UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos

Fernanda Scavassa Ribeiro do Prado

Análise cromatográfica da abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido de abelhas da espécie *Melipona scutellaris* e avaliação de efeitos de biomarcadores bioquímicos

São Carlos
2020

FERNANDA SCAVASSA RIBEIRO DO PRADO

Análise cromatográfica da abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido de abelhas da espécie *Melipona scutellaris* e avaliação de efeitos de biomarcadores bioquímicos

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutora em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

Exemplar revisado

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

São Carlos

2020

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

Assinatura: *Fernanda S. R. do Prado*
Data: *12/02/2020*

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

Prado, Fernanda Scavassa Ribeiro do

Análise cromatográfica da abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido da abelha da espécie *Melipona scutellaris* e avaliação de efeitos de biomarcadores bioquímicos. / Fernanda Scavassa Ribeiro do Prado. — São Carlos, 2020.

126 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2020.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

1. Abelha sem ferrão. 2. Agrotóxicos. 3. Cromatografia. 4. Biomarcadores bioquímicos. I. Título.

Dedico este trabalho ao meu pai José Luiz,
à minha mãe Maria Cristina e ao meu marido
Dyovani, por sempre estarem ao meu lado
em todos os momentos. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por iluminar o meu caminho e ter me dado forças para chegar até aqui.

Aos meus pais José Luiz e Maria Cristina e ao meu irmão André pelo apoio durante todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido Dyovani pelo apoio, incentivo e por ter me encorajado a não desistir.

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira pela orientação, confiança e por ter me acolhido mesmo sabendo do pouco tempo que eu teria para conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Fernanda Canduri e suas alunas por toda a ajuda para a confecção dos géis e pelas discussões.

À técnica Dra. Bianca Ferreira da Silva pelas análises cromatográficas, pelas sugestões e pela paciência.

À Dra. Janete Castele Brigante pela ajuda nos testes de exposição, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por cuidar tão bem das nossas abelhas.

À Dra. Priscila Leocadia Rosa Dourado e à Dra. Juliane Silberschmidt Freitas pela ajuda nos experimentos dos biomarcadores bioquímicos.

À Profa. Dra. Márcia Nitschke por ter disponibilizado o leitor de microplacas.

Aos técnicos João Pedro de Freitas Lima e Marília Cardoso Milanetto pela ajuda no uso do leitor de microplacas.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bessa por sempre disponibilizar seu laboratório para uso.

À Dra. Dayana Moscardi dos Santos pela ajuda nos experimentos dos biomarcadores bioquímicos e pela ajuda na finalização deste trabalho.

Aos membros e ex-membros do LAQUAAE, em especial a Thiessa e ao Augusto pela ajuda e momentos de descontração.

À Dra. Bárbara Kolstok por ter cuidado da minha saúde e ter me conduzido nessa fase da minha vida.

Às minhas amigas Marina, Carol, Regina, Daiane, Daniele, Aline, Hisae, Renata, Paula e Gisele pela amizade e pelos momentos divertidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

As abelhas são consideradas um importante agente para os serviços ecossistêmicos através do processo de polinização em culturas e plantas nativas, contribuindo expressivamente para a manutenção da biodiversidade. No entanto, a diminuição da população de abelhas em todo o mundo também está relacionada ao uso de agrotóxicos, afetando a saúde das abelhas e das colônias. Nesse sentido, estudos envolvendo a avaliação de efeitos adversos e a absorção dos agrotóxicos pelas abelhas são motivo de grande preocupação. Neste estudo foi desenvolvido um método analítico para a determinação do inseticida abamectina e do fungicida difenoconazol em tecidos da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* expostas via oral e tópica a três concentrações diferentes dos agrotóxicos. O método QuEChERS acetato modificado foi utilizado para o preparo das amostras, que na sequência foram analisadas por LC-MS/MS. Os parâmetros de validação do método desenvolvido incluíram: faixa linear entre 0,0100 a 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$; e LD e LQ de 0,038 e 0,076 $\mu\text{g g}^{-1}$ para a abamectina e o difenoconazol. O acúmulo da abamectina e do difenoconazol via oral e tópica foi verificado nas abelhas testadas, principalmente quando o produto comercial foi utilizado. A mortalidade das abelhas foi maior para a exposição oral do que para a exposição tópica para ambos os agrotóxicos. Também foram avaliadas as respostas bioquímicas ao estresse da exposição aos agrotóxicos. As atividades da superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), acetilcolinesterase (AChE) e os níveis de malondialdeído (MDA), dopamina e serotonina foram determinados nos tecidos das abelhas expostas aos agrotóxicos a fim de explorar as estratégias das abelhas para desintoxicação e tolerância. As respostas foram dependentes do tempo de exposição, da concentração dos agrotóxicos individuais e em mistura, bem como do uso de padrão de alta pureza ou produto comercial.

ABSTRACT

Bees are considered important agents for ecosystem services through polinization in native cultures and plants, contributing expressively for maintaining biodiversity. However, the worldwide decrease on bee population is also related to the use of pesticides, affecting both bees and colonies health. In this context, studies involving the evaluation of adverse effects and absorption of pesticides by bees are reasons for great concern. In this study an analytical method was developed for the determination of the insecticide abamectin and the fungicide difenoconazole on stingless bee *Melipona scutellaris* tissues exposed in both oral and topic paths to three different concentrations. The acetate modified QuEChERS method was used to prepare the samples, followed by LC-MS/MS analysis. The validation parameters of the developed method included: linear range between 0.0100 to 1.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$; and LOD and LOQ of 0.038 and 0.076 $\mu\text{g g}^{-1}$ for abamectin and difenoconazole. The accumulation of abamectin and difenoconazole in both oral and topic paths was verified in the tested bees, mainly when the commercial product was used. The mortality of bees was higher for exposure by oral paths than the topic one for both pesticides. It was also analyzed the biochemical responses to stress due to the exposure to pesticides. The activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE) and malondialdehyde (MDA), dopamine and serotonin levels were determined in bee tissues exposed to pesticides in order to explore bees' strategies for detoxification and tolerance. The responses were dependent on time exposure, pesticides concentration in both individual and mixed forms, as well as the use of high purity pattern or commercial product.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comercialização de agrotóxicos no Brasil e no mundo.....	10
Figura 2 – Monitoramento de perdas anuais de colônias nos Estados Unidos.....	13
Figura 3 – Comercialização de inseticidas no Brasil e no mundo.....	20
Figura 4 – (a) Aspecto geral das abelhas uruçu. (b) Potes de mel e de pólen dentro da colmeia.....	22
Figura 5 – Estrutura química da abamectina.....	23
Figura 6 – Estrutura química do difenoconazol.....	26
Figura 7 – Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS a) original; b) acetato e c) citrato.....	30
Figura 8 – Meliponário Experimental do CRHEA/EESC/USP.....	38
Figura 9 – Extensor plástico e recipiente de aprisionamento (gaiola) utilizados na captura das abelhas.....	39
Figura 10 – Gaiola contendo perfurações e eppendorf utilizado como alimentador emergencial.....	40
Figura 11 – Espectros de absorbância da abamectina e do difenoconazol em ACN.....	52
Figura 12 – Cromatogramas dos analitos em solvente (ACN) na concentração de 1,00 µg L ⁻¹ utilizando HPLC-DAD-UV em (a) 246 nm e (b) 230 nm. 1 – Difenoconazol, 2 – Abamectina.....	54
Figura 13 – Cromatogramas de íons extraídos dos analitos em solvente (ACN) na concentração de 1,00 µg L ⁻¹ utilizando LC-MS/MS. (a) Difenoconazol e (b) Abamectina (continua).....	59
Figura 14 – Cromatogramas de íons totais obtidos do extrato da matriz (branco) (a) e matriz fortificada (b) com 1,00 µg mL ⁻¹ de difenoconazol (Dif) e abamectina (Aba) utilizando LC-MS/MS.....	61
Figura 15 – Curvas analíticas na matriz fortificada obtidas para (a) difenoconazol e (b) abamectina.....	62
Figura 16 – Gráficos de resíduos da análise de regressão para o difenoconazol.....	64
Figura 17 – Gráficos de resíduos da análise de regressão para a abamectina.....	64
Figura 18 – Gráficos de mortalidade de abelhas versus tempo de leitura para (a) Abamectina – oral, (b) Abamectina – tópico, (c) Kraft – oral, (d) Kraft – tópico, (e) Score – oral, (f) Score – tópico, (g) Kraft + Score – oral e (h) Kraft + Score – tópico (continua).....	67
Figura 19 – Concentração da abamectina e do difenoconazol em tecidos de <i>M. scutellaris</i> (linha contínua) e dose total da exposição oral (linha tracejada) para Abamectina (A); Kraft (B); Score (C); Kraft + Score (D) nas amostras: NOEC (1); CL ₅₀ (2); e acima da CL ₅₀ (3); abelhas vivas (v); abelhas mortas (m).....	75
Figura 20 – Concentração da abamectina e do difenoconazol nos tecidos de <i>M. scutellaris</i> (linha contínua) e dose total da exposição tópica (linha tracejada) para Abamectina (A); Kraft (B); Score (C); Kraft + Score (D) nas amostras: NOEC (1); DL ₅₀ (2); e acima da DL ₅₀ (3); abelhas vivas (v); abelhas mortas (m).....	77
Figura 21 – Concentração da abamectina (presente no produto comercial Kraft) nos tecidos de <i>M. scutellaris</i> para exposição oral e tópica em amostras dos tratamentos 2 (CL ₅₀ e DL ₅₀) e 3 (acima da CL ₅₀ e DL ₅₀) por 48 e 72 h.....	78

Figura 22 – Análise eletroforética SDS-PAGE em gel das proteínas do extrato do tecido de abelha. 1 – C+; 2 – Aba_C-_72h_v; 3 – Aba_3_72h_m; 4 – Aba_3_72h_v; 5 – MMM; 6 – C+; 7 – K_C-_72h_v; 8 – K_3_48h_m; 9 – K_3_72h_m. Teste oral.....	82
Figura 23 – Análise eletroforética SDS-PAGE em gel das proteínas do extrato do tecido de abelha. 1 – C+; 2 – S_C-_72h_v; 3 – S_3_24h_m; 4 – S_3_48h_m; 5 – MMM; 6 – C+; 7 – KS_C-_72h_v; 8 – KS_3_24h_m; 9 – KS_3_48h_m. Teste oral.....	83
Figura 24 – Análise eletroforética SDS-PAGE em gel das proteínas do extrato do tecido de abelha. 1 – C+; 2 – Aba_C-_72h_v; 3 – Aba_3_72h_m; 4 – Aba_3_72h_v; 5 – MMM; 6 – C+; 7 – K_C-_72h_v; 8 – K_3_72h_m; 9 – K_3_72h_v. Teste tópico...	83
Figura 25 – Análise eletroforética SDS-PAGE em gel das proteínas do extrato do tecido de abelha. 1 – C+; 2 – S_C-_72h_v; 3 – S_3_72h_m; 4 – S_3_72h_v; 5 – MMM; 6 – C+; 7 – KS_C-_72h_v; 8 – KS_3_72h_m; 9 – KS_3_72h_v. Teste tópico.....	84
Figura 26 – Cromatograma do complexo MDA-TBA na concentração de 10,0 pmol mL ⁻¹ utilizando HPLC-DAD-UV em 532 nm.....	86
Figura 27 – Concentração do MDA em amostras de tecido de abelhas para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL ₅₀ e CL ₅₀ (2); e acima da DL ₅₀ e CL ₅₀ (3); abelhas vivas (v) (continua).....	87
Figura 28 – Atividade da GST em amostras de tecido de abelhas para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL ₅₀ e CL ₅₀ (2); e acima da DL ₅₀ e CL ₅₀ (3); abelhas vivas (v). * (p < 0,001 em relação ao controle).....	90
Figura 29 – Atividade da AChE em amostras de tecido de abelhas para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL ₅₀ e CL ₅₀ (2); e acima da DL ₅₀ e CL ₅₀ (3); abelhas vivas (v). * (p < 0,001 em relação ao controle).....	92
Figura 30 – Cromatograma de uma solução padrão de octopamina, dopamina e serotonina na concentração de 1,00 µg mL ⁻¹ utilizando HPLC-FD, λ _{ex} = 279 nm, λ _{em} = 320 nm. 1 – Octopamina, 2 – Dopamina e 3 – Serotonina.....	94
Figura 31 – Curvas analíticas em ácido perclórico 0,200 mol L ⁻¹ contendo cisteína 3,00 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ obtidas para (a) octopamina, (b) dopamina e (c) serotonina (continua).....	94
Figura 32 – Concentração média de dopamina e serotonina em extratos da cabeça de <i>M. scutellaris</i> para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL ₅₀ e CL ₅₀ (2); e acima da DL ₅₀ e CL ₅₀ (3); abelhas vivas (v); abelhas mortas (m) (continua).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Propriedades físicas e químicas da abamectina.....	24
Tabela 2 –	Toxicidade da abamectina para alguns seres vivos.....	25
Tabela 3 –	Propriedades físicas e químicas do difenoconazol.....	26
Tabela 4 –	Toxicidade do difenoconazol para alguns seres vivos.....	27
Tabela 5 –	Reagentes utilizados e sua procedência.....	36
Tabela 6 –	Transições dos íons precursores/produtos e parâmetros de ionização para LC-MS/MS.....	37
Tabela 7 –	Concentrações e endpoints utilizadas para os testes de exposição oral e tópica dos produtos individualmente. Valores obtidos de Brigante et al. (em preparação).....	44
Tabela 8 –	Concentrações para os testes de exposição oral e tópica para a mistura dos produtos. Valores obtidos de Brigante et al. (em preparação).....	45
Tabela 9 –	Gradientes de eluição testados.....	53
Tabela 10 –	Descrição dos métodos QuEChERS original testados para aproximadamente 0,14 g de abelha (correspondente a dois indivíduos) e a recuperação de cada método para cada analito estudado via HPLC-DAD-UV.....	56
Tabela 11 –	Descrição dos métodos QuEChERS citrato testados para aproximadamente 0,14 g de abelhas (correspondente a dois indivíduos) e a recuperação de cada método para cada analito estudado via HPLC-DAD-UV.....	57
Tabela 12 –	Descrição dos métodos QuEChERS acetato testados para aproximadamente 0,14 g de abelha (correspondente a 2 indivíduos) e a recuperação de cada método para cada analito estudado via HPLC-DAD-UV.....	58
Tabela 13 –	Parâmetros analíticos obtidos da análise das curvas analíticas na matriz fortificada para o difenoconazol e para a abamectina.....	63
Tabela 14 –	Resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95 % de confiança.....	63
Tabela 15 –	Valores de precisão intradia e interdias e exatidão para três níveis de fortificação.....	65
Tabela 16 –	Consumo de alimento para os testes de toxicidade aguda oral.....	69
Tabela 17 –	Principais enzimas analisadas durante o estudo bioquímico e suas respectivas massas.....	82
Tabela 18 –	Parâmetros analíticos obtidos da análise da curva analítica para os neurotransmissores.....	96

LISTA DE SIGLAS

Aba	Abamectina
AChE	Acetilcolinesterase (Acetylcholinesterase)
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio (Biochemical Oxygen Demand)
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CE	Energia de colisão (Collision energy)
CEN	Comité Européen de Normalisation
CEP	Potencial de entrada da cela de colisão (Collision cell entrance potential)
CL ₅₀	Concentração Letal Média
CXP	Potencial de saída da cela de colisão (Collision cell exit potential)
DCC	Distúrbio do colapso da colônia (Colony Collapse Disorder)
Dif	Difenoconazol
DL ₅₀	Dose Letal Média
DP	Potencial de orifício (Declustering potential)
d-SPE	Extração em Fase Sólida Dispersiva (Dispersive Solid-Phase Extraction)
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
EM	Efeito Matriz
EP	Potencial de entrada (Entrance potential)
EPE	Eficiência do Processo de Extração
ESI	Ionização por Electrospray (Electrospray Ionization)
FD	Detector de fluorescência (Fluorescence Detector)
GABA	Ácido gama aminobutírico (Gamma-Aminobutyric Acid)
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (Gas Chromatography with Mass Spectrometry)
GPx	Glutathione Peroxidase

GSH	Glutathione
GST	Glutathione S-Transferase
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Arranjos de Diodos (High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection)
i. a.	Ingrediente ativo
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em “tandem” (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malondialdeído
NOEC	Concentração Sem Efeitos Observáveis (No Observed Effect Concentration)
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Co-operation and Development)
p. c.	Produto comercial
PPDB	Pesticide Properties DataBase
PSA	Amina Primária e Secundária (Primary Secondary Amine)
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
r^2	Coeficiente de correlação
RE	Recuperação
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)
RSD	Desvio Padrão Relativo (Relative Standard Deviation)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SOD	Superoxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
UV/VIS	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. USO DE AGROTÓXICOS E DIMINUIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ABELHAS	10
1.2. IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS COMO POLINIZADORES.....	11
1.3. O DECLÍNIO DO NÚMERO DE ABELHAS	12
1.4. AGENTES CAUSADORES DA EXTINÇÃO DE ABELHAS	14
1.4.1. <i>Fungos e doenças</i>	15
1.4.2. <i>Distúrbio do colapso das colônias (DCC)</i>	16
1.4.3. <i>Alterações climáticas e perda de habitat</i>	17
1.4.4. <i>Agrotóxicos</i>	18
1.5. <i>MELIPONA SCUTELLARIS</i> OU URUÇU	21
1.6. AGROTÓXICOS ESTUDADOS	23
1.6.1. <i>Abamectina</i>	23
1.6.2. <i>Difenoconazol</i>	25
1.7. DETERMINAÇÃO DA ABAMECTINA E DO DIFENOCONAZOL EM TECIDOS DE ABELHAS ...	28
1.7.1. <i>QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)</i>	28
1.8. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	31
1.8.1. <i>Neurotransmissores</i>	33
2. OBJETIVO GERAL.....	34
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES	35
3.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS E CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS	36
3.3. MATERIAIS BIOLÓGICOS	38
3.4. EXTRAÇÃO DOS AGROTÓXICOS PELO MÉTODO QUECHERS	40
3.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	41
3.5.1. <i>Seletividade</i>	41
3.5.2. <i>Linearidade</i>	41
3.5.3. <i>Limite de detecção e de quantificação do método</i>	42
3.5.4. <i>Precisão e exatidão</i>	42
3.5.5. <i>Efeito matriz e recuperação</i>	43
3.6. BIOENSAIOS DE TOXICIDADE	43
3.6.1. <i>Bioensaios de toxicidade aguda oral</i>	45
3.6.2. <i>Bioensaios de toxicidade aguda tópica</i>	45
3.7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	46
3.7.1. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	46
3.7.2. <i>Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA)</i>	47
3.7.3. <i>Determinação da atividade enzimática da GST</i>	48
3.7.4. <i>Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase</i>	48
3.7.5. <i>Análise das proteínas totais</i>	49
3.7.6. <i>Análise estatística</i>	49

3.8. NEUROTRANSMISSORES	49
3.8.1.1. Padrões e soluções	49
3.8.1.2. Preparo das amostras e análise dos neurotransmissores	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	51
4.1.1. <i>Condições cromatográficas do HPLC-DAD-UV</i>	51
4.2. SELEÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO QUECHERS	55
4.3. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA O LC-MS/MS	59
4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	60
4.4.1. <i>Seletividade</i>	60
4.4.2. <i>Linearidade</i>	62
4.4.3. <i>Limite de detecção e de quantificação do método</i>	65
4.4.4. <i>Precisão e exatidão</i>	65
4.4.5. <i>Efeito matriz</i>	66
4.5. BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA ORAL E TÓPICO	66
4.6. DETERMINAÇÃO DA ABAMECTINA E DO DIFENOCONAZOL EM AMOSTRAS DE TECIDO DE ABELHAS	74
4.7. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	80
4.7.1. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	81
4.7.2. <i>Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica</i>	86
4.7.3. <i>Determinação da atividade enzimática da GST</i>	89
4.7.4. <i>Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase</i>	91
4.7.5. <i>Neurotransmissores</i>	93
5. CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS.....	107

1. INTRODUÇÃO

O declínio das populações de abelhas é considerado um problema a nível global e investigações devem ser conduzidas de modo a compreender os seus mecanismos.

A utilização de agrotóxicos na agricultura é eminente no Brasil e quando usados de forma inadequada, resíduos desses compostos podem persistir nos alimentos, podendo ser fonte de exposição humana a produtos tóxicos e ainda contaminar abelhas que percorrem quilômetros em busca de alimentos como água, néctar e pólen. Neste trajeto percorrido pelas abelhas, micro-organismos, partículas suspensas no ar e produtos químicos como agrotóxicos podem ser interceptados por estes polinizadores, podendo ficar retidos nos pelos superficiais do seu corpo e/ou inalados e retidos no seu aparelho respiratório. Se essas partículas forem levadas pelas abelhas para a colmeia, elas podem contribuir para a extinção da colônia ou desencadear o fenômeno conhecido como Distúrbio do Colapso da Colônia (DCC, do inglês Colony Collapse Disorder). A extinção de colmeias causa prejuízos para as plantas nativas e também para a produção agrícola em geral que dependem da polinização desses insetos.

Estudos envolvendo a exposição da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* à agrotóxicos são escassos em comparação com a abelha mais conhecida *Apis mellifera*. No entanto, um estudo toxicológico desenvolvido com *M. scutellaris* mostrou que essa abelha é mais sensível ao fipronil do que a espécie *A. mellifera*. (1)

Os agrotóxicos abamectina e difenoconazol são muito utilizados na agricultura no Brasil, principalmente em culturas de frutas, tais como o morango, tomate, mamão, entre outros (2) e poucos estudos foram feitos para verificar os efeitos desses agrotóxicos em abelhas, portanto, é importante compreender as respostas de abelhas nativas brasileiras em relação a esses agrotóxicos.

Sendo assim, esse estudo é de fundamental importância visto que os dados gerados neste estudo poderão ser utilizados para a discussão sobre a avaliação dos riscos ambientais dos agrotóxicos sobre as abelhas nativas do Brasil.

1.1. Uso de agrotóxicos e diminuição da população de abelhas

O uso de agrotóxicos no processo de produção agrícola é responsável pela movimentação de bilhões de dólares em todo o mundo. (3)

No ano de 2016, o Brasil se posicionava em terceiro lugar no ranking mundial dos países comercializadores de agrotóxicos, tendo consumido ou vendido ao setor agrícola 377.176 toneladas de agrotóxicos. No mesmo ano, cerca de 5.860.537 toneladas de agrotóxicos foram comercializadas no mundo. (4) A Figura 1 apresenta o consumo de agrotóxicos no período de 2011 a 2016 no Brasil e no mundo.

Figura 1 – Comercialização de agrotóxicos no Brasil e no mundo.

Fonte: Ref. (4)

A utilização de agrotóxicos por um lado é vista como benéfica devido sua ação no controle de pragas, em contrapartida, é vista como causadora da contaminação do solo, água, alimentos e insetos, entre outros, uma vez que esses compostos apresentam permanência no meio ambiente e tendência de bioacumulação. (5)

Nos últimos anos, devido ao declínio global da população de abelhas, principalmente as do gênero *Apis*, a saúde das abelhas tornou-se uma questão de interesse público. Desde 2003, na América do Norte e na Europa, ocorre o fenômeno de DCC. Dados europeus revelaram que as taxas de mortalidade anual por colônia

relatadas entre 2012 e 2014 chegaram a 36 %. Dados dos Estados Unidos mostraram que as perdas anuais de colônias relatadas pelos apicultores chegaram a 45 %. (6)

O mecanismo de DCC continua desconhecido, mas há um consenso entre cientistas de que existem vários fatores que podem ocasionar perdas de colônias. Os pesquisadores devem disseminar o conhecimento do papel dos agrotóxicos, como um dos fatores principais que afetam a saúde das abelhas, pelo desenvolvimento de novos métodos mais sensíveis e confiáveis, para detectar níveis muito baixos de concentração. A presença de agrotóxicos e a interação entre diferentes compostos em amostras ambientais podem prejudicar os sistemas de defesa das abelhas que permitem que parasitas ou vírus causem a extinção da colônia. (6)

1.2. Importância das abelhas como polinizadores

Os polinizadores desempenham um importante papel funcional na maioria dos ecossistemas terrestres e representam um importante serviço ambiental que é essencial para a manutenção das comunidades de plantas silvestres e da produtividade agrícola. (7)

As abelhas são os agentes polinizadores mais importantes e são responsáveis pela polinização de aproximadamente 73 % das espécies vegetais cultivadas no mundo, ao passo que as moscas são responsáveis por 19 %, os morcegos por 6,5 %, as vespas por 5 %, os besouros por 5 %, os pássaros por 4 % e as borboletas e mariposas por 4 %. (8)

A ausência de polinizadores pode ser relacionada à segurança alimentar do mundo todo, pois a produção agrícola torna-se comprometida. A polinização por insetos, principalmente por abelhas, é necessária para 75 % de todas as culturas que são usadas diretamente para alimentação humana. Embora muitas das culturas de maior volume (por exemplo, arroz, trigo e milho) sejam polinizadas pelo vento, uma grande proporção de culturas de frutas (por exemplo, maçã e melão) são potencialmente vulneráveis a declínios nos estoques de apicultura e polinizadores silvestres. (9), (7) Mesmo em culturas que não dependem totalmente de polinizadores, como o café, as abelhas podem ajudar no aumento da produtividade e na melhoria da qualidade dos frutos. (10)

Quando não há insetos suficientes na natureza para realizar a polinização nos cultivos agrícolas, abelhas *Apis mellifera* e *Bombus* são adquiridas ou alugadas por agricultores em muitos países para suplementar a fauna polinizadora local. No entanto, este artifício tem um custo para o agricultor, ao passo que os polinizadores realizam este serviço gratuitamente. (10), (11)

O valor da produção mundial de culturas utilizadas para alimentação humana em 2005 foi de 1.618 trilhões de euros e o valor econômico da polinização por insetos para a agricultura mundial totalizou 153 bilhões de euros, o que representou cerca de 9,5 % do valor da produção agrícola mundial usada para a alimentação humana. Legumes e frutas foram as principais categorias de culturas polinizadas por insetos, com cerca de 50 bilhões de euros cada, seguidas de culturas para a produção de óleos comestíveis, estimulantes, nozes e especiarias. (11)

Atualmente, um declínio generalizado de colmeias em vários locais do mundo está acontecendo. As culturas que necessitam de polinização estão crescendo significativamente mais lentas do que as culturas que não necessitam de polinização, o que sugere que o declínio da população de insetos polinizadores é um fator limitante na produtividade agrícola. (12)

A redução do número de abelhas exóticas *Apis mellifera* em grande proporção no Brasil ocorreu concomitantemente com a expansão da cultura de cana de açúcar e o consequente aumento do uso de agrotóxicos, além da perda de vegetação natural para o desenvolvimento urbano e aumento das áreas de cultivo e dos elevados níveis de doenças, principalmente nos estados do Sul. (13), (14), (15)

1.3. O declínio do número de abelhas

A redução do número de abelhas não é um fenômeno recente. Em 1906, os apicultores de uma pequena ilha na costa sul da Inglaterra, notaram que muitas de suas colônias estavam morrendo, com numerosas abelhas rastejando da colmeia, incapazes de voar. Apesar de alguns agricultores sugerirem que se tratava de uma “paralisia”, uma condição que há muito tempo era conhecida, as perdas na colônia foram amplamente divulgadas nos meios de comunicação da época, e os apicultores

se convenceram de que a causa era uma doença nova e altamente infecciosa, e foi relatada em toda a Grã-Bretanha. (16), (17)

No Reino Unido, o número de colônias de abelhas caiu em 53 % entre 1985 e 2005. Na Europa, o número de colônias diminuiu em 25 % entre 1985 e 2005. (18) Nos Estados Unidos, as elevadas perdas de colônias de abelhas são uma grande preocupação para o país. As perdas de colônias são monitoradas anualmente desde o inverno de 2006-2007. (19) A Figura 2 apresenta as perdas anuais de colônias nos Estados Unidos desde o ano de 2010 até o ano de 2018. Perdas elevadas de colônia também tem sido relatadas no Oriente Médio (20) e no Japão (21).

Figura 2 – Monitoramento de perdas anuais de colônias nos Estados Unidos.

Fonte: Adaptado de Ref. (22)

A América Latina reúne alguns dos principais países produtores e exportadores de mel e não há relatos de grandes perdas de colônias nessa parte do mundo a partir dos sintomas do DCC (13)

As hipóteses para a boa saúde das abelhas na América Latina pode ser devido: ao manejo de abelhas não selecionadas com certa resistência natural a doenças (regiões tropicais) ou à seleção de abelhas resistentes a doenças (regiões temperadas); uma menor proporção de área plantada sobre a área total do solo, resultando em recursos de pólen mais abundantes ou de melhor qualidade; a agricultura de pequena escala e de baixa renda, levando a condições mais

sustentáveis para as abelhas. No entanto, a crescente tendência da intensificação da agricultura pode ocasionar declínios na saúde das abelhas e no tamanho da população. (13)

Houve alguns relatos de perdas de abelhas em trabalhos de pesquisa no Brasil. Mortes periódicas de abelhas em larga escala foram causadas pelo pólen tóxico das árvores nativas nas regiões do Cerrado, conhecidas como barbatimão. A solução para o problema foi a remoção das colônias para outras regiões livres de árvores barbatimão quando estas estão desabrochando. (23)

Perdas de colmeias de *Apis* em grande escala no Brasil ocorreram simultaneamente com a expansão das lavouras para agrocombustíveis e o consequente aumento do uso de agrotóxicos. Os apicultores atribuíram essas perdas ao uso de inseticidas, especialmente neonicotinóides. (13)

A infestação pelo ácaro *Varroa* sp. é evidentemente alta nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e os apicultores relatam perdas de colmeias atribuídas a esse ácaro. Parece que o *Varroa* e também o parasita de abelhas *Nosema* spp. estão se tornando mais problemáticos do que costumavam ser, podendo ser uma consequência do aumento do uso de agrotóxicos que causam o enfraquecimento das defesas imunológicas ou comportamentais das abelhas. (13)

1.4. Agentes causadores da extinção de abelhas

Os altos índices de mortalidade das abelhas são causados principalmente pelos seguintes fatores: falta de reserva de alimentos (néctar e pólen), insuficiência da rainha, condições pobres de forrageamento devido à perda e fragmentação de habitat, agrotóxicos e doenças como a loque americana, varroose, nosemosi e distúrbio de colapso das colônias. (24), (25)

1.4.1. Fungos e doenças

O ácaro ectoparasita *Varroa destructor* é o principal parasita envolvido na morte de abelhas no mundo, podendo trazer consequências negativas para a produção agrícola e para o ecossistema não agrícola. (24), (26)

Esse parasita pode ser visto a olho nu sobre as pupas, principalmente as de zangão, e também sobre o tórax das abelhas adultas. Possui a cabeça do tamanho de um alfinete e cor marrom avermelhada. Se alimenta da hemolinfa das larvas, pupas e indivíduos adultos, e transmite vários tipos de doenças. (24), (27)

A partir da década de 70, o ácaro se tornou parasita da abelha *Apis mellifera*. Hoje em dia está presente em várias regiões do mundo. (26)

No Brasil, o ácaro foi observado pela primeira vez em 1972 nos apiários de Ribeirão Preto – São Paulo, sendo dispersado rapidamente e, hoje, é encontrado em todo o país. (26), (28)

Os danos causados pelo ácaro *varroa* são: redução da hemolinfa ocasionando desnutrição das abelhas; menor longevidade das abelhas; nascimento de abelhas deficientes; menor produtividade; antecipação das tarefas das abelhas jovens devido à falta de campeiras; redução da postura de ovos das rainhas; diminuição da resistência aos agrotóxicos; inoculação de agentes patógenos e aparecimento de fungos. (27)

Com o intuito de reduzir os efeitos da infestação do *varroa*, alguns acaricidas sintéticos foram desenvolvidos, como os organofosforados e os piretroides. No entanto, a aplicação constante desses produtos leva a seleção de ácaros resistentes, além da possibilidade de contaminarem o mel e a cera no interior da colmeia. Assim, novas estratégias, como o uso de óleos essenciais para o combate de doenças e pragas, tem sido estudada pelos pesquisadores e utilizadas pelos apicultores. (26)

O ácaro *varroa* e a doença nosemose estão entre os fatores mais importantes que levam a perdas de colônias. A nosemose é causada pelo desenvolvimento dos microsporídeos *Nosema ceranae* ou *Nosema apis*, que são parasitas intracelulares que infectam, crescem e se reproduzem no intestino médio das abelhas, podendo danificar o tecido intestinal e se alastrar por todos os tecidos do hospedeiro, incluindo o cérebro e tecido abdominal. (24), (29) Ambas as espécies de *nosema* podem infectar todos os membros da colônia (operárias, zangões e rainhas). (30)

Os parasitas intracelulares entram no hospedeiro por via oral e precisam de energia para se reproduzir. Assim, as forrageiras infectadas são acometidas por um estresse energético, o que aumenta sua fome e a busca por alimento, resultando em uma maior transmissão dos esporos do parasita. (31)

Essa doença não apresenta sintomas evidentes, podendo ser difícil de detectar e muitas vezes podendo não ser percebida. (32) Seus principais efeitos são a redução do tempo de vida da abelha e da população da colônia e uma menor produção de mel. (33)

O medicamento mais eficaz no controle desses parasitas é o antibiótico fumagilina, mas preocupações com o custo e possíveis resíduos no mel muitas vezes impedem seu uso. (32) Assim, novas estratégias, como o uso de produtos naturais, como, por exemplo, o timol e o resveratrol (34), tem sido estudadas pelos pesquisadores.

O controle da doença é feito principalmente pelo cumprimento de medidas preventivas, como a acomodação das colmeias em locais com baixa umidade e a higienização de equipamentos apícolas com ácido acético. (24), (35)

1.4.2. Distúrbio do colapso das colônias (DCC)

O distúrbio do colapso das colônias (DCC) foi relatada pela primeira vez em 2006 por apicultores nos Estados Unidos, no entanto, os apicultores observaram declínios de colônias consistentes com o DCC em 2004. (36) Durante o inverno de 2006-2007 foi registrado nos Estados Unidos uma perda média de 38 % de suas colônias de abelhas. (37)

O DCC causa a perda rápida de abelhas operárias adultas, o enfraquecimento ou morte da colônia com excesso de crias em relação a população de abelhas adultas e a falta de abelhas operárias dentro e ao redor das colmeias afetadas. (38)

Há uma suposição de que o DCC é causado devido à inserção de um agente infeccioso não identificado anteriormente. Essa ideia é fundamentada por evidências de que o DCC é causado pela reutilização de equipamentos que foram usados em colônias contaminadas e esse fato pode ser interrompido pela esterilização do equipamento antes do uso. (36)

A síndrome do DCC não é causada por um único fator. Elevados níveis de patógenos continuam sendo detectados nas abelhas afetadas pelo DCC (36), (14), mas nenhum patógeno específico pode ser decisivamente relacionado à síndrome. (39), (14)

O ácaro *Varroa destructor* e o microsporídeo *Nosema ceranae* não foram capazes de comprovar a responsabilidade destes pela síndrome. (14)

Além da associação da doença com parasitas ou patógenos, os agrotóxicos têm sido apontados como um possível fator contribuinte para o declínio das abelhas e para o DCC, mas a associação direta com o DCC precisa ser melhor estudada. (25)

No Brasil, o primeiro caso semelhante ao DCC, aconteceu em duas colmeias na região de Altinópolis – SP no ano de 2008. No decorrer dos últimos anos, tem sido relatada, por apicultores e por fiscais federais/estaduais, altas perdas de colônias nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. As análises feitas em abelhas forrageiras, coletadas nas regiões afetadas, mostraram a existência dos microsporídeos *N. ceranae* e *N. apis*, do ácaro *Varroa destructor* e de alguns vírus. (40)

As prováveis causas do DCC também estão relacionadas a problemas nutricionais que afetam o sistema imunológico das abelhas e das colônias (41); ao manejo inadequado das colônias como, por exemplo, exposição a fontes de água restritas ou contaminadas, falta de sombra em regiões de climas quentes, não provimento de alimentação suplementar, ataque de pragas e não substituição de rainhas; e a mudanças climáticas. (24)

1.4.3. Alterações climáticas e perda de habitat

A abelha *Apis mellifera* é uma espécie que possui grande potencial adaptativo, por esse motivo é encontrada em quase todo o mundo e em climas altamente diversos. No entanto, as altas taxas de mortalidade e os colapsos de colônias registradas atualmente, demonstram a fragilidade das populações de abelhas em todo o mundo. (42)

As mudanças climáticas podem prejudicar as abelhas de diferentes maneiras, como: modificar o comportamento e a fisiologia das abelhas; alterar a qualidade do

ambiente floral e aumentar ou reduzir a capacidade de colheita e desenvolvimento da colônia; desestabilizar as relações entre flores e polinizadores; definir novas faixas de distribuição de abelhas e gerar novas relações competitivas entre espécies e raças, bem como entre seus parasitas e patógenos. (42), (43)

Com as mudanças no clima, os apicultores serão obrigados a mudar seus métodos de apicultura. Eles vão transferir suas colmeias para novas áreas de forrageamento e importar raças estrangeiras para testar sua utilidade nos novos ambientes. (42)

O clima influencia o desenvolvimento floral e a produção de néctar e pólen, que estão diretamente ligados à atividade de forrageamento e desenvolvimento de colônias. As abelhas precisam acumular reservas de mel suficientes para sobreviver no inverno. Um dos principais efeitos da mudança climática sobre as abelhas de mel deriva de mudanças na distribuição das espécies de flores, das quais as abelhas dependem dos alimentos. (43)

A fragmentação e perda de habitat, perda de florestas, mudanças no uso do solo e práticas agrícolas agressivas também estão entre os principais causadores do declínio dos polinizadores. (44) A degradação do habitat pode prejudicar as espécies de abelhas pela perda de recursos florais e de nidificação. (7) Em muitos lugares, o único habitat adequado para o assentamento de abelhas é em fileiras de árvores ao longo das estradas. (45)

1.4.4. Agrotóxicos

Uma das principais causas do declínio dos polinizadores nas áreas agrícolas é o uso inadequado de práticas de cultivo, com o uso de agrotóxicos, principalmente nas áreas extensas de monocultivo. (46), (47), (48)

Na agricultura, o controle de pragas e doenças está concentrado no uso de várias classes de agrotóxicos, como herbicidas, fungicidas, inseticidas, entre outros. (14)

A contaminação das abelhas por agrotóxicos acontece, geralmente, durante a atividade de forrageio, no momento da coleta de néctar e pólen e pode atingir em maior ou menor extensão a colmeia. (49)

As abelhas são os vetores primários da distribuição indesejada de agrotóxicos em outras matrizes da colmeia, desempenhando um papel mais importante do que as vias de transporte usuais (ar e água). (50)

As abelhas desempenham um papel tanto passivo quanto ativo. A distribuição passiva ocorre através do contato de suas pernas e corpos com uma superfície contaminada e subsequente difusão do composto dentro da colmeia (especialmente na cera ou superfícies de madeira/própolis sobre as quais elas andam). (50)

A distribuição ativa acontece quando o composto é incorporado ao corpo do animal através de várias maneiras (contato, ingestão e respiração). O composto pode então ser metabolizado e/ou transferido para os produtos das abelhas, tais como mel, pólen, cera recém-secretada e geleia real. (50)

Os agrotóxicos e seus resíduos em produtos da colmeia podem desempenhar um importante papel no distúrbio do colapso das colônias e outros problemas da colônia. Embora nenhum agrotóxico isolado tenha demonstrado causar o distúrbio do colapso das colônias, os efeitos aditivos e sinérgicos de múltiplas exposições a agrotóxicos podem contribuir para o declínio das abelhas. (25)

No passado, a intoxicação das abelhas por agrotóxicos era associada apenas à exposição letal (intoxicação aguda), que tem como consequência um acúmulo de abelhas mortas perto das colmeias. No entanto, os agrotóxicos afetam as abelhas em níveis subletais, não as matando de imediato, mas prejudicando seus comportamentos ou suas capacidades de combater infecções. Por esses motivos, a exposição a agrotóxicos pode ser um dos fatores que contribuem para o declínio dos polinizadores e aumento do DCC. (51), (14)

Os inseticidas são os agrotóxicos que causam maior preocupação no Brasil, principalmente os que são aplicados por aeronaves sobre as amplas áreas de monoculturas. (14) A Figura 3 apresenta a comercialização de inseticidas no período de 2011 a 2016 no Brasil e no mundo.

Figura 3 – Comercialização de inseticidas no Brasil e no mundo.

Fonte: Ref. (4)

No ano de 2016 o Brasil consumiu 60.607 toneladas de inseticidas, enquanto que no mundo o consumo foi de aproximadamente 181.131 toneladas. (4)

Abelhas *Apis mellifera* tratadas em laboratório com doses subletais de inseticidas apresentaram redução da movimentação e da mobilidade, diminuição da capacidade de comunicação e de aprendizagem, diminuição de retorno à colônia, no comportamento de forrageamento e na polinização. (52), (53), (54), (55)

Exemplos desses efeitos são observados quando abelhas *A. mellifera* são expostas aos inseticidas piretróides em concentrações iguais às encontradas no ambiente. Os piretróides prejudicam o comportamento de forrageamento e aumentam a mortalidade das operárias causando reduções significativas no desenvolvimento da ninhada e da colônia. Exposição a baixos níveis de piretróides pode afetar a capacidade das abelhas de voltar para a colmeia. (56)

Em um estudo foi relatado que 43 % das forrageiras de *A. mellifera* retornaram à colmeia uma vez após a exposição a baixo nível de piretróides, apenas 4 % retornaram duas vezes após o tratamento e nenhuma das abelhas expostas estavam presentes na colmeia no final do dia ou na manhã seguinte. As abelhas ainda apresentaram distúrbios de comportamento, tais como: autolimpeza excessiva, abdômen contraído e dança trêmula. (57) Os piretróides é uma das classes de agrotóxicos mais relacionadas ao DCC. (46)

Os neonicotinóides são outra classe de agrotóxicos relacionadas às causas do DCC. (56) Abelhas *A. mellifera* expostas em laboratório a doses subletais de neonicotinóides apresentaram atividade de forrageamento anormal, redução da memória olfativa e do desempenho de aprendizagem e diminuição de retorno à colônia. (58) Baixas concentrações de neonicotinóides em néctar não apresentaram efeitos letais, mas reduziram o desempenho esperado em abelhas adultas em aproximadamente 6 e 20 %. (59) Um efeito adicional observado sobre abelhas *A. mellifera* e *Bombus terrestris* foi a alteração das suas atividades de forrageamento fazendo com que elas preferissem alimentos misturados com neonicotinóides ao invés de outras fontes de néctar. (60)

1.5. *Melipona scutellaris* ou uruçú

As abelhas sem ferrão são representadas por mais de 500 espécies distribuídas na região neotropical da Terra. (61) No Brasil, existem cerca de 300 espécies eussociais, na qual essas abelhas sem ferrão são consideradas importantes não apenas para o equilíbrio e a biodiversidade do ecossistema, mas também desempenha um importante papel na polinização de culturas. (62), (63)

As abelhas sem ferrão são responsáveis pela polinização de 30 a 90 % da flora nativa brasileira, dependendo do ecossistema em que estão presentes e pela polinização de até 33 % das culturas agrícolas. A abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) é popularmente conhecida como uruçú, uruçú verdadeira ou uruçú nordestina e é encontrada principalmente no nordeste brasileiro. Essa espécie também parece estar bem adaptada ao clima e à ecologia do Estado de São Paulo. (1) Elas constroem colônias constituídas por um grande número de indivíduos polinizadores que são capazes de produzir grande quantidade de mel. (64), (65) Ela pertence ao grupo de espécies com tamanho corpóreo moderadamente grande de *Melipona* (entre 10 e 13 mm de comprimento total) e massa corporal acima de 60 mg. (66) A Figura 4a mostra o aspecto geral das abelhas uruçú e a Figura 4b mostra os potes de mel e de pólen dentro da colmeia.

Figura 4 – (a) Aspecto geral das abelhas uruçu. (b) Potes de mel e de pólen dentro da colmeia.

Fonte: tirada por BRIGANTE (2017).

Além da sua importância ecológica como polinizadores de plantas nativas no Brasil, *M. scutellaris* é considerada uma espécie promissora entre os polinizadores para criação em larga escala, para uso em culturas protegidas ou cultivadas devido à facilidade de manutenção de colmeias fortes que podem ser facilmente transportadas e multiplicadas. No entanto, devido à acessibilidade às culturas ou a proximidade das culturas com áreas nativas da floresta, *M. scutellaris* é vulnerável a ações antrópicas. Uma das causas do aumento da taxa de mortalidade dessas abelhas é a intoxicação por agrotóxicos. (1)

O mel dessas abelhas é considerado medicinal principalmente pelas populações regionais, sendo empregado como fortificante e afrodisíaco, e para o tratamento de gripes, bronquite e coqueluche, além de outras doenças como: fadiga, câncer, cicatrizante, inflamação de garganta, asma, amebíase, catarata, trombose, tuberculose, dentre outras. (67), (68)

1.6. Agrotóxicos estudados

1.6.1. Abamectina

As avermectinas são lactonas macrocíclicas que foram descobertas em 1975, quando um micro-organismo chamado *Streptomyces avermitilis* foi isolado de uma amostra de solo japonês, apresentando atividade anti-helmíntica. Fazem parte desse grupo a ivermectina, a abamectina e a doramectina. (69), (70) A abamectina (avermectina B₁) é a avermectina mais importante produzida naturalmente, devido à sua elevada atividade antiparasitária contra uma extensa gama de parasitas em mamíferos. A abamectina é uma mistura de homólogos, contendo no mínimo 80% do homólogo B_{1a} e no máximo 20 % do homólogo B_{1b}. (70) Em 1985, a abamectina foi comercializada como um agrotóxico agrícola. (69) A Figura 5 apresenta a estrutura da abamectina.

Figura 5 – Estrutura química da abamectina.

Fonte: Autoria própria.

As propriedades físicas e químicas da abamectina estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas da abamectina.

Propriedade	Valor
Fórmula molecular	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄
Massa molar	873,09 g mol ⁻¹
Solubilidade em água (20 °C)	1,21 mg L ⁻¹
Solubilidade em tolueno (20 °C)	23,0 g L ⁻¹
Solubilidade em acetona (20 °C)	72,0 g L ⁻¹
Solubilidade em acetato de etila (20 °C)	160 g L ⁻¹
Solubilidade em octanol (20 °C)	83,0 g L ⁻¹
Ponto de fusão	161,8 °C
Ponto de ebulição	Decompõe-se antes de ferver
Log K _{ow} (pH 7, 20 °C)	4,4
Densidade	1,18 g mL ⁻¹
Constante de dissociação (pKa) a 25 °C	Não reportado
Pressão de vapor a 20 °C	3,70 × 10 ⁻³ mPa
Absorção máxima de UV-VIS	244 nm

Fonte: Ref. (70), (71), (72)

No que se refere a sua toxicidade, a abamectina é classificada como extremamente tóxica a saúde humana (Classe I) (73) e como muito tóxica ao meio ambiente (Classe II); é altamente tóxica para organismos aquáticos e abelhas, podendo atingir outros insetos benéficos. Há ainda a recomendação para não aplicação do produto no período de maior visitação das abelhas (74) A Tabela 2 apresenta a toxicidade para alguns seres vivos.

Tabela 2 – Toxicidade da abamectina para alguns seres vivos.

Propriedade	Valor
Mamíferos (rato) – DL ₅₀ oral agudo	8,70 mg kg ⁻¹
Mamíferos (rato) – DL ₅₀ dérmico	> 330 mg kg ⁻¹ de peso corporal
Pássaros (<i>Anas platyrhynchos</i>) – DL ₅₀ agudo	≤ 77,0 mg kg ⁻¹
Peixe (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) – DL ₅₀ agudo de 96h	3,60 µg L ⁻¹
Invertebrados aquáticos (<i>Daphnia pulex</i>) – EC ₅₀ agudo de 48h	0,100 µg L ⁻¹
Abelhas (<i>Apis mellifera</i>) – DL ₅₀ agudo contato de 48 h	2,20 ng abelha ⁻¹
Abelhas (<i>Apis mellifera</i>) – DL ₅₀ agudo oral de 48 h	> 11,0 ng abelha ⁻¹

Fonte: Ref. (71)

Em relação a sua funcionalidade, a abamectina é classificada como um inseticida/acaricida/nematicida de origem biológica, além de ser um agente antiparasitário em animais de criação e estimação. (75) Seu mecanismo de ação estimula a liberação do ácido gama aminobutírico (GABA) nas terminações nervosas, interrompendo os impulsos nervosos resultando num estado de repouso forçado, ataxia e paralisia. (70), (76)

A abamectina é aplicada como pulverização foliar no controle de pragas em culturas de algodão, batata, café, cebola, citros, coco, cravo, crisântemo, ervilha, feijão, figo, maçã, mamão, manga, melancia, melão, morango, pepino, pêra, pêssego, pimentão, rosa, soja, tomate e uva. Ainda pode ser aplicada em sementes de algodão, cebola, cenoura, feijão, melão, milho, tomate e soja; em solo na cultura de tomate e em sementes no sulco de plantio para as culturas de algodão e soja. A ingestão diária considerada aceitável para humanos é de 0,002 mg kg⁻¹ de peso corporal. (73)

1.6.2. Difenconazol

O difenoconazol é um fungicida que pertence ao grupo químico dos triazóis. Este grupo de fungicidas, introduzido na década de 1980, também consiste nos

seguintes compostos: ciproconazol, fenobaronazol, flutriafol, ipconazol, metconazol, propiconazol, triticonazol, tebuconazol e tetraconazol. (77) A Figura 6 apresenta a estrutura química do difenoconazol.

Figura 6 – Estrutura química do difenoconazol.

Fonte: Autoria própria.

As propriedades físicas e químicas do difenoconazol estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades físicas e químicas do difenoconazol.

Propriedade	Valor
Fórmula molecular	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
Massa molar	406,26 g mol ⁻¹
Solubilidade em água (20 °C)	15,0 mg L ⁻¹
Solubilidade em etanol (20 °C)	330 g L ⁻¹
Solubilidade em acetona (20 °C)	610 g L ⁻¹
Solubilidade em tolueno (20 °C)	500 g L ⁻¹
Solubilidade em n-hexano (20 °C)	3,40 g L ⁻¹
Ponto de fusão	82,5 °C
Ponto de ebulição	101 °C
Log K _{ow} (pH 7, 20 °C)	4,36
Densidade	1,37 g mL ⁻¹
Constante de dissociação (pKa) a 25 °C	1,07
Pressão de vapor a 20 °C	3,33 x 10 ⁻⁵ mPa
Absorção máxima de UV-VIS	215 nm

Fonte: Ref. (78), (79)

No que se refere a sua toxicidade, o difenoconazol é classificado como extremamente tóxico a saúde humana (Classe I) (80) e como muito tóxico ao meio ambiente (Classe II). (81) De acordo com o PPDB (82) o difenoconazol apresenta baixo risco tóxico para abelhas. A Tabela 4 apresenta a sua toxicidade para alguns seres vivos.

Tabela 4 – Toxicidade do difenoconazol para alguns seres vivos.

Propriedade	Valor
Mamíferos (rato) – DL ₅₀ oral agudo	1,45 g kg ⁻¹
Mamíferos (rato) – DL ₅₀ dérmico	> 330 mg kg ⁻¹ de peso corporal
Pássaros (<i>Anas platyrhynchos</i>) – DL ₅₀ agudo	> 2,15 g kg ⁻¹
Peixe (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) – DL ₅₀ agudo de 96h	1,10 mg L ⁻¹
Invertebrados aquáticos (<i>Daphnia magna</i>) – EC ₅₀ agudo de 48h	0,770 mg L ⁻¹
Abelhas (<i>Apis mellifera</i>) – DL ₅₀ agudo contato de 48 h	> 100 µg abelha ⁻¹
Abelhas (<i>Apis mellifera</i>) – DL ₅₀ agudo oral de 48 h	> 177 µg abelha ⁻¹

Fonte: Ref. (78)

O difenoconazol é aplicado como pulverização foliar nas culturas de abacate, abóbora, abobrinha, álamo, alface, algodão, alho, ameixa, amendoim, antúrio, arroz, asstroeméria, aveia, azaléia, banana, batata, begônia, berinjela, beterraba, boca de leão, café, caju, caqui, cebola, cenoura, cevada, citros, coco, couve-flor, cravo, cravínea, crisântemo, ervilha, eucalipto, feijão, figo, gerânio, gérbera, girassol, goiaba, kalanchoe, lisianthus, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, morango, nectarina, pepino, pêssego, pimentão, rosa, soja, tomate, trigo, uva e violeta; em mudas de café e em sementes de algodão, amendoim, cevada, feijão, soja e trigo. A ingestão diária considerada aceitável para humanos é de 0,6 mg kg⁻¹ de peso corporal. (80)

De acordo com AGROFIT (83) o difenoconazol é indicado para 36 diferentes cultivos dos quais 9 deles também recebem a indicação do uso da abamectina, são eles: batata, café, citros, feijão, mamão, morango, soja e tomate.

O mecanismo de ação dos triazóis é muito específico, eles inibem a biossíntese do ergosterol, um componente essencial para a integridade das membranas celulares

dos fungos. Devido ao seu local de ação ser muito específico, há preocupações de resistência. (77)

1.7. Determinação da abamectina e do difenoconazol em tecidos de abelhas

1.7.1. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)

Neste estudo, o método QuEChERS foi utilizado para a extração da abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido de abelhas. O método de extração QuEChERS foi introduzido por Anastassiades et al. (84) em 2003, com o intuito de ultrapassar as limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração de agrotóxicos existentes. O método foi descrito como rápido, fácil, de baixo custo, efetivo, robusto e seguro, o qual foi proposto para análise de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais. (84), (5)

O método de extração QuEChERS foi desenvolvido a fim de se obter um procedimento que pudesse ser executado em qualquer laboratório, com a utilização de etapas simples e que consistisse na extração com solvente orgânico seguida por uma etapa de extração/partição com adição de sais e uma etapa de limpeza (clean-up) por Extração em Fase Sólida Dispersiva (Dispersive Solid-Phase Extraction, d-SPE). (84), (5), (85) A última etapa é essencial, pois reduz os interferentes da amostra e o efeito matriz. (86)

Segundo Anastassiades et al. (84) e Lehotay e Mastovská (85) algumas das vantagens do método QuEChERS são: recuperações elevadas (maiores que 85 %) para agrotóxicos, numa vasta faixa de polaridade e volatilidade, baixo consumo de solventes, análises rápidas (10 a 20 amostras em 30 a 40 minutos), produção de poucos resíduos, utilização de pouco material, robustez e baixo custo dos reagentes utilizados.

O método QuEChERS desenvolvido por Anastassiades et al. (84) é conhecido como método “QuEChERS Original” e envolve as seguintes etapas: pesagem de 10 g de amostra, extração dos analitos com 10 mL de acetonitrila (ACN), adição de 4 g de

MgSO₄ anidro e 1 g de NaCl para etapa de partição/extração, adição de padrão interno, obtenção de alíquota e clean-up com 150 mg de MgSO₄ e 25 mg de PSA, obtenção de alíquota e análise por LC-MS ou GC-MS. (84) A Figura 7a apresenta a descrição do método.

A acetonitrila é utilizada como solvente devido a extração de uma quantidade menor de co-extrativos lipofílicos oriundos da amostra como, por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos, além de extrair vários agrotóxicos com diferentes polaridades. (5), (87)

Em alguns casos, o uso do método original mostrou que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação conforme o pH da matriz. (88), (89) Então, a primeira modificação do método foi proposta por Lehotay et al. (89), com o acréscimo de uma etapa de tamponamento com a intenção de melhorar os percentuais de recuperação. Os pesquisadores desenvolveram o método “QuEChERS – acetato” (Figura 7b), no qual a adição de acetato de sódio promove o efeito tamponante (pH 4,8). Este método foi aceito pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) como método oficial para a determinação de agrotóxicos em alimentos no ano de 2007. (90)

Outra modificação do método foi proposta por Anastassiades et al. (91) que desenvolveram o método “QuEChERS – citrato” (Figura 7c), no qual uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado promove o efeito tamponante (pH 5,0 – 5,5). Em 2008, este método foi adotado pelo Comité Européen de Normalisation (CEN) como método de referência na União Européia. (92)

Figura 7 – Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS a) original; b) acetato e c) citrato.

Fonte: Adaptado de Ref. (86)

Kiljanek et al. (6) desenvolveram um método para a determinação de 200 agrotóxicos e metabólitos de agrotóxicos em amostras de abelhas utilizando o método QuEChERS acetato para extração. 97 % dos analitos estudados mostraram recuperação na faixa requerida de 70 a 120 % e precisão abaixo de 20 %.

Kasiotis et al. (93) desenvolveram um método para a determinação de 115 analitos em amostras de abelha, mel e pólen utilizando o método QuEChERS original modificado para extração. Os valores de recuperação obtidos variaram de 59 a 117 % para todas as matrizes.

Wiest et al. (94) desenvolveram um método para a análise de 80 contaminantes ambientais, agrotóxicos e medicamentos veterinários em mel, abelha e pólen utilizando o método QuEChERS citrato modificado para extração. Os valores de

recuperação variaram de 60 a 120 % e permitiu a quantificação em níveis de 10 ng g⁻¹.

1.8. Biomarcadores bioquímicos

Um grande número de estudos tem utilizado os biomarcadores bioquímicos como ferramentas funcionais para avaliar o efeito de vários compostos sobre os organismos vivos. (95)

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações observáveis ou mensuráveis nos níveis moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos ou comportamentais indicativos da exposição presente ou passada de um organismo a xenobióticos. (96)

No ambiente terrestre, a abelha é um modelo particularmente pertinente para o desenvolvimento de biomarcadores, com o intuito de avaliar a contaminação ambiental, pois sua intensa atividade de forrageamento as coloca em contato com um grande número de contaminantes ao redor da colmeia. (96), (97)

Poucos estudos têm sido feitos sobre a presença de biomarcadores nas abelhas, e a maioria deles diz respeito à enzima acetilcolinesterase (AChE). No entanto, uma avaliação eficaz dos impactos ecotoxicológicos dos xenobióticos sobre as abelhas requer uma abordagem que combina vários biomarcadores, pois permitirá um diagnóstico mais preciso dos efeitos causados pela exposição a estressores ambientais por meio de uma combinação de diferentes respostas biológicas. (96)

Exemplos de biomarcadores utilizados em avaliações da toxicidade e efeitos de estressores sobre organismos incluem a atividade de enzimas de biotransformação, de defesa antioxidante e parâmetros de estresse oxidativo. (98)

O processo de biotransformação de xenobióticos é dividido em três fases: a fase I envolve a oxidação, redução ou hidrólise dos contaminantes; a fase II consiste em reações de conjugação e na fase III acontece a excreção. (98) O processo de biotransformação gera espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species), que são radicais livres que reagem com biomoléculas causando sua desestruturação, muitas vezes com consequente perda de sua função. Exemplos de

ROS incluem o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) altamente reativo. (99)

Para minimizar o dano oxidativo aos componentes celulares, os organismos desenvolveram defesas antioxidantes. Importantes enzimas antioxidantes são as enzimas superóxido dismutase (SOD, converte $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2), catalase (CAT, reduz H_2O_2 para água) e glutathione peroxidase (GPx, desintoxica H_2O_2 ou hidropéroxidos orgânicos produzidos, por exemplo, por peroxidação lipídica). A glutathione S-transferase (GST) catalisa a conjugação de glutathione (GSH) com várias substâncias eletrofílicas e evita o dano oxidativo ao conjugar produtos de degradação de peróxidos lipídicos a GSH. (99)

Os organismos podem se habituar ao aumento da produção de ROS, regulando positivamente as defesas antioxidantes, como as atividades das enzimas antioxidantes. A falha da defesa aos antioxidantes em desintoxicar a produção excessiva de ROS pode levar a danos oxidativos significativos, tais como: danos no DNA, degradação de proteínas e lipídeos, inativação de enzimas e peroxidação lipídica. (99)

A peroxidação lipídica é um dos principais mecanismos pelos quais os oxirradicais podem causar danos aos tecidos, prejudicando a função celular e provocando alterações nas propriedades físico-químicas das membranas celulares, que por sua vez interrompem as funções vitais. (99)

Os peróxidos lipídicos se decompõem e produzem uma variedade de substâncias, sendo o malondialdeído (MDA) a mais importante delas. Os níveis de MDA refletem os efeitos combinados da exposição ao estresse oxidativo e a capacidade ou falta deles para resistir ao dano oxidativo através de vários mecanismos de reparo. O biomarcador malondialdeído é uma medida comum do estresse oxidativo em insetos e sistemas de vertebrados. (100)

Um grupo de biomarcadores pode ser uma ferramenta valiosa para constatar perturbações fisiológicas induzidas por estressores e estudar os modos de ação dos estressores. Os biomarcadores envolvidos nos principais sistemas biológicos representam uma comprovação da saúde das abelhas e também podem ser usados com a sintomatologia e análises químicas para estabelecer um diagnóstico de intoxicação por agrotóxicos. (96)

1.8.1. Neurotransmissores

O sistema nervoso dos insetos possui altos níveis de octopamina, dopamina e serotonina. (101) Nos insetos, esses compostos demonstraram atuar como neurotransmissores, neurohormônios e neuromoduladores. (102)

Nas abelhas (*Apis mellifera*) grandes quantidades de octopamina, dopamina e serotonina e outros compostos neuroativos (acetilcolina, ácido gama-aminobutírico, glutamato, triptofano e quinurenina) são encontrados no sistema nervoso central. (101)

A octopamina está presente em altas concentrações em vários tecidos de insetos. (102) Os níveis de octopamina no sistema nervoso central dos insetos mudam em resposta ao desenvolvimento metamórfico, fome, fuga e estresse no manuseio. A octopamina afeta o comportamento e as respostas das abelhas aos odores. (101) Comportamentos muito complexos, como aprendizagem e memória, também são modulados pela octopamina. (102) Existem evidências de que a octopamina é liberada na hemolinfa em momentos de estresse na barata e na abelha *Apis mellifera*. (103) A octopamina também está envolvida na regulação da divisão do trabalho relacionado ao envelhecimento em abelhas. As abelhas mais velhas, particularmente forrageiras, tem níveis mais altos de octopamina no cérebro do que as abelhas mais jovens que trabalham na colmeia. (104)

A dopamina está presente em concentrações relativamente altas em todo o tecido nervoso dos insetos. No sistema nervoso das abelhas, sua concentração é de aproximadamente 2 a 3 vezes maior em comparação com a octopamina e está envolvida no aprendizado olfativo e na memória. (102) Além disso, a dopamina desempenha um papel crucial na modulação da aprendizagem aversiva. (105)

A serotonina é um neurotransmissor encontrado em vertebrados e invertebrados. Está presente em vários tecidos de insetos, sendo encontrada em maiores concentrações no tecido nervoso. No sistema nervoso central, a serotonina também está envolvida em processos como aprendizado e memória. Mudanças na capacidade de resposta das abelhas aos estímulos olfativos também foram atribuídas a serotonina. (102)

2. Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa foi analisar os resíduos dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol em amostras de tecido de abelhas nativas sem ferrão da espécie *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 e avaliar os efeitos desses compostos por meio de biomarcadores bioquímicos.

2.1. Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar método de extração QuEChERS para pré-concentrar os agrotóxicos em estudo em amostras de tecido de abelhas.
- Desenvolver, validar e aplicar método analítico para determinar os agrotóxicos abamectina e difenoconazol em amostras de tecido de abelhas expostas em laboratório.
- Avaliar o grau de estresse oxidativo causado pelos compostos estudados por meio de sistemas antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e em sistemas antioxidantes não enzimáticos como glutathione oxidada e glutathione reduzida e níveis de peroxidação lipídica em amostras de tecido de abelhas.

3. Materiais e métodos

3.1. Padrões analíticos e reagentes

Os padrões analíticos utilizados foram com alto grau de pureza, abamectina (96,9 %) e difenoconazol (99,7 %) e adquiridos da Sigma Aldrich. Para a validação do método e extração dos agrotóxicos pelo método QuEChERS foram preparadas soluções individuais de cada substância na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila. Em seguida, foram preparadas soluções analíticas das substâncias na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a partir destas foram feitas as diluições para obtenção das soluções nas concentrações selecionadas para o estudo.

Os solventes utilizados foram todos grau HPLC e os reagentes utilizados na extração dos analitos de interesse também foram de alto grau de pureza.

Nos testes de exposição foram utilizados o padrão de alta pureza da abamectina e o produto comercial KRAFT 36EC® da Cheminova e Bayer CropScience, registrado no MAPA sob nº 07703 como inseticida acaricida de origem biológica do grupo químico da avermectina (ingrediente ativo abamectina $36,0 \text{ g L}^{-1}$). Também foi utilizado o produto comercial SCORE 250EC® da Syngenta S. A., registrado no MAPA sob nº 002894 como fungicida sistêmico do grupo químico triazól (ingrediente ativo difenoconazol 250 g L^{-1}).

Para os testes de exposição tópica e oral, o padrão analítico foi diluído em acetona P.A. para preparação de uma solução estoque de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da qual sucessivas diluições foram realizadas para os testes. Para os testes tópicos e orais as sucessivas diluições foram feitas no mesmo solvente e em solução de sacarose (1:1 m:v), respectivamente. Os produtos comerciais, por sua vez, foram diluídos em solução de Triton 0,1 % para os testes tópicos e em solução de sacarose (1:1 m:v) para os testes orais. Um controle solvente foi feito para os bioensaios citados.

Os reagentes utilizados no desenvolvimento deste estudo e sua procedência estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Reagentes utilizados e sua procedência.

Reagentes	Procedência
Abamectina	Sigma-Aldrich
Acetato de etila	Panreac
Acetato de sódio	J. B. Baker
Acetonitrila	Sigma-Aldrich
Ácido acético	Synth
Ácido fórmico	Synth
Água deionizada (18,2 MΩ cm a 25 °C)	Sistema Milli-Q (Milipore)
Amina primária e secundária	Agilent Technologies
Cloreto de sódio	Synth
Diclorometano	Panreac
Difenoconazol	Sigma-Aldrich
Hexano	Panreac
C18	Agilent Technologies
Sulfato de magnésio	J. B. Baker

Fonte: Autoria própria.

3.2. Equipamentos utilizados e condições cromatográficas

Para a seleção dos comprimentos de onda monitorados nas análises cromatográficas da abamectina e do difenoconazol foi utilizado um espectrofotômetro UV/VIS (UV-1800, Shimadzu).

Para o método de extração QuEChERS foi utilizado vórtex tipo orbital (Ika, modelo MS 3 digital, Alemanha), centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5702, Alemanha) e balança analítica (BEL, M214Ai, Brasil) com precisão de 4 casas decimais.

As condições cromatográficas para a análise da abamectina e do difenoconazol foram otimizadas utilizando um cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a um detector UV/VIS com arranjos de diodos, marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series (Estados Unidos), com desgaseificador G1322A, bomba quaternária de alta pressão G1311A, injetor automático ALS G1329A, compartimento da coluna

termostatizado G1316A e detector de arranjo de diodos G1315D. Usou-se uma coluna cromatográfica Nucleosil-C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula da Macherey-Nagel. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, com temperatura da coluna de 25 °C e vazão da fase móvel de 1 mL min⁻¹. Os comprimentos de onda selecionados para obtenção dos cromatogramas foram de 230 e 246 nm. A fase móvel utilizada foi composta por 15 % de A (água com 0,1 % de ácido fórmico) e 85 % de B (acetonitrila) em modo isocrático.

A validação do método analítico e as análises das amostras para detecção da abamectina e do difenoconazol foram feitas utilizando um cromatógrafo a líquido, marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series, acoplado a um espectrômetro de massas QTRAP 3200 triplo quadrupolo da SCIEX. Os analitos foram ionizados por electrospray (Electrospray Ionization, ESI) operando no modo positivo.

Os parâmetros da fonte de ionização foram os seguintes: gás de cortina 15 psi; gás de aquecimento e gás nebulizador 50 psi; voltagem do electrospray 5500 V e temperatura da fonte 700 °C.

Os parâmetros de potencial de orifício (DP); o potencial de entrada (EP); o potencial de entrada da cela de colisão (CEP); a energia de colisão (CE); o potencial de saída da cela de colisão (CXP) e as transições dos íons precursores e produtos dos compostos são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Transições dos íons precursores/produtos e parâmetros de ionização para LC-MS/MS.

	Íon precursor > íon produto	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
Aba	895,5 > 751,4	60	70	11	30	41	8
	895,5 > 449,3					51	6
	895,5 > 327,4					55	4
Dif	406,1 > 251	60	51	9	16	27	4
	406,1 > 111,1					75	
	406,1 > 75,1					105	

Fonte: Autoria própria.

Usou-se uma coluna cromatográfica Nucleosil-C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula da Macherey-Nagel. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, com temperatura da coluna de 25 °C e vazão da fase móvel de 1 mL min⁻¹. A fase móvel utilizada foi composta por água com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila

com 0,1 % de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição foi programado conforme descrição a seguir: 0-0,5 min, 40 % B; 0,5-12,5 min 100 % B; 12,5-18 min 40 % B.

A avaliação dos níveis de MDA e a análise dos neurotransmissores foram feitas utilizando o cromatógrafo HPLC-DAD-UV descrito anteriormente.

A determinação da atividade enzimática da GST e AChE, assim como a determinação das proteínas totais, foram feitas utilizando um leitor de microplacas da Perkin Elmer Enspire, modelo 2300 Multilabel Reader.

3.3. Materiais biológicos

Para os experimentos de exposição aos agrotóxicos foram utilizadas abelhas adultas forrageiras da espécie nativa sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, provenientes de nove colônias racionais mantidas ao ar livre no Meliponário Experimental do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA/EESC/USP), Itirapina/SP, localizado em latitude 22°9'56,32"S e longitude 47°54'7,00"O (Figura 8).

Figura 8 – Meliponário Experimental do CRHEA/EESC/USP.

Fonte: Autoria própria.

As forrageiras foram coletadas diretamente na saída da colmeia utilizando-se um extensor plástico e um recipiente de aprisionamento, como mostrado na Figura 9. A coleta foi feita no período da manhã, momento de maior atividade das abelhas. Somente colmeias fortes e saudáveis foram incluídas na amostragem, sendo esta característica evidenciada pelo número de forrageiras em atividade, pela ausência de predadores e pragas e boa postura da rainha. Foram coletadas abelhas de diferentes colmeias de modo a não afetar a saúde das mesmas e em quantidade suficiente para os procedimentos analíticos. Para os testes de exposição tópica e oral foram coletadas aproximadamente dez abelhas da mesma colmeia e cada grupo experimental foi feito em triplicata, totalizando aproximadamente 30 abelhas por grupo experimental. Imediatamente após a coleta, as abelhas receberam alimentação emergencial por meio de um tubo tipo eppendorf acoplado à gaiola-teste (Figura 10) e foram mantidas em ambiente escuro até a chegada no laboratório, momento em que foram reservadas sob condições controladas de temperatura ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (50 a 70 %) em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) com ausência de iluminação. Esse procedimento de aclimatização foi especialmente feito com as abelhas submetidas aos testes de exposição tópica e oral. As abelhas utilizadas para a validação do método analítico foram coletadas da saída da colmeia e em seguida mantidas em freezer para conservação dos componentes biológicos.

Figura 9 – Extensor plástico e recipiente de aprisionamento (gaiola) utilizados na captura das abelhas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 10 – Gaiola contendo perfurações e eppendorf utilizado como alimentador emergencial.

Fonte: Autoria própria.

3.4. Extração dos agrotóxicos pelo método QuEChERS

O método QuEChERS foi utilizado neste estudo para a extração da abamectina e do difenoconazol de amostras de tecido de abelhas. Os três métodos QuEChERS (tradicional, acetato e citrato) foram testados a fim de se obter os melhores percentuais de recuperação do método. Dos três métodos, o método QuEChERS acetato modificado foi o que apresentou a melhor recuperação sendo então este o escolhido para o estudo.

O preparo da amostra consistiu em adicionar aproximadamente 0,14 g de abelha (correspondendo a duas abelhas) em tubo Falcon de 50 mL e foi feita fortificação com 1 mL dos agrotóxicos em estudo nas concentrações desejadas para obtenção da curva analítica. Para as amostras de abelhas provenientes dos bioensaios de toxicidade aguda oral e tópica não foi feita esta etapa de fortificação. As abelhas foram maceradas e adicionou-se 15 mL de ACN + 1 % de ácido acético e agitou-se por 1 minuto em vórtex. Após o tempo de contato de 2 horas foram adicionados 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1,5 g de acetato de sódio, seguido de agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugado a 4400 rpm por 15 minutos.

Posteriormente foi transferido todo o sobrenadante para outro tubo Falcon de 15 mL contendo os sais do clean-up: 150 mg de $MgSO_4$ e 50 mg de PSA e agitou-se

em vórtex por 1 minuto e centrifugou-se em 4400 rpm por 5 minutos. Após, todo o sobrenadante foi retirado, colocado em frasco de vidro e levado para secagem em fluxo suave de N₂. Após seco reconstituiu-se em 1 mL de acetonitrila. O volume final obtido foi filtrado utilizando filtro seringa com membrana de celulose regenerada com poro de 0,45 µm em um vial.

3.5. Validação do método

Para a validação do método analítico foram utilizados os guias de validação da ANVISA (106) e do MAPA (107). Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, efeito matriz, recuperação e eficiência do método.

3.5.1. Seletividade

A determinação da seletividade foi feita pela análise de amostras não fortificadas (branco) e amostras fortificadas com abamectina e difenoconazol. O método é seletivo quando não se observa a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

3.5.2. Linearidade

As curvas analíticas utilizadas na quantificação dos analitos foram preparadas em amostras de tecido de abelhas, por meio da fortificação com os analitos antes da extração. Para a construção das curvas foram utilizadas as seguintes concentrações da abamectina e do difenoconazol: 0,0100; 0,0500; 0,100; 0,200; 0,250; 0,500; 0,750 e 1,00 µg mL⁻¹. Cada nível de concentração foi preparado em triplicata. A linearidade

foi avaliada por meio da relação entre a área de pico e a concentração dos analitos, pela aplicação da técnica de regressão linear e de um teste de falta de ajuste. O software utilizado para a análise foi o Minitab 19.

3.5.3. Limite de detecção e de quantificação do método

O limite de detecção (LD) corresponde a menor concentração que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, de um analito. O limite de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. (108), (106) O LD e o LQ podem ser calculados de várias formas, dentre elas estão o método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica e teste de Huber. (108), (109) O LQ também pode ser considerado como sendo o primeiro ponto da curva analítica que apresente boa precisão e exatidão.

Neste estudo, os limites de detecção e de quantificação foram determinados através do teste de Huber, no qual o limite de detecção corresponde ao primeiro ponto fora da curva de linearidade e o limite de quantificação ao primeiro ponto dentro da curva de linearidade. (109)

3.5.4. Precisão e exatidão

A precisão do método foi determinada em três níveis de concentração, denominados baixo ($0,38 \mu\text{g g}^{-1}$), médio ($1,9 \mu\text{g g}^{-1}$) e alto ($5,8 \mu\text{g g}^{-1}$). Três réplicas foram feitas para cada nível. A precisão intradia foi determinada nos mesmos níveis de concentração em um mesmo dia e a precisão interdias em dois dias diferentes. A precisão foi calculada através do desvio padrão relativo (RSD), segundo a Equação 1:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: s = desvio padrão e $\bar{x}$ = concentração média.

A exatidão do método foi calculada utilizando os mesmos níveis de concentração utilizados para o cálculo da precisão. Foi relacionado a concentração média experimental e a concentração teórica correspondente, conforme a Equação 2:

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

3.5.5. Efeito matriz e recuperação

O estudo do efeito matriz (EM) foi feito de acordo com os trabalhos de Matuszewski et al. (110), (111). O EM foi calculado segundo a Equação 3.

$$EM (\%) = \frac{B}{A} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: A = coeficientes angulares das curvas analíticas no solvente e B = coeficientes angulares das curvas analíticas no extrato pós-fortificado.

A recuperação foi calculada segundo a Equação 4:

$$RE (\%) = \frac{\text{Área do pico cromatográfico amostra pré-fortificada}}{\text{Área do pico cromatográfico amostra pós-fortificada}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

3.6. Bioensaios de toxicidade

A toxicidade de agrotóxicos para abelhas está fundamentada na determinação de uma dose letal média (DL₅₀) e/ou de uma concentração letal média (CL₅₀), que representa a probabilidade estatística de uma dose ou concentração do agrotóxico causar a mortalidade de 50 % da população experimental. (112), (113)

Os bioensaios de exposição oral e tópica da abamectina e do difenoconazol, tanto individual como em mistura, tomaram como base valores de concentração dos produtos correspondentes à DL_{50} tópica e CL_{50} oral (48 h) obtidos de Brigante et al. (em preparação), realizados com a formulação comercial (Kraft e Score). Foram aplicadas três diferentes concentrações dos produtos, representadas pela NOEC (concentração sem efeitos observáveis, do inglês No Observed Effect Concentration) tópica e oral, DL_{50} tópica e CL_{50} oral e 2 vezes a DL_{50} tópica e CL_{50} oral (Tabela 7). As concentrações para os testes de exposição para o padrão de alta pureza da abamectina foram as mesmas do produto comercial Kraft.

Tabela 7 – Concentrações e endpoints utilizados para os testes de exposição oral e tópica dos produtos individualmente. Valores obtidos de Brigante et al. (em preparação).

Substância	Exposição	Concentração	Endpoint
Kraft (Abamectina)	Oral ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	$1,00 \times 10^{-3}$	NOEC
		$6,00 \times 10^{-3}$	CL_{50}
		$1,00 \times 10^{-2}$	acima da CL_{50}
	Tópico ($\mu\text{g } \text{abelha}^{-1}$)	$7,00 \times 10^{-3}$	NOEC
		$2,80 \times 10^{-2}$	DL_{50}
		$5,00 \times 10^{-2}$	acima da DL_{50}
Score (Difenoconazol)	Oral ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	2,50	NOEC
		5,00	CL_{50}
		10,0	acima da CL_{50}
	Tópico ($\mu\text{g } \text{abelha}^{-1}$)	10,0	NOEC
		67,0	DL_{50}
		$1,00 \times 10^2$	acima da DL_{50}

Fonte: Autoria própria.

Para os testes de exposição com a mistura dos produtos foi fixada a NOEC tópica e oral do fungicida e feita a combinação com as três doses do inseticida (oral e tópica), como mostrado na Tabela 8, seguindo os trabalhos de Vandame & Belzunces (114). A partir da exposição oral e tópica, as abelhas foram reservadas para as análises cromatográficas de resíduos dos produtos no tecido biológico, como também de alterações no sistema enzimático.

Tabela 8 – Concentrações para os testes de exposição oral e tópica para a mistura dos produtos. Valores obtidos de Brigante et al. (em preparação).

Mistura Oral ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)		Mistura Tópica ($\mu\text{g } \text{abelha}^{-1}$)	
Kraft	Score	Kraft	Score
$1,00 \times 10^{-3}$	2,50	$7,00 \times 10^{-3}$	10,0
$6,00 \times 10^{-3}$	2,50	$2,80 \times 10^{-2}$	10,0
$1,00 \times 10^{-2}$	2,50	$5,00 \times 10^{-2}$	10,0

Fonte: Autoria própria.

3.6.1. Bioensaios de toxicidade aguda oral

Os procedimentos para os bioensaios da CL_{50} oral foram baseados no Protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, número 213 (OECD, 1998a) (115), desenvolvido para *A. mellifera*. Para obter as concentrações desejadas (NOEC, CL_{50} e $(2 \times) \text{CL}_{50}$), da solução estoque foram feitas diluições diretamente em solução de sacarose 50 % (m/v). Um grupo controle recebeu apenas solução de sacarose a 50 % m/v. Antes de iniciar o ensaio, as abelhas não foram alimentadas por um intervalo de 2 horas para garantir a baixa influência do alimento sem contaminação. Cerca de 1 mL de alimento contaminado foi exposto ad libitum até a finalização do teste. Os ensaios foram conduzidos em incubadora BOD com temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 a 70 % de umidade relativa e ausência de iluminação. Foram feitas leituras em 24; 48 e 72 horas, sendo que o número de abelhas mortas foi registrado e separado do experimento, sendo reservadas em freezer para as análises químicas e bioquímicas.

3.6.2. Bioensaios de toxicidade aguda tópica

Os procedimentos dos bioensaios de toxicidade aguda tópica foram baseados no protocolo da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, número 214 (OECD, 1998b) (116), desenvolvido para *A. mellifera*. As diluições dos

agrotóxicos foram preparadas em solução de $1,00 \text{ g L}^{-1}$ de Triton X-100. Da solução estoque dos agrotóxicos foram preparadas as diluições desejadas. Para a aplicação do agrotóxico na região do pronoto das abelhas, as mesmas foram anestesiadas com CO_2 por dez minutos e receberam uma aplicação tópica de $1,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução contendo a substância testada. Um grupo controle recebeu a solução de Triton X-100 em água. Os ensaios foram conduzidos em incubadora BOD com temperatura de $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 a 70 % de umidade relativa e ausência de iluminação. Foram feitas leituras em 24; 48 e 72 horas, sendo que o número de abelhas mortas foi registrado e separado do experimento, sendo reservadas em freezer para as análises químicas e bioquímicas.

3.7. Análises bioquímicas

3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi utilizada para avaliar a expressão das enzimas nas amostras de tecido de abelha. Uma amostra de tecido de todo o organismo foi colocada em eppendorf e macerada utilizando um bastão de vidro, em seguida foi adicionado $250 \text{ }\mu\text{L}$ de água purificada no sistema Milli-Q com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ e centrifugada a $13,2 \text{ rpm}$ por 30 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi coletado e misturado com tampão de amostra desnaturante ($\text{Tris-HCl } 100 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,8; azul de bromofenol 0,2 %; glicerol 30 %, SDS 4 % e β -mercaptoetanol $200 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na proporção de $20 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra: $10 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão (2:1) e aquecido por 5 minutos em banho termostatzado a $95 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, $15 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra e $8 \text{ }\mu\text{L}$ do marcador de massa molecular Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker da Thermo Scientific foram aplicados no gel de empilhamento previamente confeccionado. O gel foi submetido a uma voltagem inicial de 90 V até entrada no gel de resolução (SDS-PAGE 15 %) e 120 V a partir de então até o final da corrida. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue da BioRad e depois descorado

com uma solução de ácido acético 75 % e glicerol 10 % dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

3.7.2. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (MDA)

A avaliação dos níveis de peroxidação lipídica foi feita por meio do produto formado entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA) de acordo com os trabalhos de Almeida et al. (117), (118).

As amostras de tecido de todo o organismo foram pesadas e homogeneizadas (homogeneizador Ultra Stirrer, modelo Ultra 380) em solução tampão Tris-HCl 0,100 mol L⁻¹, pH 8,0 na proporção 1:3 (m/v). Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução de TBA 0,4 % diluído em HCl 0,200 mol L⁻¹. As amostras foram incubadas por 40 minutos a 90 °C. Em seguida, o extrato da abelha após reação do MDA com o TBA formou uma solução cor de rosa. Após, o extrato foi colocado em banho de gelo para resfriar a -10 °C e então foi adicionado a cada um deles 1,0 mL de álcool n-butilico. Logo após, foram centrifugadas a 3500 rpm por 3 minutos e coletados 700 µL do sobrenadante para posterior análise.

A análise das amostras foi feita utilizando um HPLC-DAD-UV. A coluna cromatográfica utilizada foi C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de poro). O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, com temperatura da coluna de 30 °C e vazão da fase móvel de 1 mL min⁻¹. O comprimento de onda selecionado para obtenção dos cromatogramas foi 532 nm. A fase móvel utilizada foi composta por 60 % de A (tampão fosfato de potássio monobásico 50,0 mmol L⁻¹ pH 7,0) e 40 % de B (metanol) em modo isocrático. Para a quantificação do MDA formado, foi utilizada a curva analítica, também injetada no HPLC-DAD-UV, com concentrações conhecidas de MDA derivatizado com o TBA, em que os dados foram expressos em pmol mg⁻¹ de tecido.

3.7.3. Determinação da atividade enzimática da GST

A atividade enzimática da GST foi medida através do monitoramento do conjugado do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida (GSH) catalisada por GST na amostra de tórax mais abdômen da abelha, de acordo com o método descrito por Keen et al. (119).

As amostras de tecidos das abelhas foram pesadas e homogeneizadas em tampão Tris HCl 0,200 mol L⁻¹, pH 7,5 contendo 1,00 mol L⁻¹ de inibidor de protease Phenylmethanesulfon Fluoride (PMSF) na proporção 1:4 (m/v). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 9.000 RCF (força centrífuga relativa, do inglês relative centrifugal force) por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para o meio de reação contendo 2,22 mmol L⁻¹ de CDBN (dissolvido em tampão fosfato 0,200 mol L⁻¹, pH 6,5) e 2,22 mmol L⁻¹ de GSH (dissolvida em tampão fosfato 0,200 mol L⁻¹, pH 6,5) e a absorbância foi monitorada a 340 nm em um leitor de microplacas.

3.7.4. Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase

A atividade enzimática da AChE foi determinada por meio do monitoramento da degradação da acetiltiocolina pela atividade da acetilcolinesterase nas amostras de tecido da abelha inteira, com formação de tiocolina, de acordo com o método descrito por Ellman et al. (120) modificado para um leitor de microplacas.

As amostras de tecido de todo o organismo foram pesadas e homogeneizadas em tampão Tris HCl 0,100 mol L⁻¹, pH 8,0 na proporção 1:4 (m/v). Em seguida, foram centrifugadas por 30 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e adicionado a um meio de reação contendo DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) dissolvido no tampão fosfato de potássio 0,100 mol L⁻¹ pH 8,0 e 0,500 mmol L⁻¹ de iodeto de acetilcolina e a absorbância foi monitorada a 405 nm em um leitor de microplacas.

3.7.5. Análise das proteínas totais

A estimativa da concentração das proteínas totais nos extratos produzidos nos testes da GST e AChE foi feita segundo o método de Bradford (121) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão e lidas em 595 nm em leitor de microplacas.

3.7.6. Análise estatística

A normalidade e homogeneidade dos resultados foram verificadas usando Shapiro Wilk e Levene. Os dados não paramétricos foram transformados em log e, no caso de permanecerem não paramétricos foi realizada a análise não paramétrica Kruskal Wallis. Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA-one way com pos Hoc Tukey para a comparação entre os grupos expostos. O software utilizado para a análise foi o Statistic 64.

3.8. Neurotransmissores

3.8.1.1. Padrões e soluções

Os procedimentos para a análise dos neurotransmissores em amostras de cabeça das abelhas expostas aos agrotóxicos foram baseados nos estudos de Benedetto et al. (122).

Os padrões analíticos utilizados foram com alto grau de pureza, octopamina (98,0 %), dopamina (98,0 %) e serotonina (98,0 %) e adquiridos da Sigma Aldrich. As soluções estoque de octopamina e dopamina (1000 mg L^{-1}) foram preparadas individualmente em água e a solução estoque da serotonina (200 mg L^{-1}) foi preparada em MeOH:H₂O. Todas as soluções foram mantidas no escuro e em geladeira. As

soluções intermediárias foram preparadas diluindo as soluções estoque para as concentrações selecionadas para o estudo com ácido perclórico $0,200 \text{ mol L}^{-1}$ contendo cisteína $3,00 \text{ mmol L}^{-1}$. Para a construção da curva analítica foram utilizadas as seguintes concentrações dos neurotransmissores: $1,60 \times 10^{-2}$; $3,10 \times 10^{-2}$; $6,20 \times 10^{-2}$; $0,312$; $0,625$ e $0,938 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

3.8.1.2. Preparo das amostras e análise dos neurotransmissores

As amostras da cabeça das abelhas foram pesadas individualmente e homogeneizadas em $100 \mu\text{L}$ de ácido perclórico ($0,200 \text{ mol L}^{-1}$) com cisteína ($3,00 \text{ mmol L}^{-1}$). O homogenato foi centrifugado (12.000 rpm , a 4°C por 5 minutos) e o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro de PVDF $0,22 \mu\text{m}$ e analisado no sistema HPLC com detecção de fluorescência (FD). Para a separação dos neurotransmissores em estudo foi utilizada uma coluna cromatográfica C18 ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) da Nano Separation Technologies e mantida a 35°C durante as análises. A fase móvel utilizada foi composta por 95 % de A (ácido perclórico 5 mmol L^{-1}) e 5 % de B (acetonitrila) em modo isocrático. A vazão da fase móvel foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume de injeção da amostra foi de $20 \mu\text{L}$. Os neurotransmissores foram monitorados com um detector de fluorescência ajustado com comprimento de onda de 279 nm de excitação e 320 nm de emissão. A concentração dos neurotransmissores foi calculada com base na curva analítica.

O método desenvolvido foi utilizado na determinação da octopamina, dopamina e serotonina em amostras de cabeça de abelhas provenientes dos bioensaios de toxicidade aguda oral e tópico. Além dessas amostras, foram coletadas abelhas da saída da colmeia e em seguida mantidas em nitrogênio líquido para conservação dos componentes biológicos e análise dos neurotransmissores nas condições da colmeia.

4. Resultados e discussão

4.1. Determinação das condições cromatográficas

Primeiramente, foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a um detector UV-VIS com arranjos de diodos (HPLC-DAD-UV) para os testes preliminares, com o objetivo de otimizar as condições cromatográficas de análise da abamectina e do difenoconazol.

Após esta etapa, o método foi ajustado para utilização em um cromatógrafo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS/MS), que possui maior seletividade para a determinação dos analitos de interesse em amostras ambientais.

4.1.1. Condições cromatográficas do HPLC-DAD-UV

Com o intuito de investigar qual o comprimento de onda de absorção máxima da abamectina e do difenoconazol foram feitos experimentos para avaliar o espectro de absorção dos compostos.

A Figura 11 apresenta os espectros de absorção da abamectina e do difenoconazol.

Figura 11 – Espectros de absorbância da abamectina e do difenoconazol em ACN.

A absorbância máxima foi observada no comprimento de onda de 230 nm para o difenoconazol e 246 nm para a abamectina, estando de acordo com Campbell (70) que também descreveu a absorbância máxima para a abamectina no comprimento de onda de 245 nm em metanol. Moreira et al. (123) e Sanches et al. (124) detectaram e quantificaram a abamectina e o difenoconazol em 246 e 230 nm, respectivamente, utilizando um HPLC-DAD-UV.

Sendo assim, estes comprimentos de onda foram selecionados para monitoramento dos compostos para as análises cromatográficas.

A escolha da coluna, dos solventes e da proporção da fase móvel também foram otimizadas.

Foram testadas as colunas Nucleosil-C18 (120 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula) da Macherey-Nagel (Alemanha), (Estados Unidos), Accucore C18 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm de tamanho de partícula) da Thermo Scientific (Estados Unidos) e também a coluna Nucleosil-C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula) da Macherey-Nagel (Alemanha).

A escolha da coluna foi feita a partir da avaliação da resolução (R_s) que é um parâmetro de separação de dois componentes consecutivos em um cromatograma, no qual valores de $R_s \geq 1,5$ indicam boa separação; e do fator de assimetria (A_s) que mede a simetria de um pico cromatográfico, no qual valores entre 0,8 e 1,2 são considerados satisfatórios. (125)

Dentre as colunas testadas, a coluna Nucleosil-C8 foi a que apresentou melhores resultados para os analitos estudados, com boa separação analítica ($R_s =$

3,9) e picos simétricos ($A_s = 1,0$ para abamectina e difenoconazol), sendo então escolhida para os testes. De acordo com Wiest et al. (94) o tipo mais adequado de coluna para as avermectinas é a coluna C8. Neste contexto, diferentes resíduos de avermectinas tais como abamectina, ivermectina, benzoato de emamectina e doramectina foram analisados em alimentos por Hernando et al. (126), enquanto Krogh et al. (127) analisaram estes e ainda eprinomectina, moxidectina e selamectina em amostras de águas superficiais, sedimentos e solos. Em ambos os estudos foi utilizada LC-MS/MS como método de análise.

Diferentes proporções de fase móvel foram testadas a fim de obter uma separação analítica adequada. Foram utilizadas como condições iniciais, volume de injeção de 20 μL , vazão da fase móvel de 1 mL min^{-1} , tempo de corrida de 10 minutos e eluição isocrática, com fase móvel composta por água com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), conforme os gradientes mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Gradientes de eluição testados.

	(A) $\text{H}_2\text{O} + 0,1 \%$ ácido fórmico (%)	(B) ACN (%)
Teste 1	10,0	90,0
Teste 2	5,00	95,0
Teste 3	20,0	80,0
Teste 4	15,0	85,0
Teste 5	0,00	100

Fonte: Autoria própria.

Todos os testes foram feitos nas seguintes temperaturas de coluna: 20; 25 e 40 $^{\circ}\text{C}$ e o melhor resultado obtido foi para o Teste 4 utilizando uma temperatura de coluna de 25 $^{\circ}\text{C}$. A Figura 12 mostra o cromatograma obtido para uma solução de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da abamectina e do difenoconazol em solvente (ACN).

Figura 12 – Cromatogramas dos analitos em solvente (ACN) na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando HPLC-DAD-UV em (a) 246 nm e (b) 230 nm. 1 – Difenoconazol, 2 – Abamectina.

O difenoconazol (pico 1) apresentou um tempo de retenção de 4,3 minutos e a abamectina (pico 2) apresentou um tempo de 5,1 minutos e o tempo total da corrida foi de 8 minutos.

As condições cromatográficas pré-definidas no HPLC-DAD-UV foram utilizadas como base para definição do método em LC-MS/MS.

4.2. Seleção do método de extração QuEChERS

Assim como mencionado no item 3.5.1, o método de extração QuEChERS foi utilizado para a extração da abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido de abelhas. Para alcançar o método final foram realizadas otimizações dos três métodos QuEChERS (original, acetato e citrato) afim de se obter os melhores percentuais de recuperação da extração dos compostos em estudo.

As otimizações incluíram solventes de extração, sais de extração e sais do clean-up em diferentes quantidades e combinações. Primeiramente foram realizadas otimizações do método QuEChERS original (Tabela 10), seguido do método QuEChERS citrato (Tabela 11) e por último o método QuEChERS acetato (Tabela 12). A recuperação para estes testes foi calculada segundo a Equação 4.

Tabela 10 – Descrição dos métodos QuEChERS original testados para aproximadamente 0,14 g de abelha (correspondente a 2 indivíduos) e a recuperação de cada método para cada analito estudado via HPLC-DAD-UV.

Método					Recuperação (%)	
Teste	Solvente	Volume (mL)	Sais de extração	Clean-up	Aba	Dif
T1	ACN	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	46,2	67,9
T2	ACN	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	89,4	95,5
T3	Acetato de etila	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	19,8	49,1
T4	Acetato de etila	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	19,5	59,5
T5	Diclorometano	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	0	129
T6	Diclorometano	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	105	0
T7	Acetato de etila	20	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	84,5	27,3
T8	ACN + 0,1 % ácido acético:acetato de etila (70:30) v/v	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	0	54,2
T9	Hexano	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	65,3	156
T10	ACN + 0,1 % ácido acético	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	75,3	50,4
T11	ACN + 1 % ácido acético	15	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	133	102
T12	ACN	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,0 g de NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg carvão ativado	0	0

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 – Descrição dos métodos QuEChERS citrato testados para aproximadamente 0,14 g de abelha (correspondente a 2 indivíduos) e a recuperação de cada método para cada analito estudado via HPLC-DAD-UV.

Método					Recuperação (%)	
Teste	Solvente	Volume (mL)	Sais de extração	Clean-up	Aba	Dif
T13	ACN	10	4 g MgSO ₄ + 1 g Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	20,9	17,8
T14	ACN	10	4 g MgSO ₄ + 1 g Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O + 1g NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	26,7	42,6
T15	ACN	10	4 g MgSO ₄ + 1 g Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O + 1g NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	26,4	41,6
T16	ACN	10	4 g MgSO ₄ + 1 g Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O + 1g NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg carvão tivado	0	0

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 – Descrição dos diferentes métodos QuEChERS acetato testados para aproximadamente 0,14 g de abelha (correspondente a 2 indivíduos) e a recuperação de cada método para cada analito estudado via HPLC-DAD-UV.

Método					Recuperação (%)	
Teste	Solvente	Volume (mL)	Sais de extração	Clean-up	Aba	Dif
T17	ACN + H ₂ O + Hexano	10:3:3	4,0 g de MgSO ₄ + 1,7 g CH ₃ COONa	600 mg MgSO ₄ + 500 mg C18	49,7	45,9
T18	ACN + 1 % ácido acético	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,7 g CH ₃ COONa	600 mg MgSO ₄ + 500 mg C18	82,3	77,2
T19	ACN + 1,5 % ácido acético	10	4,0 g de MgSO ₄ + 1,7 g CH ₃ COONa	600 mg MgSO ₄ + 500 mg C18	93,7	19,2
T20	ACN + 1 % ácido acético	15	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	35,5	106,7
T21	ACN	10	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	30,0	39,2
T22	ACN	10	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	29,1	40,2
T23	ACN	10	6 g MgSO ₄ + 1,5 g CH ₃ COONa	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg carvão ativado	0	0
T24	ACN + 1 % ácido acético	10	4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18	57,6	36,6

Fonte: Autoria própria.

O método adotado para a extração dos analitos nas amostras de tecido de abelhas foi o método QuEChERS acetato modificado, descrito como teste T20, e utilizou como sais de extração 6 g MgSO_4 e 1,5 g CH_3COONa , como solvente utilizou 15 mL de ACN + 1 % ácido acético e como sais do clean-up 150 mg MgSO_4 e 50 mg PSA. Esse método apresentou valores de recuperação de 35,5 % para a abamectina e 107 % para o difenoconazol. Apesar da baixa porcentagem de recuperação da abamectina, este método apresentou boa precisão, portanto, foi escolhido para a extração dos analitos em estudo.

4.3. Condições cromatográficas para o LC-MS/MS

Após a otimização das condições cromatográficas foi feita a análise da abamectina e do difenoconazol em LC-MS/MS. As condições cromatográficas foram descritas no tópico 3.2. A Figura 13 apresenta os cromatogramas de íons extraídos da análise de uma solução dos compostos na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 13 – Cromatogramas de íons extraídos dos analitos em solvente (ACN) na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando LC-MS/MS. (a) Difenoconazol e (b) Abamectina (continua).

Figura 13 – Cromatogramas de íons extraídos dos analitos em solvente (ACN) na concentração de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando LC-MS/MS. (a) Difenconazol e (b) Abamectina (conclusão).

O difenoconazol (a) apresentou um tempo de retenção de 9,4 minutos e a abamectina (b) apresentou um tempo de 10,2 minutos.

4.4. Validação do método

4.4.1. Seletividade

Com o intuito de avaliar a seletividade do método, foram analisadas amostras de tecido de abelhas isentas dos analitos de interesse (branco) e amostras fortificadas com os analitos. Os cromatogramas são apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Cromatogramas de íons totais obtidos a partir do extrato da matriz (branco) (a) e matriz fortificada (b) com $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ de difenoconazol (Dif) e abamectina (Aba) utilizando LC-MS/MS.

O cromatograma do branco apresentado na Figura 14 (a) mostra que não há o registro de pico cromatográfico na região de 9,4 min (tempo de retenção do difenoconazol) e 10,2 min (tempo de retenção da abamectina). No entanto, esses picos estão presentes no cromatograma da amostra fortificada da Figura 14 (b). Neste caso, as amostras de tecido de abelhas foram fortificadas com abamectina e difenoconazol. Esses resultados mostram que o método é seletivo, uma vez que não foi observada a presença de compostos interferentes na região de resposta dos analitos de interesse.

4.4.2. Linearidade

As curvas analíticas foram construídas para verificar a linearidade do método desenvolvido utilizando o LC-MS/MS. As curvas foram construídas em amostras de tecido de abelhas fortificadas em oito níveis de concentração. A Figura 15 apresenta as curvas analíticas na matriz fortificada com abamectina e difenoconazol.

Figura 15 – Curvas analíticas na matriz fortificada obtidas para (a) difenoconazol e (b) abamectina.

As curvas analíticas apresentadas na Figura 15 mostram um aumento linear da área dos picos em função da concentração dos analitos no intervalo de concentração estudado, apresentando coeficientes de correlação linear (r^2) maiores que 0,99.

Os dados relacionados a equação de regressão da reta, o coeficiente de correlação linear e o intervalo linear constam na Tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros analíticos obtidos da análise das curvas analíticas na matriz fortificada para o difenoconazol e para a abamectina.

Analitos	Intervalo linear	Equação da reta	r^2
Dif	0,0100 – 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$y = -8210,25 + 6,67 \times 10^6 * x$	0,999
Aba	0,0100 – 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$y = 692,52 + 3,81 \times 10^4 * x$	0,992

Fonte: Autoria própria.

A avaliação da linearidade da curva analítica foi complementada por meio da análise de regressão linear e aplicado um teste de falta de ajuste no nível de 95 % de confiança. Os resultados da análise de regressão linear são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados da análise de regressão linear no intervalo de 95 % de confiança.

Validação da linearidade				
Analitos	Regressão		Falta de ajuste	
	$F_{regressão}^*$	p	F_{faj}^{**}	p
Dif	$3,72 \times 10^3$	0,000	0,550	0,765
Aba	155	0,000	0,140	0,988

* $F_{crítico}(0,025;1,22) = 4,30$. ** $F_{crítico}(0,025;6,16) = 2,74$. Fonte: Autoria própria.

Os resultados da análise de regressão linear indicam que há uma relação linear entre a concentração e a área de pico para a abamectina e o difenoconazol, visto que o valor de $F_{regressão}$ foi maior que o $F_{crítico}$ para ambos analitos. O valor de F_{faj} foi menor que o $F_{crítico}$, o que indica que não existe falta de ajuste do modelo linear para os dois analitos. Os valores de $p < 0,05$ para regressão e de $p > 0,05$ para o teste de falta de ajuste indicam um bom ajuste do modelo linear aos dados experimentais.

As Figura 16 e 17 mostram os gráficos de resíduos da análise de regressão para o difenoconazol e para a abamectina, respectivamente. Os gráficos de probabilidade normal e os histogramas mostram que a distribuição dos dados é normal e os histogramas não apresentam assimetria. Os gráficos de resíduos versus ajustados apresentam variância constante, pois os pontos aparecem espalhados aleatoriamente no gráfico e os gráficos de resíduos versus ordem mostram que os

resíduos são independentes, não mostram tendências e os resíduos aparecerem distribuídos aleatoriamente em torno da linha central.

Figura 16 – Gráficos de resíduos da análise de regressão para o difenoconazol.

Figura 17 – Gráfico de resíduos da análise de regressão para a abamectina.

4.4.3. Limite de detecção e de quantificação do método

Com o método de extração QuEChERS otimizado foi possível detectar e quantificar os analitos presentes em amostras de tecido de abelhas em baixa concentração utilizando LC-MS/MS. Para calcular o LD e o LQ foi utilizado o teste de Huber, no qual o limite de detecção corresponde ao primeiro ponto fora da curva de linearidade e o limite de quantificação ao primeiro ponto dentro da curva de linearidade.

Os limites de detecção e de quantificação do método foram de 0,038 e 0,076 $\mu\text{g g}^{-1}$ para ambos os analitos, respectivamente. O teste de Huber foi escolhido pois foi o método mais adequado para quantificar os analitos presentes nas amostras de tecido de abelhas.

4.4.4. Precisão e exatidão

Como descrito no item 3.5.4, foram selecionados três níveis de fortificação para cada analito. Os níveis denominados baixo, médio e alto foram 0,38; 1,9 e 5,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Os resultados de precisão e exatidão são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores de precisão intradia e interdias e exatidão para três níveis de fortificação.

Analitos	Níveis	Precisão intradia RSD (%), n = 3	Precisão interdias RSD (%), n = 6	Exatidão (%), n = 3
Aba	Baixo	2,69	11,9	114
	Médio	3,13	6,81	115
	Alto	5,36	10,3	114
Dif	Baixo	7,55	10,6	113
	Médio	3,19	4,90	106
	Alto	5,25	3,40	102

RSD (Relative Standard Desviation). Fonte: Autoria própria.

As precisões intradia e interdias apresentaram valores de RSD menores que 15 % para os dois analitos nos três níveis de concentração estudados. A exatidão está no intervalo de 80 a 120 % para os dois analitos. Sendo assim, a precisão e a exatidão estão de acordo com o estabelecido pelas agências regulamentadoras ANVISA (106), MAPA (107) e INMETRO (128).

4.4.5. Efeito matriz

O estudo do efeito matriz (EM) foi feito com base nos estudos de Matuszewski et al. (110), (111). A abamectina apresentou um valor de EM de 120,1 % e o difenoconazol apresentou um valor de 101,8 %.

Um valor de EM de 100 % indica que a resposta no solvente e na matriz foram as mesmas e nenhum efeito de matriz foi observado. Um valor maior que 100 % indica um aumento de ionização e um valor menor que 100 % indica uma supressão de ionização (110).

O efeito matriz não foi significativo para o difenoconazol (1,8 %). Para a abamectina foi observado um aumento de 20 % no coeficiente angular a partir da curva preparada na matriz em comparação com a preparada no solvente. Com o aumento do sinal analítico nas análises de efeito matriz se faz necessário compensar esse efeito. Assim, as curvas analíticas foram preparadas utilizando o extrato da matriz fortificada com os analitos antes da extração, de acordo com o estabelecido pelo MAPA (107) e a quantificação dos analitos foi feita utilizando esta mesma curva.

4.5. Bioensaios de toxicidade aguda oral e tópico

As abelhas foram expostas aos agrotóxicos estudados em diferentes concentrações, conforme descrito no item 3.6. A Figura 18 apresenta a mortalidade de abelhas para as concentrações estudadas mais o controle para os testes de

toxicidade oral e tópico. A Fig. 18 (a) e (b) para o padrão da abamectina, (c) e (d) para o Kraft, (e) e (f) para o Score e (g) e (h) para a mistura de Kraft mais Score.

Figura 18 – Gráficos de mortalidade de abelhas versus tempo de leitura para (a) Abamectina – oral, (b) Abamectina – tópico, (c) Kraft – oral, (d) Kraft – tópico, (e) Score – oral, (f) Score – tópico, (g) Kraft + Score – oral e (h) Kraft + Score – tópico (continua).

Figura 18 – Gráficos de mortalidade de abelhas versus tempo de leitura para (a) Abamectina – oral, (b) Abamectina – tópico, (c) Kraft – oral, (d) Kraft – tópico, (e) Score – oral, (f) Score – tópico, (g) Kraft + Score – oral e (h) Kraft + Score – tópico (conclusão).

A Tabela 16 apresenta o consumo de alimento para os testes de toxicidade aguda oral para o padrão da abametina, para o Kraft, para o Score e para a mistura Kraft + Score, respectivamente.

Tabela 16 – Consumo de alimento para os testes de toxicidade aguda oral.

Tratamento	Concentração de exposição ($\mu\text{g i.a./}\mu\text{L}$)	Volume consumido por abelha sobrevivente (μL)			Dose ($\mu\text{g i.a./abelha}$)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Oral - Abamectina (padrão de alta pureza)	0,00	$7,8 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^{-2}$	$1,38 \times 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
	$1,00 \times 10^{-3}$	$1,62 \times 10^{-2}$	$1,65 \times 10^{-2}$	$1,27 \times 10^{-2}$	$1,62 \times 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-5}$	$1,27 \times 10^{-5}$
	$6,00 \times 10^{-3}$	$2,03 \times 10^{-2}$	$1,34 \times 10^{-2}$	$1,16 \times 10^{-2}$	$1,22 \times 10^{-4}$	$8,05 \times 10^{-5}$	$6,96 \times 10^{-5}$
	$1,00 \times 10^{-2}$	$1,73 \times 10^{-2}$	$1,11 \times 10^{-2}$	$1,41 \times 10^{-2}$	$1,73 \times 10^{-4}$	$1,11 \times 10^{-4}$	$1,41 \times 10^{-4}$
Oral - Kraft (p. c.)	0,00	$1,55 \times 10^{-2}$	$1,57 \times 10^{-2}$	$1,90 \times 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
	$1,00 \times 10^{-3}$	$1,62 \times 10^{-2}$	$1,41 \times 10^{-2}$	$1,26 \times 10^{-2}$	$1,62 \times 10^{-5}$	$1,41 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-5}$
	$6,00 \times 10^{-3}$	$1,83 \times 10^{-2}$	$6,20 \times 10^{-3}$	$1,03 \times 10^{-2}$	$1,10 \times 10^{-4}$	$3,74 \times 10^{-5}$	$6,21 \times 10^{-5}$
	$1,00 \times 10^{-2}$	$1,19 \times 10^{-2}$	$5,80 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-2}$	$1,19 \times 10^{-4}$	$5,83 \times 10^{-5}$	$1,44 \times 10^{-4}$
Oral - Score (p. c.)	0,00	$1,76 \times 10^{-2}$	$2,01 \times 10^{-2}$	$2,24 \times 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
	2,50	$7,80 \times 10^{-3}$	$1,62 \times 10^{-2}$	$2,18 \times 10^{-2}$	$1,94 \times 10^{-2}$	$4,05 \times 10^{-2}$	$5,46 \times 10^{-2}$
	5,00	$5,40 \times 10^{-3}$	$9,00 \times 10^{-3}$	$2,73 \times 10^{-2}$	$2,68 \times 10^{-2}$	$4,52 \times 10^{-2}$	$1,36 \times 10^{-1}$
	10,0	$5,70 \times 10^{-3}$	$1,96 \times 10^{-2}$	-	$5,70 \times 10^{-2}$	$1,96 \times 10^{-1}$	-
Oral – Mistura (p. c.)	0,00	$1,74 \times 10^{-2}$	$1,45 \times 10^{-2}$	$1,51 \times 10^{-2}$	0,00	0,00	0,00
	$1,00 \times 10^{-3}$	$7,40 \times 10^{-3}$	$8,70 \times 10^{-3}$	$7,70 \times 10^{-3}$	$7,44 \times 10^{-6}$	$8,67 \times 10^{-6}$	$7,73 \times 10^{-6}$
	$6,00 \times 10^{-3}$	$5,00 \times 10^{-3}$	$4,20 \times 10^{-3}$	$1,37 \times 10^{-2}$	$3,02 \times 10^{-5}$	$2,51 \times 10^{-5}$	$8,22 \times 10^{-5}$
	$1,00 \times 10^{-2}$	$9,00 \times 10^{-3}$	$7,10 \times 10^{-3}$	$2,31 \times 10^{-2}$	$8,96 \times 10^{-5}$	$7,10 \times 10^{-5}$	$2,31 \times 10^{-4}$

i.a. (ingrediente ativo)

Fonte: Autoria própria.

Por meio da análise dos gráficos da Figura 18 foi possível notar que não houve mortalidade significativa para todas as amostras do controle, como já era esperado, tendo em vista que as abelhas do controle não foram expostas aos agrotóxicos. De acordo com as normas da OECD 1998a, b (115), (116) para que o teste seja válido a mortalidade média para o número total de controles não deve exceder 10 % no final do teste.

A NOEC corresponde a concentração de ensaio que não produz efeitos significativos do ponto de vista estatístico quando comparada com o controle. (129) Analisando os gráficos da Figura 18, os resultados obtidos para a NOEC no tempo de leitura de 24 horas mostram que as abelhas que foram expostas ao padrão de abamectina e ao Kraft, ambos via oral, não apresentaram mortalidade neste tempo de leitura e apresentaram o mesmo consumo de alimento, conforme mostrado na Tabela 16. Já para a via de exposição tópica, a mortalidade foi maior para o padrão de abamectina. Ainda neste tempo de leitura, as abelhas que foram expostas ao Score via oral foram as que apresentaram a maior mortalidade (31 %).

Para a NOEC no tempo de leitura de 48 horas, as abelhas que foram expostas ao padrão de abamectina e ao Kraft, ambos via oral, também não apresentaram mortalidade, porém, o consumo de alimento foi maior para o padrão de abamectina. Já para a via de exposição tópica a mortalidade foi novamente maior para o padrão de abamectina. Neste tempo de leitura, as abelhas que foram expostas a mistura via oral apresentaram a maior mortalidade (69 %).

Para a NOEC no tempo de leitura de 72 horas, as abelhas expostas ao padrão de abamectina via oral apresentaram mortalidade ligeiramente maior do que as abelhas expostas ao Kraft via oral e o consumo de alimento também foi ligeiramente maior para a abamectina. Para a via de exposição tópica para o padrão de abamectina e para o Kraft, a mortalidade foi novamente maior para o padrão de abamectina. Neste tempo de leitura, as abelhas que foram expostas a mistura via oral novamente apresentaram a maior mortalidade (94 %).

Comparando os resultados obtidos para os bioensaios de toxicidade aguda oral para a abamectina e o Kraft, Figura 18 (a) e (c), para a segunda concentração testada (CL_{50}), as abelhas que receberam o Kraft em seu alimento apresentaram mortalidade ligeiramente maior nos três tempos de leitura do que as que receberam a abamectina. No entanto, o consumo de alimento para o Kraft foi menor nos três períodos de tempo do teste, o que indica que os compostos presentes na formulação do produto

comercial podem ter interferido na palatabilidade e consequente redução do consumo pelas abelhas.

Para a terceira concentração testada (acima da CL₅₀), a mortalidade das abelhas que receberam o Kraft em seu alimento foi ligeiramente maior nos tempos de leitura de 24 e 48 h e maior em 72 h chegando a atingir 100 % de mortalidade. Assim como na segunda concentração testada (CL₅₀), o consumo de alimento para o Kraft foi novamente menor nos três tempos de leitura.

Comparando os resultados obtidos para os bioensaios de toxicidade aguda tópica para a abamectina e o Kraft, Figura 18 (b) e (d), é possível notar um comportamento diferente quando comparado aos bioensaios orais. Para a segunda dose testada (DL₅₀), as abelhas que receberam a abamectina apresentaram mortalidade maior nos tempos de leitura de 24 e 48 h e ligeiramente maior em 72 h. Para a dose acima da DL₅₀, a mortalidade foi maior para a abamectina nos três tempos de leitura atingindo mortalidade de 78 % em 72 h enquanto no mesmo tempo foi observada a mortalidade de apenas 19 % para o Kraft.

Del Sarto et al. (130) estudaram a toxicidade da abamectina, deltametrina e metamidofós para a abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* e para a abelha *Apis mellifera*. As abelhas foram expostas oralmente à formulação comercial do inseticida abamectina (Vermitec 18 EC) e o valor encontrado para a DL₅₀ (24 h) via oral foi de 0,015 µg i.a./abelha para a *M. quadrifasciata* e 0,011 µg i.a./abelha para *A. mellifera*. Sendo assim, a abelha utilizada neste estudo (*M. scutellaris*) se mostrou mais suscetível aos efeitos da abamectina apresentando um valor de DL₅₀ (48 h) via oral de 0,0002 µg i.a./abelha.

Del Sarto et al. (130) também determinaram o valor de DL₅₀ (24 h) via tópica para a abamectina utilizando o padrão de alta pureza. O valor obtido foi de 134,6 µg i.a./abelha para a *M. quadrifasciata* e 7,8 µg i.a./abelha para *A. mellifera*. Novamente, a *M. scutellaris* se mostrou mais suscetível aos efeitos da abamectina apresentando um valor de DL₅₀ (48 h) via tópica de 0,028 µg i.a./abelha. Nesse caso, a *M. scutellaris* é cerca de 4.807 vezes mais suscetível a abamectina que *M. quadrifasciata* e cerca de 278 vezes mais sensível que *A. mellifera*.

O bioensaio de toxicidade aguda oral para o Score, Figura 18 (e), apresentou um consumo de alimento no tempo de leitura de 24 h para a segunda e a terceira concentração (CL₅₀ e acima da CL₅₀) bem menor quando comparado aos testes orais para a abamectina e para o Kraft no mesmo tempo de leitura e uma mortalidade alta

para as duas concentrações, sendo um indicativo de que as abelhas podem ter recusado o alimento contaminado e algumas delas podem ter morrido de fome. No tempo de leitura de 48 h o consumo foi maior, indicativo de que as abelhas sobreviventes estavam com fome e então se alimentaram e um tempo depois morreram, pois, a mortalidade atingiu 97 % para a segunda concentração e 100 % para a terceira concentração.

No bioensaio de toxicidade aguda tópica para o Score, Figura 18 (f), as abelhas apresentaram um comportamento diferente das abelhas do bioensaio oral. Para a segunda e terceira doses (DL_{50} e acima da DL_{50}) foram registradas mortalidade apenas no tempo de leitura de 24 h, no qual a segunda dose causou mortalidade de 54 % das abelhas e a terceira dose causou mortalidade de 59 %.

De acordo com o banco de dados PPDB (82), o valor da DL_{50} via oral para o difenoconazol é $> 100 \mu\text{g i.a./abelha}$ e via tópica é $> 177 \mu\text{g i.a./abelha}$, ambos valores para a abelha *A. mellifera*. Esses dados mostram que a abelha *M. scutellaris* também é mais sensível aos efeitos do difenoconazol, apresentando DL_{50} (48 h) via oral de $0,0268 \mu\text{g i.a./abelha}$ e DL_{50} (48 h) via tópica de $67,0 \mu\text{g i.a./abelha}$. Nesse caso, *M. scutellaris* é cerca de 3.731 vezes mais suscetível ao difenoconazol do que *A. mellifera* quando exposta via oral e cerca de 2,64 vezes mais suscetível ao difenoconazol do que *A. mellifera* quando exposta via tópica.

O bioensaio de toxicidade aguda oral para a mistura Kraft + Score, Figura 18 (g), apresentou um consumo de alimento no tempo de leitura de 24 h para a primeira e segunda concentração bem menor quando comparado aos demais testes orais. Este comportamento foi similar ao relatado para o bioensaio oral para o Score, o que pode confirmar o fato das abelhas terem recusado o alimento contaminado. Para a terceira concentração, o consumo de alimento foi ligeiramente maior, o que explica o fato de a taxa de mortalidade também ter sido maior quando comparada as outras concentrações.

No tempo de leitura de 48 h a mortalidade foi aumentando à medida que aumentou a concentração de Kraft e a maioria das abelhas morreram nesse tempo de leitura.

No bioensaio de toxicidade aguda tópica para a mistura Kraft + Score, Figura 18 (h), as abelhas apresentaram um comportamento diferente das abelhas do bioensaio oral. As três doses testadas apresentaram baixa mortalidade nos três

tempos de leitura. O mesmo comportamento foi observado para o bioensaio tópico para o Kraft.

Comparando os bioensaios de toxicidade aguda oral entre a mistura (Kraft + Score) e o Kraft (individual) é possível notar que a mortalidade foi bem maior para a mistura.

Efeitos interativos entre compostos são observados quando a toxicidade de uma mistura de agrotóxicos é mais ou menos tóxica do que o esperado com base na toxicidade da substância mais tóxica. Uma interação agonística é definida pelo aumento da toxicidade da combinação de agrotóxicos, enquanto uma interação antagônica é caracterizada pela diminuição da toxicidade. (131)

Substâncias que apresentam mesmo modo de ação podem interagir de forma agonística aditiva (efeito final produzido pelos compostos é igual à soma dos efeitos produzidos individualmente), enquanto as substâncias que apresentam diferentes modos de ação podem interagir de forma agonística sinérgica (efeito final produzido pelos compostos é maior do que a soma dos efeitos individuais). (131), (132)

No teste de toxicidade aguda oral para a mistura Kraft e Score foi observada interações sinérgicas para primeira concentração testada (NOEC), no qual a mortalidade atingiu 94 % para a mistura no tempo de leitura de 72 h, enquanto que para o Kraft individual a mortalidade foi de apenas 16 %. Para a segunda concentração (CL_{50}) da mistura, nas primeiras 24 h foi observada uma mortalidade semelhante tanto para a mistura (4 %) quanto para o Kraft individual (3 %), já no tempo de leitura de 48 h, a mortalidade foi de 89 % para a mistura e 57 % para o Kraft individual, portanto, novamente foi observada interações sinérgicas para esse tratamento.

Para a terceira concentração (acima da CL_{50}) da mistura, a mortalidade foi de 34 % em 24 h, enquanto que para o Kraft individual a mortalidade foi de apenas 3 %. No tempo de leitura de 48 h, a mistura apresentou uma mortalidade de 97 %, enquanto o Kraft individual apresentou uma mortalidade de 63 %. Os resultados obtidos mostraram que ocorreram interações sinérgicas para as três concentrações das misturas dos agrotóxicos.

Nos testes de toxicidade aguda tópica para a mistura Kraft e Score, a mortalidade foi maior nos três tempos de leitura para a primeira dose (NOEC), quando comparados com o teste para o Kraft individual. Para a segunda (DL_{50}) e terceira doses (acima da DL_{50}) da mistura, uma maior mortalidade foi observada em 24 h, no entanto, para os demais tempos de leitura, a mortalidade foi próxima tanto para a

mistura quanto para o Kraft individual. Ainda assim, interações sinérgicas ocorreram no tempo de leitura de 24 h para a mistura dos agrotóxicos.

As abelhas dos bioensaios de toxicidade aguda oral e tópica foram utilizadas, posteriormente, na determinação da abamectina e do difenoconazol a partir do método validado, nos ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamina e nos estudos utilizando biomarcadores bioquímicos.

4.6. Determinação da abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido de abelhas

Como descrito anteriormente, as abelhas dos bioensaios de toxicidade aguda oral e tópica foram utilizadas na determinação da abamectina e do difenoconazol a partir do método analítico validado utilizando a técnica LC-MS/MS.

As amostras analisadas incluíram abelhas mortas amostradas em diferentes tempos de exposição; abelhas que permaneceram vivas até o final do experimento; e abelhas dos grupos controle. Os dados descritos incluíram a exposição aos produtos comerciais Kraft e Score individuais, sua mistura, bem como ao padrão de alta pureza da abamectina individual.

As concentrações da abamectina e do difenoconazol foram determinadas utilizando as equações da reta (Tabela 13) obtidas para as curvas analíticas na matriz pré-fortificada dos dois compostos.

Considerando a mortalidade observada, foram selecionadas amostras para a determinação em tecidos de abelhas. Para a exposição oral, os resultados do consumo de alimento por tratamento e a quantificação nos tecidos estão apresentados na Figura 19. Como observado nesta figura, para o padrão de alta pureza da abamectina (19A), os agrotóxicos não foram detectados para o grupo controle e estavam abaixo do limite de detecção ($< LD$) para as outras amostras. No entanto, para o produto comercial Kraft (19B), a abamectina foi detectada para a exposição em CL_{50} : 0,71 e 0,85 $\mu g\ g^{-1}$; e acima da CL_{50} : 1,2 e 0,65 $\mu g\ g^{-1}$ para amostras em 48 e 72 h, respectivamente. Além da detecção nos tecidos, o consumo de alimento para a exposição ao Kraft foi menor do que as abelhas expostas ao padrão da abamectina.

Figura 19 – Concentração da abamectina e do difenoconazol em tecidos de *M. scutellaris* (linha contínua) e dose total da exposição oral (linha tracejada) para Abamectina (A); Kraft (B); Score (C); Kraft + Score (D) nas amostras: NOEC (1); CL₅₀ (2); e acima da CL₅₀ (3); abelhas vivas (v); abelhas mortas (m).

Com base nos resultados, a detecção da abamectina nos tecidos das abelhas expostas ao produto comercial pode indicar uma inibição do metabolismo de desintoxicação por outros ingredientes inativos da formulação do produto comercial e consequente acúmulo desse inseticida nas abelhas. A toxicidade de ingredientes inativos em abelhas já foi discutida, uma vez que os ingredientes ativos não são introduzidos sozinhos em aplicações de campo, resultando em diferentes efeitos fisiológicos. (130), (133) De acordo com Mullin (133), a composição de formulações comerciais pode incluir: surfactantes, intensificadores de penetrante, espalhadores, adesivos e co-solventes. Em estudos anteriores envolvendo a exposição da abelha sem ferrão *M. quadrifasciata* ao produto comercial, o Vermitec 18EC (i. a. abamectina) demonstrou uma toxicidade de 8.970 vezes maior que o padrão de alta pureza da abamectina. (130)

Para a exposição ao Score individual, o acúmulo de difenoconazol nos tecidos de *M. scutellaris* foi observado para todas as concentrações testadas (Figura 19C) e segue a ordem: 24 < 48 h, de acordo com o aumento da dose de exposição. Esse

contato contínuo com alimentos contaminados pode levar a um acúmulo nos tecidos, onde a taxa de depuração é suprimida pela absorção. O consumo de alimento observado para o Score, além de quantidades inferiores às observadas para a exposição à abamectina e ao Kraft, foi fornecido em doses mais altas e foi suficiente para bioacumular e ser detectado nos tecidos das abelhas. No entanto, esse consumo mais baixo pode ser um indicativo de que outros ingredientes do produto comercial, incluindo o forte odor desta formulação, podem contribuir para essa recusa de alimento. O mesmo comportamento foi observado para a mistura (Kraft + Score). O contato contínuo com alimentos contaminados pode levar ao acúmulo em tecidos, onde a taxa de depuração é suprimida pela taxa de absorção.

Na mistura (Kraft + Score), a abamectina foi detectada em apenas uma amostra (3_48h) na concentração de $0,035 \mu\text{g g}^{-1}$. No entanto, o difenoconazol, foi detectado em todas as amostras de tecido, tanto na mistura como para o Score individual. Na mistura comercial (Figura 19D), a faixa de concentração do difenoconazol foi de $0,45$ a $680 \mu\text{g g}^{-1}$, com a maior concentração observada no tratamento 3 em 48h, quase 40 vezes a concentração observada na exposição ao Score individual ($17,2 \mu\text{g g}^{-1}$) para a mesma concentração de exposição. Como observado acima, a presença dos ingredientes inativos em ambos os produtos comerciais pode levar a um maior acúmulo do difenoconazol nos tecidos devido à possível inibição do metabolismo da abelha.

Para a exposição tópica (Figura 20), as abelhas receberam apenas uma dose com as concentrações descritas na Tabela 6. A abamectina não foi detectada nas abelhas expostas ao padrão de abamectina (Figura 20A). Para a exposição ao Kraft (Figura 20B), a concentração de abamectina nos tecidos foi detectada no tratamento 2 (DL_{50}) em 48 h ($0,83 \mu\text{g g}^{-1}$) e 72 h ($0,78 \mu\text{g g}^{-1}$) e no tratamento 3 (acima da DL_{50}) em 48 h ($1,25 \mu\text{g g}^{-1}$) e 72 h ($0,48 \mu\text{g g}^{-1}$). Na mistura Kraft + Score não foi detectada abamectina.

Figura 20 – Concentração da abamectina e do difenoconazol nos tecidos de *M. scutellaris* (linha contínua) e dose total da exposição tópica (linha tracejada) para Abamectina (A), Kraft (B), Score (C) e Kraft + Score (D) nas amostras: NOEC (1); DL₅₀ (2); e acima da DL₅₀ (3); abelhas vivas (v); abelhas mortas (m).

Como observado na Figura 21, as concentrações da abamectina do produto comercial individual via exposição tópica foram muito semelhantes às concentrações observadas para a exposição oral. Esse aspecto pode indicar que, independente da via de exposição, por deriva de pulverização ou mesmo por alimentos contaminados (neste caso, relacionados ao consumo de néctar), esse inseticida presente no produto comercial (Kraft® 36EC) pode se bioacumular nos tecidos das abelhas. No entanto, além do acúmulo nos tecidos ter sido semelhante, a mortalidade foi até 5 vezes maior nas abelhas expostas oralmente a esse produto comercial. Esse fato pode estar relacionado à ingestão direta dos agrotóxicos testados por via oral, onde a metabolização ocorrerá no intestino das abelhas, no entanto, na exposição tópica, a transferência dos agrotóxicos e seus efeitos no metabolismo dependerão primeiro da permeação pela cutícula (134)

Figura 21 – Concentração da abamectina (presente no produto comercial Kraft) nos tecidos de *M. scutellaris* para exposição oral e tópica em amostras dos tratamentos 2 (CL₅₀ e DL₅₀) e 3 (acima da CL₅₀ e DL₅₀) por 48 e 72 h.

Para o difenoconazol, a absorção via exposição tópica foi observada no produto comercial individual (Score) (Figura 20C) e na mistura (Figura 20D), e a mortalidade das abelhas ocorreu principalmente nas primeiras 24 h de exposição, com um pequeno aumento em 48 e 72 h. Como observado nos resultados, a concentração de difenoconazol nos tecidos de *M. scutellaris* aumentou com a dose aplicada na exposição ao Score, apresentando maior concentração para as abelhas mortas do tratamento 3 em 24 h (6.361 µg g⁻¹). Devido à baixa mortalidade (%), as abelhas vivas puderam ser amostradas dos três tratamentos na exposição ao Score, e o aumento da concentração nos tecidos foi observado após o aumento da dose de exposição (Figura 20C) apresentando concentração de difenoconazol de 81,6 µg g⁻¹ para as abelhas do tratamento 1 mortas em 24 h e 85,7 µg g⁻¹ para as abelhas do tratamento 1 vivas. Diferentemente da exposição ao Kraft, onde as concentrações nos testes oral e tópico eram muito semelhantes, o acúmulo de difenoconazol para o Score nos tecidos via exposição tópica foi maior do que na exposição via oral. Este resultado pode ser associado aos níveis mais altos de exposição usados para a exposição dos tópicos (quase 10 vezes o teste oral). Nos resultados obtidos, a mortalidade das abelhas foi maior na exposição oral. Nesse sentido, o fato de as abelhas receberem uma ingestão contínua de agrotóxicos pode afetar mais severamente do que uma dose única.

Na mistura comercial (Figura 20D) foram obtidas menores concentrações de difenoconazol, e a maior concentração foi obtida para o mesmo tratamento (3_24h_m,

370 $\mu\text{g g}^{-1}$). No entanto, no caso da mistura, a mesma dose de difenoconazol foi aplicada em todos os tratamentos (10,0 $\mu\text{g abelha}^{-1}$), variando apenas a concentração da abamectina.

Uma ampla variedade de fatores pode atuar sobre a suscetibilidade das abelhas a agrotóxicos e inclui: (a) diferentes modos de ação dos ingredientes ativos; (b) diferenças morfológicas e fisiológicas entre as espécies de abelhas; (c) formas e taxas de exposição. (130) O endpoint de CL_{50} (48 h) usada neste estudo para *M. scutellaris* (0,006 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) com DL_{50} (48 h) de 0,0002 $\mu\text{g i. a. abelha}^{-1}$ foi menor do que os endpoints encontrados para a exposição à abamectina DL_{50} (24 h) para *M. quadrifasciata* (0,015 $\mu\text{g i.a. abelha}^{-1}$) ou *A. mellifera* (0,011 $\mu\text{g i.a. abelha}^{-1}$) (130), demonstrando a sensibilidade dessa espécie. *M. scutellaris* também foi exposta a outros agrotóxicos como imidacloprido com CL_{50} (24 h) de 0,002 $\mu\text{g i.a. } \mu\text{L}^{-1}$ (135) e fipronil com CL_{50} (48 h) de 0,000011 $\mu\text{g i.a. } \mu\text{L}^{-1}$ (1).

Para agrotóxicos, interações aditivas podem ocorrer quando substâncias diferentes apresentam mesmo modo de ação e interações sinérgicas quando as substâncias apresentam modo de ação diferentes. (131) Considerando os diferentes modos de ação desses agrotóxicos, nos quais a abamectina pode afetar diretamente o sistema nervoso e o difenoconazol, como fungicida, afeta a síntese de esterol nos fungos, espera-se uma resposta independente. Moreira et al. (123) realizaram testes de toxicidade aguda com misturas de Kraft® 36 EC e Score® 250 EC em cladocera neotropical e observaram que em baixas concentrações das misturas dos agrotóxicos ocorreu antagonismo e em altas concentrações ocorreu sinergismo. Para peixes, Sanches et al. (124) também realizaram testes de toxicidade aguda com as misturas Kraft® 36 EC e Score® 250 EC em peixe-zebra adulto (*Danio rerio*) e os resultados mostraram que a mistura dos dois agrotóxicos causou maior toxicidade (sinergismo) ao peixe do que quando testados individualmente. Da mesma forma, esse efeito sinérgico foi observado para *M. scutellaris*, tendo que a mortalidade foi aumentada para todos os tratamentos testados com a mistura dos produtos comerciais.

Nas abelhas, Schmuck et al. (136) também observaram um efeito sinérgico da combinação entre fungicidas inibidores da biossíntese de ergosterol e o inseticida tiaclopride em *Apis mellifera*. Em testes de laboratório, os fungicidas procloraz e tebuconazol aumentaram fortemente a toxicidade do inseticida, ocorrendo mortalidade de 87 e 70 % das abelhas tratadas, respectivamente. Johnson et al. (131) testaram combinações entre o inseticida/acaricida tau-fluvalinato e fungicidas

inibidores da biossíntese de esteróis (procloraz, propiconazol, fenbuconazol, metconazol e miclobutanil) em abelhas *Apis mellifera*. Dos fungicidas testados, quatro aumentaram a toxicidade do tau-fluvalinato de maneira dependente da dose e os autores atribuíram esse sinergismo a inibição das enzimas P450. No entanto, esse sinergismo, considerando uma exposição binária de agrotóxicos de diferentes classes e modos de ação, pode diferir. Para as abelhas solitárias *Osmia bicornis*, Azpiazu et al. (137) não observaram efeitos sinérgicos na exposição ao inseticida imidacloprido e ao fungicida miclobutanil exposto oralmente via néctar e pólen em níveis ambientais, indicando que esse sinergismo pode estar relacionado à concentração de exposição.

Para a abamectina, a inibição do metabolismo da desintoxicação não é relatada. O metabolismo é identificado em algumas espécies e relacionado ao sistema de monooxigenase P450 (138), (139), (140) Nesse sentido, como discutido anteriormente, esse composto pode ser eliminado do organismo nas concentrações testadas sem acúmulo; no entanto, os ingredientes inativos podem atuar nessa inibição e permitir a concentração do ingrediente ativo, aumentando a toxicidade das formulações comerciais aplicadas em campo. Diferentemente, os fungicidas azólicos, como o difenoconazol, podem ser considerados inibidores das enzimas monooxigenases P450, responsáveis pela metabolização dos xenobióticos (141), (142) Essa possível inibição do metabolismo da desintoxicação de P450 observada para produtos comerciais contendo abamectina, difenoconazol e suas misturas pode resultar no acúmulo dos agrotóxicos investigados nos tecidos das abelhas.

Através da determinação da abamectina e do difenoconazol em tecidos de abelhas expostas foi possível verificar a relação entre acúmulo e efeito de mortalidade. Porém, os efeitos subletais devem ser considerados, uma vez que esses agrotóxicos tenham sido acumulados nos tecidos e os efeitos sobre a saúde do organismo possam aparecer ainda mais durante a vida, afetando a sobrevivência da colmeia.

4.7. Análises bioquímicas

Os agrotóxicos são conhecidos por causar estresse oxidativo em uma vasta gama de animais, incluindo insetos. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) excede o mecanismo natural de defesa

antioxidante de um organismo e esse desequilíbrio pode resultar de uma superabundância de estressores produtores de ROS no ambiente. (143)

Enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT são essenciais na defesa de um organismo contra o estresse oxidativo e ambas foram associadas à toxicidade de agrotóxicos em insetos. Além dessas duas enzimas antioxidantes, as enzimas GST, GPx e GR também foram relatadas como ocorrendo em insetos. O aumento dos níveis de enzimas antioxidantes seria, portanto, um indicativo da tentativa dos organismos em lidar com um ambiente de estresse oxidativo. (143)

4.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a análise qualitativa das enzimas presentes nas amostras de tecido de abelhas foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Esta técnica separa as proteínas com base em seu tamanho.

As amostras analisadas incluíam abelhas expostas as maiores concentrações testadas (acima da DL_{50} e CL_{50}); abelhas mortas amostradas em diferentes tempos de exposição; abelhas que permaneceram vivas até o final do experimento e abelhas do grupo controle. Os dados descritos incluíam a exposição oral e tópica aos produtos comerciais Kraft e Score individuais, sua mistura, bem como ao padrão de alta pureza da abamectina individual.

Para entendimento das amostras analisadas nos géis a seguinte legenda foi adotada:

- MMM: marcador de massa molar;
- C+: controle positivo (abelhas que foram coletadas e em seguida mantidas em freezer);
- C-: controle negativo (abelhas do teste de exposição que não receberam os agrotóxicos);
- Aba: abamectina (padrão de alta pureza);
- K: Kraft (produto comercial, i.a. abamectina);
- S: Score (produto comercial, i.a. difenoconazol);
- KS: mistura de Kraft e Score;

- v: abelhas vivas;
- m: abelhas mortas.

As enzimas presentes no extrato das amostras de tecido de abelhas e suas respectivas massas são mostradas na Tabela 17 e foram obtidas do banco de dados UniProtKB (144) para a abelha *A. mellifera*.

Tabela 17 – Principais enzimas analisadas durante o estudo bioquímico e suas respectivas massas.

Enzima	Catalase (CAT)	Peroxidase (PE)	Glu. peroxidase (GPx)	Glu. redutase (GR)	Sup. dismutase (SOD)
Massa (kDa)	55	40	23	56	15

Fonte: Autoria própria.

As Figuras 22 e 23 apresentam os géis para as amostras do bioensaio de toxicidade aguda oral e as Figuras 24 e 25 para o tópico.

Figura 22 – Análise eletroforética SDS-PAGE em gel das proteínas do extrato do tecido de abelha. 1– C+; 2 – Aba_C_-72h_v; 3 – Aba_72h_m; 4 – Aba_72h_v; 5 – MMM; 6 – C+; 7 – K_C_-72h_v; 8 – K_48h_m; 9 – K_72h_m. Teste oral.

Figura 23 – Análise eletroforética SDS-PAGE em gel das proteínas do extrato do tecido de abelha. 1 – C+; 2 – S_C-_72h_v; 3 – S_24h_m; 4 – S_48h_m; 5 – MMM; 6 – C+; 7 – KS_C-_72h_v; 8 – KS_24h_m; 9 – KS_48h_m. Teste oral.

Figura 24 – Análise eletroforética SDS-PAGE em gel das proteínas do extrato do tecido de abelha. 1 – C+; 2 – Aba_C-_72h_v; 3 – Aba_72h_m; 4 – Aba_72h_v; 5 – MMM; 6 – C+; 7 – K_C-_72h_v; 8 – K_72h_m; 9 – K_72h_v. Teste tópico.

Figura 25 – Análise eletroforética SDS-PAGE em gel das proteínas do extrato do tecido de abelha. 1 – C+; 2 – S_C-_72h_v; 3 – S_72h_m; 4 – S_72h_v; 5 – MMM; 6 – C+; 7 – KS_C-_72h_v; 8 – KS_72h_m; 9 – KS_72h_v. Teste tópico.

Por meio da análise dos géis (Figuras 22, 23, 24 e 25) foi possível notar a presença de todas as enzimas alvo desse estudo. As enzimas CAT, PE, GPx e GR se mostraram em quantidades constantes para todas as amostras analisadas, no entanto, houve uma pequena variação da enzima SOD para algumas amostras.

Para a exposição oral ao padrão de alta pureza da abamectina (Figura 22), as amostras representadas pelos números 3 (Aba_72h_m) e 4 (Aba_72h_v) a enzima SOD se mostrou levemente proeminente quando comparadas aos controles (amostras 1 e 2), podendo ser um indicativo de que as abelhas que se alimentaram da solução contendo uma alta concentração de abamectina apresentaram suas taxas enzimáticas mais elevadas devido a um maior gasto metabólico para a degradação da toxina. Entretanto, quando as abelhas foram expostas via oral ao produto comercial Kraft (Figura 22) foi observado um efeito contrário a exposição oral ao padrão de alta pureza da abamectina. A expressão da enzima SOD foi ligeiramente menor para as amostras representadas pelos números 8 (K_48h_m) e 9 (K_72h_m) quando comparadas as amostras do grupo controle (6 e 7).

Quando a exposição das abelhas foi feita via tópica ao padrão de alta pureza da abamectina (Figura 24) não foi observada alteração para a expressão da SOD

entre as amostras expostas (3 e 4) quando comparadas as amostras do grupo controle (1 e 2). Já com a aplicação do produto comercial Kraft (Figura 24), a expressão da SOD foi menor para a amostra 9 (K_72h_v) quando comparada as demais amostras (6, 7 e 8). Esse mesmo efeito também foi observado para a exposição oral ao Kraft. Ainda no gel da Figura 24 foi possível observar a presença de bandas proeminentes com massas molares menores que 14,4 kDa. Nos demais géis essas bandas não estavam presentes ou estavam presentes em menor expressão.

Para a exposição oral e tópica do produto comercial Score (Figuras 23 e 25) não foi observada alteração para a expressão da SOD entre as amostras expostas e as amostras dos grupos controles.

As abelhas expostas via oral a mistura dos produtos comerciais Kraft e Score (Figura 23) apresentaram a expressão da enzima SOD ligeiramente menor apenas para a amostra 9 (K_72h_v) quando comparada as amostras dos grupos controle. O mesmo comportamento foi observado para as abelhas expostas via tópica a mistura dos produtos comerciais Kraft e Score (Figura 25), na qual a expressão da SOD foi ligeiramente menor para as amostras 8 (KS_72h_m) e 9 (KS_72h_v) quando comparadas a amostra 6 do grupo controle.

Chakrabarti et al. (143) analisaram o efeito de agrotóxicos com relação ao estresse oxidativo em laboratório e em populações de campo de duas espécies de abelhas indianas (*Apis dorsata* e *A. cerana*) examinando uma combinação de biomarcadores, por exemplo, SOD, CAT e xantina oxidase (XOX). No laboratório as abelhas foram alimentadas com concentrações variáveis de três agrotóxicos (dimetoato, cipermetrina e endossulfam) e foi constatado um aumento significativo nos níveis de atividade da SOD e da CAT nas duas espécies de abelhas.

Diante dos resultados obtidos neste estudo e dos resultados obtidos no estudo de Chakrabarti et al. (143) percebe-se a necessidade do uso de uma técnica mais sensível para determinar os níveis de atividade das enzimas antioxidantes.

4.7.2. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica

Os níveis de MDA em organismos é um indicador da peroxidação lipídica decorrente de efeitos negativos e estresse oxidativo gerado pela exposição a diversos contaminantes.

O MDA foi medido através da sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), o qual produziu o complexo MDA-TBA de cor rósea sendo detectado por HPLC-DAD-UV, conforme o cromatograma apresentado na Figura 26.

Figura 26 – Cromatograma do complexo MDA-TBA na concentração de 10,0 pmol mL⁻¹ utilizando HPLC-DAD-UV em 532 nm.

O tempo de retenção do complexo MDA-TBA foi de 4,2 minutos e o tempo total da análise foi de 8 minutos.

Foi feita uma curva analítica de MDA em tampão Tris-HCl 0,10 mol L⁻¹ pH 8,0 + TMP + TBA nas concentrações de 1,00; 2,00; 3,00; 5,00 e 10,0 pmol mL⁻¹ de MDA e a curva apresentou $r^2 = 0,9$, com equação da reta sendo $y = 14,85 * x$.

A partir da equação da reta obtida da curva analítica foi possível determinar a concentração de MDA nas amostras de tecido de abelhas.

As amostras de tecido de abelhas analisadas incluíram abelhas que permaneceram vivas até o final do experimento, pois assim foi possível garantir que estas morreram no mesmo tempo e foram expostas ao mesmo nível de estresse, e abelhas dos grupos controle.

Os dados descritos incluíram a exposição oral e tópica aos produtos comerciais Kraft e Score individuais, sua mistura, bem como ao padrão de alta pureza da abamectina individual. A Figura 27 mostra as concentrações de MDA encontradas nas amostras de tecido de abelhas.

Figura 27 – Concentração do MDA em amostras de tecido de abelhas sobreviventes para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL_{50} e CL_{50} (2); e acima da DL_{50} e CL_{50} (3) (continua).

Figura 27 – Concentração do MDA em amostras de tecido de abelhas para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL₅₀ e CL₅₀ (2); e acima da DL₅₀ e CL₅₀ (3); abelhas vivas (v) (conclusão).

Para as amostras da exposição oral ao padrão de alta pureza da abamectina (Fig. 27a) foi observado que os níveis de MDA diminuíram com o aumento da concentração de abamectina na exposição. Nessa mesma Figura foi observado que as abelhas do grupo controle apresentaram uma concentração elevada de MDA, indicativo de que as abelhas do controle também estavam em condição de estresse. Entretanto, quando as abelhas foram expostas via oral ao produto comercial Kraft (Figura 27c), apenas as abelhas expostas ao tratamento 1 (NOEC) e as abelhas do grupo controle sobreviveram até o final do experimento, portanto, a concentração de MDA foi avaliada somente para essas amostras. O resultado obtido não mostrou diferença significativa entre as concentrações de MDA para as amostras do grupo controle e do tratamento 1, corroborando com os resultados obtidos para a enzima SOD no gel da Figura 22, na qual não foi observada diferença entre a expressão dessa enzima entre as amostras do grupo controle e dos demais tratamentos.

Quando a exposição das abelhas foi realizada por via tópica ao padrão de alta pureza da abamectina (Figura 27b) a concentração do MDA aumentou para as amostras do tratamento 2 (DL₅₀) e do tratamento 3 (acima da DL₅₀). Já com a utilização do produto comercial Kraft não foi observada diferença significativa entre as amostras do grupo controle e dos demais tratamentos. O mesmo comportamento foi observado para as amostras da exposição oral ao Kraft.

Para a exposição oral ao produto comercial Score (Figura 27e), assim como para a exposição oral ao produto comercial Kraft, apenas as abelhas expostas ao tratamento 1 (NOEC) e as abelhas do grupo controle sobreviveram até o final do experimento, sendo assim, a concentração de MDA foi avaliada somente para essas amostras. O resultado obtido não mostrou diferença significativa entre as concentrações de MDA para as amostras do grupo controle e do tratamento 1. Todavia, com a exposição tópica ao produto comercial Score (Figura 27f), a concentração do MDA diminuiu para as amostras dos três tratamentos quando comparadas ao grupo controle e as amostras do tratamento 2 (DL₅₀) apresentou a menor concentração.

Ao avaliar o efeito da mistura dos produtos comerciais Kraft e Score (Figura 27g), foi observado que com a exposição oral a concentração do MDA aumentou para as amostras dos tratamentos 1 (NOEC) e 3 (acima da CL₅₀), sendo maior para as amostras do tratamento 3, que recebeu a maior concentração do Kraft. Já com a exposição tópica a mistura dos produtos comerciais Kraft e Score (Figura 27h), a concentração de MDA foi significativa para as amostras do tratamento 2 (DL₅₀), mas, interessante foi menor do que a concentração para as amostras do grupo controle.

4.7.3. Determinação da atividade enzimática da GST

Os resultados obtidos para a dosagem da atividade enzimática da GST nos tecidos das abelhas *M. scutellaris* expostas via oral e tópica aos produtos comerciais Kraft e Score individuais, sua mistura, bem como ao padrão de alta pureza da abamectina individual são mostrados na Figura 28.

Figura 28 – Atividade da GST em amostras de tecido de abelhas para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL₅₀ e CL₅₀ (2); e acima da DL₅₀ e CL₅₀ (3); abelhas vivas (v). * (p < 0,001 em relação ao controle)

Para as amostras da exposição oral ao padrão de alta pureza da abamectina (Fig. 28a) foi observado que a atividade enzimática da GST diminuiu em relação ao controle para as amostras do tratamento 2 mortas em 72 h ($p < 0,001$; Kruskal Wallis), as demais amostras não foram significativas em relação ao controle. Quando as abelhas foram expostas via oral ao produto comercial Kraft (Figura 28c) não foi observada diferença significativa entre as amostras e o grupo controle.

Quando a exposição das abelhas foi realizada por via tópica ao padrão de alta pureza da abamectina (Figura 28b) não foi observada diferença significativa entre as amostras e o grupo controle. Já para as amostras da exposição via tópica ao produto comercial Kraft (Figura 28d) a atividade da enzima GST aumentou para as amostras do tratamento 2 (72 h vivas) ($p < 0,001$; ANOVA) e diminuiu para as amostras do tratamento 3 mortas em 24 h ($p < 0,001$; ANOVA).

Para a exposição oral ao produto comercial Score (Figura 28e) a atividade enzimática da GST foi menor para as amostras do tratamento 2 mortas em 24 h ($p < 0,001$; ANOVA) e do tratamento 3 mortas em 48 h ($p < 0,001$; ANOVA) em relação ao controle. Quando a exposição das abelhas foi realizada por via tópica ao produto comercial Score (Figura 28f) a atividade da GST também diminuiu para as amostras do tratamento 1 (72h vivas) ($p < 0,001$; ANOVA) e dos tratamentos 2 ($p < 0,001$; ANOVA) e 3 ($p < 0,001$; ANOVA) mortas em 24 h.

Ao analisar o efeito da mistura dos produtos comerciais Kraft e Score (Figura 28g), foi observado que com a exposição oral não houve diferença significativa entre as amostras e o grupo controle. Já com a exposição tópica a mistura dos produtos comerciais Kraft e Score (Figura 28h), a atividade da GST diminuiu para a amostra do tratamento 2 mortas em 24 h ($p < 0,001$; ANOVA).

4.7.4. Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase

Os resultados obtidos para a determinação da atividade enzimática da AChE nos tecidos das abelhas são mostrados na Figura 29.

Figura 29 – Atividade da AChE em amostras de tecido de abelhas para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL₅₀ e CL₅₀ (2); e acima da DL₅₀ e CL₅₀ (3); abelhas vivas (v). * (p < 0,001 em relação ao controle)

Quando as abelhas foram expostas ao padrão de alta pureza da abamectina via oral (Figura 29a) a atividade da enzima AChE não foi alterada. O mesmo comportamento foi observado para as amostras da exposição ao padrão de abamectina via tópica (Figura 29b).

Para as amostras da exposição oral ao produto comercial Kraft (Figura 29c) a atividade da AChE diminuiu para as amostras do tratamento 1 (72 h vivas) ($p < 0,001$; ANOVA), do tratamento 2 ($p < 0,001$; ANOVA) e 3 ($p < 0,001$; ANOVA) mortas em 48 h e do tratamento 2 ($p < 0,001$; ANOVA) e 3 ($p < 0,001$; ANOVA) mortas em 72 h. Já para as abelhas expostas ao produto comercial Kraft via tópica (Figura 29d) não foi observada diferença significativa para a atividade da AChE entre os tratamentos e o grupo controle.

Para a exposição oral ao produto comercial Score (Figura 29e) a atividade da AChE diminuiu para as amostras do tratamento 1 mortas em 72 h ($p < 0,001$; ANOVA). Para a exposição tópica ao produto comercial Score (Figura 29f) a atividade da AChE diminuiu para as amostras do tratamento 3 mortas em 24 h ($p < 0,001$; ANOVA).

Ao expor as abelhas a mistura dos produtos comerciais Kraft e Score via oral (Figura 29g) e via tópica (Figura 29h) a atividade enzimática da AChE não apresentou diferença significativa em relação ao controle.

4.7.5. Neurotransmissores

Os neurotransmissores em estudo foram detectados por HPLC-FD. A Figura 30 mostra o cromatograma obtido para uma solução dos padrões de octopamina, dopamina e serotonina na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ácido perclórico $0,200 \text{ mol L}^{-1}$ contendo cisteína $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 30 – Cromatograma de uma solução padrão de octopamina, dopamina e serotonina na concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando HPLC-FD, $\lambda_{\text{ex}} = 279 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 320 \text{ nm}$. 1 – Octopamina, 2 – Dopamina e 3 – Serotonina.

O tempo de retenção da octopamina foi de 4,2 minutos, da dopamina de 5,9 minutos e da serotonina de 14 minutos e o tempo total da análise foi de 18 minutos.

As curvas analíticas foram feitas com seis concentrações dos neurotransmissores em ácido perclórico $0,200 \text{ mol L}^{-1}$ contendo cisteína $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em triplicata (Figura 31). O intervalo de concentração dos neurotransmissores foram de $16,0$ a 938 ng mL^{-1} .

Figura 31 – Curvas analíticas em ácido perclórico $0,200 \text{ mol L}^{-1}$ contendo cisteína $3,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ obtidas para (a) octopamina, (b) dopamina e (c) serotonina (continua).

Figura 31 – Curvas analíticas em ácido perclórico 0,200 mol L⁻¹ contendo cisteína 3,00 × 10⁻³ mol L⁻¹ obtidas para (a) octopamina, (b) dopamina e (c) serotonina (conclusão).

As curvas analíticas apresentadas na Figura 31 mostram um aumento linear da área dos picos cromatográficos em função da concentração dos analitos no intervalo de concentração estudado, apresentando coeficientes de correlação linear (r^2) de 0,999. O teste de Huber foi utilizado para avaliar a linearidade das curvas e também para determinar o limite de quantificação do método.

Os dados relacionados ao intervalo linear, a equação de regressão da reta e o coeficiente de correlação linear constam na Tabela 18. O LQ do método foi de 16,0 ng mL⁻¹ para os três neurotransmissores.

Tabela 18 – Parâmetros analíticos obtidos da análise da curva de calibração para os neurotransmissores.

Analitos	Intervalo linear (ng mL ⁻¹)	Equação da reta	r ²
Octopamina	16,0 – 938	$y = - 0,2856 + 0,0533 * x$	0,999
Dopamina	16,0 – 938	$y = - 0,2248 + 0,0621 * x$	0,999
Serotonina	16,0 – 625	$y = - 0,416 + 0,3087 * x$	0,999

Fonte: Autoria própria.

As abelhas dos bioensaios de toxicidade aguda oral e tópica foram utilizadas na determinação dos neurotransmissores a partir do método descrito utilizando a técnica HPLC-FD.

As amostras analisadas incluíram abelhas mortas amostradas em diferentes tempos de exposição; abelhas que permaneceram vivas até o final do experimento; abelhas dos grupos controle e uma amostra que foi coletada da colmeia e colocada imediatamente em nitrogênio líquido (Uruçu).

Os dados descritos incluíram a exposição aos produtos comerciais Kraft e Score individuais, sua mistura, bem como ao padrão de alta pureza da abamectina individual.

As concentrações dos neurotransmissores foram determinadas utilizando as equações da reta (Tabela 18) obtidas para a curva analítica dos três compostos. A Figura 32 mostra as concentrações de dopamina e serotonina encontradas nas amostras da cabeça das abelhas.

Figura 32 – Concentração média de dopamina e serotonina em extratos da cabeça de *M. scutellaris* para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL₅₀ e CL₅₀ (2); e acima da DL₅₀ e CL₅₀ (3); abelhas vivas (v); abelhas mortas (m) (continua).

Figura 32 – Concentração média de dopamina e serotonina em extratos da cabeça de *M. scutellaris* para Abamectina Oral (a); Abamectina Tópico (b); Kraft Oral (c); Kraft Tópico (d); Score Oral (e); Score Tópico (f); Kraft + Score Oral (g); Kraft + Score Tópico (h) nas amostras: NOEC (1); DL₅₀ e CL₅₀ (2); e acima da DL₅₀ e CL₅₀ (3); abelhas vivas (v); abelhas mortas (m) (conclusão).

Os gráficos da Figura 32 mostram que a dopamina foi detectada em todas as amostras analisadas. A serotonina foi detectada apenas nas amostras dos testes de toxicidade aguda para a abamectina tópico, Fig. 32 (b), e para o Score oral, Fig. 32 (e). A octopamina não foi detectada em nenhuma das amostras.

No sistema nervoso das abelhas, a concentração da dopamina é de 2 a 3 vezes maior em comparação com a concentração da octopamina (102), podendo ser por esse motivo que não foi possível detectar a octopamina nas amostras estudadas.

As abelhas que foram expostas via oral ao padrão de alta pureza da abamectina (Figura 32a) apresentaram menor concentração em relação as abelhas que não foram expostas (Uruçu). A amostra Uruçu apresentou uma concentração de dopamina de 14,0 ng mg abelha⁻¹, enquanto as amostras do grupo controle da exposição apresentou concentração de apenas 0,440 ng mg abelha⁻¹. Para a exposição tópica (Figura 32b), a concentração da dopamina diminuiu para os tratamentos 1, 2 e 3 em relação ao grupo controle e no tratamento 3, a concentração foi maior para 48 h do que para 72 h.

Quando as abelhas foram expostas ao produto comercial Kraft via oral, a concentração de dopamina das amostras do tratamento 1 (72 h vivas) foi maior do que a concentração das amostras do grupo controle. Esse mesmo efeito foi observado para a exposição via oral ao padrão da abamectina. Já para as amostras do tratamento 2 mortas em 48 h, a concentração de dopamina foi menor do que a concentração do grupo controle, sendo esse efeito também observado para a exposição via oral ao padrão de abamectina. No entanto, a concentração de dopamina para as amostras do tratamento 2 mortas em 72 h foi menor do que para as amostras do mesmo tratamento para mortas em 48 h, enquanto que para a exposição via oral ao padrão de alta pureza da abamectina foi observado o efeito contrário. Para as amostras do tratamento 3 mortas em 48h, a concentração de dopamina foi maior do que a concentração do grupo controle para a exposição via oral ao Kraft e menor do que a concentração do grupo controle para a exposição via oral ao padrão da abamectina.

Quando a exposição das abelhas foi realizada por via tópica ao padrão de alta pureza da abamectina (Figura 32b), a serotonina foi detectada para as 4 amostras estudadas e também para o controle, mas apresentou concentração bem menor em relação a dopamina. A concentração da dopamina diminuiu para as amostras em relação ao controle e para o tratamento 3 a concentração foi maior para 48 h do que para 72 h. Já com a utilização do produto comercial Kraft (Figura 32 d) não foi possível detectar a serotonina. A concentração de dopamina foi maior para as amostras do tratamento 1 (72h vivas) e menor para as amostras do tratamento 3 (72h vivas) em relação ao controle.

Para a exposição oral ao produto comercial Score (Figura 32e), a serotonina foi detectada para 3 amostras e o grupo controle e para as amostras do tratamento 2 mortas em 24 h a concentração de serotonina diminuiu. A concentração da dopamina também diminuiu para a amostra do tratamento 2 mortas em 48 h. Assim como para a exposição oral, quando as abelhas foram expostas via tópica ao produto comercial Score (Figura 32f) a concentração da dopamina para as amostras dos tratamentos 1, 2 e 3 mortas em 24 h diminuíram em relação ao controle.

Ao avaliar o efeito da mistura dos produtos comerciais Kraft e Score (Figura 32g), foi observado que com a exposição oral a concentração da dopamina aumentou para as amostras dos tratamentos 1 e 2 mortas em 48 h e do tratamento 3 mortas em 24 h em relação ao controle e diminuiu para as amostras do tratamento 3 mortas em 48 h. Para a exposição tópica a mistura dos produtos comerciais Kraft e Score (Figura 32h), a concentração da dopamina diminuiu para as amostras do tratamento 3 mortas em 48 h.

Os efeitos observados da exposição à abamectina e ao difenoconazol no metabolismo de abelhas podem ser considerados importantes na determinação da toxicidade não apenas aguda, mas também a longo prazo. De acordo com Farouqui (145) a exposição crônica de abelhas a agrotóxicos pode desregular a sinalização neuronal, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) que reagem com uma diversidade de macromoléculas e organelas, tais como o DNA e membrana lipídica. Dessa forma, esse estresse oxidativo gerado pode afetar o desenvolvimento cognitivo e habilidades eussociais e de orientação.

Dependendo do grau de exposição, os agrotóxicos podem afetar irreversivelmente o status energético dos organismos, contribuindo para os processos de envelhecimento, carcinogênese e levando à apoptose celular. (146), (145) Nesse caso, onde a toxicidade é considerada aguda ou encontra organismos com menor resistência, a ativação do sistema anti-oxidante pode não ser observada. (147)

Na exposição das abelhas à abamectina, como discutido anteriormente, não foi possível detectar esse inseticida nos tecidos. Essa bioacumulação nos tecidos foi somente observada para o seu produto comercial (Kraft), o que pode ser resultante da hidroxilação desse agrotóxico em sua forma pura pelo P450 (148), enquanto na formulação comercial, a presença de outros componentes do produto pode estar atuando na inibição desse sistema de detoxificação. Esse acúmulo nos tecidos pode ser responsável por desencadear efeitos de estresse oxidativo, através da geração de

espécies reativas de oxigênio. Em *M. scutellaris*, a concentração de MDA e, consequentemente, a peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo, embora não observada para a exposição oral ao padrão analítico, foi significativa em relação à exposição tópica (DL_{50} e acima da DL_{50}) e na mistura Kraft + Score oral. De acordo com Li-Byarlay et al. (147) o aumento dos níveis de peroxidação lipídica ocorre em abelhas consideradas mais resistentes, onde não ocorre o processo de detoxificação e sim tolerância à toxicidade.

Um outro indicativo de estresse oxidativo pode ser observado através da maior expressão de SOD nas abelhas expostas à abamectina (oral). Embora a análise via SDS-PAGE não seja quantitativa, essa expressão mais acentuada de SOD nas abelhas expostas é evidente e não foi observada em nenhuma outra exposição realizada. O estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre a razão pro-oxidante e anti-oxidante, sendo o cérebro das abelhas altamente susceptível a esse processo (145) e onde outros biomarcadores tais como a acetilcolinesterase e neurotransmissores, podem ser levados em consideração.

A acetilcolina está amplamente distribuída no cérebro desses organismos, onde os receptores colinérgicos atuam no aprendizado, memória e associação. (149) A alteração da atividade da AChE, responsável pela hidrolização da acetilcolina em acetil + colina em abelhas pode estar diretamente relacionada à exposição à pesticidas tais como neonicotinóides, organofosfatados e carbamatos. (150), (151) Nos resultados observados, a redução da acetilcolinesterase foi verificada apenas para as exposições orais aos produtos comerciais individuais Kraft e Score e tópica para o Score. Através da inibição da AChE não ocorre a hidrolização da acetilcolina, o que pode ocasionar a morte do organismo exposto (151). O efeito da abamectina presente no produto comercial Kraft sobre a atividade da acetilcolinesterase foi observado na menor concentração testada (NOEC) e também nas maiores concentrações. Badawy et al. (151) observaram que a exposição de abelhas *Apis* a quatro inseticidas (acetamiprida, dinotefuran, pimetozina e pyridalyl) induziram a redução da AChE em todas as doses testadas para os quatro inseticidas. Em outro estudo envolvendo a exposição de *A. mellifera* ao fipronil, pesticida que possui mecanismo de ação similar ao da abamectina, Roat et al. (152) não observou alteração nos níveis de AChE de abelhas expostas em relação aos controles.

As aminas biogênicas tais como a dopamina, serotonina e octopamina são encontradas no sistema nervoso central e podem afetar funções do comportamento

tais como reflexos, aprendizado e memória, sendo consideradas como neurotransmissores e neuromoduladores. (153), (154) Para a abamectina, os níveis de dopamina foram bastante variáveis, não sendo possível uma correlação clara em relação à concentração de exposição. De acordo com Hewlett et al. (155) o confinamento pode reduzir os níveis dessas aminas no cérebro, assim como observado principalmente para a dopamina, onde a abelha controle “Uruçu” (amostrada diretamente na colmeia) os níveis são significativamente maiores do que aqueles encontrados para as abelhas expostas. Já a serotonina, detectada nas amostras de exposição tópica a abamectina pode também estar associada a ações defensivas desencadeadas por esse neurotransmissor (155).

Alterações da atividade da GST em tecidos das abelhas expostas à pesticidas depende do mecanismo de ação do contaminante investigado. Para o fipronil, Roat et al. (152) não observou alterações significativas para esse biomarcador em abelhas *A. mellifera*, alertando para a presença de isoformas da GST, que são expressas em diferentes fases do desenvolvimento desses organismos. Já a diminuição da atividade da GST, tal como observado para a amostra DL₅₀ da exposição à abamectina oral e acima da DL₅₀ para o Kraft tópico, já foram relatadas previamente na literatura na exposição ao dinotefuran (151), demonstrando mais uma vez que o metabolismo das abelhas pode responder diferentemente dependendo do agente tóxico e das concentrações utilizadas. Além disso, o estresse oxidativo pode afetar os níveis de GST no organismo uma vez que essa enzima pode estar sendo consumida em excesso em resposta à exposição aos ROS. (156)

A GST, sendo uma importante enzima de biotransformação, pode também ser responsável pela resistência do organismo ao inseticida (145), uma vez que, quando em funcionamento normal pode metabolizar o contaminante sem que esse possa trazer algum dano irreversível para o organismo exposto. Como a concentração de abamectina nos tecidos de *M. scutellaris* foi observada na exposição oral e tópica ao produto comercial (Kraft), a análise de GST nessas amostras pode indicar uma ativação do metabolismo de detoxificação, principalmente para as amostras expostas às maiores concentrações. Para a exposição oral ao Kraft não foi observada uma diferença significativa da atividade da GST. Já para o Kraft tópico, a atividade da GST aumentou para a amostra do tratamento 2 (72 h vivas) e diminuiu para a amostra do tratamento 3 (72 h vivas). Na mistura Kraft + Score tópico foi possível notar uma diminuição da atividade da GST na concentração 2 (DL₅₀) no tempo de exposição de

24 h, mostrando que o metabolismo das abelhas pode responder diferentemente dependendo do agente tóxico e das concentrações utilizadas.

Subala et al. (157) investigaram os efeitos da melatonina contra o estresse oxidativo induzido pela abamectina na mariposa *Spodoptera litura* utilizando o produto comercial Agrimek 0,15 EC e observaram que a exposição das mariposas à 1,5 mL L⁻¹ de abamectina diminuiu a atividade da SOD e GST e aumentou os níveis de MDA.

Ma et al. (158) estudaram os efeitos tóxicos da abamectina no caracol *Physa acuta* e as respostas bioquímicas ao estresse da exposição. As atividades da SOD, CAT, GST, AChE e MDA foram determinadas após 96 h de exposição às concentrações de 3,4; 9,6; 19,2 e 27,4 µg L⁻¹ de abamectina. Os resultados mostraram que não houve alteração na atividade enzimática em 12 h. Já em 24 h foi observado estresse oxidativo, com o aumento da atividade da SOD, CAT, GST e MDA. Em outros tempos de exposição as atividades enzimáticas foram dependentes do tempo de exposição e da concentração da abamectina. A atividade enzimática da AChE foi inibida pela exposição à abamectina em 24 h até o final do teste.

El-Aziz et al. (156) investigaram os efeitos da abamectina presente no produto comercial Vermitec no verme de folha de algodão *Spodoptera littoralis*. Os níveis de MDA e as atividades da GSH, GST e CAT foram determinadas durante 5 dias de tratamento à uma concentração de 44,7 mg L⁻¹. Os resultados mostraram que a exposição à abamectina resultou em uma diminuição da capacidade de defesa enzimática antioxidante nos tecidos larvais de *S. littoralis*.

O fungicida difenoconazol, embora não possua rotas específicas de metabolização em insetos por não se tratar de um inseticida, também apresentou respostas aos biomarcadores investigados, muitas vezes similares à exposição realizada com a abamectina e seu produto comercial, assim como na mistura dos dois produtos Kraft + Score. Na exposição oral ao Score, não foi possível verificar a presença de estresse oxidativo nas amostras, uma vez que a SOD e o MDA não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Os efeitos do difenoconazol sobre a acetilcolinesterase e peroxidação lipídica (MDA) já foram previamente observados em outros organismos. Na exposição à ratos em laboratório, Abd-Alraham et al. (159), observou uma redução da atividade da AChE e um aumento do MDA em organismos expostos oralmente à doses de 10 mg kg⁻¹. Na exposição à embriões de peixe-zebra, Mu et al. (160) observaram que não houve mudança nos níveis de MDA dos peixes expostos a 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ de difenoconazol

durante 96 h. Para *M. scutellaris*, a diminuição da acetilcolinesterase foi significativa apenas para a exposição oral na menor concentração (NOEC, mortas em 72 h) e para a exposição tópica na maior concentração (DL₅₀, mortas em 24 h).

Em relação aos neurotransmissores, a diminuição significativa de dopamina foi observada principalmente associada à exposição tópica ao Score individual. Alterações nos níveis de dopamina em abelhas podem ocasionar uma diminuição da resposta condicionada, afetando o desempenho eussocial desses organismos. (154) A presença de serotonina em abelhas expostas ao Score via oral pode estar associada à aversão ao forte odor do produto comercial e que levou à um menor consumo do alimento contaminado, uma vez que a serotonina também pode ser considerada como reguladora do apetite (154).

O aumento da atividade da GST na mistura em baixas concentrações pode estar mais associado à presença do difenoconazol à mistura, uma vez que a concentração no tecido indica uma concentração máxima desse agrotóxico nos tecidos de *M. scutellaris* em 48h (NOEC), enquanto a abamectina proveniente do produto comercial Kraft não foi detectada nos tecidos expostos à essa mesma concentração. Entretanto, devido à ausência de testes envolvendo a exposição apenas ao padrão analítico, a interpretação a respeito dos efeitos do produto comercial permanece comprometida.

Han et al. (161) avaliaram os efeitos do acetamiprido e do fungicida inibidor do ergosterol propiconazol individuais e em mistura para a abelha *Apis cerana cerana*. As abelhas foram expostas via oral a 24 ng μL^{-1} de propiconazol e a mistura de 3,66 ng μL^{-1} de acetamiprido + 24 ng μL^{-1} de propiconazol durante 5 dias. Os resultados mostraram que a combinação de acetamiprido e propiconazol modulou as atividades da P450s, GST e CAT. A atividade da GST aumentou para o propiconazol individual e para a mistura no primeiro dia, mas no quinto dia de exposição a atividade diminuiu para a mistura, indicando que o acetamiprido e o propiconazol podem induzir estresse oxidativo em curto prazo, mas a exposição a longo prazo, o acúmulo de ROS pode inibir a GST. A atividade da AChE não foi afetada pelos agrotóxicos.

Zhu et al. (162) estudaram os efeitos de 5 triazóis em embriões de peixes *Gobiocypris rarus* expostos a 0,2; 1,0 e 50, mg L^{-1} de triazol por 72 h e os resultados mostraram que a atividade da SOD e GST aumentaram em concentrações baixas dos triazóis e diminuíram em concentrações altas. A atividade da AChE diminuiu nas concentrações médias e altas. Os níveis reduzidos de SOD e GST em altas

concentrações de triazóis indicaram que o sistema protetor dos embriões pode ser destruído, ou seja, os triazóis podem enfraquecer o sistema de defesa antioxidante e aumentar o estresse oxidativo e prejudicar a fisiologia do embrião.

De uma maneira geral, as abelhas expostas apresentaram respostas diferenciadas à exposição em níveis subletais de abamectina, difenoconazol e sua mistura. A associação da assimilação dos agrotóxicos pelas abelhas expostas foi de fundamental importância para a discussão dos efeitos observados. Estudos futuros envolvendo a análise dos biomarcadores em abelhas mortas e sobreviventes após as primeiras 24 h de exposição podem auxiliar na elucidação desses efeitos subletais observados em 48 e 72 h de exposição.

5. Conclusão

A determinação da abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* foi realizada com êxito. O método de extração QuEChERS acetato modificado foi preciso, apresentando valores de precisão intradia entre 2,69 e 7,55 % e precisão interdias entre 3,40 e 11,9 %. O método também foi exato, apresentando valores de exatidão entre 102,3 e 115,1 %. O método cromatográfico validado apresentou LD de 0,038 $\mu\text{g g}^{-1}$ e LQ de 0,076 $\mu\text{g g}^{-1}$ para ambos os analitos.

As abelhas expostas via oral e tópica aos produtos comerciais, bem como ao padrão de alta pureza, no caso da abamectina, demonstraram a sensibilidade dessa espécie a concentrações já descritas na literatura como NOEC, C(D)L₅₀ e 2 vezes C(D)L₅₀. A mortalidade foi maior para a ingestão oral, no entanto, as concentrações nos tecidos foram observadas nos dois modos de exposição, demonstrando a absorção desses agrotóxicos e o acúmulo nos tecidos.

Para a exposição ao padrão de alta pureza da abamectina individual, não foi possível detectar esse inseticida nos tecidos, enquanto no produto comercial esse acúmulo foi observado. Para o difenoconazol, no produto comercial, foi observado que na mistura dos produtos comerciais o acúmulo desse fungicida foi aumentado.

Dos neurotransmissores estudados, a dopamina foi detectada em todas as amostras de tecido, a serotonina foi detectada apenas para a exposição tópica ao padrão da abamectina e ao produto comercial Score e a octopamina não foi detectada.

As atividades enzimáticas da SOD, GST, AChE e os níveis de MDA mostraram resultados dependes das concentrações dos agrotóxicos utilizados e do tempo de exposição. Embora os agrotóxicos não possam ser claramente associados aos efeitos tóxicos investigados por meio da análise dos biomarcadores selecionados, os resultados obtidos são apresentados como relevantes para o início das discussões a respeito do impacto da exposição a longo prazo. Esse fato é ainda mais importante uma vez que existem poucos estudos envolvendo a toxicidade de agrotóxicos em abelhas sem ferrão. No caso de efeitos subletais, estudos envolvem apenas a abelha *A. mellifera*, o que dificulta a discussão uma vez que os níveis de toxicidade e a sensibilidade dessas duas espécies diferem.

Todos esses resultados podem contribuir significativamente para a compreensão do impacto dos agrotóxicos nas abelhas e da capacidade de acumulação nos tecidos, como resultado de diferentes vias de exposição. Mais estudos devem ser feitos para a investigação dos efeitos dessas concentrações no metabolismo e na saúde das abelhas, efeitos que podem contribuir para o aumento da mortalidade das abelhas e colapso das colônias. Ao mesmo tempo, o método desenvolvido também pode ser aplicado em amostras ambientais, na qual a avaliação de riscos ambientais pode ser acessada.

REFERÊNCIAS

- 1 LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 89, n. 4, p. 921-924, 2012.
- 2 SILVEIRA, G. S. R.; GUIMARÃES, B. C. Aspectos sociais e econômicos da cultura do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 279, p. 7-10, 2014.
- 3 MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A. EGLER, M.; ARAÚJO, A. J.; MOURA, C. M. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.
- 4 FAO. **Pesticides use**. Roma, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>. Acesso em: 01 mar. 2019.
- 5 PRESTES, D. O.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.
- 6 KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; SEMENIUK, S.; GAWEL, M.; BORZECKA, M.; POSYNIK, A. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectroscopy: honeybee poisoning incidents. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1435, p. 100-114, 2016.
- 7 POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 345-353.
- 8 FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - the international response. *In*: BRENO, M.; PEREIRA, J. O. P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. p. 19-25.
- 9 GHAZOUL, J. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. **Trends in Ecological Evolution**, Oxford, v. 20, p. 367-373, 2005.
- 10 SILVA, F. O.; BARREIRA, H. C. S.; COSTA NETO, W.; ARAUJO, R. B.; LIMA, M. C.; ROCHA, S. A.; VIANA, B. F. **Agrotóxicos e polinizadores: isso combina?** Rio de Janeiro: FUNBIO, 2014. 24 p.

- 11 GALLAI, N.; SALLES, J. M.; SETTELE, J.; VAISSIERE, B. E. Economic valuation of vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, p. 810-821, 2009.
- 12 GARIBALDI, L. A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; WINFREE, R.; AIZENM, M. A.; BOMMARCO, R.; CUNNINGHAM, S. A. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, Washington, v. 339, n. 6127, p. 1608-1611, 2013.
- 13 VANDAME, R.; PALACIO, M. A. Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? **Apidologie**, Paris, v. 41, n. 3, p. 243-255, 2010.
- 14 PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.
- 15 CARDOSO, M. C.; GONÇALVES, R. B. Reduction by half: the impact on bees of 34 years of urbanization. **Urban Ecosystems**, New York, v. 21, p. 943-949, 2018.
- 16 BAYLEY, L. The isle of wight disease. **Central Association of Bee-Keepers**, Poole, v. 11, p. 12, 2002.
- 17 NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2010.
- 18 POTTS, S. G.; ROBERTS, S. P. M.; DEAN, R.; MARRIS, G.; BROWN, M. A.; JONES, R.; NEUMANN, P.; SETTELE, J. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 49, p. 15-22, 2010.
- 19 LEE, K. V.; STEINHAEUER, N.; RENNICH, K.; WILSON, M. E.; TARPY, D. R.; CARON, D. M.; ROSE, R.; DELAPLANE, K. S.; BAYLIS, K.; LINGERICH, E. J.; PETTIS, J.; SKINNER, J. A.; WILKES, J. T.; SAGILI, R.; VANENFELSDORP, D. A national survey of managed honey bee 2013-2014 annual colony losses in the USA. **Apidologie**, Paris, v. 46, p. 292-305, 2015.
- 20 HASSONA, N. M.; KORDY, A. M. Relationship between toxicity of certain pesticides to the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidea) foragers and their haemolymph amino acids. **Middle East Journal of Applied Sciences**, Faisalabad, v. 5, n. 1, p. 19-25, 2015.
- 21 GUTIERREZ, D. Honey bee collapse strikes Japan, up to fifty percent of honey bees gone. **Natural News**, 2009. Disponível em: https://www.naturalnews.com/026151_Japan_honeybees_honey.html. Acesso em: 09 abril 2019.

- 22 BRUCKNER, S.; STEINHAEUER, N.; RENNICH, K.; AURELL, S. D.; CARON, D. M.; ELLIS, J. D.; FAUVEL, A. M.; KULHANEK, K.; NELSON, K. C.; RANGEL, J.; ROSE, R.; SAGILI, R.; SLATER, G. P.; SNYDER, R.; THOMS, C. A.; WILKES, J. T.; WILSON, M. E.; VANENGELSDORP, D. Honey bee colony losses 2017-2018: preliminary results. **Bee Informed Partnership**. Disponível em: <https://beeinformed.org/results/honey-bee-colony-losses-2017-2018-preliminary-results/>. Acesso em: 09 abr. 2019.
- 23 DE CARVALHO, A. C. P.; MESSAGE, D. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoideae) which causes sacbrood-like symptoms. **Apidologie**, Paris, v. 35, p. 89-90, 2004.
- 24 FREITAS, P. V. D. X.; RIBEIRO, F. M.; ALMEIDA, E. M.; ZANATA, R. A.; ALVES, J. J. L.; OLIVEIRA, V. F.; FAQUINELLO, P. Declínio populacional das abelhas polinizadoras: revisão. **PUBVET**, Maringá, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2017.
- 25 JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, M. Pesticides and honey bee toxicity - USA. **Apidologie**, Paris, v. 41, p. 312-331, 2010.
- 26 CASTAGNINO, G. L. B.; ORSI, R. O. Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 738-744, 2012.
- 27 ARAUJO, F. H.; POFFO, S. L.; CLAUDINO, G. G. S.; CELLA, I.; WEBER, R.; MILANI, V.; BOLZANI, R.; CESCONE TO, E. F. **Monitoramento e controle do ácaro *Varroa destructor* em colmeias de abelhas *Apis mellifera***. Florianópolis: Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia de Santa Catarina, 2015. Disponível em: http://ciram.epagri.sc.gov.br/ciram_arquivos/arquivos/apicultura/acervo/cartilha-varroa.pdf. Acesso em: 16 mar. 2019.
- 28 PINTO, F. A.; PUKER, A.; BARRETO, L. M. R.; MESSAGE, D. The ectoparasite mite *Varroa destructor* Anderson and Trueman in southeastern Brazil apiaries: effects of the hygienic behavior of Africanized honey bees on infestation rates. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 5, p. 1194-1199, 2012.
- 29 CORBY-HARRIS, V.; SNYDER, L.; MEADOR, C. A. D.; NALDO, R.; MOTT, B.; ANDERSON, K. E. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., improves honey bee (hymenoptera: apidae) resistance to nosema. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 0, n. 0, p. 1-7, 2016.
- 30 PARIS, L.; ALAOUI, H. E.; DELBAC, F.; DIOGON, M. Effects of the gut parasite *nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 26, p. 149-154, 2018.
- 31 NAUG, D.; GIBBS, A. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. **Apidologie**, Paris, v. 40, p. 595-599, 2009.

- 32 MALONE, L. A.; GIACON, H. A. Effects of *Nosema apis* Zander on inbred New Zealand honey bees (*Apis mellifera ligustica* L.). **Apidologie**, Paris, v. 27, p. 479-486, 1996.
- 33 KHEZRI, M.; MOHARRAMI, M.; MODIRROUSTA, H.; TORKAMAN, M.; SALEHI, S.; ROKHZAD, B.; KHANBABAI, H. Molecular detection of *Nosema ceranae* in the apiaries of Kurdistan province, Iran. **Veterinary Research Forum**, Urmia, v. 9, n. 3, p. 273-278, 2018.
- 34 COSTA, C.; LODESANI, M.; MAISTRELLO, L. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. **Apidologie**, Paris, v. 41, p. 141-150, 2010.
- 35 MAISTRELLO, L.; LODESANI, M.; COSTA, C.; LEONARDI, F.; MARANI, G.; CALDON, M.; MUTINELLI, F.; GRANATO, A. Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, Paris, v. 39, p. 436-445, 2008.
- 36 COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; VANENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, A.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, Washington, v. 318, p. 283-287, 2007.
- 37 VANENGELSDORP, D.; UNDERWOOD, R.; CARON, D.; JUNIOR, J. H. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006 - 2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. **American Bee Journal**, Hamilton, p. 599-603, 2007.
- 38 VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony collapse disorder: a descriptive study. **Plos One**, San Francisco, v. 4, p. 1-17, 2009.
- 39 CORNMAN, R. S.; TARPY, D. R.; CHEN, Y.; JEFFREYS, L.; LOPEZ, D.; PETTIS, J. S.; VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. **Plos One**, San Francisco, v. 7, p. 1-15, 2012.
- 40 MESSAGE, D.; LAZZARINI, K. R. G.; FREITAS, N. H. A.; SIMÕES, Z. L. P.; JONG, D.; SILVA, I. C.; TEIXEIRA, E. W. Colapso de colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 59, 2011.
- 41 DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 10, p. 170-176, 2015.

- 42 LE CONTE, Y.; NAVAJAS, M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 27, n. 2, p. 499-510, 2008.
- 43 REDDY, P. V. R.; VERGHESE, A.; RAJAN, V. V. Potential impact of climate change on honeybees (*Apis* spp.) and their pollination services. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**, New Delhi, v. 18, n. 2, p. 121-127, 2012.
- 44 GIANNINI, T. C.; ACOSTA, A. L.; GARÓFALO, C. A.; SARAIVA, A. M.; SANTOS, I. A.; FONSECA, V. L. I. Pollination services at risk: bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 244, p. 127-131, 2012.
- 45 OLEKSA, A.; GAWRONSKI, R.; TOFILSKI, A. Rural avenues as a refuge for feral honey bee population. **Journal of Insect Conservation**, Dordrecht, v. 17, n. 3, p. 465-472, 2013.
- 46 LIMA, M. C.; ROCHA, S. A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil**: proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2012. 88 p.
- 47 FLETCHER, M.; BARNETT, L. Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 56, n. 1, p. 141-145, 2003.
- 48 FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MEDINA, L. M.; KLEINERT, A. M. P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Diversity threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, Paris, v. 40, p. 332-346, 2009.
- 49 JAY, S. C. Spatial management of honeybees on crops. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 31, p. 49-65, 1986.
- 50 BONZINI, S.; TREMOLADA, P.; BERNARDINELLI, I.; COLOMBO, M.; VIGHI, M. Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax. **Apidologie**, Paris, v. 42, p. 378-390, 2011.
- 51 FRAZIER, M.; MULLIN, C.; FRAZIER, J.; ASHCRAFT, S. What have pesticides got to do with it? **American Bee Journal**, Hamilton, v. 148, p. 521-523, 2008.
- 52 DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELEGUE, M. H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 48, p. 242-250, 2005.
- 53 INGRAM, E. M.; AUGUSTIN, J.; ELLIS, M. D.; SIEGFRIED, B. D. Evaluating sublethal effects of orchard-applied pyrethroids using video-tracking software to quantify honey bee behaviors. **Chemosphere**, Oxford, v. 135, p. 272-277, 2015.

- 54 GOÑALONS, C. M.; FARINA, W. M. Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. **Plos One**, San Francisco, v. 10, p. 1-15, 2015.
- 55 TOSI, S.; BURGIO, G.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1201, p. 1-8, 2017.
- 56 THOMPSON, H. M. Behavioural effects of pesticides in bees - their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v. 12, p. 317-330, 2003.
- 57 COX, R. L.; WILSON, W. T. Effects of permethrin on the behavior of individually tagged honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Entomology**, Cary, v. 13, n. 2, p. 375-378, 1984.
- 58 HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J. F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, Washington, v. 336, p. 348-350, 2012.
- 59 CRESSWELL, J. E. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. **Ecotoxicology**, New York, v. 20, p. 149-157, 2011.
- 60 KESSLER, S. C.; TIEDEKEN, E. J.; SIMCOCK, K. L.; DERVEAU, S.; MITCHELL, J.; SOFTLEY, S.; RADCLIFFE, A.; STOUT, J. C.; WRIGHT, G. A. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, London, v. 521, p. 74-76, 2015.
- 61 FAO. **Meliponiculture of stingless bees**. Roma, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i0842e/i0842e07.pdf>. Acesso em: 14 outubro 2019.
- 62 EMBRAPA. **Criação de abelhas-sem-ferrão**. Teresina, 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/166288/1/CriacaoAbelhaSemFerrao.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- 63 NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueiraapis, 1997. 445 p.
- 64 ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SANTOS, W. S. Areas of natural occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in the state of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 679-688, 2012.
- 65 WEBBEE. **Uruçu: a abelha do litoral baiano e nordestino**. [S. l.], 2019. Disponível em: <http://www.webbee.org.br/projetos/urucu/index.html>. Acesso em: 10 jan 2020.
- 66 SILVA, M. D.; RAMALHO, M.; ROSA, J. F. Por que *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) forrageia sob alta umidade relativa do ar? **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 101, p. 131-137, 2011.

67. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Biociências. **A abelha urucu**. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/urucu/index.html>. Acesso em: 12 jun. 2017.

68 CARTAXO, R. T. **Fracionamento bioquímico e caracterização química de compostos com atividade antimicrobiana de geoprópolis de urucu nordestina: abelha indígena sem ferrão *Melipona scutellaris***. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012.

69 ÔMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 31, p. 91-98, 2008.

70 CAMPBELL, W. C. **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer-Verlag New York Inc., 1989. 379 p.

71 VSDB: Veterinary Substances DataBase. **Abamectin**. Hertfordshire, 2019. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/8.htm>. Acesso em: 05 abr. 2019.

72 TOMASZ, G.; JAN, J. J.; WALERIAN, P. Correlations between no observed effect level and selected parameters of the chemical structure for veterinary drugs. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 24, p. 953-959, 2010.

73 ANVISA. **Abamectina**. Brasília, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/A18%2B%2BAbamectina.pdf/77bf0354-9d40-40a2-bc14-4c6159385604>. Acesso em: 05 abr. 2019.

74 ADAPAR. **Bula Kraft 36 EC**. Curitiba, 2019. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/kraft.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2019.

75 KOLAR, L.; ERZEN, N. K.; HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C. A. M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 151, p. 182-189, 2008.

76 GERENUTTI, M.; SPINOSA, H. S. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. **Biotemas**, Florianópolis, v. 10, n. 2, p. 07-27, 1997.

77 FISHEL, F. M. **Pesticide toxicity profile: triazole pesticides**. Gainesville: University of Florida, 2005. p. PI-68.

78 PPDB: Pesticide Properties DataBase. **Difenoconazole**. Hertfordshire, 2019. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/230.htm>. Acesso em: 05 abr. 2019.

79 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance difenoconazole**. EFSA Journal, Parma, v. 9, n. 1, 2011.

- 80 ANVISA. **Difenoconazol**. Brasília, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D36%2B-%2BDifenoconazol.pdf/fce161cd-d3d4-41b2-b4ff-53438306cf4d>. Acesso em: 05 abr. 2019.
- 81 SYNGENTA Brasil. **Score**. São Paulo, 2018. Disponível em: https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/score_1.pdf?token=1546534177. Acesso em: 05 abr. 2019.
- 82 PPDB: Pesticide Properties DataBase. **Difenoconazole** (Ref: CGA 169374). Hertfordshire, 2019. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/230.htm>. Acesso em: 26 fev. 2019.
- 83 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**. Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Acesso em: 19 jun. 2019.
- 84 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Cary, v. 86, p. 412-431, 2003.
- 85 LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, Cary, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.
- 86 PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.
- 87 LEHOTAY, S. J.; LIGHTFIELD, A. R.; HARMAN-FETCHO, J. A.; DONOGHUE, D. J. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 10, p. 4589-4596, 2001.
- 88 LEHOTAY, S. J. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC International**, Cary, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005.
- 89 LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKA, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast an easy method for residue analysis of fruits an vegetables. **Journal of AOAC International**, Cary, v. 88, n. 2, p. 615-629, 2005.
- 90 AOAC International. **AOAC Official Method 2007.01**: pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. Rockville, 2007.

91 ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. **Pesticide Chemistry**: crop protection, public health, environmental safety. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2007.

92 EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (CEN). **Foods of plant origin** - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method. EN 15662:2008. Brussels, European Union, 2008.

93 KASIOTIS, K. M.; 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**, Amsterdam, p. 633-642, 2014.

94 WIEST, L.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; FRATTA, C.; AMIC, S.; LAMBERT, O.; POULIQUEN, H.; ARNAUDGUILHERM, C. 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. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 12718, p. 5743-5756, 2011.

95 RODRIGUES, S. R.; CALDEIRA, C.; B., CASTRO B.; GONÇALVES, F.; NUNES, B.; ANTUNES, S. C. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects xenobiotics. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 99, p. 181-188, 2011.

96 BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; CARVALHO, G. A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L. P. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Maryland Heights, v. 82, p. 22-31, 2012.

97 LEITA, L.; MUHLBACHOVA, G.; CESCO, S.; BARBATTINI, R.; MONDINI, C. Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 43, p. 1-9, 1996.

98 DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The toxicology of fishes**. New York: Taylor & Francis Group, 2008.

99 BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J. C.; ARUN, S.; PORTE, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Philadelphia, v. 140, p. 175-186, 2005.

100 FINSTROM, M. S.; LI-BYARLAY, H.; HUANG, M. H.; STRAND, M. K.; RUEPPELL, O.; TARPY, D. R. Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-10, 2016.

- 101 HARRIS, J. W.; WOODRING, J. Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 29-35, 1992.
- 102 ROEDER, T. Biogenic amines and their receptors in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 107C, n. 1, p. 1-12, 1994.
- 103 OSBORNE, R. H. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, Philadelphia, v. 69, n. 2, p. 117-142, 1996.
- 104 SCHULZ, D. J.; ROBINSON, G. E. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. **Journal of Comparative Physiology A**, Heidelberg, v. 184, p. 481-488, 1999.
- 105 VERLINDEN, H. Dopamine signalling in locusts and other insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 97, p. 40-52, 2018.
- 106 ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos. Resolução - RDC nº 166, 25 de julho de 2017**. Brasília, 2017. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2019.
- 107 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Brasília, 2011. p. 227.
- 108 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 109 VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F.; AUGUSTO, F. Análise quantitativa por cromatografia. **Chemkeys**, Campinas, n. 10, p. 1-18, 2003.
- 110 MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.
- 111 MATUSZEWSKI, B. K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 830, p. 293-300, 2006.
- 112 OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2014. 685 p.
- 113 LOURENÇO, C. T. **Determinação da toxicidade tópica e oral do inseticida fipronil e efeitos de suas doses subletais no comportamento de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* (LATREILLE, 1811)**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos. Araras, 2012.

- 114 VANDAME, R.; BELZUNCES, L. P. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. **Neuroscience Letters**, Shannon, v. 251, p. 57-60, 1998.
- 115 OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Honeybees, acute contact toxicity test, n. 214**. Paris, 1998a. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-214-honeybees-acute-contact-toxicity-test_9789264070189-en. Acesso em: 05 abr. 2019.
- 116 OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Honeybees, acute oral toxicity test, n. 213**. Paris, 1998b. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-213-honeybees-acute-oral-toxicity-test_9789264070165-en. Acesso em: 05 abr. 2019.
- 117 ALMEIDA, E. A.; MARQUES, S. A.; KLITZKE, C. F.; BAINY, A. C. D.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P. D.; LOUREIRO, A. P. M. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, Philadelphia, v. 135, p. 295-303, 2003.
- 118 ALMEIDA, E. A.; MIYAMOTO, S.; BAINY, A. C. D.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P. D. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 49, p. 386-392, 2004.
- 119 KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.
- 120 ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Philadelphia, v. 7, p. 88-95, 1961.
- 121 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 122 BENEDETTO, G. E.; FICO, D.; PENNETTA, A.; MALITESTA, C.; NICOLARDI, G.; LOFRUMENTO, D. D.; NUCCIO, F.; LA PESA, V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, n. 98, p. 266-270, 2014.
- 123 MOREIRA, R. A.; DAAM, M. A.; VIEIRA, B. H.; SANCHES, A. L. M.; REGHINI, M. V.; MANSANO, A. S.; FREITAS, E. C.; ESPINDOLA, E. L. G.; ROCHA, O. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 185, p. 58-66, 2017.

124 SANCHES, A. L. M.; VIEIRA, B. H.; REGHINI, M. V.; MOREIRA, R. A.; FREITAS, E. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; DAAM, M. A. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, Oxford, v. 188, p. 582-587, 2017.

125 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2005.

126 HERNANDO, M. D.; SUÁREZ-BARCENA, J. M.; BUENO, M. J. M.; GARCIA-REYES, J. F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1155, p. 62-73, 2007.

127 KROGH, K. A.; BJORKLUND, E.; LOEFFLER, D.; FINK, G.; HALLING-SØRENSEN, B.; TERNES, T. A. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1211, p. 60-69, 2008.

128 INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: 2011. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acesso em: 08 jun. 2017.

129 OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS. **Daphnia magna Reproduction Test**, n. 211. Paris, 1998b.

130 DEL SARTO, M. C. L.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C.; CAMPOS, L. A. O. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, Paris, v. 45, p. 626-636, 2014.

131 JOHNSON, R. M.; DAHLGREN, L.; SIEGFRIED, B. D.; ELLIS, M. D. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). **Plos One**, San Francisco, v. 8, p. 1-10, 2013.

132 **PORTAL Educação**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/farmacia/farmacologia-efeitos-resultantes-da-interacao-de-agentes-quimicos/45175>. Acesso em: 14 out. 2019.

133 MULLIN, C. A. Effects of "inactive" ingredients on bees. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 10, p. 194-200, 2015.

134 THOMPSON, H. M.; FRYDAY, S. L.; HARKIN, S.; MILNER, S. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. **Apidologie**, Paris, v. 45, p. 545-553, 2014.

- 135 COSTA, L. M.; GRELLA, T. C.; BARBOSA, R. A.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, v. 64, n. 4, p. 578-582, 2015.
- 136 SCHMUCK, R.; STADLER, T.; SCHMIDT, H. W. Field relevance of a synergism effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). **Pest Management Science**, Oxford, v. 59, p. 279-286, 2003.
- 137 AZPIAZU, C.; BOSCH, J.; VIÑUELA, E.; MEDRZYCKI, P.; TEPPER, D.; SGOLASTRA, F. Chronic oral exposure to field-realistic pesticide combinations via pollen and nectar: effects on feeding and thermal performance in a solitary bee. **Scientific Reports**, London, v. 9, p. 1-11, 2019.
- 138 ZENG, Z.; ANDREW, N. W.; WODA, J. M.; HALLEY, B. A.; CROUCH, L. S.; WANG, R. W. Role of cytochrome P450 isoforms in the metabolism of abamectin and ivermectin in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 3374-3378, 1996.
- 139 CHANDOR-PROUST, A.; BIBBY, J.; RÉGENT-KLOECKNER, M.; ROUX, J.; GUITTARD-CRILAT, E.; POUPARDIN, R.; RIAZ, M. A.; PAINE, M.; DAUPHIN-VILLEMANT, C.; REYNAUD, S.; DAVID, J. P. The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. **Biochemical Journal**, London, v. 455, p. 75-85, 2013.
- 140 RIGA, M.; TSAKIRELI, D.; ILIAS, A.; MOROU, E.; MYRIDAKIS, A.; STEPHANOU, E. G. NAUEN, R.; DERMAUW, W.; VAN LEEUWEN, T.; PAINE, M.; VONTAS, J. Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in *Tetranychus urticae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 46, p. 43-53, 2014.
- 141 FEYEREISEN, R. Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. **Pest Management Science**, Oxford, v. 71, p. 793-800, 2015.
- 142 GOTTARDI, M.; TYZACK, J. D.; BENDER, A.; CEDERGREEN, N. Can the inhibition of cytochrome P450 in aquatic invertebrates due to azole fungicides be estimated with in silico and in vitro models and extrapolated between species? **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 201, p. 11-20, 2018.
- 143 CHAKRABARTI, P.; RANA, S.; SARKAR, S.; SMITH, B.; BASU, P. Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. **Apidologie**, Paris, v. 46, p. 107-129, 2015.
- 144 **UNIPROTKB**. Cambridge, 2019. Disponível em: <https://www.uniprot.org/>. Acesso em: 04 nov 2019.

- 145 FAROOQUI, T. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis. **Neurochemistry International**, London, v. 62, p. 122-136, 2013.
- 146 WEIRICH, G.; COLLINS, A. M.; WILLIAMS, V. P. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, Paris, v. 33, p. 3-14, 2002.
- 147 LI-BYARLAY, H.; HUANG, M. H.; SIMONE-FINSTROM, M.; STRAND, M. K.; TARPY, D. R.; RUEPPELL, O. Honey bee (*Apis mellifera*) drones survive oxidative stress due to increased tolerance instead of avoidance or repair of oxidative damage. **Experimental Gerontology**, Philadelphia, v. 83, p. 15-21, 2016.
- 148 RIGA, M.; TSAKIRELI, D.; LLIAS, A.; MOROU, E.; MYRIDAKIS, A.; STEPHANOU, E. G.; NAUEN, R.; DERMAUW, W.; VAN LEEUWEN, T.; PAINE, M.; VONTAS, J. Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in *Tetranychus urticae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 46, p. 43-53, 2014.
- 149 GALIZIA, G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. **Honeybee neurobiology and behavior**: a tribute to Randolph Menzel. Berlin: Springer Science & Business Media, 2011. 512 p.
- 150 BOILY, M.; SARRASIN, B.; DEBLOIS, C.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 20, p. 5603-6514, 2013.
- 151 BADAWY, M. E. I.; NASR, H. M.; RABEA, E. I. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. **Apidologie**, Paris, v. 46, p. 177-193, 2015.
- 152 ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Biochemical response of the africanized honeybee exposed to fipronil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 36, n. 6, p. 1652-1660, 2017.
- 153 SCHEINER, R.; PLUCKHAHN, S.; ONEY, B.; BLENAU, W.; ERBER, J. Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 136, p. 545-553, 2002.
- 154 SCHEINER, R.; BAUMANN, A.; BLENAU, W. Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. **Current Neuropharmacology**, Sharjah, v. 4, p. 259-276, 2006.
- 155 HEWLETT, S. E.; SMOLENIEC, J. D. D.; WAREHAM, D. M.; PYNE, T. M.; BARRON, A. B. Biogenic amine modulation of honey bee sociality and nestmate affiliation. **Plos one**, San Francisco, v. 13, n. 10, p. e0205686, 2018.

156 EL-AZIZ, N. M. A.; FAHMY, N. M. Oxidative stress effects of abamectin and hematoporphyrin with the antioxidant efficiency in the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Biosd.). **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences F. Toxicology & Pest control**, Cairo, v. 7, n. 1, p. 55-63, 2015.

157 SUBALA, S. P.; ZUBERO, E. E.; ALATORRE-JIMENEZ, A.; SHIVAKUMAR, M. S. Pre-treatment with melatonin decreases abamectin induced toxicity in a nocturnal insect *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 56, p. 76-85, 2017.

158 MA, J.; ZHOU, C.; LI, Y.; LI, X. Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the freshwater snail *Physa acuta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Maryland Heights, v. 101, p. 31-35, 2014.

159 ABD-ALRAHMAN, S. H.; ELHALWAGY, M. E. A.; KOTB, G. A.; FARID, H.; FARAG, A. A. G.; DRAZ, H. M.; ISA, M. A.; SABICO, S. Exposure to difenoconazole, diclofop-methyl alone and combination alters oxidative stress and biochemical parameters in albino rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, Madison, v. 7, n. 10, p. 3637-3646, 2014.

160 MU, X.; CHAI, T.; WANG, K.; ZHU, L.; HUANG, Y.; SHEN, G.; LI, Y.; LI, X., WANG, C. The development effect of difenoconazole on zebrafish embryos: a mechanism research. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 212, p. 18-26, 2016.

161 HAN, W.; YANG, Y.; GAO, J.; ZHAO, D.; REN, C.; WANG, S.; ZHAO, S.; Y., ZHONG. Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. **Ecotoxicology**, New York, v. 28, p. 399-441, 2019.

162 ZHU, B.; LIU, L.; GONG, Y. X.; LING, F.; WANG, G. X. Triazole-induced toxicity in developing rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 21, p. 13625-13635, 2014.