



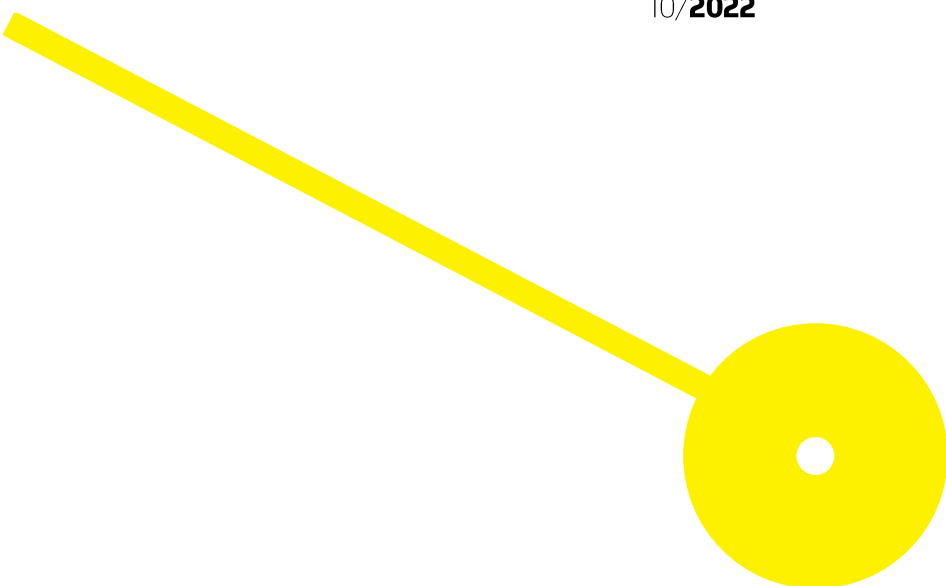
MESTRADO

BIOQUÍMICA EM SAÚDE, RAMO DE BIOTECNOLOGIA

Multiple contaminants in honey: a challenge for analytical chemistry and human health

Mónica Moreira de Sá Martins Oliveira

10/2022





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Instituto Superior de
Engenharia do Porto

Multiple contaminants in honey: a challenge for analytical chemistry and human health

Autor

Mónica Moreira de Sá Martins Oliveira

Orientadores

Doutora Virgínia Cruz Fernandes, REQUIMTE/LAQV – Grupo de Reação e Análises Químicas, ISEP

Doutora Mónica Vieira, Escola Superior de Saúde do Porto, ESS

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo de Especialização em **Biotecnologia** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Menção de apoio financeiro

Este trabalho recebeu apoio do projeto “Honey” – New reasons to care honey from the Natural Park of Montesinho: A bioindicator of environmental quality & its therapeutic potential” (MTS/SAS/0077/2020) da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais.



Agradecimentos

Todo o percurso que fiz até chegar aqui foi duro, cansativo, por vezes bastante complicado, mas, no entanto, foi recompensador, digno e merecedor. Deste modo, não podia deixar de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram a contribuir para que todo este trabalho fosse concretizado. Primeiro, quero agradecer, então, aos meus pais, Liliana e Luís, e à minha irmã, Francisca, por todo o apoio, por nunca deixarem de estar ao meu lado nesta caminhada e por me darem o vosso “colo”. Sou uma sortuda.

Ao meu companheiro de todas as horas, Rogério, por nunca deixar de acreditar em mim, por me dar sempre confiança e segurança para continuar em frente, e por respeitar sempre o meu tempo, sem nunca me apontar o dedo. O futuro vai sorrir para nós, tenho a certeza.

A todos os meus amigos, que foram essenciais neste longo percurso e me deram sempre força e confiança para mostrar sempre o meu melhor.

À minha orientadora, Doutora Virgínia Fernandes, por ser sempre compreensiva, paciente, carinhosa e uma excelente profissional, que no meio de muito trabalho e responsabilidades acrescidas, teve sempre tempo para me acompanhar ao longo deste ano.

À professora Mónica Vieira e ao professor Ricardo Ferraz, que estiveram sempre comigo desde a licenciatura até ao mestrado, sempre dedicados e empenhados em levar para a frente a Biotecnologia Medicinal, bem como o seu complemento em Mestrado, que é a Bioquímica em saúde.

À ESS e à Doutora Cristina Prudêncio, quero agradecer por me fazerem sentir sempre bem integrada e acolhida nesta instituição.

Quero também agradecer ao Grupo de Reação e Análises Químicas, pelo espaço e material que me cederam para o desenvolvimento do projeto, e por toda a amabilidade e disponibilidade da equipa.

Resumo

No âmbito da escrita da Dissertação para o Mestrado de Bioquímica em Saúde com especialização no Ramo de Biotecnologia, foi realizada a mesma no ano letivo 2021/2022, sob orientação da Doutora Virgínia Fernandes, do Grupo de Reação e Análises Químicas, localizado no Instituto Superior de Engenharia do Porto.

O tema principal do trabalho aborda o impacto que as abelhas e o mel têm na vida humana, bem como os contaminantes e poluentes emergentes que estão a ser estudados cientificamente. Para além disso, estudou-se a possibilidade do mel ser um biomarcador ambiental, e de que modo o podemos utilizar para monitorizar o meio ambiente e os contaminantes que podem interferir no quotidiano.

Para tal, foram analisadas 17 amostras de mel do Parque Natural do Montesinho, e 3 amostras comerciais. A metodologia realizada consistiu na utilização de QuEChERS e cleanup dSPE para a extração, e a análise por GC-ECD e GC-FPD.

Relativamente aos resultados, foram identificados 14 dos 40 poluentes das diversas famílias testadas, e todas as amostras de mel apresentaram na sua constituição pelo menos um pesticida e/ou contaminante ambiental. Por fim, através das retas de calibração foi possível determinar a concentração desses poluentes.

Palavras-chave: Poluentes; Mel; Cromatografia Gasosa; Química Analítica; Biomarcador ambiental.

Abstract

As part of the writing of the Dissertation for the Master's Degree in Biochemistry in Health with specialization in the Biotechnology, that was carried out in the academic year 2021/2022, under the guidance of Doctor Virgínia Fernandes, from the Chemical Reaction and Analysis Group, located at Instituto Superior of Engineering in Porto.

The main theme of the work addresses the impact that bees and honey have on human life, as well as emerging contaminants and pollutants that are being studied scientifically. In addition, the possibility of honey being an environmental biomarker was studied, and how we can use it to monitor the environment and the contaminants that can interfere with daily life.

For this, 17 samples of honey from the Parque Natural do Montesinho, and 3 commercial samples were analyzed. The methodology used consisted in the use of QuEChERS and cleanup dSPE for the extraction, and the analysis by GC-ECD and GC-FPD.

Regarding the results, 14 of the 40 pollutants from the different families tested were identified, and all honey samples had at least one pesticide and/or environmental contaminant in their constitution. Finally, through the calibration lines it was possible to determine the concentration of these pollutants.

Keywords: Pollutants; Honey; Gas Chromatography; Analytical chemistry; Environmental biomarker.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Composição do mel e as suas propriedades biológicas e nutricionais	2
1.2. Importância das abelhas no mel.....	3
1.3. Contaminantes presentes em amostras de mel.....	4
1.3.1. Poluentes emergentes em amostras de mel	7
1.4. Metodologias analíticas para avaliação da presença de contaminantes no mel	8
2. Materiais e Métodos Experimentais.....	9
2.1. Materiais e Reagentes.....	9
2.2. Métodos Experimentais.....	10
2.2.1. Otimização de Protocolo.....	12
2.2.2. Protocolo otimizado: QuEChERS EN conjugado com cleanup 1.....	13
2.3. Amostragem	14
3. Resultados.....	15
3.1. Otimização de Protocolo – Validação do método	15
3.2. Análise dos contaminantes presentes nas amostras de mel.....	23
3.2.1. Piretróides (PYR).....	23
3.2.2. Retardantes de chama fosforados – Ésteres Organofosforados (OPE)	24
3.2.3. Poluentes Orgânicos Persistentes (POP).....	25
3.2.4. Pesticidas Organofosforados (OPP).....	32
4. Discussão de Resultados	33
5. Conclusão.....	38
Referências Bibliográficas.....	40

Lista de abreviaturas

α -HCH: alfa-Hexaclorociclohexano

β -HCH: beta-Hexaclorociclohexano

γ -HCH: gama-Hexaclorociclohexano ou lindano

HCH: Hexaclorociclohexano

HCB: Hexaclorobenzeno

End I: α -Endosulfão

DDE: Diclorodifenildicloroetileno

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DDD: Diclorodifeniltricloroetano

BDE: Retardantes de chama – Éteres difenílicos polibromados

PCB: Bifenilos policlorados

OPE: Retardantes de chama – Ésteres Organofosforados

OPP: Organofosforados

PYR: Piretróides

OCP: Pesticidas organoclorados

TPrP: Tripropil fosfato

TiBP: Tri-isobutil fosfato

TnBP: Tri-n-butil fosfato

TCEP: Tris (2-carboxietil) fosfite

TBEP: Tris (2-butoxietil) fosfato

TEHP: Tris (2-etil-hexilo) fosfato

TToP: Fosfato de trietil

LOD: Limite de deteção

LOQ: Limite de quantificação

MRL: Limite máximo de resíduos

EFSA: European Food Safety Authority

GC-ECD: Cromatografia Gasosa com deteção por captura eletrónica

GC-FPD: Cromatografia Gasosa com deteção fotométrica de chamas

PNM: Parque Natural do Montesinho

QuEChERS: Método rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e Seguro

dSPE: Extração por fase sólida dispersiva

PSA: Amina Primária e Secundária

C18: sílica-octadecil

US: Ultrassons

Índice de Figuras

Figura 1 – Ciclo de contaminação com microplásticos. Imagem retirada do artigo " Naggar Y al, Brinkmann M, Sayes CM, Al-Kahtani SN, Dar SA, El-Seedi HR, et al. Are honey bees at risk from microplastics? Toxics. 2021 May 1;9(5). "	7
Figura 2 – Esquema do Protocolo Experimental aplicado nas amostras de mel.....	14
Figura 3 – Geolocalização do Parque Natural do Montesinho, com base no artigo Xie, Ying & Peng, Minggang. (2019). Forest fire forecasting using ensemble learning approaches. Neural Computing and Applications. 31. 10.1007/s00521-018-3515-0.....	14
Figura 4 – Recuperações para Otimização de protocolo, utilizando três tipos diferentes de QuEChERS (EN, AOAC, ORIGINAL), respetivamente, com o Cleanup C1.....	16
Figura 5 – Recuperações para Otimização de protocolo, utilizando os três tipos diferentes de Cleanups (C1, C2, C3), respetivamente, com o QuEChERS EN.....	18
Figura 6 – Recuperações para Otimização de protocolo, utilizando ultrassons nos passos intermédios do procedimento experimental.....	19

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Compostos analisados no projeto.....	11
Tabela 2 – Principais características cromatográficas do GC-ECD e GC-FPD.....	12
Tabela 3 – Valores específicos das recuperações e desvios padrões relativos para QuEChERS EN, AOAC, ORIGINAL.....	17
Tabela 4 – Valores descritos para recuperações e RSD, para os Cleanup C1, C2 e C3.....	18
Tabela 5 – Valores descritos para recuperações e RSD, para o uso de ultrassons antes do dSPE e do QuEChERS, e sem o uso de ultrassons.....	20
Tabela 6 – Recuperações obtidas com o Protocolo QuEChERS EN e cleanup C1, para os contaminantes PYR, OPE e OPP.....	20
Tabela 7 – Recuperações finais para todos os 40 compostos analisados.....	21
Tabela 8 – Valores LOD, LOQ e Coeficiente de correlação para os componentes estudados, em µg/L e µg/kg, e o fator matriz associado.....	22
Tabela 9 – Valores para validação do método e amostras que contêm a Cialotrina 1.....	24
Tabela 10 – Valores para validação do método e amostras que contêm a Cialotrina 2.....	24
Tabela 11 – Valores para validação do método e amostras que contêm o TToP.....	24
Tabela 12 – Valores para validação do método e amostras que contêm o TBEP.....	25
Tabela 13 – Valores para validação do método e amostras que contêm o α-HCH.....	26
Tabela 14 – Valores para validação do método e amostras que contêm o β-HCH.....	27
Tabela 15 – Valores para validação do método e amostras que contêm o HCH.....	28
Tabela 16 – Valores para validação do método e amostras que contêm o PCB 28.....	29
Tabela 17 – Valores para validação do método e amostras que contêm o PCB 153.....	29
Tabela 18 – Valores para validação do método e amostras que contêm o End I.....	30
Tabela 19 – Valores para validação do método e amostras que contêm o DDT.....	30
Tabela 20 – Valores para validação do método e amostras que contêm o DDE.....	30
Tabela 21 – Valores para validação do método e amostras que contêm o BDE 47.....	31
Tabela 22 – Valores para validação do método e amostras que contêm o BDE 100.....	32
Tabela 23 – Evidência científica de principais pesticidas, técnicas de extração e análise, e parâmetros de validação, encontrados nos últimos 10 anos.....	46

1. Introdução

Ao longo dos anos tem-se visto uma maior preocupação da humanidade com o ambiente e com a utilização de produtos alimentares provenientes da terra, com o mínimo de tratamentos químicos possível. Como tal, cada vez mais existe uma procura por alimentos biológicos e com produção sustentável, por exemplo alguns tipos de fruta e produtos provenientes da agricultura, como o morango, amora preta, o milho (1), e até mesmo o mel.

Destacando o mel da lista, este pode ser definido como um produto natural, complexo e doce, produzido pelas abelhas, e pode ser utilizado diretamente pelo ser humano, sem ter de passar por nenhum tipo de processamento (2), sendo um dos poucos produtos naturais presentes no mercado atualmente (3), e consumido por inúmeras pessoas em todo o mundo (4).

De acordo com o ultimo relatório apresentado pela Comissão Europeia no Parlamento, em abril de 2022, a União Europeia é o segundo maior produtor de mel com cerca de 218000 toneladas produzidas, sendo a China o maior produtor global. De acordo com o ranking de produção, os países da EU que mais produzem são a Espanha, Roménia, Grécia, Polónia, França e Itália, sendo que Portugal também se destaca nos 10 maiores produtores, ocupando a décima posição (5).

Como tal, devido a todas as preocupações em torno deste produto alimentar, é possível, também, assumir que este pode ser considerado um biomarcador ambiental, através da forma como é produzido. Assim, devido ao trajeto vasto que as abelhas podem percorrer, ao mesmo tempo que contactam com determinados compostos presentes no seu percurso, esta espécie de animal transporta-os para as colmeias, podendo culminar na presença de potenciais contaminantes e poluentes, aquando a produção de mel, que provém de diversos subsistemas integrados no meio ambiente (6).

O presente trabalho insere-se no âmbito de um projeto financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, intitulado "*Honey⁺ New reasons to care honey from the Natural Park of Montesinho (NPM): a bioindicator of environmental quality and it's therapeutic potential*", sendo que os principais objetivos do projeto Honey⁺ consistem na avaliação do mel e de que forma este pode ser útil como biomarcador ambiental para a poluição, sendo capaz de avaliar as diferentes classes de poluentes no ar, solo, água e plantas, e de que modo pode influenciar a qualidade do mel presente em amostras do Parque Natural do Montesinho. Para além disso, é também um dos objetivos, estudar o comportamento terapêutico e farmacológico das amostras de mel recolhidas através da avaliação de ensaios in vivo.

Deste modo, estando inserido no projeto Honey⁺, os objetivos acabam por ir ao encontro dos objetivos globais do projeto, no entanto, assentam, essencialmente, na construção e otimização de um protocolo, com determinada metodologia, que se revele eficaz ao ponto de ser possível analisar múltiplos contaminantes numa só extração de cada amostra retirada do Parque Natural do Montesinho, no sentido de continuar a incorporar a metodologia no seguimento do projeto Honey⁺. Para além disso, foi também um dos objetivos, a análise desses mesmos contaminantes extraídos das 20 amostras de mel, a fim de

poder concluir se, de facto, existe a possibilidade do mel ser considerado um potencial biomarcador ambiental, no sentido em que já houveram alguns estudos que comprovam que as abelhas também podem ser consideradas como indicadores da poluição ambiental (7–9).

1.1. Composição do mel e as suas propriedades biológicas e nutricionais

Sendo um produto natural, o mel é composto por uma solução aquosa de açúcar supersaturada, tornando-se numa excelente fonte de energia (2,6). É, portanto, uma substância que contém cerca de 80% de carboidratos, principalmente glicose (35%), frutose (40%) e sacarose (5%), e à volta de 20% de água, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, lípidos, ceras, vitaminas, minerais, compostos aromáticos, pigmentos flavonoides, grãos de pólen e enzimas (2,6). Ou seja, a sua composição apresenta diversos compostos naturais e propriedades, muito interessantes para a saúde humana (10).

No entanto, é importante ressaltar que a composição do mel depende fortemente da espécie de planta em que o néctar, o pólen e a melada são colhidos, bem como de outros fatores climáticos e ambientais (2,4). O mel pode ser classificado de diversas formas, levando em consideração a fonte de matéria-prima e a sua origem botânica, sendo que em relação à matéria-prima pode ser distinguido entre o mel proveniente de melada (partes vivas de plantas ou secreções de insetos) e o mel proveniente de flores (11). Já em relação à origem botânica, pode ser distinguido por mel monofloral ou polifloral (11), tendo em conta se o néctar coletado pelas abelhas provém de uma ou várias espécies de flores, sendo que este fator é, também, importante para autenticar o mel que é comercializado (12).

Devido à produção de mel ter um papel de elevada importância, este produto tem sido bastante abordado cientificamente, a fim de compreender e reunir mais estudos e informações acerca deste alimento, nomeadamente sobre as suas propriedades benéficas para a saúde humana. Assim, no último século, o mel foi sujeito a numerosas investigações clínicas e laboratoriais, confirmando os seus benefícios medicinais, que estão atribuídos essencialmente à presença de antioxidantes, compostos fenólicos, aminoácidos e vitaminas (13,14).

Deste modo, vários estudos provaram que o mel tem um potencial antibacteriano, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, antioxidante, conferindo, ainda, proteção hepática e atua a nível hipoglicémico (14). Para além destes benefícios para a saúde, apresenta também propriedades antissépticas, ideais para determinados tipos de tratamentos de feridas, queimaduras e outros problemas oftalmológicos, respiratórios, orais e gastroenterológicos (14). É importante referir, também, que o mel deve ser livre de qualquer contaminação química ou biológica, a fim de ser seguro para o consumo humano (13).

As propriedades antibacterianas do mel são dos benefícios mais estudados, nomeadamente devido ao facto do mel ser provado como um forte potencial agente antimicrobiano natural (15). Uma das características mais importantes que confere esta propriedade ao mel, é a sua acidez, com um pH entre 3,2 e 4,5, que é significativamente menor do que o pH favorável (6,5–7,5) para o crescimento da maioria

das bactérias (15). É relevante salientar, também, que as propriedades antibacterianas apresentam uma maior afluência de compostos químicos como os flavonoides e os compostos fenólicos e as propriedades antioxidantes, têm sido mais correlacionadas com as proteínas presentes no mel do que com os compostos químicos (10).

Relativamente às propriedades biológicas e nutricionais do mel, as mesmas podem ser decisivas para a escolha do consumidor, bem como para a comercialização deste alimento (6), daí a importância de abordar estudos com as composições químicas, as propriedades e benefícios do mel. Os parâmetros físico-químicos e nutricionais mais importantes deste alimento, como o doce, a viscosidade, a textura, a higroscopia e valores energéticos dependem, claramente, da composição em açúcar do mel (6).

Como referido anteriormente, os principais constituintes do mel são os carboidratos simples, como o caso da frutose e glicose, que podem ser utilizados pelo ser humano para responder às necessidades energéticas do corpo, devido à absorção rápida para o sangue, e sem necessitar de digestão prévia (16).

Assim, a nível energético, o mel é um exemplo favorável de alimentos que providenciam bastante energia, sendo que 100 gramas de mel têm cerca de 1283 kJ, correspondendo a perto de 306 kcal (6). A título de exemplo, 20 gramas de mel representam a quantidade de uma colher de sopa, que consiste em cerca de 3% da percentagem total de energia necessária e recomendada para consumir por dia, para adultos saudáveis (17).

1.2. Importância das abelhas no mel

As abelhas representam um papel de elevada importância na vitalidade de todo o mundo, pois sem este ser vivo, a natureza pode quebrar e, por consequência, todo o ecossistema sofre uma reviravolta total. Assim, esta pequena espécie, tem nas suas “mãos”, um dos papéis mais importantes de todo o ciclo da vida. Deste modo, as abelhas conseguem promover o desenvolvimento sustentável através da sua maior contribuição para o ecossistema, a polinização, um dos processos mais importantes no ciclo reprodutor das plantas, que ao ser realizada, contribui para a manutenção da biodiversidade e para a segurança alimentar (18).

Apis mellifera Linnaeus, é o nome de uma das espécies de abelhas que é muito comum em vários continentes. Esta abelha consegue sobreviver a diversos climas e habita em inúmeros locais, estando dividida em várias subespécies (19), tornando-se num ser vivo bastante estudado entre a comunidade científica.

As abelhas desempenham um papel vital na polinização de diversos produtos provenientes da terra, sendo importantes, também, para produção de produtos comerciais, como o mel e a cera de abelha (4). A grande maioria de plantas que originam flores, necessitam de insetos para realizar a polinização, de modo a maximizar a produção de frutos e sementes, através dos processos de fertilização das flores (20). Para além disso, é de salientar que, para assegurar este processo, deveras necessário para o meio ambiente, as

abelhas são o inseto que melhor o fazem utilizando, ainda, meios para produzir o mel, tornando-se assim esta espécie, o mais valioso polinizador (20).

O mel é produzido pelas abelhas através de um processo complexo e intenso, feito pela recolha do néctar das plantas, ou a partir de secreções presentes nas partes vivas das mesmas, sendo depois transformadas com substâncias específicas próprias das abelhas, como o caso das enzimas que estas possuem no estômago, depositando depois essa combinação nas colmeias, e aí passa por um processo de desidratação, armazenamento e amadurecimento (11,13).

As abelhas podem percorrer áreas bastante grandes, com distâncias longas, e nesse raio, contactarem com inúmeras fontes de pesticidas e outros contaminantes ambientais (21). Este contacto pode tornar-se num dos possíveis problemas aquando da recolha de pólen e néctar pelas abelhas, uma vez que grande parte destes pesticidas e compostos podem não ser indicados ao consumo humano. Esta possibilidade está reportada na literatura, uma vez que quando as abelhas pousam em determinadas plantas, solos e águas que podem estar contaminadas, transportam de seguida esses contaminantes para as colmeias, acabando por ficar incorporado na produção do mel (21,22).

No caso dos pesticidas, existe ainda a possibilidade de estes serem expostos às abelhas pelo ar, através dos produtos químicos que os apicultores utilizam para controlar algumas pragas que possam aparecer, ou até mesmo por resíduos atmosféricos que possam ficar retidos no corpo das abelhas (2).

Deste modo, existem alguns estudos publicados que mostram que os produtos provenientes do trabalho das abelhas podem ser usados como indicadores de contaminação ambiental (2,22), devido ao contacto variado e alargado a que as abelhas se submetem, e existem, também, estudos que demonstram o declínio do número de abelhas quando expostas a estes contaminantes (7–9). Como já foi referido anteriormente, as abelhas permanecem em contacto com um vasto leque de contaminantes e poluentes, quando se deparam com estes no decorrer das suas buscas por alimento e para efetuarem a polinização. Com o decorrer do tempo, colmeias de abelhas tem sido estudadas e monitorizadas, devido ao aumento da taxa de mortes que se tem verificado destes seres vivos (7,8) levando estudos científicos a comprovar que, de facto, esta exposição constante, principalmente aos compostos que pertencem aos pesticidas, nomeadamente a classes como neonicotinóides, piretróides e organofosforados (8).

1.3. Contaminantes presentes em amostras de mel

A determinação dos contaminantes presentes no mel é de elevada importância, para que seja possível averiguar se este produto alimentar pode conter poluentes e de que modo isso poderá afetar a sua qualidade, se poderá ser consumido com segurança, ou se apresenta algum risco para a saúde humana.

Assim, de acordo com vários estudos já realizados, encontraram-se diversos poluentes, sendo uma das principais classes de contaminantes encontrados, os pesticidas, que são uma categoria de químicos tóxicos, normalmente utilizados no combate a pragas, a fim de eliminar ou até mesmo repelir as mesmas

(2). Esta classe comum de poluentes, cruza-se no caminho percorrido pelas abelhas e, portanto, depois é transportado pelas mesmas até ao seu nicho. Já foram, também, evidenciados alguns antibióticos, metais pesados e materiais radioativos no mel (3,21).

As categorias de pesticidas mais comuns são, os inseticidas, acaricidas, algicidas, herbicidas e fungicidas (2,21). No caso dos inseticidas e acaricidas, estes eliminam insetos e parasitas (p.e. ácaros) através de processos de interrupção da atividade neuronal ou outros mecanismos específicos do metabolismo destas espécies (2), contactando com as abelhas através do uso dos mesmos por vários apicultores, ou até, agricultores. Os algicidas e os herbicidas, eliminam plantas e algas, destruindo as capacidades fotossintéticas ou incapacitando os mesmos de realizarem a síntese de compostos orgânicos (2), podendo significar que a presença desta subclasse no mel, pode ser devido ao percurso das abelhas perto de águas (algicidas) ou campos (herbicidas). Por último, os fungicidas eliminam fungos através da inibição de processos essenciais ao seu desenvolvimento, como por exemplo, a inibição da formação de membranas celulares (2), e que são, também muito utilizados por agricultores ou apicultores no combate à ameaça dos fungos nas suas plantações ou animais.

Algumas destas classes de pesticidas podem ser consideradas perigosas para a saúde humana, nomeadamente os organofosforados, que são utilizados como inseticidas na agropecuária, e aparentam ser os que têm maior risco para o ser humano (23), se utilizadas em excesso, ou até mesmo para as próprias abelhas (2).

Compostos como o HCH, DDT, carbaril ou coumafos têm sido encontrados em colmeias, assim como, o imidacloprida, clorpirifos, tiacloprida, clotianidina e tiametoxam, que têm sido detetados em abelhas mortas (2). Alguns destes últimos compostos, como a imidacloprida, o tiametoxam, a tiacloprida e a clotianidina, pertencem a um grupo de inseticidas que tem sido muito relatado, os neocotinóides, extensivamente utilizados para tratamento de algumas sementes, plantas e frutos, estando também presentes em vários recursos aquáticos e no solo (2).

Para além dos compostos já descritos, existem vários dados que têm sido documentados, indicando a presença de pesticidas organoclorados (OCP), compostos que têm pelo menos um átomo de cloro ligado a uma cadeia carbonada, bifenilos policlorados (PCB), compostos derivados dos organoclorados com adição de cloro ao bifenilo, e éteres difenilicos polibromados (PBDE) no mel, compostos orgânicos sintéticos que apresentam vários átomos de bromo ligados à sua estrutura (21).

Muitos destes compostos referidos acima, nomeadamente o HCH, DDT, os OCP, os PCB e PBDE, têm sido documentados como pertencentes a uma das classes de contaminantes mais preocupantes a nível mundial, os Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), que se tornaram contaminantes ambientais devido ao seu uso extensivo, de longa duração, e à sua persistência e toxicidade (24) Devido a esta crescente preocupação, em maio de 2001, foi organizada uma convenção em Estocolmo, na Suécia, para abordar esta temática sobre os POP, tendo por objetivo a proteção da saúde humana e do meio ambiente,

delineando algumas medidas destinadas a reduzir, e até mesmo eliminar as libertações destes compostos no meio ambiente, e consequentemente reduzindo a exposição humana (25). Foram adotadas medidas para monitorizar estes contaminantes, que vão sendo sempre atualizadas pelos laboratórios responsáveis, num documento exclusivo, que é o Plano de Monitoramento Global (PMG), onde, também, novos produtos químicos com alta relevância são adicionados e atualizados no documento (25).

A *European Food Safety Authority* (EFSA), revelou que existem riscos para a saúde pública relacionados com a presença de retardantes de chama bromados (BFR) na comida, principalmente os PBDE, que são parte integrante dos compostos orgânicos de bromo, e que contaminam o ambiente e a cadeia alimentar devido à sua natureza lipofílica, bio acumulativa e tóxica, suspeitando-se que causem efeitos a nível neuronal e endócrino (21).

É ainda relevante salientar, que foram relatados, também, outros poluentes existentes em amostras de mel, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) que são um grupo de compostos orgânicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos (26). Este tipo de contaminantes está presente em larga escala no ambiente, mostrando uma evidência de mutagenicidade e genotoxicidade (26). Os principais PAH que podem ser considerados como indicadores ambientais foram agrupados num grupo de 4 elementos, pela EFSA, sendo estes o benz(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo[b]fluorantreno e criseno (26,27), uma vez que, de acordo com os estudos efetuados, são os que apresentam uma maior relação entre a taxa de ocorrência em alimentos e a toxicidade (27).

Posteriormente, um dos grupos com maior abundância de compostos, são os metais pesados, que se originam quando alguns minerais presentes no mel provêm de uma fonte inorgânica ou metálica, podendo, assim, ter um fator gravidade específico cinco vezes superior à água, tornando-se tóxico (28).

Os principais metais pesados que são mais abordados em literatura científica, são o chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), crómio (Cr), cobre (Cu), manganês (Mn), níquel (Ni), zinco (Zn) e prata (Ag)(28). No entanto, aqueles que são mais perigosos para a saúde humana são o Pb, o Cd e o metaloide arsénio (As), sendo que este último é muito pouco relatado em amostras de mel, devido ao seu baixo uso no meio ambiente (28). Assim, estes compostos, para além dos estudos que já foram feitos, assumem uma elevada importância para continuar a serem estudados, devido aos seus efeitos prejudiciais na saúde humana mesmo em baixas concentrações, como dores fortes de cabeça, anormalidades metabólicas, problemas respiratórios, náuseas e vômitos (28).

Como referido anteriormente, as abelhas são espécies que ajudam a monitorizar a poluição existente, nomeadamente a *Apis mellifera*, devido às suas características biológicas, e às suas capacidades de realizar viagens distantes das suas colónias a fim de se alimentarem quando há escassez de alimento nas suas zonas (22). Como tal, no decurso da recolha de alimento elas podem acumular e transportar para as colmeias diversos contaminantes (22,26), sendo, portanto, considerados, tanto as abelhas como os seus produtos, em especial destaque o mel, como fortes potenciais biomarcadores ambientais (29).

1.3.1. Poluentes emergentes em amostras de mel

É importante realçar que, para além destes compostos conhecidos e com vários estudos científicos associados, existem outros que estão, cada vez mais, a emergir e a serem abordados em novas investigações científicas.

Os microplásticos foram abordados recentemente como contaminantes presentes em amostras de mel, sendo considerados um dos principais poluentes emergentes. Deste modo, é de conhecimento geral, que o plástico faz parte das rotinas do ser humano, embora haja, cada vez mais, uma preocupação para reduzir estes consumos. No entanto, a maioria dos desperdícios de plástico são libertados para o meio aquático, maioritariamente em oceanos, e as pequenas partículas deste material ficam, muitas vezes, suspensas no ar e no ambiente em geral, tornando-se assim, numa problemática com elevado interesse associado (29), como se pode observar na figura 1, uma vez que este aumento de microplásticos, se traduz na presença dos mesmos em amostras de mel (30,31).

Quanto à sua relevância em torno da saúde, os microplásticos apresentam impactos negativos na saúde humana, que podem ser empregues através do consumo de alimentos em que estes estejam presentes, sendo que, maioritariamente, tem sido descobertos problemas a nível de toxicidade (29–31).

Estudos relativamente recentes correlacionam o stress oxidativo, a citotoxicidade e a translocação entre tecidos destes compostos, como desencadeador de inflamação crónica, aumentando o risco de cancro (32). Em adição, podem também estar relacionados com o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, e ainda, comportarem-se como vetores para microrganismos perigosos ao ser humano (30,32).

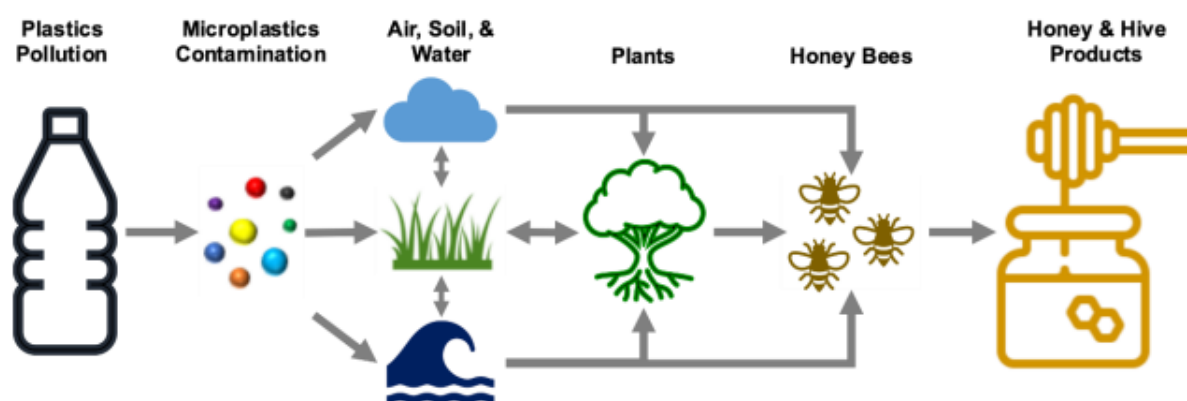


Figura 1 – Ciclo de contaminação com microplásticos. Imagem retirada do artigo "Naggar Y al, Brinkmann M, Sayes CM, Al-Kahtani SN, Dar SA, El-Seedi HR, et al. Are honey bees at risk from microplastics? *Toxics*. 2021 May 1;9(5). "

Atualmente, tem, também, havido uma maior preocupação acerca das substâncias que são utilizadas em processos ao nível da indústria, da agricultura e do próprio consumo, uma vez que alguns químicos podem, efetivamente, causar uma disrupção do sistema endócrino, afetando assim o controlo hormonal (33).

Deste modo, estes químicos capazes de afetar o sistema endócrino, têm sido considerados como novos poluentes emergentes, os químicos desreguladores endócrinos (EDC)(33).

Neste grupo de compostos, podem estar incluídos o bisfenol A, o 2,4-diclorofenol, o 2,4,5-triclorofenol, o pentaclorofenol, entre outros, sendo estes compostos utilizados industrialmente ou, até, produzidos por processos industriais (33), elevando assim a capacidade de poluição dos mesmos.

É importante ressaltar estes químicos desreguladores endócrinos, uma vez que têm sido encontrados alguns deles em amostras de mel, e de acordo com as diretrizes da União Europeia, o mel, como um produto natural, tem de estar livre de químicos (33), daí a importância de estudos nesta área.

1.4. Metodologias analíticas para avaliação da presença de contaminantes no mel

O mel pode conter vários tipos de pesticidas ou outros contaminantes devido a todo o seu processamento, e do modo como as abelhas e os apicultores trabalham. Assim, o néctar presente nas colmeias, passa por uma transformação para originar o mel, podendo conter alguma poluição que possa estar incorporada significativamente (34). Como tal, a fim de proteger a saúde do consumidores, foi estabelecido um nível máximo de resíduos (MRL), para cada pesticida de forma individual (35).

De acordo com a literatura científica, existem vários métodos para extração e análise dos contaminantes, sendo que a análise cromatográfica é das metodologias mais abordadas para este tipo de estudos (13,35–37). Deste modo, para ser possível retirar o melhor proveito e obter melhores resultados, o passo de preparação de amostras é bastante importante para se conseguir fazer uma boa análise, e como tal, tem sido utilizado um passo de extração dos compostos de interesse, eliminando interferentes que possam causar transtorno na determinação da concentração dos analitos que se pretendem avaliar (13,35,37,38). Um dos métodos mais utilizados universalmente para preparar as amostras, de forma a permitir a extração de um maior número de contaminantes em cada amostra são os QuEChERS (35), que representa, uma metodologia traduzida pelas seguintes seis características: rápida, fácil, barata, eficiente, robusta e segura (38). Esta técnica utiliza solventes, sais dispersos e adsorventes, tendo sido empregue em diversas análises e estudos, principalmente focados em resíduos de pesticidas em alimentos e no meio ambiente (39). A forma mais comum de abordar esta metodologia, consiste na extração inicial com solventes e sais, de modo a promover a partição líquido-líquido, e por último, poder realizar-se uma extração com uma fase sólida dispersiva (dSPE), com o recurso a vários adsorventes, a fim de purificar o extrato obtido (37).

Em adição, existem também, outros métodos de preparação prévia das amostras, nomeadamente para o processo de extração. A extração líquido-líquido (ELL) é uma das várias técnicas utilizadas, tendo como maior vantagem de utilização, o facto de ser um método no qual o volume ou a massa utilizada das amostras é maior do que nos QuEChERS, no entanto, apresenta uma desvantagem grande, que é o uso de solventes orgânicos tóxicos na sua abordagem (13). Para além disso, a ELL é uma metodologia,

caracterizada, também, por ser um procedimento demorado, caro, prejudicial ao meio ambiente e trabalhoso (40).

Abordando uma última técnica de extração habitualmente usada, a Extração em fase sólida (SPE), a mesma é baseada na retenção de analitos selecionados nos sorventes, seguindo-se uma eluição com os solventes mais apropriados, ou seja, pode atuar como um passo de limpeza (clean up) (36). Assim, combinando a extração com QuEChERS e o passo de clean up, proporciona uma extração mais pura, podendo ser analisada por outras metodologias, como as cromatografias (13). As principais características da SPE, são a sua simplicidade, robustez, rapidez e o baixo consumo de solvente, tornando-a, assim, uma das mais requeridas para estes procedimentos (36).

Relativamente à análise, é de salientar que os pesticidas, após uma preparação prévia das amostras, podem ser determinados no mel através de cromatografias gasosas ou líquidas, acopladas a detetores mais comuns, como a espectrometria de massa, o detetor por captura de eletrões, entre outros, consoante as suas propriedades físico-químicas (13). Na tabela 23, em anexo, pode-se observar um conjunto das técnicas mais abordadas para determinados pesticidas e contaminantes ambientais presentes em diversas amostras de mel de toda a parte do mundo, de modo a ser possível agrupar os procedimentos mais utilizados nos últimos 10 anos.

2. Materiais e Métodos Experimentais

2.1. Materiais e Reagentes

Relativamente aos contaminantes utilizados, os pesticidas (PYR, OCP e OPP) são da Sigma Aldrich, bem como os Retardantes de chama- Ésteres Organofosforados, e os Retardantes de chama- Éteres difenílicos polibromados são da *Isostandards Material*. Já os bifenilos policlorados são de duas marcas diferentes, *Sigma Aldrich* e *Techno Spec*.

Quanto aos aparelhos e reagentes utilizados na análise dos contaminantes, os compostos n-hexano e acetonitrilo usados na cromatografia foram adquiridos na *UniSolv Merck* (Darmstadt, Alemanha) e na *Carlo Erba* (Val de Reuli, França), respetivamente. O kit comercial dos sais QuEChERS e dSPE foram adquiridos pela *Agilent Technologies* (California, Estados Unidos da América). Os compostos orgânicos halogenados foram determinados usando um cromatógrafo a gás (GC) com um detetor de captura de eletrões (GC-ECD) (GC-2010, Shimadzu, Quioto, Japão) e a coluna capilar de GC utilizada foi Zebtron-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Phenomenex, Madrid, Espanha). Já na determinação dos OPP foi utilizado um GC com um detetor fotométrico de chama (FPD) (GC-2010, Shimadzu, Quioto, Japão) usando um filtro de fósforo, e a coluna capilar utilizada foi a Zebtron-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Phenomenex, Madrid, Espanha).

2.2. Métodos Experimentais

A metodologia usada neste trabalho consistiu em três partes, sendo a primeira uma otimização do protocolo experimental, onde se determinou o método de extração mais eficaz, avaliando vários procedimentos experimentais para concluir qual o que se enquadra melhor para aplicar nas 20 amostras de mel, 17 delas coletadas no Parque Natural do Montesinho (PNM), e as restantes 3 amostras eram comerciais. A avaliação da eficiência de extração foi realizada através de estudos de recuperação. De seguida, após a escolha do procedimento mais eficaz, o método analítico foi validado e aplicou-se o procedimento que obteve melhores recuperações às amostras de mel que se pretendeu avaliar e, determinou-se, através das retas de calibração da matriz, as concentrações de diferentes pesticidas (como os OCP, OPP e PYR) e outros contaminantes ambientais (como OPE, BDE e os PCB) presentes nas amostras de mel. No protocolo experimental foram extraídos 40 contaminantes (19 POP (9 OCP, 6 BDE e 4 PCB), 5 PYR e respetivos isómeros, 7 OPE e 6 OPP) que estão representados na tabela 1.

Os compostos avaliados foram analisados por dois equipamentos de Cromatografia Gasosa, sendo que os compostos halogenados, como os OCP, PYR, PCB e BDE, foram analisados no GC-ECD, e os compostos fosforados como os OPP e os OPE, foram analisados no GC-FPD. Algumas das principais condições cromatográficas de ambos os instrumentos de análise, estão representados na tabela 2.

Tabela 1 – Compostos analisados no projeto.

Compostos	Grupo
α -HCH	Pesticidas organoclorados (OCPs)
β -HCH	
γ -HCH	
Aldrina	
End I	
DDE	
Dieldrina	
o,p'-DDT	
p,p'-DDD	
Bifentrina	
Cialotrina I e II	Piretróides (PYRs)
Cipermetrina	
Fenvalerato I e II	
Deltametrina I e II	
BDE 153	Retardantes de chama-Éteres difenílicos polibromados (BDEs)
BDE 47	
BDE 100	
BDE 99	
BDE 154	
BDE 183	
PCB 28	Bifenilos policlorados (PCBs)
PCB 118	
PCB 153	
PCB 180	
TPrP	Retardantes de chama – Ésteres Organofosforados (OPEs)
TiBP	
TnBP	
TCEP	
TBEP	
TEHP	
Fosfato de trietil (TToP)	
Dimetoato	
Cloropirifos-metilo	Organofosforados (OPPs)
Paratião – metilo	
Malatião	
Cloropirifos	
Clorfenvinfos	

Tabela 2 – Principais características cromatográficas do GC-ECD e GC-FPD.

Características	GC-ECD	GC-FPD
Temperatura coluna	40 °C	100 °C
Temperatura detetor	300 °C	300 °C
Temperatura SPL1	250 °C	250 °C
Volume de injeção	1 µL	1,4 µL
Gás de arrastamento	Hélio	Hélio
Pressão do gás	83,2 kPa	92,2 kPa
Fluxo total	23,1 mL/min	15,8 mL/min

2.2.1. Otimização de Protocolo

Inicialmente, da pesquisa sobre o mel, reuniram-se informações acerca dos procedimentos que têm obtido melhores resultados neste tipo de atividades, e foram testados diferentes protocolos experimentais. Como tal, metodologia utilizada foi de acordo com alguns autores que usaram QuEChERS com o cleanup dSPE, e para a análise dos compostos optaram por diversos tipos de cromatografia (35,38,41–47) Na totalidade destes artigos diferenciados, a metodologia de extração para vários tipos de contaminantes em diversas origens de amostras de mel, culminou no uso de QuEChERS em conjunto com um passo de cleanup que foi, também, a grande maioria com extração em fase sólida dispersiva, dSPE, outros com extração líquido-líquido, e a análise das amostras foi feita tanto por Cromatografia Gasosa, acoplados a ECD ou MS (espetrometria de massa), outros por Cromatografia Líquida, e um dos estudos referenciados optou por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC).

Nos três protocolos reunidos foram testados diferentes sais QuEChERS, com composições variáveis entre si. De acordo com os requisitos dos kits, o QuEChERS AOAC apresentam 6 g de Sulfato de magnésio (MgSO_4) e 1,5 g de Acetato de sódio, o QuEChERS EN consistem em 4 g de MgSO_4 , 1 g de Cloreto de sódio (NaCl), 1 g de Citrato de sódio e 0,5 g de Citrato dissódico sesquihidratado, e o QuEChERS Original contém 6 g de MgSO_4 e 1,5 g de NaCl. Foram, também, testados 3 distintos Cleanups (C1:150 mg MgSO_4 , 50 mg PSA, 50 mg C18; C2:150 mg MgSO_4 , 25 mg PSA, 50 mg C18; C3: 150 mg MgSO_4 , 50 mg PSA, 25 mg C18). Numa primeira parte da otimização do protocolo, foram avaliados os QuEChERS, de seguida os cleanups e, por fim o uso dos ultrassons, como passo intermédio, para verificar se ajudava na homogeneização. Assim, a performance dos métodos testados, foi avaliada de acordo com estudos de recuperação, em que se fez uma extração, na qual foi contaminado primeiro com os analitos em estudo à concentração de 25 µg/L, a massa de mel pesada (cerca de 5 g), e adicionou-se, depois, o conjunto de sais (QuEChERS+dSPE) – a que chamamos o Pré-spiking – e, outra extração onde se contaminava o extrato final antes de analisar

pelo GC – a que denominamos de Post-spiking. Como tal, através do estudo e comparação desses dois resultados, chegamos a determinadas recuperações e, foi possível, analisar quais as que se encontravam dentro das melhores percentagens (entre 70% a 120%), a fim de concluir qual o método mais eficaz para a extração. É de ressaltar, que a testagem dos 3 QuEChERS, dos 3 cleanups e do uso dos ultrassons foi realizada, inicialmente, apenas no grupo que tinha maior número de compostos, os POP, composto por pesticidas OCP, BDE e PCB, e só depois se aplicou às restantes famílias químicas (PYR, OPE e OPP), refutando que apenas foi realizado neste sentido pela praticidade do uso dos compostos, que já se encontravam misturados numa solução padrão mista composta por estes múltiplos contaminantes.

De seguida, para diferenciar este método mais utilizado dos trabalhos científicos já publicados, testou-se, também, se poderia ser eficaz o uso combinado dos QuEChERS e dSPE num só tubo, mais pequeno, ou seja, reduzir a quantidade de sais utilizada, mas em proporção, diminuindo-se também a massa de mel utilizada (de 5 g para 2 g), e consecutivamente, a nível energético seria mais vantajoso, pelo que se despendiu menos tempo no vórtex e na centrífuga, permitindo-nos reduzir custos. Neste passo, por terem sido feitos cortes em proporção, não houve alteração das recuperações e, portanto, permitiu que fizéssemos dessa forma a extração dos contaminantes para as amostras de mel num só passo e mais rapidamente aplicados nas 20 amostras.

2.2.2. Protocolo otimizado: QuEChERS EN conjugado com cleanup 1

Posteriormente à otimização do protocolo experimental, ficou estabelecido o procedimento final para aplicar às amostras de mel recolhidas do Parque Natural do Montesinho.

Neste procedimento, pesou-se cerca de 2 g de cada uma das amostras de mel para tubos de falcon de 15 mL, devidamente identificados, que já continham o QuEChERS EN e o cleanup, e adicionou-se ainda 6 mL de acetonitrilo e 3 mL de água destilada. Homogeneizou-se cada tubo durante cerca de 90 segundos, no vórtex, e utilizou-se a centrífuga para cada uma das amostras, a 4500 rpm durante 5 minutos, e transferiu-se, aproximadamente, entre 1000 a 1200 μ L de sobrenadante para o vial de 1,5 mL. De seguida, foram colocados, cada vial, a secar no evaporador, com fluxo de nitrogénio, e redissolveu-se no mesmo volume, 1000 a 1200 μ L, de n-Hexano. Por fim, transferiu-se cerca de 150 μ L de cada uma das amostras extraídas, para novos vials com insert, de modo a que as amostras pudessem ser, posteriormente analisadas por Cromatografia Gasosa com deteção por captura eletrónica (GC-ECD) e com deteção fotométrica de chamas (GC-FPD), esquematizado na figura 2.

Após a extração concluída, foi necessário fazer 7 soluções padrão, a diferentes concentrações, de cada contaminante pertencente às classes POP, PYR, OPP e OPE, nomeadamente a 10, 15, 25, 50, 75, 100 e 125 μ g/L, para se construir as retas de calibração para cada contaminante. Obteve-se duas retas, ambas redissolvidas na própria matriz, sendo que numa das retas as concentrações estavam em μ g/L, e na outra reta construída, fez-se a conversão com a massa das amostras e obteve-se as concentrações em μ g/kg,

de modo a se conseguir ter as unidades certas para se retirar as concentrações de possíveis contaminantes que possam aparecer nas amostras de mel, com o objetivo de aferir se realmente algum dos contaminantes presentes poderia estar presente na matriz das nossas amostras de mel.

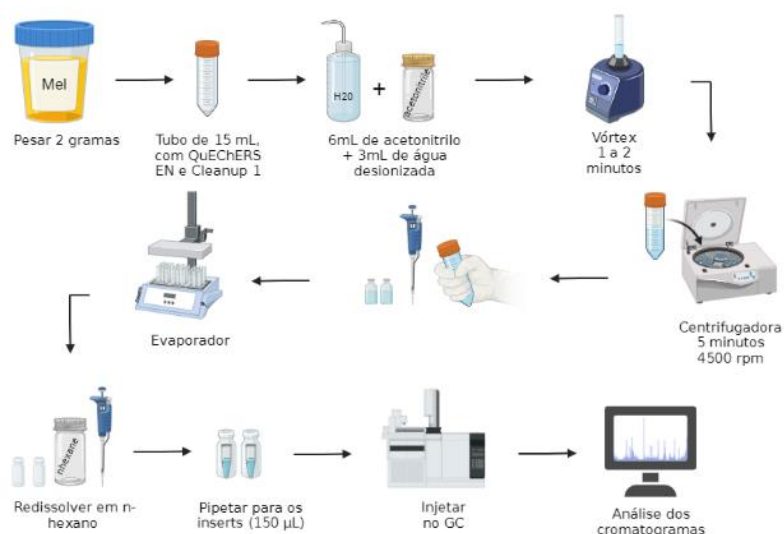


Figura 2 – Esquema do Protocolo Experimental aplicado nas amostras de mel.

2.3. Amostragem

O Parque Natural do Montesinho, localiza-se no extremo nordeste de Portugal, em que cerca de 1/3 do território é coberto por matos, que têm na sua principal constituição 3 principais grupos com a seguinte composição florística: os urzais (mais abundantes) representados pela espécie *Erica australis*, os giestais representados pela espécie *Cystisus multiflorus*, e os estevais identificados pela espécie *Cystus ladanifer* (40). Tem cerca de 75000 hectares, aproximadamente 750 km², abrangendo dimensões bastante grandes, e está rodeado de uma variedade de locais mais industrializados e, também, locais mais rurais.

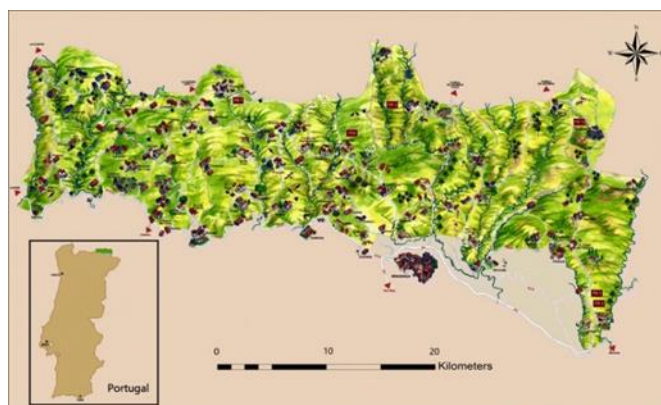


Figura 3 – Geolocalização do Parque Natural do Montesinho, com base no artigo Xie, Ying & Peng, Minggang. (2019). Forest fire forecasting using ensemble learning approaches. Neural Computing and Applications. 31. 10.1007/s00521-018-3515-0.

As amostras de mel foram recolhidas em outubro de 2021, sendo que é de elevada importância conhecer a sua origem. Comumente, das 20 amostras, 17 foram recolhidas do Parque Natural do Montesinho (ABC, ACB, ABA, ABB, ACA, CAB5, H2, H3, H4, H6, H7, M1, M2, M3, M8, M9 e M10) e, nesta recolha, tentou-se abranger diversos locais que estivessem em condições distintas, e as restantes 3 amostras (C1, C2 e C3) foram amostras comercializadas em mercados, para ter um meio de comparação do que se pode encontrar também nos locais de venda do produto.

Foram, portanto, obtidas amostras de zonas com bastante densidade florestal, zonas com diversidade de fauna e flora, locais mais perto de estradas movimentadas, perto de indústrias e empresas, bem como de casas e campos agrícolas.

A diversidade de locais, permite complementar os resultados obtidos, tendo em conta a origem de cada amostra, a fim de se compreender de que modo pode comprometer o mel, e se este poderá ser considerado como um bom biomarcador ambiental, como o esperado.

3. Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados para as duas principais partes integrantes do tema da dissertação, nomeadamente os valores que validam o método para a otimização de protocolo concluída como primeiro passo, bem como, a análise da presença de contaminantes em diferentes amostras de mel do Parque Natural do Montesinho e as respetivas concentrações obtidas, a fim de concluir se o mel poderá representar um potencial bioindicador da poluição, tendo por base a zona onde se localiza o parque, no nordeste transmontano.

3.1. Otimização de Protocolo – Validação do método

A otimização de protocolo consistiu na testagem de vários aspetos metodológicos, para ser possível determinar qual seria o melhor método para a extração de múltiplos contaminantes nas amostras de mel. Para tal, de acordo com a literatura científica reconhecida, o método mais recente que se utiliza para a extração de contaminantes em diferentes objetos de estudo é a utilização de diferentes composições de QuEChERS, em conjunto com uma segunda fase de cleanup com fase sólida dispersiva, acabando por serem analisadas por diferentes cromatografias, como se pode verificar na tabela A1 em anexo.

Neste projeto, testou-se 3 kits de QuEChERS, e 3 composições diferentes de cleanup's, para avaliar as percentagens de recuperação através do uso das diferentes composições, de modo a selecionar o método ideal.

Desta forma, o primeiro grupo testado foram os POP, que continham 9 OCP, 6 BDE e 4 PCB, e por serem o grupo com maior número de compostos avaliados, optou-se por testar os QuEChERS e os cleanup's para estes contaminantes, que são também os mais relevantes e mais abordados em vários estudos científicos (48,49). Como demonstrado na figura 4, temos as recuperações da extração múltipla dos 19 POP, para os

diferentes QuEChERS, EN, AOAC, e ORIGINAL, em conjunto com o cleanup de composição 1, e na tabela 3, encontram-se delineados os valores dos desvios padrões relativos (RSD) e as recuperações (RCV), ambos em percentagem. Nas figuras 4, 5 e 6 e nas tabelas 3, 4, 5 e 6, os valores a verde significam que as recuperações obtidas estão dentro dos limites requeridos para este parâmetro, ou seja, entre 70% e 120% (50), enquanto os valores azuis são colocados quando se encontram muito abaixo dos 70% ou muito acima de 120%. Ainda nas tabelas 1, 2 e 3, temos os valores a amarelo, que significam que com um ajuste de áreas nos cromatogramas, poderá conseguir-se atingir os limites ideais.



Figura 4 - Recuperações para Otimização de protocolo, utilizando três tipos diferentes de QuEChERS (EN, AOAC, ORIGINAL), respetivamente, com o Cleanup C1.

Tabela 3 – Valores específicos das recuperações e desvios padrões relativos para QuEChERS EN, AOAC, ORIGINAL.

QuEChERS	ORIGINAL		AOAC		EN	
Compounds	RSD	RCV	RSD	RCV	RSD	RCV
α -HCH	7%	50%	1%	50%	3%	47%
HCB	4%	37%	3%	41%	1%	39%
β -HCH	11%	56%	6%	70%	2%	67%
lindane	2%	81%	11%	68%	9%	83%
γ -HCH	14%	82%	3%	145%	3%	122%
PCB28	84%	242%	35%	63%	14%	82%
Aldrin	9%	55%	3%	62%	5%	66%
PCB10	7%	74%	9%	61%	3%	64%
End I	3%	62%	0%	67%	5%	69%
p,p'-DDE	11%	67%	5%	75%	4%	77%
Dieldrin	4%	66%	3%	61%	8%	67%
PCB118	6%	77%	7%	67%	0%	71%
BDE28	3%	106%	20%	43%	8%	77%
DDD	4%	97%	5%	81%	7%	117%
DDT	9%	79%	6%	69%	7%	131%
PCB153	3%	62%	7%	75%	3%	91%
Methoxychlor	11%	66%	2%	65%	4%	69%
PCB180	15%	74%	5%	94%	5%	82%
BDE47	14%	119%	20%	69%	15%	132%
IS	7%	72%	1%	76%	9%	77%
BDE100	4%	68%	2%	78%	4%	72%
BDE99	14%	83%	4%	81%	5%	87%
BDE153	14%	58%	6%	77%	18%	79%
BDE154	9%	82%	2%	69%	12%	82%
BDE183	14%	93%	6%	79%	4%	89%

Na figura 5, pode-se observar, que foi selecionado o melhor QuEChERS, e passou a testar-se as 3 diferentes composições de clean up's (C1, C2 e C3), estando representadas as recuperações, também, apenas para os POP, com mais detalhe dos valores na tabela 4, onde a legenda das cores é igual ao que já foi mencionado para as figuras acima. É importante ressaltar que, no gráfico de barras em que está representado o QuEChERS EN e o C2, eliminou-se as barras do lindano, DDD, PCB 180 e aldrina, e no gráfico de barras em que está representado o QuEChERS EN e o C3, eliminou-se o DDD e o PCB 180, uma vez que apresentavam recuperações muito acima dos 120% e alteravam a escala dos gráficos, no entanto, para efeitos de percentagens dos gráficos circulares respetivos, estes encontram-se representados na mesma.

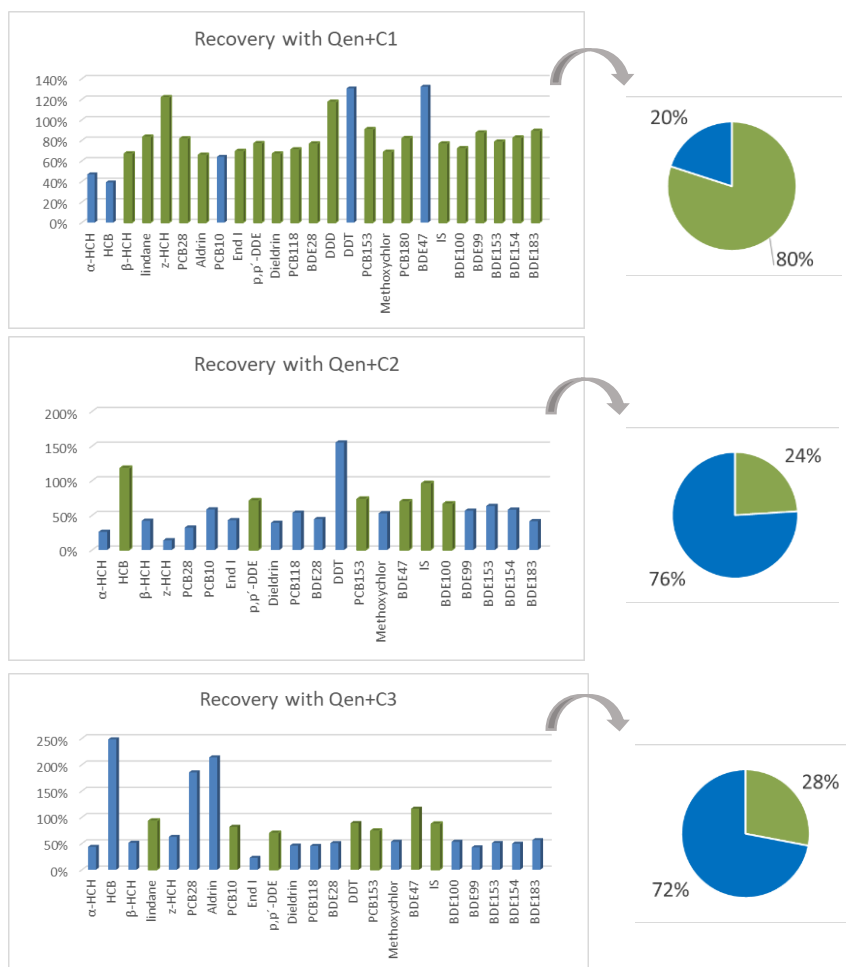


Figura 5 – Recuperações para Otimização de protocolo, utilizando os três tipos diferentes de Cleanups (C1, C2, C3), respectivamente, com o QuEChERS EN.

Tabela 4 – Valores descritos para recuperações e RSD, para os Cleanup C1, C2 e C3.

Clean Up	C1		C2		C3	
Compounds	RSD	RCV	RSD	RCV	RSD	RCV
α -HCH	3%	47%	4%	26%	11%	44%
HCB	1%	39%	2%	118%	8%	248%
β -HCH	2%	67%	9%	42%	6%	51%
lindane	9%	83%	23%	697%	31%	93%
z-HCH	3%	122%	15%	14%	8%	62%
PCB28	14%	82%	34%	32%	120%	185%
Aldrina	5%	66%	11%	410%	42%	214%
PCB10	3%	64%	2%	59%	2%	82%
End I	5%	69%	3%	43%	21%	23%
DDE	4%	77%	5%	71%	8%	70%
Dieldrina	8%	67%	7%	39%	37%	46%
PCB118	0%	71%	4%	54%	11%	45%
BDE28	8%	77%	5%	45%	17%	51%
DDD	7%	117%	7%	866%	84%	302%
DDT	7%	131%	3%	155%	44%	89%
PCB153	3%	91%	13%	73%	2%	74%
Metoxicloro	4%	69%	9%	53%	16%	53%
PCB180	5%	82%	39%	285%	126%	1801%
BDE47	15%	132%	56%	70%	18%	116%
IS	9%	77%	11%	96%	7%	87%
BDE100	4%	72%	7%	66%	7%	53%
BDE99	5%	87%	5%	57%	5%	43%
BDE153	18%	79%	3%	63%	4%	51%
BDE154	12%	82%	0%	58%	5%	50%
BDE183	4%	89%	3%	41%	19%	56%

De seguida, o último passo da otimização de protocolo, consistiu na utilização de ultrassons (US), antes da utilização dos QuEChERS ou antes da utilização do dSPE. Após selecionado o QuEChERS e o clean up de melhores composições, comparou-se as recuperações sem e com o uso dos US em duas ordens diferentes, como se pode verificar na figura 6, bem como na tabela 5, em que se encontra os valores exatos obtidos. A legenda de cores permanece do mesmo método que as figuras e tabelas representadas anteriormente. É importante ressaltar, também, que no gráfico de barras em que está representado a utilização de US antes do QuEChERS, foram eliminados o α -HCH, o PCB 118 e o PCB 180, por estarem muito distantes dos valores assumidos, no entanto, entra na mesma para as percentagens do gráfico circular.

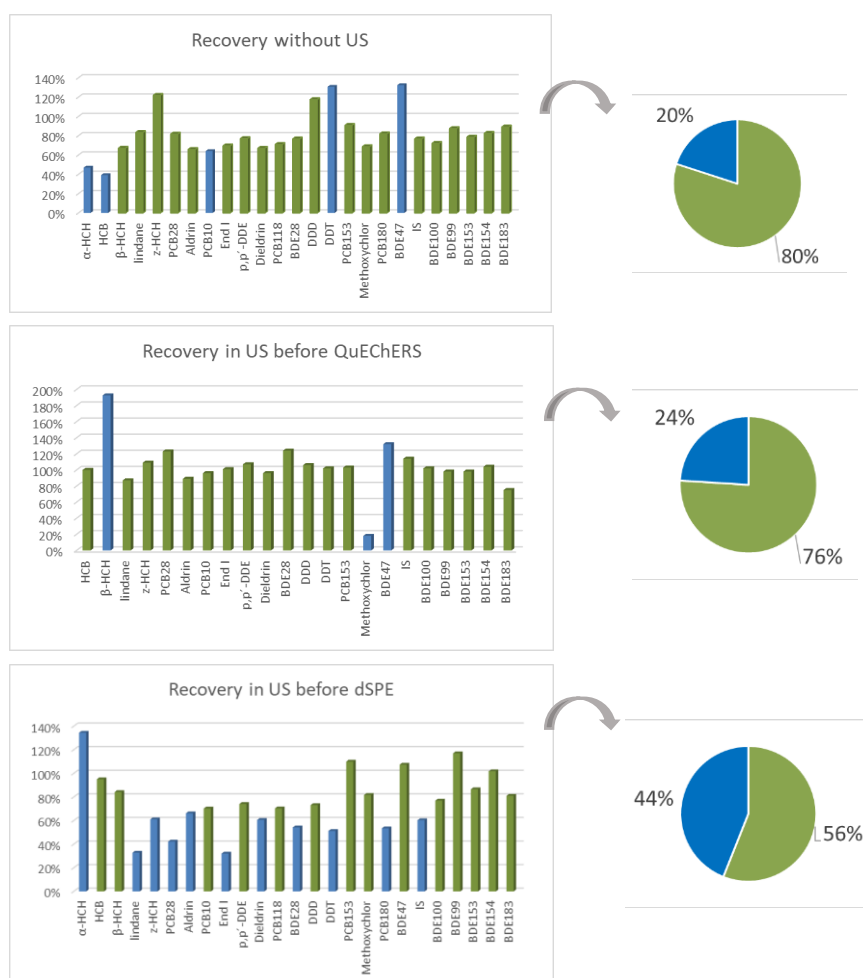


Figura 6 – Recuperações para Otimização de protocolo, utilizando ultrassons nos passos intermédios do procedimento experimental.

Tabela 5 – Valores descritos para recuperações e RSD, para o uso de ultrassons antes do dSPE e do QuEChERS, e sem o uso de ultrassons.

Ultrassound (US)	No US		US+QuEChERS		US+dSPE	
Compounds	RSD	RCV	RSD	RCV	RSD	RCV
α -HCH	3%	47%	10%	838%	3%	134%
HCB	1%	39%	7%	100%	8%	95%
β -HCH	2%	67%	7%	199%	2%	84%
lindane	9%	83%	3%	87%	4%	33%
γ -HCH	3%	122%	2%	109%	10%	61%
PCB28	14%	82%	9%	123%	1%	42%
Aldrin	5%	66%	4%	89%	1%	66%
PCB10	3%	64%	2%	96%	1%	70%
End I	5%	70%	35%	101%	2%	32%
p,p'-DDE	4%	77%	1%	107%	1%	74%
Dieldrin	8%	67%	3%	96%	8%	61%
PCB118	0%	71%	3%	366%	12%	70%
BDE28	8%	77%	2%	125%	3%	54%
DDD	7%	117%	20%	106%	0%	73%
DDT	7%	131%	1%	102%	2%	51%
PCB153	3%	91%	3%	103%	28%	110%
Methoxychlor	4%	70%	124%	20%	19%	82%
PCB180	5%	82%	14%	214%	2%	53%
BDE47	15%	132%	49%	132%	0%	107%
IS	9%	77%	4%	114%	32%	60%
BDE100	4%	72%	2%	102%	8%	77%
BDE99	5%	87%	34%	98%	18%	117%
BDE153	18%	79%	3%	98%	27%	87%
BDE154	12%	82%	2%	104%	8%	102%
BDE183	4%	89%	1%	75%	11%	81%

Por último, aplicou-se o método que melhor resultado obteve, aos restantes pesticidas (OPP e PYR) ao contaminantes ambientais retardantes de chama fosforados (OPE) que se pretendeu avaliar na extração de múltiplos contaminantes das amostras de mel, a fim de perceber se o método escolhido, era eficaz também nos PYR, OPP e OPE, como se verifica na tabela 6. Na tabela 7, estão representadas todas as recuperações obtidas para a totalidade dos 40 compostos analisados.

Tabela 6 – Recuperações obtidas com o Protocolo QuEChERS EN e cleanup C1, para os contaminantes PYR, OPE e OPP.

Recuperações PYR, OPP e OPE			
Recuperações PYR		Recoveries OPP+OPE	
Compostos	Recuperações	Compostos	Recuperações
Bifentrina	81%	TPrP	71%
Cialotrina 1	106%	TiBP	74%
Cialotrina 2	531%	TnBP	93%
Cipermetrina	92%	Cloropirifos-metilo	85%
Fenvalerato 1	91%	Paratião-metilo	85%
Fenvalerato 2	108%	Clorfenvinfos	105%
Deltametrina 1	111%	Dimetoato	70%
Deltametrina 2	96%	TCEP	113%
		Malatião	102%
		Cloropirifos	105%
		TEHP	70%
		TTOP	81%

Tabela 7 – Recuperações finais para todos os 40 compostos analisados.

Grupo	Compostos	% Recuperações
OCP	α -HCH	47%
	β -HCH	67%
	γ -HCH	83%
	Aldrina	66%
	End I	69%
	DDE	77%
	Dieldrina	67%
	DDD	117%
	DDT	131%
PYR	Bifentrina	81%
	Cialotrina 1	106%
	Cialotrina 2	531%
	Cipermetrina	92%
	Fenvalerato 1	91%
	Fenvalerato 2	108%
	Deltametrina 1	111%
	Deltametrina 2	96%
BDE	BDE153	79%
	BDE47	132%
	BDE100	72%
	BDE99	87%
	BDE154	82%
	BDE183	89%
PCB	PCB28	82%
	PCB118	71%
	PCB153	91%
	PCB180	82%
OPE	TPrP	71%
	TiBP	74%
	TnBP	93%
	TCEP	113%
	TBEP	62%
	TEHP	70%
	TToP	81%
OPP	Dimetoato	70%
	Clorpirifos-metilo	85%
	Paratião-metilo	85%
	Malatão	102%
	Clorpirifos	105%
	Clorfenvinfos	105%

Na validação do método, foram feitos 7 padrões com os compostos, a diferentes concentrações, para os POP e PYR em conjunto, e para os OPE e OPP, também em conjunto. Foram traçadas retas padrão para cada um dos pesticidas e outros contaminantes ambientais, e de acordo com a tabela 8, compilou-se os Limites de detecção e quantificação, bem como os coeficientes de correlação, para obtenção das concentrações em $\mu\text{g/L}$ e em $\mu\text{g/kg}$.

Tabela 8 - Valores LOD, LOQ e Coeficiente de correlação para os componentes estudados, em µg/L e µg/kg, e o fator matriz associado.

Compostos	Reta (µg/L)			Reta (µg/kg)			Fator matriz
	LOD	LOQ	Correlação	LOD	LOQ	Correlação	
OPE							
TPrP	5,83	19,42	0,996	0,44	1,46	0,996	0,96
TiBP	16,76	55,87	0,996	1,26	4,19	0,996	0,81
TnBP	6,47	21,56	0,999	0,49	1,62	0,999	1,30
TCEP	12,15	40,51	0,997	0,91	3,04	0,997	0,80
TBEP	10,24	34,14	0,998	0,77	2,56	0,998	0,24
TEHP	6,73	22,43	0,999	0,50	1,68	0,999	1,73
TTOP=TCP	7,13	23,78	0,999	0,53	1,78	0,999	1,45
PYR							
Bifentrina	6,06	20,21	0,999	0,45	1,52	0,999	0,06
Cialotrina 1	43,70	145,65	0,978	3,28	10,92	0,978	4,32
Cialotrina 2	7,61	25,38	0,999	0,57	1,90	0,999	0,46
Cipermetrina	12,98	43,25	0,998	0,97	3,24	0,998	0,88
Fenvalerato 1	15,31	51,02	0,996	1,15	3,83	0,996	0,64
Fenvalerato 2	21,12	70,40	0,995	1,58	5,28	0,995	4,80
Deltametrina 1	17,83	59,42	0,996	1,34	4,46	0,996	0,81
Deltametrina 2	10,28	34,26	0,999	0,77	2,57	0,999	0,21
OPP							
Dimetoato	13,79	45,98	0,996	1,03	3,45	0,996	0,64
Clorpirifos-metilo	10,29	34,30	0,998	0,77	2,57	0,998	0,67
Paratíão-metilo	10,29	34,30	0,998	0,77	2,57	0,998	0,46
Malatíão	8,13	27,11	0,999	0,61	2,03	0,999	0,42
Clorpirifos	9,92	33,06	0,998	0,74	2,48	0,998	0,70
Clorfenvinfos	7,66	25,53	0,998	0,57	1,91	0,998	8,02
OCP							
α-HCH	7,70	25,68	0,999	0,58	1,93	0,999	0,34
β-HCH	8,43	28,09	0,999	0,63	2,11	0,999	0,61
γ-HCH	17,23	57,43	0,997	1,29	4,31	0,997	26,73
Aldrina	22,72	75,72	0,994	1,70	5,68	0,994	0,55
End I	13,17	43,90	0,998	0,99	3,29	0,998	1,08
DDE	11,77	39,25	0,998	0,88	2,94	0,998	0,71
Dieldrina	26,17	87,25	0,991	1,96	6,54	0,991	0,75
DDT	18,88	62,93	0,995	1,42	4,72	0,995	0,78
DDD	47,08	156,93	0,984	3,53	11,77	0,984	0,75
BDE							
BDE 153	47,98	159,92	0,974	3,60	11,99	0,974	0,14
BDE 47	9,36	31,19	0,998	0,70	2,34	0,998	0,38
BDE 100	3,93	13,10	1,000	0,29	0,98	1,000	1,32
BDE 99	17,35	57,82	0,998	1,30	4,34	0,998	1,81
BDE 154	36,00	120,01	0,983	2,70	9,00	0,983	0,98
BDE 183	20,36	67,86	0,995	1,53	5,09	0,995	0,89
PCB							
PCB 28	17,21	57,37	0,996	1,29	4,30	0,996	0,75
PCB 118	12,65	42,16	0,997	0,95	3,16	0,997	0,20
PCB 153	40,40	134,68	0,968	3,03	10,10	0,968	0,77
PCB 180	22,09	73,63	0,994	1,66	5,52	0,994	0,08

A fim de compreender se poderia haver o efeito matriz, utilizaram-se dois padrões para cada contaminante, ou seja, dois padrões a 25 µg/L, em que um foi redissolvido na própria matriz (mel) e outro em que se redissolveu no solvente (n-hexano). Assim, desta forma, determinou-se o quociente entre as

áreas da matriz e do solvente, e obteve-se o fator matriz, que deve permanecer entre os valores de 0,8 a 1,20, para avaliar se existe algum efeito da matriz na análise cromatográfica.

3.2. Análise dos contaminantes presentes nas amostras de mel

Na análise mais abrangente dos pesticidas e outros contaminantes ambientais, aplicou-se o método otimizado e validado, às diferentes 20 amostras de mel, e consoante a análise do cromatograma de ambos os tipos de Cromatografia Gasosa (GC-ECD e GC-FPD) utilizados, determinaram-se as áreas dos picos que foram encontrados. Neste passo, foi realizada uma análise qualitativa, em que se comparou um cromatograma padrão, com todos os picos delineados e respetivos tempos de retenção para cada pesticida e contaminante ambiental, com os cromatogramas de cada amostra, de modo a ser possível verificar a presença de algum pico, dentro dos mesmos tempos de retenção dos picos padrão, obtendo a área de cada um. Assim, dentro dos 40 pesticidas e restantes contaminantes avaliados, foram identificados apenas 15 poluentes. Para cada composto encontrado, utilizou-se a reta de calibração e a respetiva equação, juntamente com a área dos picos, para determinar a concentração do analito de interesse nas amostras de mel.

Nos seguintes tópicos, são apresentadas tabelas em que consta, para cada composto identificado, os parâmetros de validação para cada pesticida e contaminante ambiental e a identificação da amostra onde foi identificado o composto, e o respetivo valor da concentração calculada pela equação da reta de calibração. É de ressaltar, ainda, que existe uma legenda de cores para identificar se as concentrações se encontram entre os LOD e LOQ da validação, ou se estão fora dos limites. No primeiro caso, estando dentro dos limites (acima do LOD e abaixo do LOQ), apresentam um tom verde, quando estão abaixo do limite de deteção identificou-se com um tom azul e quando estão acima do limite de quantificação, estão representados os valores na cor amarelo.

3.2.1. Piretróides (PYR)

Relativamente aos Piretróides, foram estudados 5 poluentes pertencentes a este grupo e respetivos isómeros perfazendo um total 8 compostos, sendo que, no entanto, apenas foram detetados 2 desses compostos, a Cialotrina 1 (ou Cialotrina λ) e Cialotrina 2 (ou Cialotrina γ).

A Cialotrina 1, apenas foi identificada numa amostra, ABB, em que a concentração foi superior ao limite de quantificação (tabela 9).

Já a Cialotrina 2, esteve presente num maior número de amostras deste grupo de pesticidas, a ABB, a H2, a H3 e a H4, sendo que apenas a H3 apresentou concentrações dentro dos LOD e LOQ (ou seja, superior ao LOD, mas inferior ao LOQ), e as restantes estiveram acima do limite de quantificação (tabela 10).

Tabela 9 – Valores para validação do método e amostras que contêm a Cialotrina 1.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
4,39E+04	3,48E+05	0,978	3,28	10,92
Amostra: ABB mABB=2,136g		Média	[] µg/kg	
		2070058,6	39,23	

Tabela 10 – Valores para validação do método e amostras que contêm a Cialotrina 2.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
1,36E+06	7,82E+03	0,999	0,57	1,90
Amostra: ABB mABB=2,136g		Média	[] µg/kg	
		4863737,2	3,56	
Amostra: H2 mH2=2,002g		Média	[] µg/kg	
		11059445,1	8,10	
Amostra: H3 mH3=2,123g		Média	[] µg/kg	
		1545901,1	1,13	
Amostra: H4 mH4=2,139g		Média	[] µg/kg	
		3009303,05	2,20	

3.2.2. Retardantes de chama fosforados – Ésteres Organofosforados (OPE)

Quanto aos OPE, foram analisados 7 compostos pertencentes a este grupo, sendo que no total, apenas foram detetados 2 desses compostos, o TBEP e o TToP. O TToP, foi identificado em 7 amostras, ACB, ABA, ABB, ACA, CAB5, H2 e H3, nas quais a concentração foi superior ao limite de quantificação (tabela 11). O TBEP, representado na tabela 12, foi identificado em 11 amostras, H6, H7, C1, C2, C3, M1, M2, M3, M8, M9 e M10, estando 7 delas dentro dos limites LOD e LOQ, e 4 estão acima dos valores de LOQ.

Tabela 11 – Valores para validação do método e amostras que contêm o TToP.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
3,13E+04	-2,04E+04	0,999	0,53	1,78
Amostra: ACB mACB=2,099g		Média	[] µg/kg	
		440994,1	14,73	
Amostra: ABA mABA=2,101g		Média	[] µg/kg	
		315457,6	10,72	
Amostra: ABB mABB=2,136g		Média	[] µg/kg	
		383578,4	12,90	
Amostra: ACA mABB=2,087g		Média	[] µg/kg	
		330477,8	11,20	
Amostra: CAB5 mCAB5=2,002g		Média	[] µg/kg	
		298283,9	10,17	
Amostra: H2 mH2=2,002g		Média	[] µg/kg	
		355800,6	12,01	
Amostra: H3 mH3=2,123g		Média	[] µg/kg	
		559809,2	18,52	

Tabela 12 – Valores para validação do método e amostras que contêm o TBEP.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
2,19E+05	-1,40E+05	0,998	0,77	2,56
Amostra: H6 mH6=2,084g	Média	[]µg/kg		
	269416,9	1,87		
Amostra: H7 mH7=2,104g	Média	[]µg/kg		
	261566,8	1,84		
Amostra: C1 mC1=2,104g	Média	[]µg/kg		
	381192,2	2,38		
Amostra: C2 mC2=2,064g	Média	[]µg/kg		
	418642,1	2,55		
Amostra: C3 mC3=2,088g	Média	[]µg/kg		
	697498,3	3,83		
Amostra: M1 mM1=2,095g	Média	[]µg/kg		
	382508,8	2,39		
Amostra: M2 mM2=2,019g	Média	[]µg/kg		
	308145,8	2,05		
Amostra: M3 mM3=1,949g	Média	[]µg/kg		
	254109,8	1,80		
Amostra: M8 mM8=2,060g	Média	[]µg/kg		
	657041,6	3,65		
Amostra: M9 mM9=2,048g	Média	[]µg/kg		
	434645,4	2,63		
Amostra: M10 mM10=2,111g	Média	[]µg/kg		
	466608,1	2,77		

3.2.3. Poluentes Orgânicos Persistentes (POP)

Em relação aos POP, este grupo é o que contém mais compostos avaliados, foram 19 compostos na totalidade, mas apenas foram identificados nas amostras de interesse, 13 poluentes.

O α -HCH, o β -HCH são isômeros do composto HCH e fazem parte do grupo dos pesticidas organoclorados. O α -HCH foi identificado em 13 amostras de mel (ABB, CAB5, H2, H4, H6, H7, C2, C3, M1, M3, M8, M9 e M10) e todas as concentrações calculadas, ficaram dentro dos limites LOD e LOQ estabelecidos, como se verifica na tabela 13.

No caso do β -HCH, este foi observado em 12 amostras (ACB, ABB, CAB5, H2, H4, H6, H7, C2, C3, M1, M3 e M8), em que 7 apresentaram concentrações dentro dos LOD e LOQ, 4 estiveram abaixo do LOD, e 1 acima do LOQ (tabela 14). Quanto aos resultados para o HCH, encontrou-se este composto em 9 amostras (ABB, H2, H6, C3, M1, M3, M8, M9 e M10), sendo que apenas 1 concentração se encontrava acima dos valores de LOQ, e as restantes estão dentro dos limites de deteção e quantificação, como se verifica na tabela 15.

Tabela 13 – Valores para validação do método e amostras que contêm o α -HCH.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(μ g/kg)	LOQ(μ g/kg)
1,46E+07	-8,43E+06	0,999	0,58	1,93
Amostra: ABB mABB=2,136g	Média 8354054,5	[] μ g/kg 1,15		
Amostra: CAB5 mCAB5=2,002g	Média 5292078,7	[] μ g/kg 0,94		
Amostra: H2 mH2=2,002g	Média 4656848,6	[] μ g/kg 0,89		
Amostra: H4 mH4=2,139g	Média 1105545,9	[] μ g/kg 0,65		
Amostra: H6 mH6=2,084g	Média 2733786,9	[] μ g/kg 0,76		
Amostra: H7 mH7=2,104g	Média 474845,7	[] μ g/kg 0,61		
Amostra: C2 mC2=2,064g	Média 4046963,5	[] μ g/kg 0,85		
Amostra: C3 mC3=2,088g	Média 8018627,9	[] μ g/kg 1,12		
Amostra: M1 mM1=2,095g	Média 1516894,6	[] μ g/kg 0,68		
Amostra: M3 mM3=1,949g	Média 6796803,8	[] μ g/kg 1,04		
Amostra: M8 mM8=2,060g	Média 13392230,9	[] μ g/kg 1,49		
Amostra: M9 mM9=2,048g	Média 13250878,5	[] μ g/kg 1,48		
Amostra: M10 mM10=2,111g	Média 16363048,0	[] μ g/kg 1,69		

Tabela 14 – Valores para validação do método e amostras que contêm o β -HCH.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(μ g/kg)	LOQ(μ g/kg)
3,84E+06	3,09E+05	0,999	0,63	2,11

Amostra: ACB mACB=2,099g	Média	[] μ g/kg
	3410831,5	0,81
Amostra: ABB mABB=2,136g	Média	[] μ g/kg
	4232761,8	1,02
Amostra: CAB5 mCAB5=2,002g	Média	[] μ g/kg
	7034576,8	1,75
Amostra: H2 mH2=2,002g	Média	[] μ g/kg
	4781443,5	1,17
Amostra: H4 mH4=2,139g	Média	[] μ g/kg
	518667,8	0,05
Amostra: H6 mH6=2,084g	Média	[] μ g/kg
	3927651,7	0,94
Amostra: H7 mH7=2,104g	Média	[] μ g/kg
	440564,0	0,03
Amostra: C2 mC2=2,064g	Média	[] μ g/kg
	1365705,1	0,28
Amostra: C3 mC3=2,088g	Média	[] μ g/kg
	3746625,1	0,90
Amostra: M1 mM1=2,095g	Média	[] μ g/kg
	740503,1	0,11
Amostra: M3 mM3=1,949g	Média	[] μ g/kg
	4847892,1	1,18
Amostra: M8 mM8=2,060g	Média	[] μ g/kg
	17598448,4	4,51

Tabela 15 – Valores para validação do método e amostras que contêm o HCH.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
3,96E+06	-1,55E+05	0,997	1,29	4,31
Amostra: ABB mABB=2,136g	Média	[] µg/kg		
	9895534,4	2,54		
Amostra: H2 mH2=2,002g	Média	[] µg/kg		
	8936351,4	2,30		
Amostra: H6 mH6=2,084g	Média	[] µg/kg		
	5475605,5	1,42		
Amostra: C3 mC3=2,088g	Média	[] µg/kg		
	8075779,9	2,08		
Amostra: M1 mM1=2,095g	Média	[] µg/kg		
	4934410,0	1,29		
Amostra: M3 mM3=1,949g	Média	[] µg/kg		
	8869601,2	2,28		
Amostra: M8 mM8=2,060g	Média	[] µg/kg		
	17277967,5	4,40		
Amostra: M9 mM9=2,048g	Média	[] µg/kg		
	6963876,0	1,80		
Amostra: M10 mM10=2,111g	Média	[] µg/kg		
	5364146,5	1,39		

Relativamente aos seguintes compostos, PCB28, PCB118, PCB 153, e PCB180, estes pertencem ao grupo dos PCB em que a principal diferença estrutural entre estes 4 compostos está relacionada com as posições nas quais os átomos de cloro se ligam.

Assim, para o PCB28, o mesmo foi encontrado em 13 amostras de mel (ACB, ABB, ACA, CAB5, H2, H4, H6, H7, C2, C3, M1, M3 e M8), estando as concentrações todas inferiores ao LOD (tabela 16).

Tabela 16 – Valores para validação do método e amostras que contêm o PCB 28.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
1,06E+07	-4,28E+06	0,996	1,29	4,30
Amostra: ACB mACB=2,099g	Média	[] µg/kg		
	2222860,3	0,61		
Amostra: ABB mABB=2,136g	Média	[] µg/kg		
	7234675,6	1,08		
Amostra: ACA mABB=2,087g	Média	[] µg/kg		
	4586578,8	0,83		
Amostra: CAB5 mCAB5=2,002g	Média	[] µg/kg		
	8172444,6	1,17		
Amostra: H2 mH2=2,002g	Média	[] µg/kg		
	5577820,5	0,93		
Amostra: H4 mH4=2,139g	Média	[] µg/kg		
	7624040,0	1,12		
Amostra: H6 mH6=2,084g	Média	[] µg/kg		
	1440170,0	0,54		
Amostra: H7 mH7=2,104g	Média	[] µg/kg		
	3852634,3	0,77		
Amostra: C2 mC2=2,064g	Média	[] µg/kg		
	7837873,1	1,14		
Amostra: C3 mC3=2,088g	Média	[] µg/kg		
	4172224,6	0,80		
Amostra: M1 mM1=2,095g	Média	[] µg/kg		
	2385265,2	0,63		
Amostra: M3 mM3=1,949g	Média	[] µg/kg		
	1706540,8	0,56		
Amostra: M8 mM8=2,060g	Média	[] µg/kg		
	9305189,8	1,28		

No caso do PCB153, este foi identificado numa amostra, ABC, em que a concentração determinada estava abaixo do limite de deteção estipulado (tabela 17).

Tabela 17 – Valores para validação do método e amostras que contêm o PCB 153.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
1,66E+06	2,39E+05	0,968	3,03	10,10
Amostra: ABC mABC=2,031g	Média	[] µg/kg		
	326034,4	0,05		

O end I, também conhecido por *Thiodan*, é um pesticida organoclorado, que foi detetado em 3 amostras de mel (ACA, C1 e C3), estando dentro dos limites de deteção e quantificação em 2 amostras, e noutra encontrou-se abaixo do LOD (tabela 18).

Tabela 18 – Valores para validação do método e amostras que contêm o End I.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
2,39E+06	6,01E+05	0,998	0,99	3,29
Amostra: ACA mABB=2,087g		Média	[] µg/kg	
		5920456,4	2,23	
Amostra: C1 mC1=2,104g		Média	[] µg/kg	
		6904931,5	2,64	
Amostra: C3 mC3=2,088g		Média	[] µg/kg	
		2245064,6	0,69	

Em relação ao DDT, este é outro dos compostos organoclorados a ser considerado um POP. O DDE, é muito semelhante ao DDT, havendo uma pequena alteração estrutural ao nível dos hidrogénios.

No primeiro caso, o DDT foi encontrado em 3 amostras, ABC, C2 e C3, sendo que as 3 concentrações estão abaixo do LOD (tabela 19).

Tabela 19 – Valores para validação do método e amostras que contêm o DDT.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
1,75E+06	1,00E+06	0,995	1,42	4,72
Amostra: ABC mABC=2,031g		Média	[]µg/kg	
		1046544,4	0,03	
Amostra: C2 mC2=2,064g		Média	[]µg/kg	
		1046380,6	0,03	
Amostra: C3 mC3=2,088g		Média	[]µg/kg	
		2266628,6	0,72	

Quanto ao DDE, este foi identificado em 5 amostras, ABB, H2, H3, H4 e C3, em que a totalidade das concentrações estão acima do LOQ, como se pode verificar na tabela 20.

Tabela 20 – Valores para validação do método e amostras que contêm o DDE.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
1,85E+05	1,93E+05	0,998	0,88	2,94
Amostra: ABB	Média	[]µg/kg		
mABB=2,136g	5198204,5	27,01		
Amostra: H2	Média	[]µg/kg		
mH2=2,002g	4950458,7	25,67		
Amostra: H3	Média	[]µg/kg		
mH3=2,123g	1852422,9	8,95		
Amostra: H4	Média	[]µg/kg		
mH4=2,139g	1836213,2	8,87		
Amostra: C3	Média	[]µg/kg		
mC3=2,088g	2266877,5	11,19		

Alguns compostos pertencentes à classe dos BDE, foram adicionados e tratados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), como é o caso do BDE100, BDE99 e BDE47.

O BDE47, foi identificado em 7 amostras (ABB, H2, H3, H4, C3, M1 e M3), onde se pode constatar que as concentrações obtidas em 2 das 7 amostras, foram dentro dos LOD e LOQ, e as restantes 5 amostras obtiveram concentrações superiores ao limite de quantificação delineado para o composto (tabela 21).

Em adição, aquando da análise das amostras de mel, um dos compostos pertencentes a esta família, o BDE100, foi o que apresentou maior presença na globalidade das amostras. Assim, para o BDE100, houve 19 amostras (ABC, ACB, ABA, ABB, ACA, CAB5, H2, H3, H4, H6, H7, C1, C2, C3, M1, M3, M8, M9 e M10) em que este foi identificado, estando todas as concentrações acima do limite de quantificação (tabela 22).

Tabela 21 – Valores para validação do método e amostras que contêm o BDE 47.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
4,30E+05	2,40E+05	0,998	0,70	2,34
Amostra: ABB	Média	[] µg/kg		
mABB=2,136g	1187131,1	2,20		
Amostra: H2	Média	[] µg/kg		
mH2=2,002g	3174889,8	6,83		
Amostra: H3	Média	[] µg/kg		
mH3=2,123g	1698828,4	3,39		
Amostra: H4	Média	[] µg/kg		
mH4=2,139g	1548270,0	3,04		
Amostra: C3	Média	[] µg/kg		
mC3=2,088g	1872290,5	3,80		
Amostra: M1	Média	[] µg/kg		
mM1=2,095g	1573684,5	3,10		
Amostra: M3	Média	[] µg/kg		
mM3=1,949g	1055796,4	1,90		

Tabela 22 – Valores para validação do método e amostras que contêm o BDE 100.

declive(m)	intercept(b)	correlação(R ²)	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
1,08E+06	-4,22E+05	1,000	0,29	0,98
Amostra: ABC mABC=2,031g	Média	[] µg/kg		
	7433405,9	7,27		
Amostra: ACB mACB=2,099g	Média	[] µg/kg		
	4486836,5	4,54		
Amostra: ABA mABA=2,101g	Média	[] µg/kg		
	9939541,4	9,59		
Amostra: ABB mABB=2,136g	Média	[] µg/kg		
	9032105,8	8,75		
Amostra: ACA mABB=2,087g	Média	[] µg/kg		
	10601360,5	10,20		
Amostra: CAB5 mCAB5=2,002g	Média	[] µg/kg		
	10745365,0	10,34		
Amostra: H2 mH2=2,002g	Média	[] µg/kg		
	8846607,2	8,58		
Amostra: H3 mH3=2,123g	Média	[] µg/kg		
	8310317,9	8,08		
Amostra: H4 mH4=2,139g	Média	[] µg/kg		
	10633741,7	10,23		
Amostra: H6 mH6=2,084g	Média	[] µg/kg		
	4802052,5	4,84		
Amostra: H7 mH7=2,104g	Média	[] µg/kg		
	6433210,6	6,35		
Amostra: C1 mC1=2,104g	Média	[] µg/kg		
	11287639,9	10,84		
Amostra: C2 mC2=2,064g	Média	[] µg/kg		
	8734901,7	8,48		
Amostra: C3 mC3=2,088g	Média	[] µg/kg		
	6344958,2	6,26		
Amostra: M1 mM1=2,095g	Média	[] µg/kg		
	7083832,8	6,95		
Amostra: M3 mM3=1,949g	Média	[] µg/kg		
	13719243,5	13,09		
Amostra: M8 mM8=2,060g	Média	[] µg/kg		
	13719243,5	13,09		
Amostra: M9 mM9=2,048g	Média	[] µg/kg		
	4625756,7	4,67		
Amostra: M10 mM10=2,111g	Média	[] µg/kg		
	9063299,6	8,78		

3.2.4. Pesticidas Organofosforados (OPP)

No grupo de OPP, foram analisados 6 pesticidas, o Dimetoato, o Malatião, o Clorpirifos, o Clorpirifos-metilo, o Paratião – metilo e o Clorfenvinfos. Contudo, nenhuma das amostras de mel de interesse apresentou vestígios destes compostos assinalados.

4. Discussão de Resultados

Relativamente à primeira parte do tema exposto, a mesma envolveu uma análise mais pormenorizada da metodologia que seria mais eficaz, sendo que depois de rever na literatura científica, optou-se por escolher três protocolos experimentais, e otimizar de forma a chegar-se a um consenso sobre qual seria o que resultaria melhor e, simultaneamente, diferenciador e inovado. Já na segunda parte, o principal objetivo foi utilizar a metodologia otimizada e o protocolo novo e devidamente validado, e extrair de uma única vez, múltiplos contaminantes que pudessem estar presentes em cada uma das amostras de mel recolhidas do PNM, determinando as concentrações desses mesmos poluentes, e comparar com os valores estipulados pela Comissão Europeia nas suas *Guidelines* fixas e recomendadas relativas aos pesticidas e outros contaminantes ambientais (51–53) que foram estudados ao longo deste trabalho.

Assim, na otimização do protocolo, os resultados obtidos foram conclusivos e culminaram no procedimento em um único passo em que se utilizou o QuEChERS EN (4 g de MgSO_4 , 1 g de Cloreto de sódio, 1 g de Citrato de sódio e 0,5 g de Citrato dissódico sesquihidratado), com dSPE (cleanup C1: 150 mg MgSO_4 , 50 mg PSA, 50 mg C18), e fez-se correr as amostras por GC-ECD e GC-FPD, consoante a classe de pesticidas e outros contaminantes a analisar.

Neste processo de otimização do protocolo, foi realizado um estudo de recuperações, em que se avaliou a eficácia dos 3 QuEChERS com o Cleanup 1 (C1), e verificaram-se melhores recuperações no QuEChERS EN+C1, como se verifica na figura 4 e tabela 3 dos resultados, em que cerca de 80% dos compostos analisados (POP) apresentaram recuperações entre os 70% e 120%. De seguida, testou-se os Cleanup's de diferentes composições com o QuEChERS selecionado, e verificou-se melhores resultados para o Cleanup de composição C1, com cerca de 80% dos compostos com recuperações entre os 70% e os 120%, selecionando-se o QuEChERS EN e Cleanup C1, como representado na figura 5 e tabela 4. Em adição, com o objetivo de reduzir custos e recursos seguindo os princípios da Química Verde, fez-se uma redução de reagentes e tempo de uso de equipamentos, de forma proporcional, em que se misturou o QuEChERS com o dSPE C1, diminuindo a massa de amostra pesada, de modo a encurtar o protocolo, e a facilitar o tempo de execução do mesmo, havendo neste sentido uma melhoria e diferenciação da metodologia. Para terminar este passo de otimização, foram testados procedimentos intermédios, em específico os ultrassons, a fim de ver se poderia haver melhorias na homogeneização da matriz do mel, e consequentemente na extração de múltiplos contaminantes. Com isto, observou-se que a matriz não apresentava melhorias significativas com o uso de ultrassons, pelo que, apenas com o vórtex e a centrifuga, já se obtiveram boas recuperações, sendo que este ligeiro desenquadramento das recuperações obtidas com US, poderia estar a promover a dissolução de mais interferentes na solução da amostra prejudicando a etapa do uso de cleanup, cujo objetivo foi remover estes possíveis interferentes da matriz do mel, como os açúcares e lípidos, e poderia estar a perder-se a eficiência na extração dos compostos. Neste processo intermédio, quando se utilizou os US antes da adição do QuEChERS, cerca de

76% dos compostos apresentaram recuperações dentro dos limites consideráveis, e na utilização dos US antes da adição do dSPE, houve 56% de compostos com boas recuperações, no entanto, nas amostras em que não se utilizou US, estivemos perante 80% de compostos com bons resultados, e ainda neste ponto obtivemos para os restantes 20% dos compostos, recuperações mais próximas dos 70% ou dos 120%, que seriam facilmente arredondadas para estes limites, com um ajuste de áreas nos picos dos respetivos cromatograma (figura 6 e tabela 5). Após todos os parâmetros selecionados, chegou-se a um protocolo final, e aplicou-se aos restantes compostos químicos (OPE, PYR e OPP), para ver o comportamento das recuperações dos compostos, sendo que houve praticamente 100% dos poluentes que apresentaram recuperações entre os 70% e os 120%. Quando verificamos a totalidade das recuperações obtidas para os 40 compostos (tabela 7), observamos que 80% dos compostos, estiveram dentro do intervalo pretendido, e os restantes 20% encontraram-se abaixo de 70% ou superior a 120%. Para finalizar a otimização do protocolo selecionado, foi necessário validá-lo, e para isso foram feitos 7 padrões a diferentes concentrações, com a metodologia otimizada, e traçaram-se retas de calibração na matriz, para cada pesticida, em $\mu\text{g/L}$ e em $\mu\text{g/kg}$, respetivamente, determinando os Limites de Detecção (LOD) e os Limites de Quantificação (LOQ), bem como os declives (m), ordenadas na origem (b) e o coeficiente de correlação (R^2), estando este último bastante perto do valor ideal de 1, para a totalidade dos pesticidas e contaminantes ambientais avaliados.

Relativamente à análise específica das amostras de mel, sabe-se que o rasto que os pesticidas deixam nos alimentos em que estão presentes, denominam-se por resíduos, que quando analisados, devem estar em concentrações baixas, de modo a garantir que determinado produto é seguro para o consumo humano ou animal. Assim, a Comissão Europeia criou uma base de dados em que existem valores fixos para o nível máximo de resíduos (MRL) (54,55) que podem ser encontrados nos alimentos para consumo humano e animal. O nível máximo de resíduos (MRL) consiste na concentração máxima tolerável e legalmente suportada pelo ser humano, em que para alguns casos é obrigatório cumprir, e está estipulado por legislações, e noutros exemplos é apenas recomendado, quando encontrados em regulamentações.

Como tal, em relação aos piretróides encontrados, o limite máximo de resíduos para a α -cialotrina e β -cialotrina afixado pela Comissão Europeia é de 50 $\mu\text{g/kg}$ no caso do mel e outros produtos agrícolas (51). No caso da α -cialotrina, esta apenas foi detetada numa amostra de mel, a ABB, resultando numa concentração de 39,23 $\mu\text{g/kg}$, o que considerando os LOD e LOQ (3,28 e 10,92 $\mu\text{g/kg}$, respetivamente), observamos que está acima de limite de quantificação, revelando ser quantificável na amostra, mas continua abaixo do valor MRL, logo não é considerado um problema para a saúde, neste caso. No que toca à β -cialotrina, foi detetada em 4 amostras, ABB, H2, H3 e H4, em que na amostra H3, o valor da concentração do analito está acima do LOD e abaixo do LOQ (0,57 $\mu\text{g/kg}$ e 1,90 $\mu\text{g/kg}$, respetivamente), sendo por isso detetável, mas não quantificável. As restantes 3 amostras em que foi detetado o analito, têm concentrações superiores ao limite de quantificação, (ABB = 3,56 $\mu\text{g/kg}$; H2 = 8,10 $\mu\text{g/kg}$; H4 = 2,20

µg/kg), mas continuam inferiores ao valor MRL estipulado, não representando um perigo para consumo nestes valores.

Em relação aos Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), o α -HCH, o β -HCH, o HCH e o Endossulfão I, apresentam MRL de 10 µg/kg, nas regulamentações da Comissão Europeia para o mel(52). Assim, analisando o pesticida α -HCH, houve 13 amostras em que foi detectado o analito, todas as concentrações estiveram acima do limite de detecção (0,58 µg/kg), mas abaixo do limite de quantificação (1,93 µg/kg), o que torna o contaminante detectável nas 13 amostras de mel, mas não quantificável o suficiente. Quanto ao β -HCH, foi identificado em 12 amostras (ACB, ABB, CAB5, H2, H4, H6, H7, C2, C3, M1, M3 e M8), em que 4 amostras (H4, H7, C2 e M1) obtiveram concentrações abaixo do LOD (0,63 µg/kg), não sendo, por esse motivo consideradas concentrações suficientes para serem detectadas nas amostras, 7 amostras mostraram concentrações do analito acima do LOD, mas inferior ao LOQ, e por isso, o pesticida foi detectado, mas não considerado quantificável, e a restante amostra (M8), apresentou uma concentração de contaminante superior ao LOQ, o que torna um contaminante quantificável, mas sem estar acima do MRL, e portanto não é considerado perigoso para a saúde. No caso do HCH, houve 9 amostras que apresentaram concentrações detectáveis deste analito (ABB, H2, H6, C3, M1, M3, M8, M9 e M10), sendo que 8 estão acima do LOD e abaixo do LOQ (1,29 µg/kg e 4,31 µg/kg, respectivamente), ou seja, são concentrações detectáveis, mas não quantificáveis, e apenas 1 (M8) obteve concentração de analito superior ao LOQ, mas ainda assim não superior ao MRL estabelecido pela Comissão Europeia. Já em relação ao End I, foi identificado em 3 amostras (ACA, C1 e C3), em que ACA e C1 tiveram concentrações do pesticida acima do LOD, mas inferior ao LOQ (LOD: 0,99 µg/kg; LOQ: 3,29 µg/kg), e por isso são concentrações detectáveis, mas não quantificáveis, enquanto a amostra C3 teve uma concentração inferior ao LOD, e nesse sentido não é considerada detectável.

Os compostos DDE e DDT, têm diretrizes para os níveis máximos de resíduos de 50 µg/kg (52). Analisando o DDE, este foi encontrado em 5 amostras de mel (ABB, H2, H3, H4 e C3), com concentrações sempre superiores ao LOQ (2,94 µg/kg), o que significa que está efetivamente presente nessas amostras, em altas concentrações, mas ainda assim, são inferiores ao MRL estipulado, e por esse motivo, não é prejudicial. No caso do DDT, houve 3 amostras (ABC, C2 e C3) em que foi identificado, sendo que a totalidade das amostras apresentaram concentrações inferiores ao LOD (1,42 µg/kg), o que revela que este analito não é considerado detectável, nesta situação.

Em relação aos contaminantes BDE 47 e BDE 100, os valores das diretrizes, não estão regulamentados, e, portanto, são apenas os recomendados, apresentando então valores mais baixos, de todos os compostos que foram analisados, com um valor MRL de 0,01 µg/kg (53). O primeiro composto, BDE 47, apresentou-se em 7 amostras (ABB, H2, H3, H4, C3, M1 e M3), 2 delas acima do LOD, mas inferior ao LOQ, enquanto as restantes 5 (H2, H3, H4, C3 e M1) apresentaram concentrações superiores ao LOQ e, ainda, superiores ao MRL, o que poderá significar que este contaminante, a estas concentrações, poderá

provocar lesões no organismo humano se o mel dessa origem for consumido, e poderá ter de ser reportado para monitorização do caso em específico. No caso do BDE 100, este foi o pesticida que foi mais identificado na totalidade das 20 amostras, tendo sido detetado em 19 amostras, com concentrações todas superiores ao LOQ (0,98 µg/kg), e também superiores ao MRL, o que se poderá traduzir numa questão de elevada importância para a saúde.

Abordando, também os compostos PCB 28, PCB 153, PCB 118 e PCB180, as diretrizes não estão idealmente afixadas nem existem recomendações para o caso específico do mel, no entanto, existem recomendações para alguns PCB (nenhum deles abordado neste estudo em questão) em determinados alimentos como carnes, leite e gorduras vegetais, entre outros. Ainda assim, é de salientar que nenhuma amostra de mel apresentou concentrações destes pesticidas que fossem acima do limite de deteção para serem consideradas válidas e quantificáveis.

Por último, no grupo dos OPE, foram encontrados os compostos TBEP e o TToP em algumas amostras, no entanto, as *guidelines* de MRL's para estes compostos no mel, ainda não estão estruturadas oficialmente nem existem recomendações a seu respeito, o que não permite a comparação do que se obteve com os dados regulamentados. Assim, o TToP foi identificado em 7 amostras, ACB, ABA, ABB, ACA, CAB5, H2 e H3, nas quais a concentração de analito foi, em todas, superior ao limite de quantificação (1,78 µg/kg). Já o TBEP foi observado em 11 amostras, H6, H7, C1, C2, C3, M1, M2, M3, M8, M9 e M10, estando 7 delas acima do LOD e abaixo do LOQ (0,77 µg/kg e 2,56 µg/kg, respetivamente), o que o torna detetável, mas não quantificável e 4 estão acima dos valores de LOQ, o que permite uma quantificação suficientemente fidedigna.

É, ainda, importante salientar, que em todas as 20 amostras analisadas, tanto as comerciais como as recolhidas no PNM, têm na sua composição pelo menos um pesticida e/ou contaminante ambiental.

Deste modo, comparando os resultados com a literatura científica já publicada anteriormente, observa-se que, num estudo realizado em Espanha (Aragão), foram utilizadas metodologias idênticas para a extração e análise de múltiplos contaminantes em 111 amostras de mel recolhidas (56). Os compostos analisados pertenciam a famílias químicas como os PCB, OCP e OPP, sendo analisados cerca de 6 PCB, 15 OCP e 7 OPP. O estudo de recuperações foi idêntico, sendo que o limite mínimo e máximo das recuperações abrangeu a escala de 60-120%, enquanto neste estudo foi de 70-120%, em que valores abaixo foram descartados e, em alguns casos, repetidos em laboratório. Quanto às concentrações máximas de alguns poluentes como o α -HCH, β -HCH e HCH (lindano), foram de 86,90 µg/kg, 5,15 µg/kg e 5,97 µg/kg, respetivamente, sendo que para o trabalho presente foram obtidas, para os mesmos compostos, na totalidade das 20 amostras, as concentrações máximas encontradas de 1,69 µg/kg, 4,51 µg/kg e 4,40 µg/kg, respetivamente. No caso do End I, DDE e DDT, as concentrações máximas obtidas para o artigo que se comparou, foram de 3,52 µg/kg, 93,57 µg/kg e 9,58 µg/kg, respetivamente. Já no presente estudo, para os mesmos contaminantes, os valores culminaram em 2,64 µg/kg, 27,01 µg/kg e 0,72

µg/kg, respetivamente. Por fim, para a classe dos PCB, os valores do estudo anterior assentaram em 593,70 µg/kg para o PCB 28 e 6,30 µg/kg para o PCB 153, e os valores do presente trabalho foram bastante mais pequenos, 1,28 µg/kg para o PCB 28 e 0,05 µg/kg para o PCB 153. Deste modo, comparando os valores obtidos neste estudo (56), em relação ao artigo utilizado para comparação, estes foram inferiores ao que já foi encontrado na literatura, ressaltando que, para estes compostos analisados, não haverá nenhuma precaução a ser adotada com urgência.

No caso dos BDE, existem alguns estudos que analisam a presença destes contaminantes em amostras de mel (57,58), no entanto, num dos casos, as amostras obtiveram concentrações do BDE 47 e do BDE 100, abaixo do limite de deteção, e, portanto, não foram quantificadas (57). Outro exemplo na literatura científica, representa a existência de ambos os BDE estudados no presente trabalho, em diferentes localizações geográficas, mas com valores muito pequenos, nomeadamente $0,43 \pm 0,56$ µg/kg para o BDE 47 e $0,06 \pm 0,05$ µg/kg para o BDE 100, no caso de países desenvolvidos (58). Comparando estes valores com os que foram obtidos, observa-se que as concentrações estiveram entre 1,90–6,83 µg/kg para o BDE 47, e entre 4,54–13,09 µg/kg para o BDE 100 e, portanto, são dados bastante superiores ao que foi encontrado na literatura científica. Estes valores, principalmente aqueles que foram quantificados, por estarem acima do valor de quantificação, um total de 5 em 7 amostras para o BDE 47, e 19 para o BDE 100, podem significar que existe uma problemática associada à presença destes compostos nas amostras de mel recolhidas no PNM.

Em relação aos OPE e aos PYR detetados nas amostras de interesse, existem poucos estudos publicados que utilizem estes poluentes, sendo que no caso dos OPE, mais especificamente para os compostos detetados nas amostras analisadas, como o TBEP e o TToP, não foram encontrados dados que revelassem concentrações detetáveis para esta família química, e no caso dos PYR, em destaque a cialotrina 1 e 2, foram encontradas informações em artigos científicos mas em alguns casos não tinham concentrações detetáveis nas amostras de mel analisadas (59) e noutro dos estudos encontrados, apenas para a cialotrina 1, foi detetado e quantificado numa das amostras de mel, uma concentração de 220 µg/kg (60). Neste exemplo, pode-se comparar com as concentrações obtidas para a cialotrina 1, que foi detetada numa amostra, com um valor de 39,25 µg/kg, acima do limite de quantificação, mas ainda assim, inferior ao que foi encontrado na literatura científica evidenciada e, portanto, não representa um perigo significativo.

5. Conclusão

O presente trabalho teve como principal objetivo determinar a presença e a concentração de analitos reportados na literatura científica, numa única extração, para cada uma das 20 amostras de mel analisadas, a fim de compreender se o mel se pode comportar como um biomarcador ambiental. Assim, foram destacados 40 pesticidas e contaminantes ambientais de diversas famílias químicas, 5 PYR e respetivos isómeros (total de 8), 6 OPP, 7 OPE, 9 OCP, 6 BDE e 4 PCB, sendo que os PCB, os OCP e os BDE analisados fazem parte da lista de POP, o que torna o projeto mais enriquecido, pelo facto de não existirem estudos científicos com compostos de famílias químicas tão diversificadas.

É importante ressaltar que os métodos utilizados ao longo de todo o projeto, foram baseados na literatura científica já existente, com a alteração/otimização de valores como massa e volumes de amostras e reagentes, bem como o uso mais económico dos aparelhos utilizados, em proporção, de modo a haver uma maior preocupação com a redução de custos energéticos e de produto, o que torna este método diferenciador e eficazmente validado pelos parâmetros obtidos. Para além desses aspetos, é um método que satisfaz os propósitos necessários, de extrair num único passo, múltiplos contaminantes de forma rápida, económica e eficaz. Na validação de método foi também estudado o efeito matriz, avaliando se poderia haver uma possível supressão ou aumento do sinal no detetor do GC. Para este efeito ser desprezível, os valores deveriam ser o mais próximo de 1 (entre 0,8 e 1,20), e com a análise dos resultados, concluiu-se que houve, efetivamente, um efeito matriz afastado do valor ideal em vários compostos e, portanto, optou-se por utilizar os valores obtidos pelas retas de calibração realizadas com a matriz do mel, para obter as concentrações de poluentes mais fiáveis, sem haver necessidade de se construir novas retas em que se redissolvia os padrões no solvente n-hexano.

Deste modo, pelo estudo das concentrações dos pesticidas e restantes contaminantes, apenas 14 foram detetados nas amostras, 2 PYR (a cialotrina 1 e 2), 2 OPE (TBEP e TToP), 2 PCB (PCB 28 e PCB 153), 2 BDE (BDE 47 e BDE 100) e 6 OCP (α -HCH, β -HCH, HCH, DDT, DDE e Endl), sendo que apenas os BDE se encontravam acima dos MRL recomendados. Numa análise geral das amostras, concluiu-se que em todas as 20 analisadas, estavam presentes pesticidas e/ou contaminantes ambientais, o que comprova que na região do PNM, dentro de um raio onde as abelhas realizam a polinização e se alimentam, existem vários compostos químicos, e tornam o mel um forte possível biomarcador ambiental, uma vez que ao mostrar que as amostras de mel, revelam, em alguns casos, concentrações de poluentes acima dos valores limite de quantificação.

Em relação aos MRL legislados, verificou-se que apenas estão divulgados para os piretróides e para os pesticidas organoclorados analisados, faltando regulamentações mais específicas para os bifenilos policlorados em específico para o mel, uma vez que existem apenas recomendações para outros tipos de alimentos, e no caso dos retardantes de chama (OPE e BDE) existem recomendações para o mel, mas nenhuma muito bem definida e sustentada. Este facto revela uma elevada preocupação, os PCB já foram

relatados em vários estudos como tóxicos para a saúde humana, e os OPE e BDE são aditivos de plásticos, que têm vindo a destacar-se como perigosos quando ingeridos. Como estes não se encontram legislados, e alguns nem sequer se encontram recomendações de MRL a cumprir, eleva a problemática associada à toxicidade quando ingerido este superalimento que é o mel, e que apresenta estes compostos na sua composição, sem uma regulamentação válida para que os órgãos de controlo de qualidade dos produtos essenciais e alimentares possam remover do mercado.

Assim, este trabalho, para além de sustentar o facto de o mel poder ser indicado como um marcador ambiental, também é relevante para ressaltar a falta de legislações que deveriam existir para este alimento, uma vez que é um alimento disponível na grande maioria dos mercados, e acessível à maior parte dos consumidores.

Em suma, os resultados colmataram na resposta afirmativa ao principal objetivo de compreender se o mel se poderia comportar como um bom biomarcador ambiental. Como perspetivas futuras do estudo efetuado, pretende-se verificar e sustentar estes valores obtidos através da recorrência à Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, a fim de ser uma das técnicas mais utilizada e recomendada para a confirmação da presença de contaminantes neste tipo amostras.

Referências Bibliográficas

1. Asami DK, Hong YJ, Barrett DM, Mitchell AE. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J Agric Food Chem*. 2003 Feb 26;51(5):1237–41.
2. Andreo-Martínez P, Oliva J, Giménez-Castillo JJ, Motas M, Quesada-Medina J, Cámara MÁ. Science production of pesticide residues in honey research: A descriptive bibliometric study. Vol. 79, *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Elsevier B.V.; 2020.
3. Liebezeit G, Liebezeit E. Non-pollen particulates in honey and sugar. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2013;30(12):2136–40.
4. Mohr S, García-Bermejo Á, Herrero L, Gómara B, Costabeber IH, González MJ. Levels of brominated flame retardants (BFRs) in honey samples from different geographic regions. *Science of the Total Environment*. 2014 Feb 15;472:741–5.
5. EUROPEAN COMMISSION. Report from the Commission to the European Parliament and the council on the implementation of apiculture programmes on the implementation of apiculture programmes . Brussels; 2019 Dec.
6. Machado De-Melo AA, Almeida-Muradian LB de, Sancho MT, Pascual-Maté A. Composición y propiedades de la miel de *Apis mellifera*: una revisión. Vol. 57, *Journal of Apicultural Research*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 5–37.
7. Calatayud-Vernich P, Calatayud F, Simó E, Pascual Aguilar JA, Picó Y. A two-year monitoring of pesticide hazard in-hive: High honey bee mortality rates during insecticide poisoning episodes in apiaries located near agricultural settings. *Chemosphere*. 2019 Oct 1;232:471–80.
8. Pohorecka K, Szczesna T, Witek M, Miszczak A, Sikorski P. The exposure of honey bees to pesticide residues in the hive environment with regard to winter colony losses. *J Apic Sci*. 2017 Jun 1;61(1):105–25.
9. Kasiotis KM, Anagnostopoulos C, Anastasiadou P, Machera K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of the Total Environment*. 2014 Jul 1;485–486(1):633–42.
10. Montenegro G, Mejías E. Biological applications of honeys produced by *Apis mellifera*. Vol. 46, *Biol Res*. 2013.

11. Cucu AA, Baci GM, Moise AR, Dezsi Ş, Marc BD, Stângaciu Ş, et al. Towards a better understanding of nutritional and therapeutic effects of honey and their applications in apitherapy. Vol. 11, Applied Sciences (Switzerland). MDPI AG; 2021.
12. Al-Awadhi MA, Deshmukh RR. A Review on Automatic Classification of Honey Botanical Origins using Machine Learning. In: International Conference of Modern Trends in ICT Industry: Towards the Excellence in the ICT Industries, MTICTI 2021. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.; 2021.
13. Souza Tette PA, Guidi LR, de Abreu Glória MB, Fernandes C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. Vol. 149, Talanta. Elsevier B.V.; 2016. p. 124–41.
14. Rana S, Mishra M, Yadav D, Subramani SK, Katare C, Prasad G. Medicinal uses of honey: A review on its benefits to human health. Vol. 20, Progress in Nutrition. Mattioli 1885; 2018. p. 5–14.
15. Hossain ML, Lim LY, Hammer K, Hettiarachchi D, Locher C. A Review of Commonly Used Methodologies for Assessing the Antibacterial Activity of Honey and Honey Products. Vol. 11, Antibiotics. MDPI; 2022.
16. Ajibola A, Chamunorwa JP, Erlwanger KH. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. Vol. 9, Nutrition and Metabolism. 2012.
17. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: A review. J Am Coll Nutr. 2008;27(6).
18. Galanis A, Vardakas P, Reczko M, Harokopos V, Hatzis P, Skoulakis EMC, et al. Bee foraging preferences, microbiota and pathogens revealed by direct shotgun metagenomics of honey. Mol Ecol Resour. 2022 Oct 1;
19. Ilyasov RA, Lee M Iyeol, Takahashi J ichi, Kwon HW, Nikolenko AG. A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera*. Vol. 27, Saudi Journal of Biological Sciences. Elsevier B.V.; 2020. p. 3615–21.
20. Scopece G, Cozzolino S, Johnson SD, Schiestl FP. Pollination efficiency and the evolution of specialized deceptive pollination systems. American Naturalist. 2010 Jan;175(1):98–105.
21. Chiesa LM, Labella GF, Giorgi A, Panseri S, Pavlovic R, Bonacci S, et al. The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution. Chemosphere. 2016 Jul 1;154:482–90.

22. Bargańska Z, Ćlebioda M, Namieśnik J. Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. Vol. 46, Critical Reviews in Environmental Science and Technology. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 235–48.
23. Terziev V, Petkova Georgieva S. HUMAN HEALTH PROBLEMS AND CLASSIFICATION OF THE MOST TOXIC PESTICIDES. IJASOS– International E-journal of Advances in Social Sciences. 2019 Dec 20;5(15):1349–56.
24. Kim YA, Park JB, Woo MS, Lee SY, Kim HY, Yoo YH. Persistent organic pollutant-mediated insulin resistance. Vol. 16, International Journal of Environmental Research and Public Health. MDPI AG; 2019.
25. Magulova K, Priceputu A. Global monitoring plan for persistent organic pollutants (POPs) under the Stockholm Convention: Triggering, streamlining and catalyzing global POPs monitoring. Environmental Pollution. 2016 Oct 1;217:82–4.
26. Kazazic M, Djapo-Lavic M, Mehic E, Jesenkovic-Habul L. Monitoring of honey contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons in Herzegovina region. Chemistry and Ecology. 2020 Sep 13;36(8):726–32.
27. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food – Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA Journal. 2008 Aug 1;6(8).
28. Solayman M, Islam MA, Paul S, Ali Y, Khalil MI, Alam N, et al. Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2016 Jan 1;15(1):219–33.
29. Diaz-Basantes MF, Conesa JA, Fullana A. Microplastics in honey, beer, milk and refreshments in Ecuador as emerging contaminants. Sustainability (Switzerland). 2020 Jul 1;12(12).
30. Pironti C, Ricciardi M, Motta O, Miele Y, Proto A, Montano L. Microplastics in the environment: Intake through the food web, human exposure and toxicological effects. Vol. 9, Toxics. MDPI; 2021.
31. Naggar Y al, Brinkmann M, Sayes CM, Al-Kahtani SN, Dar SA, El-Seedi HR, et al. Are honey bees at risk from microplastics? Toxics. 2021 May 1;9(5).
32. Prata JC, da Costa JP, Lopes I, Duarte AC, Rocha-Santos T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. Vol. 702, Science of the Total Environment. Elsevier B.V.; 2020.

33. Rodríguez-Gonzalo E, Domínguez-Álvarez J, García-Gómez D, García-Jiménez MG, Carabias-Martínez R. Determination of endocrine disruptors in honey by CZE-MS using restricted access materials for matrix cleanup. *Electrophoresis*. 2010 Jul;31(13):2279–88.
34. Balayiannis G, Balayiannis P. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2008 Oct;55(3):462–70.
35. Gawel M, Kiljanek T, Niewiadowska A, Semeniuk S, Goliszek M, Burek O, et al. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 2019 Jun 1;282:36–47.
36. Pirard C, Widart J, Nguyen BK, Deleuze C, Heudt L, Haubruge E, et al. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007;1152(1–2).
37. Bang Ye S, Huang Y, Lin DY. QuEChERS sample pre-processing with UPLC-MS/MS: A method for detecting 19 quinolone-based veterinary drugs in goat's milk. *Food Chem*. 2022;373.
38. Xiao J, He Q, Liu Q, Wang Z, Yin F, Chai Y, et al. Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment. *Science of the Total Environment*. 2022 Jan 20;805.
39. Perestrelo R, Silva P, Porto-Figueira P, Pereira JAM, Silva C, Medina S, et al. QuEChERS – Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. Vol. 1070, *Analytica Chimica Acta*. 2019.
40. Anthemidis AN, Ioannou KIG. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review. Vol. 80, *Talanta*. 2009.
41. Shendy AH, Al-Ghobashy MA, Mohammed MN, Gad Alla SA, Lotfy HM. Simultaneous determination of 200 pesticide residues in honey using gas chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with streamlined quantification approach. *J Chromatogr A*. 2016;1427.
42. ben Mukiibi S, Nyanzi SA, Kwetegyeka J, Olisah C, Taiwo AM, Mubiru E, et al. Organochlorine pesticide residues in Uganda's honey as a bioindicator of environmental

- contamination and reproductive health implications to consumers. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;214.
43. Mrzlikar M, Heath D, Heath E, Markelj J, Kandolf Borovšak A, Prosen H. Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC–MS/MS. *LWT.* 2019;104.
 44. Malhat FM, Haggag MN, Loutfy NM, Osman MAM, Ahmed MT. Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. *Chemosphere.* 2015;120.
 45. Wiest L, Buleté A, Giroud B, Fratta C, Amic S, Lambert O, et al. Multi-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. *J Chromatogr A.* 2011;1218(34).
 46. Bargańska Z, Ślebioda M, Namieśnik J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food Control.* 2013;31(1).
 47. Tomasini D, Sampaio MRF, Caldas SS, Buffon JG, Duarte FA, Primel EG. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2012;99.
 48. Herrera A, Pérez–Arquillué C, Conchello P, Bayarri S, Lázaro R, Yagüe C, et al. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Anal Bioanal Chem.* 2005 Feb;381(3):695–701.
 49. Al-Alam J, Fajloun Z, Chbani A, Millet M. Determination of 16 PAHs and 22 PCBs in honey samples originated from different region of Lebanon and used as environmental biomonitors sentinel. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2019 Jan 2;54(1):9–15.
 50. Pihlström T, Fernández-Alba AR, Ferrer Amate C, Erecius Poulsen M, Lippold R, Carrasco Cabrera L, et al. ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED SANTE 11312/2021.
 51. European Commission. Commission Regulation (EC) No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as

- regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union. 2008;1–216.
52. European Commission. Commission Regulation (EC) No 149/2008 of 29 January 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union. 2008;3–400.
 53. European Commission. 2014/118/EU: Commission Recommendation of 3 March 2014 on the monitoring of traces of brominated flame retardants in food Text with EEA relevance. Official Journal of the European Union. 2014;39–40.
 54. Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. In.
 55. SANTE/11956/2016. Technical guidelines for determining the magnitude of pesticide residues in honey and setting Maximum Residue Levels in honey. 2020.
 56. Herrera A, Pérez-Arquillué C, Conchello P, Bayarri S, Lázaro R, Yagüe C, et al. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Anal Bioanal Chem.* 2005 Feb;381(3):695–701.
 57. Villalba A, Maggi M, Ondarza PM, Szawarski N, Miglioranza KSB. Influence of land use on chlorpyrifos and persistent organic pollutant levels in honey bees, bee bread and honey: Beehive exposure assessment. *Science of the Total Environment.* 2020 Apr 15;713.
 58. Wang J, Kliks MM, Jun S, Li QX. Residues of polybrominated diphenyl ethers in honeys from different geographic regions. *J Agric Food Chem.* 2010 Mar 24;58(6):3495–501.
 59. Rissato SR, Galhiane MS, de Almeida M v., Gerenutti M, Apon BM. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chem.* 2007;101(4):1719–26.
 60. de Pinho GP, Neves AA, de Queiroz MELR, Silvério FO. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control.* 2010 Oct;21(10):1307–11.

ANEXOS

Tabela 23- Evidência científica de principais pesticidas, técnicas de extração e análise, e parâmetros de validação, encontrados nos últimos 10 anos.

Compounds	Extraction methodology	Analysis	Recoveries(%)	LOD/LOQ	Referências
207 pesticides	QuEChERS: Acetate buffer / Cleanup: Z-Sep / PSA	LC-MS/MS and GC-MS/MS	Majority of compounds (98%)= 70 to 120% Remaining compounds <70%	LOD: doesn't exist LOQ: 0.001 mg/kg (45% compounds) 0.005 mg/kg (41% compounds) 0.01 mg/kg (14% compounds)	Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.003
Triazole pesticides (pentanazole, hexaconazole, diniconazole, tebuconazole, and difenoconazole)	Elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction	Gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection	Range of 97–100%	LOD: 0.05–0.21 ng g ⁻¹ LOQ: 0.15–1.1 ng g ⁻¹	Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey chromatography-nitrogen phosphorus detection https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461001
15 Organochlorine pesticides	Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) protocol Acetonitrile (dispenser) and Chloroform (extraction solvent)	Gas Chromatography Electron Capture (GC-ECD) or Ion Trap mass spectrometry (GC-IT/MS)	Mean recoveries were ranged from 75% to 119%	LOD: range of 0.02–0.15 µg L ⁻¹ (0.4–3 ng g ⁻¹) for GC-ECD and 0.01–0.2 µg L ⁻¹ (0.2–4 ng g ⁻¹) for GC-IT/MS LOQ: range of 0.07–0.50 µg L ⁻¹ (1.4–10 ng g ⁻¹) for GC-ECD and 0.04–0.65 µg L ⁻¹ (0.8–13 ng g ⁻¹) for GC-IT/MS	Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticide in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.03.073
200 Pesticide residues	QuEChERS method: liquid-liquid partitioning with acetone/nitrite followed by a cleanup step via dispersive solid phase extraction (d-SPE) using primary secondary amine (PSA) separation by ultra-inert capillary column (DB-35MS)	GC-MS/MS	99.3% compounds had mean percentage recovery of 60.00–140.00%	LOD: 1.00 to 3.00 ng mL ⁻¹ LOQ: 5.00 to 10.00 µg kg ⁻¹	Simultaneous determination of 200 pesticide residues in honey using gas chromatography mass spectrometry in conjunction with streamlined quantification approach https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.068
9 OCP (organochlorine pesticide) residues	QuEChERS method	Gas Chromatograph coupled to an Electron Capture Detector (GC-ECD)	(73–90%) and (78–99%) for the soil and honey samples respectively; 0.50 µg/kg (64–85%) and (73–95%) for the soil and honey samples respectively; 0.25 µg/kg	LOD: 0.05–0.20 µg/kg LOQ: doesn't exist	Organochlorine pesticide residues in Uganda's honey as a bioindicator of environmental contamination and reproductive health implications to consumers https://doi.org/10.1016/j.jecenv.2021.112094
63 pesticides	Liquid-liquid extraction (conventional method)	GC-MS	not described	not described	Analysis of sugar composition and pesticides using HPLC and GC-MS techniques in honey collected from Saudi Arabian markets https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004
64 pesticides	QuEChERS multi-residue method	GC-MS UPLC-MS/MS (for optimization)	68.4% and 121.3% for the GC-MS	LOD: 0.20 to 1.02 µg/kg LOQ: 0.60 to 3.40 µg/kg	Analysis of honey/bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150292

7 pesticides	green dispersive liquid-liquid microextraction using a new high density deep eutectic solvent	gas chromatography-flame ionization detection	range of 56-86%	LOD: 0.32–1.2 ng g ⁻¹ LOQ: 1.1–4.0 ng g ⁻¹	Synthesis of a green high density deep eutectic solvent and its application in microextraction of seven widely used pesticides from honey https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.051
116 pesticides	Modified QuEChERS [Extraction solvent - acetonitrile:ethyl acetate 70:30 with 1% acetic acid (v/v) / Extraction salts - magnesium sulfate and sodium acetate/ Clean up - magnesium sulfate, Florisil and PSA]	UHPLC-MS/MS	between 70 and 120%	LOD: 0.005 mg/kg LOQ: 0.010 and 0.025 mg/kg	Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.036
Thiamethoxam and Thiadiprid	New selective and sensitive dual-template molecularly imprinted polymer nanoparticles (MIPs) - for simultaneous extraction and clean-up	UHPLC-MS/MS	96.8 to 106.5% - thiamethoxam 95.3 to 104.4% - thiadiprid	LOD: 0.045 to 0.070 µg kg ⁻¹ LOQ: 0.07 to 0.10 µg kg ⁻¹	Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for the extraction and clean-up of thiamethoxam and thiadiprid in light and dark honey https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129936
Three kinds of organophosphorus insecticides and Two kinds of carbamate insecticides	Doesn't exist sample preparation - new method	Neutral Desorption-extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ND-EESI-MS)	between 87.00% and 114.98%	LOD: 1.16 to 4.18 ng/g LOQ: doesn't exist	Direct detection of multiple pesticides in honey by neutral desorption-extractive electrospray ionization mass spectrometry https://doi.org/10.1016/j.jms.2017.09.005
Carbaryl	1/200 dilution in PBS only	HFF-QCM (High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance) sensors	between 110 and 120%	LOD: 0.035 µg/L LOQ: 0.083 µg/L	High Fundamental Frequency Quartz Crystal Microbalance (HFF-QCM) immunosensor for pesticide detection in honey https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.026
Neonicotinoids	QuEChERS extraction	LC-MS/MS	92.2–100.0%	LOD: 0.06–0.85 ng/g LOQ: 0.19–2.84 ng/g	Investigation of neonicotinoid pesticides in Slovenian honey by LC-MS/MS https://doi.org/10.1016/j.jwt.2019.01.017
Organophosphorus, sulfite ester, benzoate, bridged di-phenyl, pyrethroid (7 pesticides)	SPWE	GC-MS	81–125 %	LOD: 0.1–2.0 mg/L LOQ: 0.5–10 mg/L	Electrospun nanostructured polystyrene as a new coating material for solid-phase microextraction: Application to separation of multipesticides from honey samples http://dx.doi.org/10.1016/j.chromb.2015.07.061

Organochlorines, pyrethroids (18 pesticides)	QueChERS Clean up: dSPE	GC- μ ECD	85–115 %	LOD: 0.5–30 μ g/kg LOQ: 2–60 μ g/kg	Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.032
Organochlorines, chlorinated hydrocarbon, organophosphorus, triazole, phthalimide, pyrimidinol, quinaline, phenylpyridine, strobilurin, dicarboximide, carboxamide, anthranilic diamide, tetrone acid (28 pesticides)	LLE Clean up: SPE	GC-MS/MS	75–102 %	LOD: 0.75–1.4 μ g/kg LOQ: 2.25–4.44 μ g/kg	Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.024
Organochlorines (8 pesticides)	MSPE Clean up solvent: Magnetic cobalt ferrite filled carbon nanotubes (MFCNTs)	GC-ECD	83–128 %	LOD: 0.0013–0.0036 (mg/L) LOQ: doesn't exist	Novel Magnetic SPE method based on carbon nanotubes filled with cobalt ferrite for the analysis of organochlorine pesticides in honey and tea https://doi.org/10.1002/jssc.201300710
Organochlorines, organophosphorus, carbamates, pyrethroids, dicarboximide, bridged diphenyl and others unclassified (22 pesticides)	LLE Clean up: MEPS	GC-MS	82–114 %	LOD: doesn't exist LOQ: 10 μ g/kg	Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry https://doi.org/10.1093/chromsci/bms187
Organotin (7 pesticides)	HS-SPME	GC-AED and GC-MS	77–101 %	LOD (GC-AED): 0.002–0.022 μ g/kg and LOD (GC-MS): 0.0003–0.0043 μ g/kg LOQ: doesn't exist	Solid-phase microextraction followed by gas chromatography for the speciation of organotin compounds in honey and wine samples: A comparison of atomic emission and mass spectrometry detectors https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.08.001
Organochlorines (11 pesticides)	DLLME	GC-MS	35–83 %	LOD: 0.1–4 μ g/kg LOQ: 0.3–13.2 μ g/kg	Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of selected organochlorine pesticides in honey by gas chromatography-mass spectrometry doi:10.1007/s00217-011-1635-1
Organochlorines, amide, organophosphorus, pyrethroids, triazoles, pyrimidines, dicarboximide, synergist, insect growth regulator (80 pesticides)	QueChERS Clean up: dSPE	GC-TOF	23–136 %	LOD: 0.1–23.9 μ g/kg LOQ: 3.0–65.8 μ g/kg	Multi-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 doi:10.1016/j.chroma.2011.06.079

Chlorophenols (6 pesticides)	IL-DLLME	HP/LC-UV	91–114 %	LOD: 0.8–3.2 mg/L LOQ: doesn't exist	Determination of chlorophenols in honey samples using in-situ ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.050
Neonicotinoids (7 pesticides)	DLLME	HP/LC-UV	73–118 %	LOD: 1.5–2.5 µg/kg LOQ: 5.0–10.0 µg/kg	Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.021
Neonicotinoids (7 pesticides)	IS-DLLME	HP/LC-UV	96–107 %	LOD: 0.25–0.50 mg/L LOQ: 0.80–2.00 mg/L	In-coupled syringe assisted octadecyl-water partition microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of neonicotinoid insecticides residues in honey http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.033
Neonicotinoids, dinitroanilines, triazoles, organophosphorus, carbamates, dicarboximides (115 pesticides)	QueChERS Clean up: dSPE	LC-MS/MS	59–117 %	LOD: 0.03–23.3 µg/kg LOQ: 0.1–78 µg/kg	Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.042
30 pesticides	SLE and QueChERS Clean up: dSPE SLE: SPE	LC-ESI-MS/MS	SLE: 36–96 % and QueChERS: 36–86 %	LOD QueChERS: 0.33–7.37 µg/kg and LOD SLE: 0.35–7.09 µg/kg LOQ QueChERS: 1.10–23.65 µg/kg and LOQ SLE: 1.17–22.75 µg/kg	Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS: Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.024
30 pesticides	QueChERS Clean up: dSPE	LC-ESI-MS/MS	80–109 %	LOD: 0.91–25 µg/kg LOQ: 2.73–75 µg/kg	Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.049
Neonicotinoids (7 pesticides)	DLLME	LC-MS/MS	74–113 %	LOD: 0.5–1.0 µg/kg LOQ: 1.5–2.5 µg/kg	Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey using optimized dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.059
Pyrethroids (4 pesticides)	IL-DLLME Clean up: D-µ-SPE	HP/LC-UV	86–98 %	LOD: 0.03–0.05 mg/L LOQ: 0.10–0.18 mg/L	Ionic liquid-linked dual magnetic microextraction: A novel and facile procedure for the determination of pyrethroids in honey samples https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.056
Organophosphorus, organochlorines, carbamates, pyrethroids, biopesticides, ureas, neonicotinoids, triazines, triazoles (350 pesticides)	LLE	UHPLC-Orbitrap-MS	66–102 %	LOD: 25–50 µg/kg LOQ: doesn't exist	Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.088
Amidine, benzimidazole, organophosphorus, phenylpyrazole, pyrethroid, neonicotinoid, triazole (8 pesticides)	QueChERS Clean up: dSPE	LC-APCI-MS/MS	70–112 %	LOD: 1.6–330 µg/kg LOQ: 5–1000 µg/kg	Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QueChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.068