temos os valores das áreas.

Tabela 12. Resultados obtidos para o imidacloprida no mel de Jataí.

Mel	Tempo de retenção- min	Área do pico-mAU*s
Jataí 1	7,874	40,45612
Jataí 2	7,879	23,07319

Fonte: Autoria própria.

Com a média e aplicando na equação da reta, temos que a concentração de imidacloprida no mel de Jataí é de 215.586 $\mu\text{g/L}$.

O cromatograma do mel de jataí de Indaiatuba está representado na Figura 25.

Figura 25. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Jataí do município de Indaiatuba.

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado, a amostra de mel de jataí de Indaiatuba não apresenta analitos no tempo de retenção referentes ao imidacloprida ou tiametoxam, o que indica a ausência desses compostos na amostra. O cromatograma de mel de tiúba de Vargem Grande está representado na Figura 26.

Figura 26. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Tiúba do município de Vargem Grande.

Fonte: Autoria própria.

No cromatograma descrito, não é possível observar compostos no tempo de retenção dos agrotóxicos estudados. O cromatograma do mel de Santa Eudóxia está descrito na Figura 27.

Figura 27. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel adquirida no município de Santa Eudóxia.

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado, não foi encontrado nenhum analito nos tempos de retenção dos agrotóxicos estudados, tiametoxam e imidacloprida. Então pode-se dizer que não existem esses agrotóxicos na amostra de mel analisada. O cromatograma do mel de Tiúba do Maranhão está descrito na Figura 28.

Figura 28. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Tiúba do Maranhão.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se pelo cromatograma da Figura 28 que não existe nenhum pico depois dos 5 minutos de tempo de retenção, o que pode ser visto como ausência dos agrotóxicos estudados, segundo o método desenvolvido e aplicado neste estudo. O cromatograma referente ao extrato da amostra do mel da abelha Tubuna está na Figura 29.

Figura 29. Cromatograma referente ao extrato da amostra de mel de Tubuna.

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado, nos tempos de retenção dos agrotóxicos estudados, não existe nenhum pico cromatográfico, o que indica a ausência desses agrotóxicos na amostra de mel de tubuna, segundo o método validado neste estudo.

Como os resultados demonstraram, não houve quantidades significativas dos agrotóxicos estudados nas amostras de mel utilizadas. Essa ausência ou baixa quantidade encontrada apenas no mel da espécie Jataí oriunda do município de São Carlos, se deve ao fato desses agrotóxicos não serem amplamente utilizados nessa região. Como as culturas do interior de São Paulo se concentram principalmente em cana-de-açúcar, café e citrus, os produtores das monoculturas de café e citrus não acabam utilizando tanto os neonicotinóides, já que estes são mais utilizados majoritariamente na produção de soja (MAPA, 2020; MacBean, 2010) e não são comumente utilizados para a cana-de-açúcar. Apesar de serem utilizados em café e citrus, pode ser observado que a quantidade é menor para essas culturas que são encontradas na região em que foram adquiridas as amostras do estudo.

Outra observação a ser feita é que na região de São Carlos, a cultura predominante é a cana-de-açúcar, que teve um aumento significativo da sua produção nos últimos anos. Além disso, a cultura que utilizaria os neonicotinóides estudados em maior escala seria a de citrus, que após o ano de 2015 teve uma queda significativa em sua produção (Lima, 2021).

5 CONCLUSÃO

Um método de extração QuEChERS foi otimizado com modificações para análise de mel, como preparação de amostra, utilizado para a determinação e quantificação dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam presentes nas amostras.

Como conclusão dos resultados obtidos, tem-se que o tiametoxam e o imidacloprida podem ser analisados a partir do método quantitativo utilizando o HPLC - DAD com a devida validação efetuada.

A utilização de uma amostra composta (mix) durante a análise de matrizes complexas é muito importante, melhorando a sua homogeneidade e representatividade. Desse modo, o uso de mel com um tempo baixo de prateleira como amostra, facilitou a obtenção de uma amostra composta, diminuindo bastante o efeito matriz.

O efeito matriz foi satisfatório, obtendo-se em média valores baixos em torno de $\leq 20\%$ o que é aceito pelos guias de regulamentação da SANTE e ANVISA.

O método validado apresentou limites de detecção e quantificação respectivamente de 0,02 e 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os analitos. Com isso, as amostras de mel puderam ser analisadas utilizando o método proposto. O método foi preciso, sendo obtidos valores de desvio padrão relativo (RSD) entre 7,1 e 16,8 % para os ensaios de repetitividade, e 6,5 a 18,4 % para os ensaios de precisão intermediária. Além disso, o método foi exato, sendo os valores entre 91 e 116 % considerados adequados. Os valores de recuperação variaram entre 83 e 110 %, satisfatórios, com um RSD associado menor à 20 %. O efeito de matriz foi pouco acentuado com valores 5,975% para o tiametoxam e -6,572% para o imidacloprida.

Observou-se que o imidacloprida estava presente nas amostras de mel de jataí adquirido em São Carlos. Já o neonicotinóide tiametoxam não foi encontrado em nenhuma das amostras de mel comercial estudados.

Essa ausência de agrotóxicos pode ser devido à quantidade apresentada nas amostras ser menor que os limites de detecção e quantificação determinados durante a validação, porém como esses valores encontrados foram muito pequenos, os agrotóxicos provavelmente não estão presentes. Isso se dá devido às culturas comuns dessa região, em que os agrotóxicos estudados não são amplamente utilizados.

A análise de diferentes amostras de mel sugere que o método desenvolvido possui um grande potencial para ser usado como um método analítico, principalmente em lugares com pouco recursos que não obtém um equipamento mais robusto para determinar resíduos de agrotóxicos em subprodutos de abelhas e com resultados confiáveis, podendo ser futuramente readaptado em análises em HPLC-MS/MS, aumentando assim a sensibilidade do método.

REFERÊNCIAS

ABADIO FINCO, F. D. B.; MOURA, L. L.; SILVA, I. G. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 706-712, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

AIZEN, M.A.; GARIBALDI, L. A.; CUNNINGHAM, S. A.; KLEIN, A. M. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. **Current Biology**, Cambridge, v. 18, p.1572–1575, 2008.

AL, M. L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 112, n. 4, p. 863-867, 2009.

ALMEIDA, C. M. V. B. **Deteção de contaminantes no mel**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Cary, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. *In*: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H. (ed.). **Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. p. 439-458.

AZEREDO, L. C., AZEREDO, M., SOUSA, S., DUTRA, V. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 80, p. 249-254, 2003.

BACAXIXI, P.; BUENO, C. E. M. S.; RICARDO, H. A.; EPIPHANIO, P. D.; SILVA, D. P.; BARROS, B. M. C.; SILVA, T. F.; BOSQUÊ, G. G.; LIMA, F. C. C. A importância da apicultura no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, n. 20, p. 1-6, 2011.

BEKERS, M.; MARAUSKA, M.; GRUBE, M.; KARKLINA, D. New prebiotics for functional food. **Acta-Alimentaria**, Budapest, v. 33, n. 1, p. 31-37, 2004.

BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, Oxford, v. 10, p. 51–58, 2015.

BIESMEIJER, J. C.; ROBERTS, S.P.; REEMER, M.; OHLEMULLER, R.; EDWARDS, M.; PEETERS, T.; SCHAFFERS, A.P.; POTTS, S. G.; KLEUKERS, R.; THOMAS, C. D.; SETTELE, J.; KUNIN, W. E. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, Washington, v. 313, n. 5785, p. 351-354, 2006.

BLASCO, C.; FERNÁNDEZ, M.; PENA, A.; LINO, C.; SILVEIRA, M. I.; FONT, G.; PICÓ, Y. Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 8132-8138, 2003.

BOGDANOV, S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, Paris, v. 37, p. 1-18. 2006.

BOGDANOV, S., RUOFF, K., ODDO, L. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. **Apidologie**, Paris, v. 35, p. S4-S1, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro Nortox sob no. 11012**. Brasília, 2020, 18p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório de ingredientes ativos: thiamethoxam**. Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual da garantia da qualidade analítica: resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília, 2011. 227 p.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 191 p.

CRANE, E. **O livro do mel**. São Paulo: Noel, 1983.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honeyhunting**. New York: Routledge, 1999.

DUSSAUBAT, C.; MAISONNASSE, A.; CRAUSER, D.; TCHAMITCHIAN, S.; BONNET, M.; COUSIN, M.; KRETZSCHMAR, A.; BRUNET, J. L.; LE CONTE, Y. Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 31430, p. 1-7, 2016.

EMBRAPA MEIO NORTE. **Sistemas de produção: apicultura**. Teresina, 2003.

EMBRAPA MEIO NORTE. **Sistemas de produção: produção de mel**. Teresina, 2003.

FAO. **Key statistics of food and agriculture external trade**. Rome, 2004. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 06 ago. 2019.

FONG, W. G.; MOYE H. A.; SEIBER J. N.; TOTH J. P. **Pesticides residues in foods**: methods, techniques, and regulations. New York: John Wiley & Sons, 1999.

GAZZONI, D. L. **Tiametoxam**: uma revolução na agricultura brasileira. São Paulo: Vozes, 2008. 342 p.

GOULSON, D. Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, Chichester, v. 50, p. 977-987, 2013.

HORIE, M.; SAITO, H.; NATORI, T.; NAGATA, J. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 27, n. 5, p. 863-874, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DOUTOR RICARDO JORGE. PortFIR. **Tabela de composição de alimentos**. Lisboa, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2020. 30 p.

JESCHKE, P.; NAUEN, R. Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science**, Oxford, v. 64, n. 11, p. 1084-1098, 2008.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 7, 2897-2908, 2011.

KUJAWSKI, M. W.; NAMIÉŚNIK, J. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 9, p. 785-793. 2008.

LIMA, B. S.; FERRAZ-ALMEIDA, R. Perfil da produção agrícola na região de São Carlos, SP: um balanço dos últimos 12 anos. **Acta Ambiental Catarinense**, Chapecó, v. 18, n. 1, p. 42-55, 2021.

MACBEAN, C. **Thiametoxam (153719-23-4) the e-pesticide Manual**. Versão 5.0.1 15. ed. Surrey: British Crop Protection Council, 2010.

MATSUNO, T. **O efeito terapêutico da própolis**. [S. l.: s. n.], 1997. v. 1.

MOTHERSHAW, A. S.; JAFFER, T. Antimicrobial activity of foods with different physico-chemical characteristics. **International Journal of Food Properties**, New York, v. 7, n. 3, p. 629-638, 2004.

MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; ENGELSDORP, D.; PETTIS, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010.

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, Kampala, v. 7, n. 3, p. 159-165, 2007.

ÖZCAN, M.; ARSLAN, D.; CEYLAN, D. A. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 99, p. 24-29, 2006.

PORTUGAL. Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas. Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro. **Diário da República**, Lisboa, nº 216 – Iª Série-A, 2003.

RIAL-OTERO, R.; GASPAR, E.M.; MOURA, I.; CAPELO, J.L. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: an overview. **Talanta**, Amsterdam, v. 71, p. 503-514, 2007

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; ALMEIDA, M. V.; GENERUTI, M.; APON, B. M. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 101, p. 1719-172, 2007.

SCHLINDWEIN, C.; WITTMANN, D.; MARTINS, C. F.; HAMM, A.; SIQUEIRA, J. A.; SCHIFFLER, D.; MACHADO, I. C. Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): how much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators? **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v. 250, n.3, p. 147-156, 2005.

SCHNEIDER, C. W.; TAUTZ, J.; GRUNEWALD, B.; FUCHS, S. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 1, 2012.

SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. A polinização das plantas do cerrado. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 48, p. 651-653. 1988.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 254 p.

SOEIRO, T. Em busca do doce sabor. **Portugalia: revista de arqueologia do Departamento de Ciências e Técnicas do Património**, Porto, v. 27-28, p. 119-158, 2006.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 247-68, 2005.

TOMIZAWA, M.; YAMAMOTO, I. Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 18, p. 91-98, 1993.

VILAS-BÔAS, J. **Manual tecnológico: mel de abelhas sem ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2012. 100 p.

WAILI-AL, N. S. Natural honey lowers plasma glucose, C-reactive protein, homocysteine, and blood lipids in health, diabetic, and hypelipidemic subjects: comparison with dextrose and sucrose. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 7, n. 1, p. 100-107, 2004.

WIEST, L.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; FRATTA, C.; AMIC, S.; LAMBERT, O.; POULIQUEN, H.; ARNAUDGUILHERM, C. Mult-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, p. 5743-5756, 2011.

WU, J. Y.; ANELLI, C. M., SHEPPARD, W. S. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2011.

ZHOU, G. C.; WANG, Y.; ZHAI, S.; GE, F.; LIU, Z. H.; DAI, Y. J.; YAUN, S.; HOU, J. Y. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. **Applied Microbial and Cell Physiology**, Berlin, p. 4065-4074, 2012.