UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Análise de resíduos de neonicotinóides no pólen forrageado
e em tecidos das espécies de abelhas *Apis mellifera*
africanizada e *Tetragonisca angustula* Latreille (1811)**

ANA MARIA BARBOSA MEDINA

São Carlos – SP

2021

ANA MARIA BARBOSA MEDINA

**Análise de resíduos de neonicotinóides no pólen forrageado
e em tecidos das espécies de abelhas *Apis mellifera*
africanizada e *Tetragonisca angustula* Latreille (1811)**

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

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos – SP

2021

RESUMO

As abelhas têm um papel muito importante na sustentação das florestas e da produção agrícola, já que através da polinização mantêm a biodiversidade e aumentam o rendimento de sementes e frutas. No entanto, nos últimos anos a população das abelhas está em declínio, em parte, devido aos efeitos de agrotóxicos, principalmente os neonicotinóides. No Brasil tem se tornado cada vez mais comuns episódios de mortalidade de abelhas e abandono de colmeias como consequência do uso extensivo de agrotóxicos. Apesar disso, existem poucos estudos sobre os efeitos dessas substâncias nas espécies nativas e híbridas. Assim, o presente estudo teve como finalidade desenvolver um método de extração QuEChERS miniaturizado seguido da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), para a determinação dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam no pólen forrageado e nos tecidos das abelhas *Apis mellifera* africanizada e *Tetragonisca angustula* Latreille (1811). Este método permitiu estimar resíduos dos agrotóxicos em níveis de nanograma/grama (ng g^{-1}), usando pequenas quantidades de amostra e reagentes. Desta forma, foram empregadas pequenas quantidades de solventes e sais, 15 vezes menos do que a utilizada nos métodos tradicionais. Obtiveram-se recuperações médias entre 64,5 e 105,5 %, com repetibilidade abaixo de 20 %, LOD e LOQ de 0,7 e 3 ng g^{-1} para ambos os inseticidas. Utilizando o método proposto, foram analisadas abelhas *A. mellifera* africanizadas de colmeias localizadas no estado de São Paulo e amostras de pólen e abelhas *T. angustula* de meliponários situados no município de Bom Repouso (Minas Gerais). Os neonicotinóides foram detectados em concentrações entre 7,0 e 27,0 ng g^{-1} , obtendo-se a maior concentração para o tiametoxam em tecidos de *A. mellifera* africanizada. A metodologia desenvolvida mostrou versatilidade para a extração de neonicotinóides em tecidos de abelhas de diferentes espécies e matrizes apícolas, deste modo poderá ser usado como um método analítico que segue os princípios da química verde, para analisar neonicotinóides em níveis de resíduo em pequenas quantidades de amostras apícolas, consequentemente economizando produtos químicos e gerando poucos resíduos.

Palavras-chave: QuEChERS; abelhas; pólen; neonicotinóides; cromatografia líquida; espectrometria de massas; miniaturização.

ABSTRACT

Bees have a very important role in sustaining forests and agricultural production since through pollination they maintain biodiversity and increase the yield of seeds and fruits. Nevertheless, in recent years the bee population has been declining, in part, because of the effects of pesticides, especially neonicotinoids. In Brazil, it has become increasingly common episodes of bee mortality and abandonment of hives as a consequence of the extensive use of pesticides. Despite this, there are few studies on the effects of these substances on native and hybrid species. Thus, the present study aimed to develop a miniaturized QuEChERS extraction method followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the determination of the neonicotinoids imidacloprid and thiamethoxam in the foraged pollen and bees' tissues from Africanized *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* Latreille (1811). This method allowed the estimation of pesticide residues at nanogram/gram (ng g^{-1}) levels, using small quantities of sample and reagent. In this way, low amounts of solvents and salts were employed, 15 times fewer than that utilized in traditional methods. Average recoveries ranged from 64.5 to 105.5 % were obtained, with repeatability below 20 %, LOD and LOQ of 0.7 and 3 ng g^{-1} for both insecticides. Using the proposed approach, Africanized *A. mellifera* honeybees from hives located at São Paulo state and pollen's samples and *T. angustula* bees from meliponaries located in the city of Bom Repouso (Minas Gerais) were analyzed. Neonicotinoids were detected in concentrations between 7.0 to 27.0 ng g^{-1} , obtaining the highest concentration for thiamethoxam in Africanized *A. mellifera* honeybees' tissues. The developed methodology showed versatility for the extraction of neonicotinoids in tissues of different species of bees and beekeeping matrices, therefore it can be used as an analytical method that follows the green chemistry's principles to analyze neonicotinoids at trace levels in small quantities of beekeeping samples, consequently saving chemicals and reducing waste.

Keywords: QuEChERS, bees, pollen, neonicotinoids, liquid chromatography, mass spectrometry, miniaturization.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, apicultores e pesquisadores tem se preocupado pela diminuição da diversidade e população das abelhas (FREITAS; PEREIRA, 2004), já que de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a grande maioria das plantas do planeta dependem dos polinizadores (FAO, 2009). Entre as principais causas do declínio da população das abelhas se encontra o uso extensivo de agrotóxicos, pois estas substâncias são altamente tóxicas para as abelhas e demais polinizadores. Além disso, mesmo em baixas concentrações, seus efeitos podem ser letais o subletais (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA), 2012).

No Brasil, a questão dos agrotóxicos é preocupante, devido a que nos últimos anos tem aumentado seu consumo por causa da expansão dos monocultivos, já que esses cultivos são muito vulneráveis a pragas e requerem fumigações intensas. Ao mesmo tempo têm se registrado vários incidentes sobre mortalidade de abelhas por possível contaminação pelo uso inadequado destas substâncias, principalmente os neonicotinóides (PIRES *et al.*, 2016). Contudo, as pesquisas acerca os efeitos nocivos dos agrotóxicos sobre as abelhas do território nacional ainda são escassas (IBAMA, 2012).

Os neonicotinóides são um dos inseticidas mais utilizados em diversos cultivos no Brasil e no mundo (TOMIZAWA; CASIDA, 2005; BRASIL, 2015a, 2015b), ademais seu efeito tóxico sobre as abelhas tem sido amplamente descrito na literatura e associado às causas de declínio da população dos polinizadores (THOMPSON, 2003), o qual afeta a agricultura e, principalmente para a sobrevivência das espécies.

Deste modo, a proposta aqui apresentada do desenvolvimento e validação de um método analítico para a identificação e quantificação dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam em amostras de pólen forrageado e nos tecidos das abelhas *Apis mellifera* africanizada e *Tetragonisca angustula* Latreille (1811), por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), permitirá contribuir com a documentação e avaliação dos riscos de exposição das espécies investigadas para a possível adoção de medidas que permitam o uso razoável de agrotóxicos e a sustentação dos polinizadores nas áreas agrícolas nacionais.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1.1. Abelhas

As abelhas são consideradas os agentes polinizadores mais importantes, devido ao seu grande número, já que representam cerca de 25.000 das 40.000 espécies de polinizadores; à sua vida social e à sua eficiência na polinização, pois polinizam uma ampla variedade de flores. A polinização é o principal mecanismo para manter a biodiversidade vegetal na Terra, no qual é garantida a produção de frutas e sementes, além da reprodução de várias plantas. De acordo com a FAO, 85 % das espécies conhecidas de plantas com flores e 70 % das culturas agrícolas dependem dos polinizadores para se reproduzirem, principalmente abelhas (FAO, 2009).

As abelhas precisam encontrar seu alimento nas flores, o qual pode ser néctar ou pólen. Para isso, as abelhas voam de flor em flor, escovando e movendo os grãos de pólen para arrumá-los nas suas corbículas (cestos de pólen) feitas de pelos duros, longos e densos nas suas patas traseiras. Alguns desses grãos são tão secos que não formam uma moita, então para evitar que caiam durante o voo, as abelhas regurgitam um pouco do néctar ou mel, e misturá-lo com o pólen. Algumas abelhas não têm corbículas e transportam o pólen nos pelos localizados em seu abdômen. Assim, quando a abelha com pólen pousa na próxima flor, haverá suficiente pólen nos pelos do seu corpo para polinizar a nova flor (FAO, 2009).

Algumas plantas precisam de visitas frequentes, como por exemplo a flor de maçã, que pode precisar de quatro ou cinco visitas para receber os grãos de pólen suficientes para sua fertilização. Se a fertilização for inadequada devido à falta de abelhas, nem todas as sementes se desenvolverão, e a forma do fruto será pobre e pequena. As abelhas apresentam um comportamento denominado constância de forrageamento, dado que quando forrageiam néctar ou pólen, elas visitam as mesmas espécies de flores, desde que haja suficientes recursos, e não se comportam como os outros insetos polinizadores que visitam diferentes espécies de plantas na mesma viagem sem nenhum grande efeito de polinização (FAO, 2009).

Normalmente, uma abelha pode chegar a visitar entre 50 e 1.000 flores em uma única viagem, que leva entre 30 minutos a quatro horas. A capacidade da abelha comunicar-se com outras abelhas na colônia para reunir recursos florais é muito importante para sua eficiência como polinizadores (FAO, 2009). Quando uma abelha escoteira encontra uma fonte de néctar ou pólen, ela voltará para a colônia e se comunicará com outras abelhas por meio de uma dança especial para lhes indicar a distância, qualidade e direção onde se encontra. A vivacidade dessa dança dependerá da qualidade e a quantidade da fonte de alimento. Se a fonte for de excelente qualidade, cada vez que retornarem da coleta, as forrageadoras dançarão com entusiasmo e

longamente. No caso contrário, as danças serão menos intensas, mais curtas e menos vigorosas, consequentemente recrutarão menos novas forrageadoras (WINSTON, 1991).

Após a visita às flores, a abelha forrageira retorna à colônia com suas cargas de néctar e/ou pólen, as quais são colocadas no ninho em áreas do favo perto da ninhada. A composição principal do néctar é entre 5-80 % de açúcares, além de outros compostos tais como minerais, vitaminas e ácidos orgânicos. Por sua alta concentração de carboidratos, esta atua como a principal fonte de energia da abelha. O seu consumo varia de acordo com o estágio de vida da abelha (larva ou abelha adulta) e as suas tarefas desempenhadas na colmeia (RORTAIS *et al.*, 2005).

O pólen é o alimento proteico das abelhas, já que contém entre 6-28 % de proteínas, 1-20 % de lipídios, carboidratos, vitaminas, minerais e aproximadamente 0,5 % de esteróis. Tal como acontece com o néctar, o consumo de pólen varia segundo o estágio da abelha (RORTAIS *et al.*, 2005). As abelhas amamentadoras consomem grandes quantidades de pólen para produzir leite de abelha ou geléia real para alimentar a rainha e a ninhada. Se a colônia não tiver pólen disponível, a rainha parará de botar ovos (FAO, 2009).

Estima-se que existam mais de 20.000 espécies de abelhas distribuídas ao redor do mundo, mas muitas delas são solitárias e pouco sociais, o que significa que não há contato entre a mãe e sua prole. Após ser fecundada, a abelha fêmea prepara o ninho, põe um único ovo, fornece alimento para sua cria, fecha o ninho e o abandona. Dentre as espécies que apresentam um alto nível de desenvolvimento social, destacam-se as famílias Halictidae, Anthophoridae e Apidae. Estas famílias consideram-se sociais pois apresentam uma casta reprodutiva (uma rainha), cuidam a sua prole e possuem sobreposição de gerações. Embora muitas espécies de abelhas colem néctar, que posteriormente convertem em mel e finalmente o armazenam como fonte de alimento, apenas algumas grandes colônias formadas por espécies sociais da família Apidae tais como as tribos Apini (*Apis mellifera*) e Meliponini (abelhas sem ferrão), conseguem armazenar quantidades significativas de mel, sendo exploradas pelos humanos para consumo (FAO, 2009).

O Brasil abriga cerca de 5.000 espécies de abelhas, incluindo abelhas sociais e solitárias. Dentre elas, as Meliponini compõem a grande maioria das espécies de abelhas nativas e são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão. Em termos de produção de mel, as abelhas da espécie *Apis mellifera* são mais produtivas. Por isso, durante o período colonial foram introduzidas algumas variedades da *Apis mellifera* para fins de apicultura, provenientes da Europa (*A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica* e *A. mellifera carnica*) e do continente africano (*A. mellifera scutellata*). Atualmente, a maioria dos ninhos naturais estão formados por

um poli-híbrido destas subespécies denominado *Apis mellifera* africanizada (Figura 1), o qual apresenta uma maior resistência aos patógenos e parasitas (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Figura 1 – Abelhas *Apis mellifera*.

Fonte: IRL AGROPECUÁRIA, 2021.

As abelhas *A. mellifera* africanizadas possuem relevância ecológica e econômica, uma vez que se apresenta extensivamente distribuída ao longo de todo o território brasileiro. Dessa forma, sua distribuição contribui com a polinização das áreas agrícolas, devido a seu amplo perfil na busca de recursos florais, o tamanho de suas colônias e seu fácil manejo (PIRES *et al.*, 2016). Acredita-se que aproximadamente o 60 % das plantas cultivadas para o consumo humano no Brasil, dependem da polinização feita por abelhas (GIANNINI *et al.*, 2015); nesse contexto, estima-se que os valores globais do serviço de polinização das culturas, representam entre US\$195 a US\$387 bilhões anuais para o setor agrícola (PORTO *et al.*, 2020).

Além de aumentar a produtividade e qualidade dos frutos, as abelhas representam um grande valor na produção de mel e outros produtos como geléia real, própolis, pólen etc. Em 2019, o Brasil produziu 46 mil toneladas de mel com o valor da produção de 493,7 milhões de reais, sendo os maiores produtores os estados do Paraná (15,7 %), Rio Grande do Sul (13,6 %), Piauí (10,9 %), São Paulo (9,8 %) e Minas Gerais (9,2 %) (PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL, 2019).

As abelhas sem ferrão (Meliponini) também são essenciais para a meliponicultura e o ecossistema brasileiro, através da polinização da vegetação nativa e algumas plantas de consumo humano (SLAA *et al.*, 2006). Estas abelhas são tão eficientes no processo de polinização quanto a espécie *A. mellifera*, pois realizam visitas constantes a uma única fonte

floral, aumentando a quantidade dos frutos assim como a sua qualidade (SLAA *et al.*, 2006; KLATT *et al.*, 2014). Elas também apresentam outras vantagens, devido a sua falta de ferrão, tornando-as menos prejudiciais para humanos e animais domésticos (HEARD, 1999).

A espécie Meliponini que mais habita nos ecossistemas da região neotropical é a abelha *Tetragonisca angustula* Latreille (1811) (Figura 2), conhecida pelo nome de origem indígena “Jataí” (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2004). É uma abelha de pequeno porte com uma grande capacidade de adaptação, facilidade de manejo das suas colônias (SLAA *et al.*, 2006; VOSSLER *et al.*, 2018). Além disso, o seu serviço de polinização é de suma importância em diversas culturas para o desenvolvimento dos frutos, como no caso do cultivo de morango (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2004; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). Seu mel possui um maior valor econômico em comparação com o produzido pelas *A. mellifera*, devido à sua baixa produtividade (aproximadamente 1 litro por colônia ao ano). Ele possui consistência, aroma, coloração e sabor diferenciados, e é procurado pelas suas propriedades nutritivas e medicinais, já que é rico em substâncias antibactericidas e praticamente dispensa de pasteurização (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Figura 2 – Abelha *Tetragonisca angustula* Latreille (1811).

Fonte:INFANTE, 2019.

1.2. Declínio da população de abelhas

Estudos recentes têm mostrado o declínio de muitos polinizadores no mundo, o qual afeta a polinização nos ecossistemas tanto naturais como agrícolas, e a reprodução de plantas silvestres (POTTS *et al.*, 2010). As perdas significativas de colônias de abelhas de *A. mellifera* registradas nos Estados Unidos (VANENGELSDORP *et al.*, 2007, 2011) e na Europa (LAURENT *et al.*, 2016) entre 2006 e 2010, deram origem a um fenômeno chamado distúrbio

do colapso das colônias (DCC). Segundo Vanengelsdorp *et al.* (2009b), o DCC se caracteriza pela diminuição rápida e inexplicável de abelhas adultas e operárias das colmeias, evidenciada pelo excesso de abelhas imaturas e invasão da colmeia por pragas.

Dentre os fatores que estão relacionados ao declínio das populações de polinizadores, destaca-se o desmatamento para expansão de cidades e culturas agrícolas, práticas inadequadas de apicultura, agentes patógenos e o uso intensivo de agrotóxicos. Os inseticidas, principalmente aqueles que possuem ação neurotóxica, amplificam seu efeito, os herbicidas diminuem os lugares de nidificação e o número de flores silvestres, e alguns fungicidas podem exercer ação repelente, reduzindo as visitas florais às culturas, ou também podem afetar a disponibilidade do pólen, devido às possíveis anomalias cromossômicas durante a meiose (FREITAS *et al.*, 2009).

Há alguns casos documentados sobre a morte de colônias de abelhas no Brasil. Carvalho e Message (2004) relataram mortes em larga escala de *A. mellifera*, devido ao pólen tóxico de barbatimão (*Stryphnodendron* spp.). Ao longo dos anos, estas perdas têm se tornado cada vez mais comuns no território nacional, como consequência do crescimento da produção de agrocombustíveis, que resulta no aumento do uso de agrotóxicos. Estas substâncias afetam tanto as abelhas melíferas como sem ferrão, e por isso os apicultores tendem a atribuir as suas perdas de colônias aos inseticidas, principalmente aos neonicotinóides (VANDAME; PALACIO, 2010).

Na região sudeste do país, especificamente no município de Altinópolis (São Paulo), foram registradas perdas de abelhas em apiários próximos a culturas de cana-de-açúcar e eucalipto, nas quais são frequentemente usados os neonicotinóides e o fipronil. Nessas colônias foi detectada a presença do ácaro *V. destructor* e outros patógenos, como o fungo *N. ceranae*, dentre outros vírus (TEIXEIRA *et al.*, 2008, 2012). Na região sul, nos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, também ocorreram perdas por uma alta infestação de *V. destructor*. Desta forma, parece que atualmente os apicultores estão tendo mais problemas com o *V. destructor* e o *N. ceranae*, devido ao enfraquecimento do sistema imunológico das abelhas por causa do uso de agrotóxicos (VANDAME; PALACIO, 2010).

1.3. Agrotóxicos e as abelhas

Segundo o artigo 2º do Código Internacional de Conduta para a Gestão de Pesticidas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), denomina-se agrotóxico a “qualquer substância ou mistura de substâncias de ingredientes químicos ou biológicos, destinadas a repelir, destruir ou controlar qualquer praga, ou para regular o crescimento da planta” (FAO, 2014, p. 6). No Brasil, conforme o Decreto nº 4.074 que regimenta a Lei nº 7.802/1989, estabelece que os agrotóxicos são:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

A ação dos agrotóxicos sobre os organismos a eliminar ou controlar pode ser por contato, ingestão, atividade sistêmica (que age no interior da planta e é transladado através da seiva até os frutos) ou por fumigação (BAIRD; CANN, 2011). Assim, conforme o organismo alvo, os agrotóxicos podem ser classificados da seguinte forma:

Tabela 1 – Classificação dos agrotóxicos conforme seu alvo.

Tipo de agrotóxico	Organismo alvo
Acaricida	Ácaros
Avicida	Aves comedoras de sementes
Bactericida	Bactérias do solo
Fungicida	Fungos
Herbicida	Ervas daninhas
Inseticida	Insetos
Moluscicida	Caracóis, lesmas
Nematicida	Nematóides (parasitas de plantas nas raízes)
Raticida	Roedores

Fonte: Adaptação BAIRD; CANN, 2011.

Para determinar os efeitos dos agrotóxicos sobre um organismo, são obtidos dados toxicológicos a partir da toxicidade aguda, onde se observa que tão rápido aparecem os sintomas, incluindo a morte. Apesar desta toxicidade ser de interesse quando o organismo é exposto acidentalmente ao agrotóxico, a toxicologia ambiental foca-se mais na exposição

crônica, que é a exposição contínua por um longo período, relativa a uma dose individual baixa para um composto químico tóxico. Além disso, a mesma substância pode ter tanto efeitos crônicos como agudos em um mesmo organismo (BAIRD; CANN, 2011).

Devido ao fato de os indivíduos diferirem significativamente em suas susceptibilidades para um dado composto, a classificação toxicológica dos agrotóxicos baseia-se na dose que provoca a morte do 50 % da população dos organismos testados, denominada dose letal média (DL₅₀). Portanto, os agrotóxicos são classificados em quatro classes segundo sua toxicidade como se observa na Tabela 2, onde o agrotóxico com menor DL₅₀ é considerado o mais tóxico, já que é necessária uma menor quantidade para prejudicar o organismo (BAIRD; CANN, 2011).

Tabela 2 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Classe	Classificação	DL ₅₀ (mg i.a./kg de organismo)
I	Extremamente perigoso	<50
II	Altamente perigoso	50-500
III	Moderadamente perigoso	500-5000
IV	Ligeiramente perigoso	>5000

i.a., ingrediente ativo

Fonte: Adaptação BAIRD; CANN, 2011.

Outro parâmetro usualmente utilizado para determinar se as concentrações presentes de um agrotóxico específico em uma amostra ambiental são perigosas é a concentração letal média (CL₅₀), a qual faz referência à concentração do composto que é letal para 50 % da população dos organismos testados durante um período de exposição fixado (BAIRD; CANN, 2011).

Na agricultura, o uso intensivo de agrotóxicos para melhorar a produtividade resultou na ampla distribuição desses compostos no meio ambiente. Recentemente, o uso de agrotóxicos no Brasil tem aumentado em virtude da expansão do agronegócio. Embora as abelhas não sejam o alvo dos agrotóxicos, elas apresentam uma alta vulnerabilidade à exposição à estas substâncias. Além dos efeitos de toxicidade aguda que causam a morte das abelhas, os agrotóxicos podem também gerar alterações no seu comportamento, que com o passar do tempo, podem originar sérios danos na manutenção das colônias (IBAMA, 2012). Entre os impactos negativos das doses subletais de agrotóxicos nas abelhas se encontram a diminuição da longevidade das abelhas e taxas de sobrevivência (WU *et al.*, 2011), dificuldades nos processos de desintoxicação (BERENBAUM; JOHNSON, 2015) e na atividade de forrageamento da colônia (SCHNEIDER *et al.*, 2012), declínio na geração de progênes, alteração na habilidade de produção de feromônios da rainha para inibir a formação de novas rainhas (DUSSAUBAT *et al.*, 2016), além de deformidades morfogênicas como menor tamanho corporal, malformações das asas e das pernas (FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Também, os agrotóxicos em baixas doses podem interagir com agentes infecciosos e parasitários que afetam as abelhas (PETTIS *et al.*, 2012).

As abelhas são susceptíveis à maioria dos agrotóxicos em determinadas concentrações, principalmente aos inseticidas (LOZOWICK, 2013). A intoxicação das abelhas por estas substâncias acontece por contato, ingestão e fumigação, geralmente durante a procura de recursos alimentares como pólen e néctar (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014). Desta forma, o pólen e o néctar contaminados com resíduos de agrotóxicos são levados até a colmeia, onde permanecem por um tempo no pão de abelha e mel. Consequentemente, as larvas e a rainha são alimentadas com esses resíduos e, também são afetadas como as abelhas forrageiras (ORANTES-BERMEJO *et al.*, 2010). Além da comida, as abelhas bebem água para controlar a sua temperatura corporal, a qual pode estar eventualmente contaminada por agrotóxicos provenientes do solo (SCHMARANZER, 2000; BELDEN *et al.*, 2007).

Além dos agrotóxicos usados na agricultura, as abelhas também estão expostas ao acaricidas usados para o controle de parasitas, entrando em contato com maiores concentrações dessas substâncias (MARTEL *et al.*, 2007).

Dessa forma, não é surpresa que até o momento tenham sido encontrados resíduos de 173 compostos diferentes nos apiários (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014), fazendo com que as abelhas não sejam ameaçadas unicamente por um produto, mas pela mistura de muitos deles (SANCHEZ-BAYO; GOYA, 2016).

Por sua natureza, os inseticidas são os compostos mais tóxicos para as abelhas. Deste modo, a Tabela 3 apresenta as DL₅₀ de contato e oral de alguns inseticidas para as abelhas. Estes valores também podem ser expressos em µg/abelha (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

Tabela 3 – Toxicidade de inseticidas comuns para as abelhas (DL₅₀ em 48 horas) por contato ou exposição oral.

Inseticida	DL ₅₀ contato (µg/abelha)	DL ₅₀ oral (µg/abelha)
Carbofurano	0,16	-
Clorpirifós	0,072	0,24
Diazinona	0,38	0,21
Fipronil	0,007	0,001
Clotianidina	0,039	0,004
Imidacloprida	0,061	0,013
Tiametoxam	0,024	0,005
Dinotefuran	0,043	0,015

Fonte: Adaptação SANCHEZ-BAYO; GOYA, 2016.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) considera quatro níveis de toxicidade de agrotóxicos para as abelhas (US-EPA, 2014):

Altamente tóxico: $DL_{50} < 2 \mu\text{g/abelha}$;

Moderadamente tóxico: $2 \leq DL_{50} \leq 11 \mu\text{g/abelha}$;

Levemente tóxico: $11 < DL_{50} < 100 \mu\text{g/abelha}$;

Não tóxico: $DL_{50} > 100 \mu\text{g/abelha}$.

No Brasil, os inseticidas são os agrotóxicos de maior preocupação, por isso o Ministério do Meio Ambiente através do IBAMA, publicou a Instrução Normativa nº 2, de 9 de fevereiro de 2017 que resolve:

Art. 1º Estabelecer diretrizes, requisitos e procedimentos para a avaliação dos riscos de ingredientes ativos de agrotóxicos para insetos polinizadores, utilizando-se as abelhas como organismos indicadores.

§ 1º A avaliação de que trata o caput restringir-se-á aos ingredientes ativos ainda não registrados no Brasil em produtos técnicos, pré-misturas ou formulações, aos ingredientes ativos submetidos à reavaliação bem como a novos pleitos de produtos formulados à base de ingredientes ativos que já tenham sido submetidos à avaliação de risco para insetos polinizadores (BRASIL, 2017, p. 33).

Essa norma converteu-se na primeira a definir critérios de decisão fundados na probabilidade de ocorrência de um efeito adverso, em virtude da exposição a agrotóxicos, portanto restringe o registro de agrotóxicos ao comparecimento de informações que possibilitem o seu uso apropriado sem danificar a sobrevivência, reprodução e desenvolvimento das abelhas, assim sendo promove a proteção dos polinizadores (BRASIL, 2017, p. 33).

1.4. Neonicotinóides

Os neonicotinóides são inseticidas de uma classe relativamente nova e amplamente utilizados que agem no sistema nervoso central de insetos sugadores, como pulgas e pulgões (PESTICIDE ACTION NETWORK NORTH AMERICA (PANNA), 2012). Além disso, apresentam atividade sobre insetos que são resistentes a outras classes de agrotóxicos, tais como, organofosforados, carbamatos, piretróides etc. (VAN DER SLUIJS *et al.*, 2013).

Esses compostos foram introduzidos na década de 1990 e desde então se tornaram na classe de inseticidas com maior crescimento na história dos agrotóxicos sintéticos. Em 2005, os neonicotinóides haviam conquistado 16 % do mercado total global, e quase um 77 % do mercado de tratamento de sementes. Entre seus usos estão tratamentos tópicos contra pulgas para animais de estimação, gramado e jardim, e uma variedade de usos agrícolas, incluindo frutas de caroço, nozes, algodão, arroz, milho, soja, cana-de-açúcar dentre outras (PANNA, 2012).

Os neonicotinóides são inseticidas neuromusculares pertencentes ao grupo de moduladores competitivos dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR). Esses receptores são sensíveis à ação da nicotina, pois ela é estruturalmente semelhante à molécula de acetilcolina (ACh). Porém a nicotina é um inseticida natural produzido pelas plantas de tabaco (JESCHKE *et al.*, 2011).

A acetilcolina é o principal e mais rápido neurotransmissor de excitação nos insetos. Portanto, esses compostos imitam a ação da acetilcolina, estimulando repetidamente as células nervosas. Ao ligar-se aos receptores nicotínicos, a enzima acetilcolinesterase (AChE) que é responsável por degradar as moléculas de acetilcolina e interromper os sinais nervosos, não atua sobre eles, desta forma o inseto é levado à morte por hiperexcitação nervosa (TOMIZAWA; YAMAMOTO, 1993; GOULSON, 2013).

A semelhança entre essas moléculas se deve ao alinhamento de suas estruturas com áreas-chave no receptor nAChR do inseto que interagem com certas partes das elipses como se observa na Figura 3. O sítio catiônico contém um resíduo de triptofano que atrai o átomo de nitrogênio carregado tanto na ACh como na nicotina. Nos neonicotinóides por exemplo, o correspondente átomo de nitrogênio carregado parcialmente positivo no imidacloprida, também se liga a este resíduo. Uma segunda ligação acontece entre o grupo carbonila da ACh e o grupo piridina das outras moléculas. Ademais, os receptores de insetos também contêm grupos que se ligam ao grupo nitro do imidacloprida, contribuindo ainda mais para a seletividade dessas moléculas. Assim sendo, os neonicotinóides nada mais são do que moléculas sintéticas análogas à nicotina, com o mesmo modo de ação (BASF, 2013).

Figura 3 – Interações intermoleculares entre a acetilcolina (ACh), a nicotina e os neonicotinóides.

Fonte: Adaptação BASF, 2013.

No total, existem sete compostos registrados no mercado pertencentes à classe dos neonicotinóides. Estes podem ser classificados de acordo com seu grupo farmacóforo como se mostra na Figura 4: N-nitro-guanidinas (imidacloprida, tiametoxam, clotianidina e dinotefuran), nitrometileno (nitempiram) e N-ciano-amidinas (acetamiprida e tiaclopride) (ELBERT *et al.*, 2008; JESCHKE *et al.*, 2011).

Figura 4 – Estruturas dos neonicotinóides. Cada farmacóforo foi identificado com uma cor: N-nitro-guanidinas (vermelho), nitrometileno (azul) e N-ciano-amidinas (verde).

Fonte: ELBERT *et al.*, 2008; JESCHKE *et al.*, 2011.

Os neonicotinóides com uma porção N-ciano-amidina (acetamiprida e tiaclopride) não são tóxicos para as abelhas (JESCHKE; NAUEN, 2008). No entanto, os neonicotinóides que contém N-nitro-guanidina (tiametoxam, imidacloprida e clotianidina) mostram uma alta seletividade para ligação aos nAChRs dos insetos como se observou na Figura 3 (KANNE *et al.*, 2005), portanto são considerados altamente tóxicos para as abelhas (JESCHKE; NAUEN, 2008). Devido às suas propriedades químicas, os neonicotinóides têm potencial para se acumular no solo e persistem por anos, dado que são altamente solúveis em água e estão presentes em todas as plantas tratadas, desde a semente até a colheita (PANNA, 2012).

Os neonicotinóides clotianidina, imidacloprida e tiametoxam podem ser considerados como os inseticidas mais utilizados no mundo para o controle de pragas e são registrados no Brasil para várias culturas (TOMIZAWA; CASIDA, 2005; BRASIL, 2015a, 2015b). Estes neonicotinóides são conhecidos por serem altamente tóxicos para as abelhas e por isso há indícios que possam estar relacionados às causas do DCC que vêm afetando as colônias de *A. mellifera* ao redor do mundo (THOMPSON, 2003).

Várias pesquisas nos EUA e na Europa demonstraram a presença de misturas de formulações e vários tipos desses agrotóxicos nas abelhas, cera, alimento estocado e no pólen e néctar disponível para as abelhas se alimentarem. Os estudos também encontraram neonicotinóides no solo, poeira, exaustão da plantadeira, gotas de água (gutação) exsudadas por plantas tratadas e em plantas não tratadas de campos próximos (KRUPKE *et al.*, 2012; MULLIN *et al.*, 2010; VANENGELSDORP *et al.*, 2009a; BONMATIN *et al.*, 2005a).

1.4.1. Imidacloprida

O imidacloprida é o neonicotinóide mais utilizado nas plantações em todo o mundo, além de estar registrado para muitos usos não agrícolas tais como o tratamento local de pulgas, tratamento de grama para larvas brancas e como cupinicida. É um inseticida de amplo espectro com excelente atividade sistêmica e de contato, empregado em solos, sementes e aplicações foliares para o controle de insetos sugadores em muitas culturas tais como arroz, cereais, milho, girassóis, batatas e vegetais. Ele age sobre os receptores nicotínicos dos insetos, expressando baixa toxicidade para as espécies de vertebrados (BONMATIN *et al.*, 2005b). A Tabela 4 apresenta as propriedades físicas e químicas do imidacloprida:

Tabela 4 – Propriedades físicas e químicas do imidacloprida.

Nome IUPAC	1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilideno amina	
Fórmula molecular	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	
Massa molar (g mol⁻¹)	255,7	
Solubilidade em água a 20 °C (g L⁻¹)	0,61	
Solubilidade em solventes orgânicos a 20 °C (g L⁻¹)	Acetonitrila	50
	Acetona	50
Log K_{ow} (21 °C)	0,57	

Fonte: FAO, 2002.

Cresswell *et al.* (2012) expuseram abelhas operárias adultas das espécies *Bombus terrestris* L. e *Apis mellifera* L. a uma dieta de xarope com imidacloprida em dosagens entre 0,08 e 125 $\mu\text{g L}^{-1}$. As abelhas *A. mellifera* L. não mostraram resposta à dieta com imidacloprida em nenhuma das variáveis medidas (alimentação, locomoção e longevidade). Em contraste, as abelhas *Bombus terrestris* L. reduziram progressivamente a dependência da dose na taxa de alimentação com declínios de 10-30 % na faixa ambientalmente relevante de até 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, porém a sua atividade locomotora e longevidade não variaram com a dieta. Os cientistas especulam que essa diferencia na sensibilidade se deve a que as *A. mellifera* L. estão melhor pré-adaptadas do que as *Bombus terrestris* L. para se alimentar de néctares contendo alcaloides sintéticos, como o imidacloprida, em virtude de sua adaptação ancestral aos néctares tropicais nos quais os alcaloides naturais são prevalentes. Não obstante, enfatizam que seu estudo não sugere que as colônias de abelhas melíferas sejam invulneráveis às dietas com imidacloprida em condições de campo, mas seus resultados levantaram novas preocupações sobre o impacto dos neonicotinóides nas populações de abelhas selvagens.

Dively *et al.* (2015) estudaram durante três anos colmeias de *A. mellifera* para determinar o destino dos resíduos de imidacloprida além de avaliar os efeitos subletais crônicos em abelhas alimentadas com dieta suplementar de pólen contendo imidacloprida a 5, 20 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ao longo de vários ciclos de criação. Para isso foram medidos os parâmetros de toxicidade do desempenho da colônia e o comportamento de forrageamento durante e após a exposição, incluindo a sobrevivência no inverno. Doses de exposição ao imidacloprida de até 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, não tiveram efeitos significativos na atividade de forrageamento ou outros indicadores de desempenho da colônia durante e logo após a exposição. A saúde das colônias não foi afetada por doenças e pragas, mas as infestações de ácaros *Varroa* foram significativamente maiores nas colônias expostas. As reservas de mel indicaram que as colônias expostas podem ter evitado o alimento contaminado. Os efeitos da dose de imidacloprida foram adiados mais tarde no verão, quando as colônias expostas a 20 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ apresentaram taxas mais altas de falha

da rainha e períodos sem cria, o que levou a colônias mais fracas no inverno. Ao longo de dois anos, a sobrevivência de inverno das colônias foi em média 59,2-85,7 %. De acordo com as evidências, a exposição crônica ao imidacloprida na faixa mais alta de doses de campo (20 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) no pólen de certas safras tratadas pode causar impactos negativos na saúde das colônias de abelhas e reduzir o sucesso da hibernação.

Calatayud-Vernich *et al.* (2016b) avaliaram o impacto potencial dos agroquímicos na taxa de mortalidade das abelhas *A. mellifera* L. durante a época de florescência de árvores cítricas em Valencia (Espanha), encontrando uma média de quatro agrotóxicos por amostra de abelha. O imidacloprida foi um dos agroquímicos mais detectados. Quase 32 % das amostras apresentaram imidacloprida com uma concentração máxima de 223 ng g^{-1} .

Martinello *et al.* (2017) estudaram a correlação potencial entre a mortalidade das abelhas melíferas com a exposição a tratamentos de agrotóxicos e infecções de vírus no nordeste da Itália durante a primavera de 2014. Para isto, foram monitorados 150 ingredientes ativos e três vírus. Em 72,2 % das 79 amostras de abelhas mortas, foi detectado pelo menos um ingrediente ativo, sendo os mais abundantes o imidacloprida, clorpirifós, tau-fluvalinato e ciprodinil.

Estudos anteriores demonstraram que as larvas de *A. mellifera* expostas a doses subletais de imidacloprida apresentam anormalidades comportamentais como insetos adultos. Por isso, Wu *et al.* (2017) investigaram as mudanças globais de expressão gênica nas cabeças de adultos recém-emergidos e observaram que 578 genes mostraram alterações de mais de 2 vezes na expressão gênica após a exposição a imidacloprida. Os genes que codificam as principais proteínas da geléia real (MRJPs), um grupo de proteínas multifuncionais com papéis significativos no desenvolvimento sustentável de colônias de abelhas, foram fortemente desregulados. Esses padrões de desregulação foram posteriormente confirmados por meio de análises usando a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa nas cabeças de abelhas de operárias de 6 dias de idade.

Raymann *et al.* (2018) estudaram o impacto do imidacloprida na composição do microbioma intestinal, na sobrevivência e na suscetibilidade a patógenos de abelhas melíferas. Da mesma forma que outros estudos também mostraram que a exposição ao imidacloprida resulta em uma mortalidade elevada de abelhas na colmeia e aumento da suscetibilidade à infecção por patógenos. No entanto, não encontraram evidências sobre o efeito do imidacloprida na comunidade bacteriana intestinal das abelhas. Os experimentos *in vitro* demonstraram que as bactérias intestinais da abelha podem crescer na presença do imidacloprida, e além disso encontraram algumas evidências de que o imidacloprida pode ser metabolizado no ambiente intestinal da abelha. No entanto, nenhuma das espécies bacterianas

individuais do intestino das abelhas testadas conseguiram metabolizar o imidacloprida, sugerindo que o metabolismo observado do imidacloprida nas culturas de intestino de abelhas *in vitro* não foi causado pelas bactérias do intestino. Em geral, os resultados do estudo indicaram que o imidacloprida causa aumento da mortalidade em abelhas, mas essa mortalidade não parece estar ligada ao microbioma.

Pesquisas recentes sobre as monooxigenases do citocromo P450 das abelhas *A. mellifera* (P450s) revelaram o CYP9Q3 como o determinante molecular que medeia a seletividade dos inseticidas neonicotinóides, explicando por que certos neonicotinóides tais como o imidacloprida apresentam maior toxicidade. Assim, Haas e Nauen (2021) realizaram uma avaliação de risco mecanicista em nível molecular usando um ensaio *in vitro* de alto rendimento baseado em fluorescência, prevendo a interação de diversos quimiotipos dos agrotóxicos, incluindo fungicidas azólicos, com enzimas CYP9Q de abelhas expressas de forma recombinante, conhecidas por metabolizar tiaclopride, acetamiprida e tau-fluvalinato. Alguns fungicidas azólicos mostraram ser sinérgicos em combinação com certos inseticidas, incluindo neonicotinóides e piretróides. Os dados da inibição bioquímica CYP9Q2/CYP9Q3 de azóis revelaram uma correlação notável com seu potencial sinérgico no nível do organismo, explicando os efeitos combinados de toxicidade observados para as misturas de agrotóxicos sob condições de campo. Nenhuma inibição do metabolismo do substrato 7-benziloxi-4-(trifluorometil)-cumarina (BFC) foi observada com o aumento das concentrações de imidacloprida e tiametoxam, demonstrando que o CYP9Q3 não tem a capacidade de metabolizar esses neonicotinóides altamente tóxicos para as abelhas.

1.4.2. Tiametoxam

O tiametoxam é um neonicotinóide com propriedades inseticidas de amplo espectro, registrado em muitos países para o controle de insetos sugadores e mastigadores. Atua nos seus receptores nicotínicos da acetilcolina, danificando o sistema nervoso e por fim causando a morte dos insetos. É empregado em culturas de vegetais, ornamentais, frutas decíduas, frutas cítricas, algodão e arroz. Possui ação por contato e ingestão. Suas propriedades sistêmicas resultaram em seu uso contra insetos que se alimentam de folhas por meio de tratamento de sementes, aplicação no solo, por meio de sistemas de irrigação, ou nos troncos das árvores. Também está

registrado para aplicação foliar direta (GAZZONI, 2008; FAO, 2011). A Tabela 5 apresenta as propriedades físicas e químicas do tiametoxam:

Tabela 5 – Propriedades físicas e químicas do tiametoxam.

Nome IUPAC	(EZ)-3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno(nitro)amina	
Fórmula molecular	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	
Massa molar ($g\ mol^{-1}$)	291,71	
Solubilidade em água a 25 °C ($g\ L^{-1}$)	4,1	
Solubilidade em solventes orgânicos a 25 °C ($g\ L^{-1}$)	Acetonitrila	48
	Acetona	48
Log K_{ow} (25 °C)	-0,13	

Fonte: FAO, 2011.

Oliveira e colaboradores (2014), estudaram os efeitos tóxicos do tiametoxam em operárias de abelhas africanizadas recém-emergidas. Para isso, determinaram a concentração letal do tiametoxam ($CL_{50} = 4,28\ ng\ i.a.\ \mu L^{-1}$ de dieta) e analisaram as amostras de abelhas por técnica morfológica, encontrando que a intoxicação com doses subletais de tiametoxam pode comprometer o cérebro e o intestino médio da abelha, contribuindo para a redução da vida útil do inseto. Após, foram analisadas as sequelas nas células do intestino médio e nos túbulos de Malpighi, expondo forrageiras recém-emergidas por até 8 dias a uma dieta com uma dose subletal igual a 1/10 da CL_{50} . As abelhas foram dissecadas e os órgãos foram processados para microscopia eletrônica de transmissão, assim sendo foi demonstrado que o tiametoxam é citotóxico tanto para o intestino médio como para os túbulos de Malpighi. No intestino, o dano foi mais evidente nas abelhas expostas ao inseticida no primeiro dia. Não obstante, no oitavo dia se observaram as células ultraestruturalmente intactas, sugerindo uma recuperação desse órgão. Com respeito aos túbulos de Malpighi, eles apresentaram alterações pronunciadas no oitavo dia de exposição das abelhas ao inseticida. Este estudo demonstrou que a exposição contínua a uma dose subletal de tiametoxam pode danificar os órgãos encarregados da metabolização do inseticida (CATAE *et al.*, 2014).

A avaliação dos efeitos da exposição aguda ou crônica ao tiametoxam na capacidade de vôo dos forrageiros de *A. mellifera* foi realizada pelo Tosi, Burgio e Nieh (2017) por meio de moinho de vôo. Seus resultados fornecem a primeira demonstração de que a exposição aguda ou crônica a um neonicotinóide de forma isolada, pode alterar significativamente o vôo das abelhas.

No mesmo ano, Tavares *et al.* (2017) avaliaram em condições de laboratório, os efeitos adversos do tiametoxam em larvas, pupas e abelhas emergentes após exposição com diferentes

concentrações no alimento (0,00001; 0,001 e 1,44 ng μL^{-1}). A exposição ao inseticida reduziu a sobrevivência de larvas e pupas e, conseqüentemente, diminuiu a porcentagem de abelhas emergentes. O tiametoxam também induziu distúrbios fisiológicos importantes, já que elevou a atividade da acetilcolinesterase em todas as fases de crescimento e aumentou as atividades da glutathione-S-transferase (GST) e da carboxilesterase *para* (CaEp) nos estágios de pupa. Entretanto, para a fosfatase alcalina intestinal (ALP), não foi detectada nenhuma atividade nos estágios de pupa, e não foi observado nenhum efeito em larvas e abelhas emergentes. Desta forma, os cientistas assumiram que os efeitos do tiametoxam na sobrevivência, emergência e fisiologia das abelhas podem afetar o desenvolvimento da colônia, e por isso deve-se atentar para a exposição aos agrotóxicos durante os estágios de desenvolvimento da abelha. Este estudo foi a primeira investigação dos efeitos do tiametoxam no desenvolvimento de *A. mellifera* após a exposição larval.

Coulon *et al.* (2018) estudaram a cinética de metabolização do tiametoxam em abelhas com uma dieta com esse neonicotinóide. Mostraram que o tiametoxam, na dose de 0,25 ng/abelha/dia é rapidamente e efetivamente metabolizado em clotianidina ao longo de um período de exposição de 20 dias. Em outro experimento, avaliaram o impacto de co-exposição do tiametoxam e do vírus da paralisia crônica (CBPV) que afeta as abelhas. Assim, foi demonstrado que uma dose alta de tiametoxam (5,0 ng/abelha/dia) pode causar aumento sinérgico na mortalidade em abelhas após 8 a 10 dias de exposição. Esses resultados mostraram que as interações entre patógenos e agrotóxicos nas abelhas podem diminuir a tolerância à infecção viral.

Decio *et al.* (2021) analisaram se a exposição de longo prazo à uma dose subletal do tiametoxam altera o padrão de splicing alternativo dos genes em cérebros de abelhas *A. mellifera* africanizadas, tais como a adaptação à sinalização neuronal alterada. Foram encontrados genes regulados diferencialmente que mostraram respostas dependentes da concentração ao tiametoxam, mas nenhuma alteração no splicing alternativo. A maioria dos genes expressos diferencialmente não tiveram uma função notória, porém codificaram quadros abertos de leitura (ORF) curtos, uma característica dos peptídeos antimicrobianos. Como esses resultados sugeriram que as respostas imunológicas podem ser comprometidas pela exposição ao tiametoxam, os cientistas avaliaram o impacto do tiametoxam na imunidade das abelhas por meio da injeção de bactérias. Assim, foi demonstrado que a exposição subletal ao tiametoxam torna as abelhas mais vulneráveis a bactérias normalmente não patogênicas.

Embora a maioria das pesquisas se concentrem nas abelhas *A. mellifera*, há alguns trabalhos com as populações de abelhas nativas. Hladik, Vandever e Smalling (2016) coletaram

abelhas no nordeste do Colorado (EUA) em pastagens (2013-2014) e campos de trigo (2014). Para isso, instalaram armadilhas bimestralmente durante o verão, onde todas as abelhas, independentemente da espécie, formaram amostras compostas a fim de analisar 136 agrotóxicos e produtos de degradação. Assim, essas amostras representaram a exposição geral das abelhas a agrotóxicos. Foram detectados 19 agrotóxicos e produtos de degradação em 54 amostras compostas coletadas com concentrações entre 1 e 310 ng g⁻¹. O tiametoxam foi um dos mais frequentemente detectados (46 %). Desta forma, seus resultados mostraram que as abelhas nativas estão expostas a vários agrotóxicos nas áreas agrícolas. Por outro lado, Miotelo *et al.* (2021) quantificaram a diferença na sensibilidade das abelhas *Melipona scutellaris* e *A. mellifera* à ingestão oral do inseticida tiametoxam por meio da determinação da CL₅₀, tempo letal médio (TL₅₀) e seu efeito sobre o cérebro. Deste modo, mostraram que a abelha sem ferrão é mais sensível ao inseticida do que *A. mellifera*, pois apresentou uma menor CL₅₀ (0,0543 ng i.a.µL⁻¹) em comparação com o valor para *A. mellifera* (0,227 ng ia µL⁻¹). As análises morfológicas e ultra-estruturais, evidenciaram um aumento significativo nos espaços entre as células nervosas de ambas as espécies quando expostas a uma concentração subletal.

1.5. Métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em abelhas

A determinação de compostos químicos em matrizes biológicas, ambientais e em alimentos é uma tarefa difícil de ser executada, já que geralmente se encontram em concentrações imensamente baixas em comparação com as altas concentrações de substâncias interferentes. Assim, antes da análise instrumental, é necessário realizar um tratamento das amostras para isolar e concentrar os analitos, removendo os interferentes que podem coeluir com os analitos e comprometer a seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão do método cromatográfico (LOPES; CASSIANO, 2015).

Nesse caso, a determinação de resíduos de agrotóxicos em abelhas requer uma etapa preliminar de preparo de amostra, em virtude da complexidade da matriz e às baixas concentrações nas quais são encontrados os analitos, sendo assim as interferências provenientes das proteínas, carboidratos, ceras, dentre outros, que devem ser minimizadas (FAIRBROTHER *et al.*, 2014). Para escolher essa técnica de preparo de amostra o ideal é que seja simples, rápida, compatível com o instrumento analítico, de baixo custo e de fácil execução. Dentre as possibilidades de métodos que podem ser empregados para a extração de agrotóxicos em

amostras de abelhas, tem-se: o método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, conhecido como QuEChERS; a extração em fase sólida (SPE), a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e extrações magnéticas ou assistidas por ultrassom (KASIOTIS *et al.*, 2014; MUSA *et al.*, 2018; VALVERDE *et al.*, 2018b; TU; CHEN, 2020). Entretanto, destaca-se o método QuEChERS como o método mais econômico e aplicado para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em abelhas e seus produtos, (VÁZQUEZ *et al.*, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2016; KILJANEK *et al.*, 2016; TETTE *et al.*, 2016), com valores de recuperação eficientes entre 70 e 120 % (CALATAYUD-VERNICH *et al.*, 2016a; GARCÍA *et al.*, 2018).

1.5.1. Método de extração QuEChERS

Com base na literatura recente, o desenvolvimento de maior sucesso introduzido nos últimos anos no campo do método de extração em fase sólida (SPE), foi o método conhecido como QuEChERS. A sigla vem das palavras em inglês: rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro. Inicialmente, Anastassiades *et al.* (2003) introduziram este novo procedimento de preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e legumes, com o intuito de ultrapassar as limitações práticas dos métodos multirresíduo existentes na época.

Em seu esquema mais simples, o método baseia-se na extração sólida com acetonitrila, seguida da partição fomentada pela adição de sais (ex. MgSO_4 e NaCl), e finalmente uma limpeza com base na extração em fase sólida dispersiva (dSPE), utilizando como sorventes uma amina primária-secundária (PSA) e MgSO_4 anidro para remover a água (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Posteriormente, foram relatadas duas modificações notáveis do método original, pois este não possui nenhuma correção de pH e por isto apresentou efeitos negativos sobre alguns agrotóxicos dependentes do pH (ANASTASSIADES *et al.*, 2007). Assim, Lehotay *et al.* (2005) propuseram a adição de uma etapa de tamponamento promovida pela adição de acetato de sódio e a acidificação do acetonitrila com ácido acético (pH 4,8), dando origem ao método QuEChERS-acetato. Em 2007, outra modificação foi sugerida por Anastassiades e colaboradores, denominada método QuEChERS-citrato, no qual é utilizada uma combinação de citrato de sódio di e sesqui-hidratado para produzir o efeito tamponante (pH 5,0-5,5). A Tabela 6 apresenta alguns dos trabalhos publicados que usaram o método QuEChERS para a extração de agrotóxicos em tecidos de abelhas e alguns dos seus produtos (mel, cera de abelha e pólen).

Tabela 6 – Métodos QuEChERS usados para a análise de agrotóxicos em tecidos de abelhas e produtos apícolas.

Amostra	Análise	Analitos	Condições QuEChERS	Autor
Mel, abelhas e pólen	LC-MS/MS	19 agrotóxicos	5 g mel + 10 mL H ₂ O + 10 mL ACN ^a + 4,0 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1,5H ₂ O 1 mL dSPE + 25 mg PSA + 150 mg MgSO ₄	Niell <i>et al.</i> , 2015
			2 g abelhas + 5 mL H ₂ O + 10 mL ACN + 4,0 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1,5H ₂ O 1 mL dSPE + 25 mg PSA + 25 mg C ₁₈ + 150 mg MgSO ₄ /GCB (59:1)	
			5 g pólen + 5 mL H ₂ O + 10 mL ACN + 4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa + 100 µL HAc 1 mL dSPE + 25 mg PSA + 25 mg C ₁₈ + 150 mg MgSO ₄	
Pólen	LC-MS/MS e GC-MS/MS	253 agrotóxicos	2 g pólen + 2 mL H ₂ O + 4 mL ACN + 0,8 g MgSO ₄ + 0,2 g NaCl + 0,2 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O + 0,1 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1,5H ₂ O 2 mL + 50 mg PSA + 50 mg C ₁₈ + 300 mg MgSO ₄	Vázquez <i>et al.</i> , 2015
Abelhas	LC-MS/MS e GC-MS/MS	200 agrotóxicos	5 g amostra + 2 g pérolas de vidro + 10 mL H ₂ O + 10 mL ACN (1 % HAc ^b) + 4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa 7 mL dSPE + 350 mg PSA + 350 mg Z-Sep + 1050 mg MgSO ₄	Kiljanek <i>et al.</i> , 2016
Abelhas	LC-MS/MS	58 agrotóxicos	5 g + 7,5 mL H ₂ O + 10 mL ACN + 6 g MgSO ₄ + 1 g NaCl 1 mL dSPE + 50 mg C ₁₈ + 50 mg PSA + 150 mg MgSO ₄	Calatayud-Vernich <i>et al.</i> , 2016b
Mel	UPLC- MS/MS	116 agrotóxicos	5 g mel + 10 mL H ₂ O + 10 mL ACN:EtOAc 70:30 (1 % HAc) + 4 g MgSO ₄ + 1 g CH ₃ COONa 1 mL dSPE + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg Florisil	Tette <i>et al.</i> , 2016
Cera de abelha	LC-ESI- QqQ-MS	120 agrotóxicos	10 g cera + 10 mL ACN + 4,0 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O + 0,5 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1,5H ₂ O 6 mL dSPE + 150 mg PSA + 900 mg MgSO ₄	López <i>et al.</i> , 2016
Abelhas	LC-MS/MS e GC-MS/MS	260 agrotóxicos	2 g abelhas + 5 mL H ₂ O + 5 mL ACN + ultrassom + 2 g MgSO ₄ + 0,5g NaCl + 0,5 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O + 0,25 g C ₆ H ₆ Na ₂ O ₇ ·1,5H ₂ O 2 mL dSPE + 750 mg MgSO ₄ + 125 mg PSA + 125 mg Z-Sep	García <i>et al.</i> , 2018
Pólen	NanoLC- HRMS	8 agrotóxicos	0,1 g pólen + 0,5 mL H ₂ O + 1 mL ACN + 0,5 g NaCl + 0,5 g MgSO ₄ 0,8 mL dSPE + 20 mg PSA + 20 mg C ₁₈ + 50 mg MgSO ₄	Moreno-González <i>et al.</i> , 2018

^aACN, acetonitrila; ^bHAc, ácido acético glacial.

Fonte: Autoria própria.

1.6. Parâmetros de qualidade do método analítico

Em um sistema de análise de substâncias químicas, a avaliação dos parâmetros de qualidade do método é realizada para assegurar que este seja exato, reprodutível, flexível e funcione adequadamente dentro das condições nas quais uma substância será analisada. Como pré-requisitos, todos os instrumentos empregados devem estar verificados e os analistas devem ser qualificados (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

Os parâmetros de qualidade do método variam conforme cada guia, entretanto as principais figuras de mérito para a validação de todo tipo de métodos são quase as mesmas. No Brasil, existem vários guias de validação dentre os quais destacassem os fornecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017; INMETRO, 2020).

Atualmente, apesar de não ser mandatório, é seguido o guia da Comissão Europeia SANTE/11813/2017 (EUROPEAN UNION, 2018) durante a análise de resíduos de agrotóxicos em tecidos de abelhas e seus produtos (mel, pão de abelha e pólen), pois é um dos guias mais citados nas publicações referentes ao desenvolvimento e avaliação das figuras de mérito dos métodos cromatográficos com este fim (ARES *et al.*, 2017; CALATAYUD-VERNICH *et al.*, 2017; VALVERDE *et al.*, 2018a; MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2020). Os parâmetros contemplados pelo guia são os seguintes:

1.6.1. Seletividade

A seletividade de um método analítico corresponde à sua habilidade para determinar o analito no meio de substâncias que podem interferir na sua análise, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para isso, costuma-se comparar a matriz isenta de analitos versus a matriz fortificada com eles, usando detectores como um arranjo de diodos ou um espectrômetro de massas (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

1.6.2. Sensibilidade

A sensibilidade do método é definida mediante os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). O LOD é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. Enquanto o LOQ é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis ante as condições experimentais estabelecidas.

Entre as formas mais utilizadas para estimar estes limites para os métodos instrumentais estão:

Método visual: Realiza-se análises de amostras com concentrações conhecidas do analito, definindo a concentração mínima onde o analito é detectado com confiabilidade, e quantificado dentro dos limites de precisão e exatidão.

Método da relação sinal/ruído (S/N): Realiza-se a comparação dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e um branco (matriz isenta do analito), considerando assim uma relação sinal/ruído de 3:1 para a concentração mínima detectável, e uma relação 10:1 para a concentração mínima quantificável (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

1.6.3. Linearidade

A linearidade do método corresponde à sua faculdade de prover resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa definida. A faixa de trabalho compreende o valor do LOQ obtido para o analito como valor inicial, mais 4-5 concentrações em ordem crescente para a construção da curva analítica correspondente, injetando no mínimo três réplicas por cada nível de concentração.

A curva analítica é expressa por meio da relação linear simples, descrita pela seguinte equação:

$$y = bx + a \quad (1)$$

Na qual y é a variável dependente correspondente ao sinal analítico, x é a variável independente correspondente às diferentes concentrações, b é o coeficiente angular, e a é o coeficiente linear da reta.

A linearidade é avaliada através de um teste de Hartley (teste F) para verificar a homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) na curva analítica, calculando o valor de F (F_{exp}) da seguinte forma:

$$F_{exp} = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad (2)$$

Na qual s_1 e s_2 são as variâncias das réplicas dos extratos da matriz fortificada com os analitos, sendo s_2 a máxima e s_1 a mínima das variâncias obtidas dentro todos os níveis de concentração. Ao mesmo tempo, o valor de F tabulado (F_{tab}) é obtido:

$$F_{tab} = (f_1, f_2; \alpha) \quad (3)$$

Com $f_1=n_1-1$ graus de liberdade no denominador e $f_2=n_2-1$ graus de liberdade no numerador, adotando um nível de significância $\alpha=0,05$ (5 %) ou nível de confiança $1-\alpha=0,95$ (95 %).

Se as variâncias forem constantes em toda a faixa de calibração, os resíduos estarão distribuídos igualmente em torno do eixo x e o $F_{exp} < F_{tab}$ (MILLER; MILLER, 2005).

Em caso de evidenciar uma situação heterocedástica, é necessário aplicar os modelos de calibração ponderada ($x^{-0,5}$, x^{-1} , x^{-2} , $y^{-0,5}$, y^{-1} e y^{-2}) sugeridos por Almeida, Castel-Branco e Falcão (2002) para escolher o melhor fator de ponderação (w_i) baseado na soma dos resíduos absolutos ($\sum \%RE$), no coeficiente de correlação e no gráfico de resíduos (%). Para calcular o coeficiente angular (b), linear (a) e de correlação (r) são utilizadas as seguintes equações:

$$b = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (4)$$

$$a = \frac{\sum w_i x_i^2 \cdot \sum w_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i x_i y_i}{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \quad (5)$$

$$r = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - \sum w_i x_i \cdot \sum w_i y_i}{\sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2} \cdot \sqrt{\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2}} \quad (6)$$

Onde w_i é o fator de ponderação, x_i a concentração e y_i a área do sinal analítico. Em seguida, é preciso avaliar a significância dos coeficientes através de um teste t Student, estimando-se os desvios padrões dos residuais ($s_{y/x}$), da inclinação (s_b) e do intercepto (s_a) por meio das seguintes equações:

$$s_{(y/x)} = \sqrt{\frac{\sum w_i(y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (7)$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8)$$

$$s_a = s_{(y/x)} \sqrt{\frac{\sum (x_i^2)}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9)$$

Deste modo, os valores de t (t_{calc}) para os coeficientes são calculados por meio das seguintes razões:

$$t_b = \frac{b}{s_b} \quad (10)$$

$$t_a = \frac{a}{s_a} \quad (11)$$

Para a análise t Student são testadas as seguintes hipóteses:

$$H_0: \beta_0 = 0$$

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_0 \neq 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Intercepto (a)

Inclinação (b)

Assim, são comparados os valores estatísticos com o valor de t tabulado (t_{tab}), o qual é obtido a partir da tabela de distribuição de Student para $v=n-2$ graus de liberdade e um nível de confiança de 95 %.

Se $t_a \geq t_{\text{tab}}$, rejeita-se a hipótese $\beta_0 = 0$ e conclui-se que o intercepto é significativamente diferente de zero ($a \neq 0$). Da mesma forma, se $t_b \geq t_{\text{tab}}$, rejeita-se a hipótese nula e, portanto, conclui-se que a inclinação é significativamente diferente de zero ($b \neq 0$).

Posteriormente é determinado o valor da estatística t para verificar o ajuste do modelo linear para as curvas de calibração através da Equação 12, onde r é o coeficiente de correlação e n o número de níveis de concentração.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (12)$$

Se $t_r \geq t_{\text{tab}}$ considera-se que o modelo de calibração linear é ajustado e consequentemente, a hipótese nula $H_0: r=0$ é rejeitada, pois existe uma correlação significativa entre x e y (MILLER; MILLER, 2005).

1.6.4. Efeito matriz

O estudo do efeito matriz (EM) tem como objetivo verificar as possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz, causando a diminuição ou ampliação do sinal instrumental. Para a determinação desse efeito, são comparadas as curvas de calibração de soluções analíticas preparadas no solvente com as curvas preparadas em extratos da matriz fortificada nas mesmas concentrações com no mínimo três réplicas por cada nível de concentração.

Após, as análises são avaliadas por meio de um teste F, para verificar se as variâncias da inclinação (b) e do intercepto (a) das curvas no solvente e na matriz podem ser consideradas estatisticamente iguais.

O valor de F_{calc} é estimado usando a Equação 13, onde $s_{b,1}$ e $s_{b,2}$ são as variâncias dos coeficientes angulares das curvas no solvente e na matriz, deixando a maior variância no numerador.

$$F_{\text{calc},b} = \frac{s_{b,2}^2}{s_{b,1}^2} \quad (13)$$

O valor de F_{tab} é obtido para $f_1=n_1-1$ graus de liberdade no denominador e $f_2=n_2-1$ graus de liberdade no numerador, adotando um nível de significância de 95 %.

Se as variâncias forem iguais ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$), pode-se concluir que a matriz não tem efeito estatisticamente significativo sobre a variância. No entanto, este teste não prova a ausência do EM, pelo que é necessário fazer uma análise t de Student para comparar as médias tanto do coeficiente angular como do coeficiente linear para verificar se existe EM. Desse modo, calcula-se o valor da estatística t para a inclinação:

$$t_{\text{calc},b} = \frac{|b_{b,1} - b_{b,2}|}{\sqrt{\frac{s_{b,1}^2}{n_1} + \frac{s_{b,2}^2}{n_2}}} \quad (14)$$

Onde $b_{b,1}$ e $b_{b,2}$ são os coeficientes angulares das curvas no solvente e na matriz; $s_{b,1}$ e $s_{b,2}$ são seus respectivos desvios padrão; n_1 e n_2 são os números de réplicas de calibração.

O número de graus de liberdade para o t_{tab} é obtido da seguinte forma:

$$v = \frac{\left(\frac{s_{b,1}^2}{n_1} + \frac{s_{b,2}^2}{n_2}\right)}{\frac{\left(\frac{s_{b,1}^2}{n_1}\right)}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_{b,2}^2}{n_2}\right)}{n_2 + 1}} - 2 \quad (15)$$

Se $t_{\text{cal}} \geq t_{\text{tab}}$, pode-se concluir que a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado (MILLER; MILLER, 2005).

Os testes F e t são repetidos para o intercepto a_1 e a_2 , mas substituindo a letra b por a nas equações.

Uma vez observado o efeito matriz, é feita a sua quantificação mediante a razão entre as inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz fortificada. O percentual de efeito matriz (EM, %) é estimado com a seguinte equação:

$$EM (\%) = \left(\frac{\text{Sinal na matriz}}{\text{Sinal no solvente}} - 1 \right) \times 100 \quad (16)$$

O EM é classificado de acordo com o aumento ou supressão do sinal analítico. Assim valores inferiores a ± 20 % são considerados baixos, faixas de ± 20 % e ± 50 % possuem um efeito moderado, e valores superiores a 50 % ou inferiores a -50 % significam um elevado efeito matriz (ECONOMOU *et al.*, 2009).

1.6.5. Precisão

A precisão mostra a dispersão de resultados entre ensaios independentes em condições operacionais similares. Ela é estimada por meio do desvio padrão relativo (RSD), calculado pela Equação 19, onde s é o desvio padrão (Equação 17) e $\bar{x}$ é o valor médio do número total de medidas N (Equação 18), sendo x_i cada uma das medidas individuais.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (17)$$

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{N} \quad (18)$$

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (19)$$

A precisão pode ser expressa de três maneiras:

Repetitividade: Grau de concordância entre medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições em um período curto.

Precisão intermediária: Grau de concordância entre várias medições efetuadas sob as mesmas condições, porém em dias diferentes, com equipamentos diferentes ou por outros analistas.

Reprodutibilidade: Grau de concordância entre os resultados obtidos para uma determinada análise realizada por laboratórios diferentes, mas seguindo a mesma metodologia (BRASIL, 2011).

1.6.6. Exatidão

A exatidão reflete a proximidade entre a média de vários resultados de um ensaio ($\bar{x}$) e o valor de referência considerado verdadeiro (μ). Ela é expressa pela seguinte equação:

$$Exatidão = \frac{\bar{x}}{\mu} \times 100 \quad (20)$$

A recuperação (RE) está relacionada com a exatidão, pois refere-se à quantidade do analito extraído no processo em relação à quantidade real presente na amostra. Assim, a recuperação é estimada através da relação percentual entre a concentração das amostras fortificadas antes e após o processo de extração (BRASIL, 2011):

$$RE (\%) = \left(\frac{\text{Concentração amostra pre} - \text{fortificada}}{\text{Concentração amostra pós} - \text{fortificada}} \right) \times 100 \quad (21)$$

A Tabela 7 apresenta as figuras de mérito contempladas pelo guia da Comissão Europeia SANTE/11813/2017 (EUROPEAN UNION, 2018) e seus respectivos critérios de aceitação:

Tabela 7 – Figuras de mérito consideradas pela SANTE/11813/2017 para a validação de um método analítico com seus critérios de aceitação.

Parâmetro	Critério
Seletividade	Ausência de co-eluição entre os interferentes da matriz e os analitos.
Limite de quantificação (LOQ)	Razão sinal/ruído ≥ 10
Linearidade	Significância da regressão.
Efeito matriz	Diminuição ou ampliação do sinal/resposta instrumental $\leq 20 \%$
Precisão/Repetibilidade	RSD $\leq 20 \%$
Exatidão	70-120 %

Fonte: EUROPEAN UNION, 2018.

CAPÍTULO 2

Determinação de neonicotinóides em tecidos de abelhas *Apis mellifera* africanizadas

Este capítulo gerou a seguinte publicação:

Determination of neonicotinoids in Africanized *Apis mellifera* Honeybees through a miniaturized QuEChERS procedure followed by UHPLC-MS/MS

Ana Maria Barbosa-Medina, Edvaldo Vasconcelos Soares Maciel, Dayana Moscardi dos Santos, Fernando Mauro Lanças, and Eny Maria Vieira
Chemosphere, março 2021 - submetido

2.1. Introdução

De uma maneira geral, a análise de agrotóxicos em abelhas é realizada por cromatografia líquida ou gasosa, principalmente associada a espectrometria de massas, em razão das baixas concentrações em que esses compostos são encontrados e às doses letais para abelhas da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ e ng g^{-1} (FAIRBROTHER *et al.*, 2014). Em virtude da complexidade dos organismos tais como as abelhas, que incluem macromoléculas (proteínas, carboidratos, etc.), cera de abelha e outros compostos endógenos, o uso de apenas uma técnica analítica não é suficiente para atingir resultados analíticos satisfatórios, portanto é obrigatório o uso de uma etapa prévia de preparo de amostra. Nesse cenário, o método QuEChERS tem sido o principal procedimento aplicado com sucesso durante o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em abelhas e seus produtos (VÁZQUEZ *et al.*, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2016; KILJANEK *et al.*, 2016; TETTE *et al.*, 2016).

O intuito inicial deste capítulo foi desenvolver um método QuEChERS para a extração dos neonicotinóides tiametoxam e imidacloprida em tecidos de abelhas *A. mellifera* africanizadas, porém ao longo dos testes e com o incentivo de buscar procedimentos mais ecológicos para alcançar resultados semelhantes aos métodos tradicionais de preparação de amostra (MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2020), foi atingida uma grande redução das quantidades de amostra e reagentes, obtendo-se um método QuEChERS miniaturizado seguido da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

Analisar os resíduos dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam em tecidos de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, empregando o método de extração QuEChERS seguido da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).

2.2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar o preparo de amostra empregando o método QuEChERS para extrair resíduos dos agrotóxicos imidacloprida e tiametoxam em tecidos de abelhas *A. mellifera* africanizadas;
- Estabelecer as melhores condições cromatográficas para a análise de resíduos dos agrotóxicos de interesse em tecidos abelhas africanizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas;
- Validar o método desenvolvido utilizando o método QuEChERS mais eficiente e seletivo para os analitos;
- Aplicar a metodologia desenvolvida para a análise de resíduos de imidacloprida e tiametoxam em amostras de apiários de abelhas *A. mellifera* africanizadas.

2.3. Conclusão

Foi desenvolvido um método QuEChERS completamente miniaturizado como etapa de preparação de amostra, visando a determinação e quantificação dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam em tecidos de abelhas *A. mellifera* africanizadas. Desta forma, o método proposto mostrou-se eficaz na extração dos analitos usando 50 vezes menos amostra do que o método QuEChERS tradicional, e 7 a 17 vezes menos do que os métodos já desenvolvidos por outros pesquisadores, assim sendo menor o impacto na mortalidade de abelhas necessárias para as análises. Consequentemente, o uso de reagentes também foi reduzido, usando 15 vezes menos sais e solvente do que os métodos convencionais, portanto foram gerados menos resíduos químicos.

A obtenção de uma amostra composta durante a análise de matrizes complexas é de grande importância, pois melhora a sua homogeneidade e representatividade. Assim, o uso de abelhas liofilizadas como amostra, facilitou a obtenção de uma amostra composta e reduziu o efeito matriz.

A análise dos compostos através de um sistema UPLC-MS/MS com fonte de ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI+), operando no modo Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM) com três transições (m/z) para cada analito, proporcionou satisfatória detectabilidade dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam.

O método validado apresentou limites de detecção e quantificação de 0,7 e 3 ng g⁻¹ para ambos os analitos, respectivamente. O método foi preciso, mostrando valores de desvio padrão relativo (RSD) entre 7,1 e 16,8 % para os ensaios de repetitividade, e 6,5 a 18,4 % para os ensaios de precisão intermediária. O método também foi exato, evidenciando valores adequados entre 96,8 e 108,9 %. Os valores de recuperação foram satisfatórios e variaram entre 64,5 e 99,7 %, com um RSD associado menor à 20 %.

A análise de amostras de diferentes apiários sugere que o método desenvolvido possui um grande potencial para ser usado como um método analítico mais ecológico para determinar resíduos de agrotóxicos em abelhas com desempenho semelhante ou até melhor que os outros métodos já existentes, e com resultados confiáveis.

As concentrações detectadas de tiametoxam e imidacloprida nas amostras dos apiários foram semelhantes às encontradas em eventos de envenenamento de abelhas nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul do país, onde o tiametoxam também foi o principal neonicotinóide detectado.

CAPÍTULO 3

Determinação de neonicotinóides em tecidos de abelhas *Tetragonisca angustula* Latreille (1811) e no pólen forrageado das suas colmeias

3.1. Introdução

As abelhas *A. mellifera* são de grande importância econômica na produção de mel e na polinização e, por este motivo são a espécie mais monitorada frente aos efeitos dos agrotóxicos (ARENA; SGOLASTRA, 2014; BOFF *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2018). Entretanto, os estudos para meliponíneos são até então relativamente escassos, uma vez que essas espécies não habitam regiões temperadas, onde geralmente são realizados os estudos de monitoramento (XAVIER *et al.*, 2010; BARRETO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2016; BERNARDES *et al.*, 2018).

As abelhas sem ferrão (Meliponini) são essenciais para a polinização da vegetação nativa e algumas espécies vegetais de interesse econômico (HEARD, 1999; SLAA *et al.*, 2006), já que as visitas constantes dessas abelhas melhoram a quantidade, qualidade e valor de mercado das frutas (RICKETTS *et al.*, 2008; KLATT *et al.*, 2014).

A espécie *Tetragonisca angustula* Latreille (1811) fornece um serviço fundamental na polinização de culturas tais como o morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), pois favorece o aumento no número de óvulos fecundados, o que leva a produzir frutos mais pesados (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2004; ANTUNES *et al.*, 2007; WITTER *et al.*, 2012). Contudo, essa cultura é muito suscetível a doenças e pragas, o que resulta no uso excessivo e muitas vezes inadequado de agrotóxicos afim de reduzir esses estragos. Deste modo, as abelhas ficam muito expostas aos efeitos negativos desses compostos. Nesse sentido, os meliponíneos parecem apresentar maior sensibilidade aos neonicotinóides do que as *A. mellifera* (DECOURTYE; DEVILLERS, 2010).

Por isso, neste capítulo foi aplicado o método QuEChERS miniaturizado desenvolvido para a determinação de resíduos de imidacloprida e tiametoxam em tecidos de abelhas *A. mellifera* africanizadas, desta vez em tecidos de abelhas *T. angustula* e no seu pólen forrageado com o propósito de avaliar o seu desempenho.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo geral

Analisar os resíduos dos agrotóxicos imidacloprida e tiametoxam em tecidos de abelhas nativas sem ferrão da espécie *Tetragonisca angustula* Latreille (1811) e no pólen coletado ao interior das suas colmeias, empregando o método QuEChERS miniaturizado seguido da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).

3.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o uso do método QuEChERS miniaturizado anteriormente desenvolvido para a determinação dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam em tecidos de abelhas *T. angustula* e no pólen forrageado;
- Desenvolver e otimizar as condições de extração do método QuEChERS miniaturizado acoplado à UPLC-MS/MS para a análise dos agrotóxicos alvo em tecidos de abelhas nativas sem ferrão e no pólen;
- Validar os métodos miniaturizados desenvolvidos para a determinação dos analitos em tecidos de abelhas *T. angustula* e no pólen forrageado;
- Aplicar as metodologias desenvolvidas para a análise de resíduos de imidacloprida e tiametoxam em amostras de meliponários de abelhas *T. angustula*.

3.3. Conclusão

O método QuEChERS miniaturizado também se mostrou eficaz na extração dos neonicotinóides imidacloprida e tiametoxam em tecidos de abelhas *T. angustula* e no pólen coletado ao interior das suas colmeias. Neste caso, foi possível reduzir ainda mais a quantidade de amostra necessária para as análises, usando assim 10 vezes menos abelhas e 3 vezes menos pólen do que no método já desenvolvido para *A. mellifera*. Para a obtenção da amostra composta, as abelhas *T. angustula* não foram liofilizadas devido ao seu porte e dificuldade de manipulação.

As metodologias validadas para a determinação de neonicotinóides em tecidos de abelhas Jataí e pólen forrageado, apresentaram LOD e LOQ de 2 a 7 ng g⁻¹, e 5 a 17 ng g⁻¹ para ambos os analitos, respectivamente. Os ensaios de repetitividade e precisão intermediária atenderam os critérios de aceitação para ambas as matrizes, variando desde 4,4 a 16,6 % e 3,9 a 18,6 %, respectivamente. Os valores de exatidão dos métodos também foram adequados, situando-se entre 90,5 e 102,5 %. Os valores médios de recuperação foram satisfatórios e variaram entre 77,0 e 105,5 %, obtendo-se maiores recuperações para o pólen, porém os valores de ambos os métodos estiveram conforme os critérios de aceitação.

A análise de amostras de meliponários indicou que o método QuEChERS miniaturizado pode ser utilizado para a determinação de agrotóxicos tanto em amostras de tecido de abelhas de diferentes espécies como em matrizes apícolas, mantendo um ótimo desempenho e resultados confiáveis.

CAPÍTULO 4

Conclusão geral e perspectivas futuras

4.1. Conclusão geral

O uso de um método QuEChERS miniaturizado como preparo de amostra, mostrou versatilidade para a extração de neonicotinóides em tecidos de abelhas de diferentes espécies e matrizes apícolas, obtendo bons resultados para amostras de pólen forrageado e amostras de tecidos de abelhas das espécies *A. mellifera* africanizada e *T. angustula*. Além disso, o mesmo apresentou várias vantagens sobre os métodos tradicionais tais como rapidez, simplicidade, menor custo, quantidades menores de amostra e reagentes, entre outras.

As concentrações dos agrotóxicos detectados nos tecidos das abelhas estiveram entre 7,0 e 27,0 ng g⁻¹, obtendo-se a maior concentração para o tiametoxam em *A. mellifera* africanizada. Nos tecidos das abelhas *T. angustula* não foram detectados resíduos de tiametoxam, no entanto foram observadas as maiores concentrações de imidacloprida.

4.2. Perspectivas futuras

A análise de resíduos de neonicotinóides no pólen forrageado e nos tecidos de abelhas das espécies *A. mellifera* africanizada e *T. angustula* por meio de um método QuEChERS miniaturizado acoplado com UPLC-MS/MS, apresentou resultados prometedores e poderá ser testado com outras espécies de abelhas e matrizes apícolas para determinar a presença de agrotóxicos. Este avanço possibilitará a substituição das técnicas tradicionais por alternativas miniaturizadas afim de desenvolver métodos analíticos mais amigáveis com o meio ambiente.

A avaliação da biodisponibilidade dos neonicotinóides por meio da identificação e quantificação desses compostos em amostras de tecido das abelhas forrageiras da espécie *T. angustula*, apresentou resultados relevantes, convertendo-se no primeiro estudo relatado na literatura até o momento. Deste modo, o método QuEChERS miniaturizado desenvolvido, poderá ser empregado para futuros estudos de exposição ou eventos de mortalidade de abelhas sem ferrão, devido ao uso de agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. Primeiro ciclo do Plano Plurianual 2017-2020:** gerência geral de toxicologia. Brasília: ANVISA, 2019. 136 p. Disponível em: <https://cutt.ly/pxWtZYw>. Acesso em: 29 abr. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório de atividades 2010:** gerência geral de toxicologia. Brasília: ANVISA, 2011. 26 p. Disponível em: <https://cutt.ly/CxWt7KN>. Acesso em: 29 abr. 2021.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Control pH during method development for better chromatography.** Technical Overview. Santa Clara: Agilent Technologies, 2015. 8 p. Disponível em: <https://bit.ly/2IvANNE>. Acesso em: 29 abr. 2021.

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais:** guia prático. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009. 136 p.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration line revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry:** theory and practice. New York: Oxford University Press, 1998. 135 p.

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

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

ANTUNES, L. E. C.; BONOW, S.; REISSER JUNIOR, C. R. Morango: crescimento constante em área e produção. **Anuário Campo & Negócios HF**, Uberlândia, v. 37, p. 88-92, 2020. Disponível em: <https://cutt.ly/dxcKGPA>. Acesso em: 29 abr. 2021.

ANTUNES, O. T.; CALVETE, E. O.; ROCHA, H. C.; NIENOW, A. A.; CECCHETTI, D.; RIVA, E.; MARAN, R. E. Produção de cultivares de morangueiro polinizadas pela abelha jataí em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 94-99, 2007.

AOAC Official Method 2007.01: pesticides residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. Rockville: AOAC 2007, p. 9.

ARENA, M.; SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, New York, v. 23, p. 324-334, 2014.

- ARES, A. M.; VALVERDE, S.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. Determination of flubendiamide in honey at trace levels by using solid phase extraction and liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 232, p. 169-176, 2017.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011, p. 437-489.
- BARBOSA, W. F.; TOMÉ, H. V. V.; BERNARDES, R. C.; SIQUEIRA, M. A. L.; SMAGGHE, G.; GUEDES, R. N. C. Biopesticide induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 34, p. 2149-2158, 2015.
- BARRETO, A. Q.; BRITO, S. X.; CARVALHO, C. A. L.; NASCIMENTO, A. S.; LÊDO, C. A. S. Contact action of neem extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Tetragonisca angustula* Latreille (Hymenoptera: Apidae) under controlled conditions. **Magistra, Cruz das Almas-BA**, Cruz das Almas, v. 24, p. 52-56, 2012.
- BASF. Crop Protection Division Global Strategic Marketing, Insecticides. **Insecticide mode of action**: technical training manual. Piemonte; BASF, 2013. Disponível em: <https://cutt.ly/IcODhDK>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- BELDEN, J. B.; GILLIOM, R. J.; MARTIN, J. D.; LYDY M. J. Relative toxicity and occurrence patterns of pesticide mixtures in streams draining agricultural watersheds dominated by corn and soybean production. **Integrated Environmental Assessment and Management**, Hoboken, v. 3, n. 1, p. 90-100, 2007.
- BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, Kidlington, v. 10, p. 51–58, 2015.
- BERNARDES, R. C.; BARBOSA, W. F.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A. P. The reduced-risk insecticide azadirachtin poses a toxicological hazard to stingless bee *Partamona helleri* (Friese, 1900) queens. **Chemosphere**, Oxford, v. 201, p. 550-556, 2018.
- BOFF, S.; FRIEDEL, A.; MUSSURY, R. M.; LENIS, P. R.; RAIZER, J. Changes in social behavior are induced by pesticide ingestion in a neotropical stingless bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Philadelphia, v. 164, p. 548-553, 2018.
- BONFIGLIO, R.; KING, R. C.; OLAH, T. V.; MERKLE, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Oxford, v. 13, n. 12, p. 1175-1185, 1999.
- BONMATIN, J. M.; MARCHAND, P. A.; CHARVET, R.; MOINEAU, I.; BENGSCH, E. R.; COLIN, E. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 5336-5341, 2005a.
- BONMATIN, J.M.; MOINEAU, I.; CHARVET, R.; COLIN, M.E.; FLECHE, C.; BENGSCH, E.R. Behaviour of imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees. In: **Environmental Chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems**. Berlin: Springer Science+Business Media, 2005b. p. 483-494.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório de ingredientes ativos:** imidacloprid. Brasília: MAPA, 2015a. Disponível em: <https://cutt.ly/kjLVZTJ>. Acesso em: 29 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório de ingredientes ativos:** thiamethoxam. Brasília, MAPA, 2015b. Disponível em: <https://cutt.ly/xxQ6McB>. Acesso em: 29 abr. 2021.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos. Resolução – RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de julho 2017. 22 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Instrução Normativa nº 2, de 9 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 fev. 2017. Seção 1, p. 33.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Disponível em: <https://cutt.ly/QlPxG4y>. Acesso em: 29 abr. 2021.

CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMÓ, E.; PICÓ, Y. Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. **MethodsX**, Amsterdam, v. 3, p. 452–458, 2016a.

CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMÓ, E.; PICÓ, Y. Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 605, p. 745-754, 2017.

CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMÓ, E.; SUAREZ-VARELA, M. M.; PICÓ, Y. Influence of pesticide use in fruit orchards during blooming on honeybee mortality in 4 experimental apiaries. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 541, p. 33–41, 2016b.

CARVALHO, A. C. P.; MESSAGE, D. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoideae) with causes sacbrood-like symptoms. **Apidologie**, Paris, v. 35, p. 89-90, 2004.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 58, p. 99–117, 2013.

CASTILHOS, D.; BERGAMO, G. C.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, Paris, v. 50, p. 263–272, 2019a.

CASTILHOS, D.; DOMBROSKI, J.L.D.; BERGAMO, G.C.; GRAMACHO, K.P.; GONÇALVES, L.S. Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural areas. **Apidologie**, Paris, v. 50, p. 657-668, 2019b.

- CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, Hoboken, v. 77, p. 274-281, 2014.
- CERQUEIRA, A.; FIGUEIREDO, R. A. Percepção ambiental de apicultores: desafios do atual cenário apícola no interior de São Paulo. **Acta Brasiliensis**, Campina Grande, v. 1, n. 3, p. 17-21, 2017.
- CHEMAXON. **Chemicalize**: calculate properties, search chemical data, and draw molecules online. [S. l.]: ChemAxon, 2021. Disponível em: <http://www.chemicalize.com>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- CODLING, G.; AL NAGGAR, Y.; GIESY, J. P.; ROBERTSON, A. J. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. **Chemosphere**, Oxford, v. 144, p. 2321–2328, 2016.
- COULON, M.; SCHURR, F.; MARTEL, A.C.; COUGOULE, N.; BÉGAUD, A.; MANGONI, P.; DALMON, A.; ALAUX, C.; LE CONTE, Y.; THIÉRY, R.; RIBIERE-CHABERT, M.; DUBOIS, E. Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the *Chronic bee paralysis virus* in honeybees. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 144, p. 10-18, 2018.
- CRESSWELL, J.E.; PAGE, C.J.; UYGUN, M.B.; HOLMBERGH, M.; LI, Y.; WHEELER, J.G.; LAYCOCK, I.; POOK, C.J.; DE IBARRA, N.H.; SMIRNOFF, N.; TYLER, C.R. Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). **Zoology**, Muenchen, v. 115, p. 365-371, 2012.
- DAVID, A.; BOTÍAS, C.; ABDUL-SADA, A.; GOULSON, D.; HILL, E.M. Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 407, p. 8151-81-62, 2015.
- DECIO, P.; USTAOGU, P.; DERECKA, K.; HARDY, I. C. W.; ROAT, T. C.; MALASPINA, O.; MONGAN, N.; STÖGER, R.; SOLLER, M. Thiamethoxam exposure deregulates short ORF gene expression in the honey bee and compromises immune response to bacteria. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1489, 2021.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: THANY, S.H. (ed.). **Insect nicotinic acetylcholine receptors**. New York: Springer, 2010. v. 683. (Advances in experimental medicine and biology).
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 52, p. 81-106, 2007.
- DIVELY, G.P.; EMBREY, M.S.; KAMEL, A.; HAWTHORNE, D.J.; PETTIS, J.S. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0118748.

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

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 31, p. 5856-5867, 2009.

ELBERT, A.; HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELERT, W.; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, Oxford, v. 64, n. 11, p. 1099-1105, 2008.

EUROPEAN STANDARD. **BS EN 15662:2008**. Foods of plant origin. Multimethod for the determination of pesticide residues using GC-MS- and LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method. Bruxelas: EN 2008. 84 p.

EUROPEAN UNION. Commission Implementing Regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances. **Official Journal of the European Union**, Luxembourg, L 139/12, 2013

EUROPEAN UNION. Directorate General for Health and Food Safety. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed**: SANTE/11813/2017. Luxembourg: EU, 2018. 42 p.

FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELL, R. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 33, n. 4, p. 719-731, 2014.

FLORES, J. M.; GÁMIZ, V.; GIL-LEBRERO, S.; RODRÍGUEZ, I.; NAVAS, F. J.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I.; CUTILLAS, V.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; DOLORES, H. A three-year large scale study on the risk of honey bee colony exposure to blooming sunflowers grown from seeds treated with thiamethoxam and clothianidin neonicotinoids. **Chemosphere**, Oxford, v. 262, p. 127735, 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Bees and their role in forest livelihoods**. Roma: FAO, 2009. 204 p. Disponível em: <http://bit.ly/2x311wR>. Acesso em: 29 abr. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Imidacloprid (206)**. Roma: FAO, 2002. 321 p. Disponível em: <https://bit.ly/3gPBaWL>. Acesso em: 29 abr. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The International Code of Conduct on Pesticide Management**. Roma: FAO, 2014. p. 6. Disponível em: <https://cutt.ly/mlPhLhS>. Acesso em: 29 abr. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Thiamethoxam (245)**. Roma: FAO, 2011. 235 p. Disponível em: <https://bit.ly/303pDqg>. Acesso em: 29 abr. 2021.

- FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MEDINA, L. M.; KLEINERT, A. M. P.; GALLETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. 2009. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, Paris, v. 40, p. 332-346, 2009.
- FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. 285 p.
- FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 266-281, 2010.
- GARCÍA, M. D. G.; GALERA, M. M.; UCLÉS, S.; LOZANO, A. Ultrasound-assisted extraction based on QuEChERS of pesticide residues in honeybees and determination by LC-MS/MS and GC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 410, n. 21, p. 5195-5210, 2018.
- GAZZONI, D. L. **Tiametoxam: uma revolução na agricultura brasileira**. São Paulo: Vozes, 2008. 342 p.
- GBYLIK-SIKORSKA, M.; SNIEGOCKI, T.; POSYNIK, A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 990, p. 132-140, 2015.
- GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v.108, p.1-9, 2015.
- GOULSON, D. Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, Chichester, v. 50, p. 977-987, 2013.
- HAAS, J.; NAUEN, R. Pesticide risk assessment at the molecular level using honey bee cytochrome P450 enzymes: a complementary approach. **Environmental International**, v. 147, p. 106372, 2021.
- HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 183-206, 1999.
- HLADIK, M. L.; VANDEVER, M.; SMALLING, K. L. Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 542, p. 469-477, 2016.
- INDAIATUBA. Prefeitura Municipal. **Agricultura**. Indaiatuba, 2020. Disponível em: <https://www.indaiatuba.sp.gov.br/governo/economia/agricultura/>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- INFANTE, M. **Vamos falar sobre abelhas nativas?** São Paulo, Verde SP, 2019. Disponível em: <http://verdesp.com.br/vamos-falar-sobre-abelhas-nativas/>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Brasília: IBAMA, 2012. 88 p. Disponível em: <http://bit.ly/2w4i2XK>. Acesso em: 29 abr. 2021.

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

IRL AGROPECUÁRIA. Mel. **História do mel no Brasil** – Prof. Kerr e as abelhas africanizadas. São Paulo: IRL Agropecuária, 2021. Disponível em: <https://mel.com.br/historia-do-mel-no-brasil/>. Acesso em: 29 abr. 2021.

IWASA, T.; MOTOYAMA, N.; AMBROSE, J.T.; ROE, R.M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 23, p. 371–378, 2004.

JACOB, C.R.O.; ZANARDI, O.Z.; MALAQUIAS, J.B.; SILVA, C.A.S.; YAMAMOTO, P.T. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, Oxford, v. 224, p. 65-70, 2019.

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

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

KAMEL, A. Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 5926-5931, 2010.

KANNE, D. B.; DICK, R. A.; TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid nitroguanidine insecticide metabolites: synthesis and nicotinic receptor potency of guanidines, aminoguanidines, and their derivatives. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 18, n. 9, 1479-1484, 2005.

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, v. 485, p. 633–642, 2014.

KETOLA, J.; HAKALA, K.; RUOTTINEN, L.; OJANEN, H.; RAMO, S.; JAUHIAINEN, L.; RAISKIO, S.; KUKKOLA, M.; HEINIKAINEN, S.; PELKONEN, S. **The impact of the use of neonicotinoid insecticides on honey bees in the cultivation of spring oilseed crops in Finland in 2013-2015**. Helsinki: Natural Resources Institute Finland, 2015. 70 p.

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 spectrometry—Honeybee poisoning incidents. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1435, p. 100-114, 2016.

KING, R.; BONFIGLIO, R.; FERNANDEZ-METZLER, C.; MILLER-STEIN, C.; OLAH, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, Washington, v. 11, n. 11, p. 942-950, 2000.

- KLATT, B. K.; HOLZSCHUH, A.; WESTPHAL, C.; CLOUGH, Y. SMIT, I.; PAWELZIK, E.; TSCHAMTKE, T. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B**, Colchester, v. 281, p. 20132440, 2014.
- KRUPKE C.; HUNT G. J.; EITZER B. D.; ANDINO G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e29268, 2012.
- LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 354p.
- LAURENT, M.; HENDRIKX, P.; RIBIERE-CHABERT, M.; CHAUZAT, M. A **pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014**. [S. l.]: European Union Reference Laboratory for Honeybee Health 2016. 44 p. Disponível em: <http://bit.ly/2v6zSvN>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- LEHOTAY, S. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Cary, v. 90, p. 485-520, 2007.
- 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.
- LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, Cary, v. 88, p. 615-629, 2005.
- LEITE, D. T.; SAMPAIO, R. B.; DOS SANTOS, C. O.; DOS SANTOS, J. N.; CHAMBÓ, E. D.; DE CARVALHO, C. A. L.; DA SILVA SODRÉ, G. Toxicity of fenpyroximate, difenoconazole and mineral oil on *Apis mellifera* L. **Sociobiology**, Feira de Santana, v. 65, p. 737-743, 2018.
- LIMA, M. A. P.; MARTINS, G. F.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of Comparative Physiology A**, Heidelberg, v. 202, p. 733-747, 2016.
- LIN, C. H.; SPONSLER, D. B.; RICHARDSON, R. T.; WATTERS, H. D.; GLINSKI, D. A., HENDERSON, W. M.; MINUCCI, J. M., LEE, E. H.; PURUCKER, S. T.; JOHNSON, R. M. Honey bees and neonicotinoid-treated corn seed: contamination, exposure, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 40, n. 4, p. 1212-1221, 2021.
- LOPES, B. R.; CASSIANO, N. M. Injeção direta de amostras: uma nova tendência em LC. In: CASS, Q.B.; CASSIANO, N. (ed.). **Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2015. p. 127.
- LÓPEZ, S.; LOZANO, A.; SOSA, A.; HERNANDO, M. D.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study. **Chemosphere**, Oxford, v. 163, p. 44-53, 2016.

- LOZOWICKA, B. The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Philadelphia, v. 97, p. 210-222, 2013.
- MALAGODI-BRAGA, K.S.; KLEINERT, A.D.M.P. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses? **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 55, p. 771-773, 2004.
- MANJON, C.; TROCZKA, B. J.; ZAWORRA, M.; BEADLE, K.; RANDALL, E.; HERTLEIN, G.; SINGH, K. S.; ZIMMER, C. T.; HOMEM, R. A.; LUEKE, B.; REID, R.; KOR, L.; KOHLER, M.; BENTING, J.; WILLIAMSON, M. S.; DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; BASS, C.; NAUEN, R. Unraveling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. **Current Biology**, Cambridge, v. 28, n. 7, p. 1137-1143, 2018.
- MARTEL, A. C.; ZEGGANE, S.; AURIERES, C.; DRAJNUDEL, P.; FAUCON, J. P.; AUBERT, M. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol®50. **Apidologie**, Paris, v. 38, p. 534-544, 2007.
- MARTINELLO, M.; BARATTO, C.; MANZINELLO, C.; PIVA, E.; BORIN, A.; TOSON, M.; GRANATO, A.; BONIOTTI, M. B.; GALLINA, A.; MUTINELLI, F. Spring mortality in honey bees in northeastern Italy: detection of pesticides and viruses in dead honey bees and other matrices. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 56, n. 3, p. 239-254, 2017.
- 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, n. 2, p. 293-300, 2006.
- 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.
- MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5 ed. Harlow: Pearson Education, 2005. 268 p.
- MIOTELO, L.; REIS, A. L. M.; MALAQUIAS, J. B.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 268, p. 115770, 2021.
- MORENO-GONZÁLEZ, D.; ALCÁNTARA-DURÁN, J.; GILBERT-LÓPEZ, B.; BENITO-CAMBRA, M.; CUTILLAS, V. M.; RAJSKI, L.; MOLINA-DÍAZ, A.; GARCÍA-REYES, J. F. Sensitive detection of neonicotinoid insecticides and other selected pesticides in pollen and nectar using nanoflow liquid chromatography orbitrap tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, Cary, v. 101, n. 2, 2018.
- MORENO-GONZÁLEZ, D.; CUTILLAS, V.; HERNANDO, M.D.; ALCÁNTARA-DURÁN, J.; GARCÍA-REYES, J.F.; MOLINA-DÍAZ, A. Quantitative determination of pesticide residues in specific parts of bee specimens by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 715, p. 137005, 2020.

- MORRISON, L.M.; RENAUD, J.B.; SABOURIN, L.; SUMARAH, M.W.; YEUNG, K.K.C.; LAPEN, D.R. High-throughput quantitation of neonicotinoids in lyophilized surface water by LC-APCI-MS/MS. **Journal of AOAC International**, Cary, v. 101, n. 6, p. 1940-1947, 2018.
- MULLIN, C.A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J.S. High levels of miticides and agrochemicals in north american apiaries: implications for honey bee health. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010.
- MUSA, M.; WAN IBRAHIM, W. A.; MOHD MARSIN, F.; ABDUL KEYON, A. S.; RASHIDI NODEH, H. Graphene-magnetite as adsorbent for magnetic solid phase extraction of 4-hydroxybenzoic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid in stingless bee honey. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 265, p. 165-172, 2018.
- NIELL, S.; JESÚS, F.; PÉREZ, C.; MENDOZA, Y.; DÍAZ, R.; FRANCO, J.; CESIO, V.; HEINZEN, H. QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 18, p. 4484-4492, 2015.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 446p.
- OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2014.
- ORANTES-BERMEJO, F.J.; PAJUELO, A.G.; MEGÍAS, M.M.; FERNÁNDEZ-PÍÑAR, C.T. Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 49, n. 3, p. 243-250, 2010.
- OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 4, n. 1, p. 52-76, 2012.
- PEREIRA, W. R.; PEREIRA, A. J.; SOUZA, R. J.; GIARDINI, B. P. Avaliação da produtividade de cultivares de morango em Bom Repouso, Minas Gerais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, p. S2513-S2515, 2008.
- PEREIRA, W. R.; SOUZA, R. J.; YURI, J. E.; FERREIRA, S. Produtividade de cultivares de morangueiro, submetidas a diferentes épocas de plantio. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 500-503, 2013.
- PESTICIDE ACTION NETWORK NORTH AMERICA. **Pesticides and honey bees: state of the science**. São Francisco: PANNA, 2012. 30 p. Disponível em: <https://cutt.ly/xcsx3cl>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- PETTIS, J.S.; VANENGELSDORP, D.; JOHNSON, J.; DIVELEY, G. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. **Naturwissenschaften**, Heidelberg, v. 99, n. 2, p. 153-158, 2012.

- PIRASSUNUNGA. Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal de Agricultura. **Agricultura**. Pirassununga, 2020. Disponível em: <https://pirassununga.sp.gov.br/secretaria-municipal-de-agricultura/>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- 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 de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.
- POOK, C.; GRITCAN, I. Neonicotinoid insecticide residues in New Zealand maize paddock soil. **PeerJ Preprints**, London, v. 5, e2919v1, 2017.
- PORTO, R. G.; ALMEIDA, R. F.; CRUZ-NETO, O.; TABARELLI, M.; VIANA, B. F.; PERES, C. A.; LOPES, A. V. Pollination ecosystem services: a comprehensive review of economic values, research funding and policy actions. **Food Security**, Dordrecht, v. 12, p. 1425-1442, 2020.
- 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**, Kidlington, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.
- PRADO, F. S. R.; DOS SANTOS, D. M.; OLIVEIRA, T. M. A.; BURGARELLI, J. A. M.; CASTELE, J. B.; VIEIRA, E. M. Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille (1811) via oral and topic acute exposure. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 265, p. 114313, 2020.
- PRODUÇÃO DA PECUÁRIA MUNICIPAL. Rio de Janeiro: IBGE, v. 47, 2019. Disponível em: <https://cutt.ly/3lRu0DY>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- RAHMAN, A. **Chromatographic analysis of the insecticides thiamethoxam and imidacloprid in the stingless bee *Melipona scutellaris***: determination, toxicity, and evaluation of the effects of biochemical markers. Orientadora: Eny Maria Vieira. 2020. 111 f. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.
- RAYMANN, K.; MOTTA, E.V.S.; GIRARD, C.; RIDDINGTON, I.M.; DINSER, J.A.; MORANA, N.A. Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 84, n. 13, p. e00545–18, 2018.
- RICKETTS, T. H.; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; BOGDANSKI, A.; GEMMILL-HERREN, B.; GREENLEAF, S. S.; KLEIN, A. M.; MAYFIELD, M. M.; MORANDIN, L. A.; OCHIENG, A.; VIANA, B. F. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, Chichester, v. 11, p. 499-515, 2008.
- RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M.P.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, Paris, v. 36, n. 1, 71–83, 2005.
- SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Impacts of pesticides on honey bees. In: CHAMBO, E. D. (ed.). **Beekeeping and bee conservation - advances in research**. London: IntechOpen, 2016. p. 78-97. Disponível em: <https://cutt.ly/sx6JwSf>. Acesso em: 29 abr. 2021.

- SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees – a risk assessment. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014.
- SCHMARANZER, S. Thermoregulation of water collecting honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 46, n. 8, p. 1187–1194, 2000.
- SCHMUCK, R.; SCHÖNING, R.; STORK, A.; SCHRAMEL, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, Oxford, v. 57, p. 225–238, 2001.
- SCHNEIDER, C. W., TAUTZ, J., GRUNEWALD, B., FUCHS, S. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. e30023, 2012.
- SILVA, I. P.; OLIVEIRA, F. A. S.; PEDROZA, H. P.; GADELHA, I. C. N.; MELO, M. M.; SOTO-BLANCO, B. Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. **Apidologie**, Paris, v. 46, p. 703–715, 2015.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 254 p.
- SINGH, P.; KHAN, M.S.; KUNJWAL, N. Impact of botanical insecticides on the stingless bees, *Tetragonula iridipennis* S. and the honey bees, *Apis mellifera* L. adults bees (Hymenoptera: Apidae). **The BioScan**, Ranchi, v.10, n.4, p.1461-1463, 2015.
- SLAA, E.J.; CHAVES, L.A.S.; MALAGODI-BRAGA, K.S.; HOFSTEDE, F.E. Stingless bees in pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, Paris, v. 37, n. 2, p. 293-318, 2006.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Completing the method: validation and transfer. In: SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley, 1997, p. 685-713.
- TAVARES, D. A.; DUSSAUBAT, C.; KRETZSCHMAR, A.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O.; BÉRAIL, G.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 229, p. 386-393, 2017.
- TAYLOR, P.J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. **Clinical Biochemistry**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 328-334, 2005.
- TEIXEIRA, E.W.; CHEN, Y.P.; MESSAGE, D.; BONCRISTIANI, H.F.; PETTIS, J.S.; EVANS, J.D. Israeli acute paralysis virus in Africanized honey bees in southeastern Brazilian apiaries. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 51, p. 282-284, 2012.
- TEIXEIRA, E.W.; CHEN, Y.P.; MESSAGE, D.; PETTIS, J.; EVANS, J.D. Virus infection in Brazilian honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 99, p. 117-119, 2008.

- TETTE, P. A. S.; DA SILVA OLIVEIRA, F. A.; PEREIRA, E. N. C.; SILVA, G.; DE ABREU GLORIA, M. B.; FERNANDES, C. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 211, p. 130-139, 2016.
- THOMPSON, H.M. Behavioural effects of pesticides in bees—their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v. 12, p. 317-33-, 2003.
- TOMÉ, H. V. V.; SCHMEHL, D. R.; WEDDE, A. E.; GODOY, R. S. M.; RAVAIANO, S. V.; GUEDES, R. N. C.; MARTINS, G. F.; ELLIS, J. D. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 256, p. 113420, 2020.
- TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 247-68, 2005.
- TOMIZAWA, M.; YAMAMOTO, I. Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 18, p. 91-98, 1993.
- 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.
- TU, X.; CHEN, W. Overview of analytical methods for the determination of neonicotinoid pesticides in honeybee products and honeybee. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, New York, p. 1-10, 2020.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of Pesticide Programs. **Guidance for assessing pesticide risks to bees**. Washington: US-EPA, 2014. Disponível em: <https://cutt.ly/ZcP3lM8>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- VALVERDE, S.; ARES, A. M.; ARRIBAS, M.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M.J. ; BERNAL, J. Development and validation of UHPLC–MS/MS methods for determination of neonicotinoid insecticides in royal jelly-based products. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, n. 70, p. 105-113, 2018a.
- VALVERDE, S.; BERNAL, J. S.; MARTÍN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. Fast determination of neonicotinoid insecticides in bee pollen using QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 37, p. 2470-2477, 2016.
- VALVERDE, S.; IBÁÑEZ, M.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; HERNÁNDEZ, F.; BERNAL, J. Development and validation of ultra high performance-liquid chromatography–tandem mass spectrometry based methods for the determination of neonicotinoid insecticides in honey. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 266, p. 215–222, 2018b.
- 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, p. 243-255, 2010.

- VAN DER SLUIJS, J. P.; SIMON-DELISO, N.; GOULSON, D.; MAXIM, L.; BONMATIN, J. M.; BELZUNCES, L. P. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, Kidlington, v. 5, p. 1-13, 2013.
- VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; DONOVALL, L. MULLIN, C.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; TARPY, D.R.; HAYES JUNIOR, J.; PETTIS, J. S. “Entombed Pollen”: a new condition in honey bee colonies associated with increased risk of colony mortality. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 101, p. 147-149, 2009a.
- 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, n. 8, 2009b.
- VANENGELSDORP, D.; HAYES JR. J.; UNDERWOOD, R. M.; CARON, D.; PETTIS, J. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2011.
- VANENGELSDORP, D.; UNDERWOOD, R.; CARON, D.; HAYES JUNIOR, J. 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, v. 147, p. 599-603, 2007.
- VÁZQUEZ, P. P.; LOZANO, A.; UCLÉS, S.; RAMOS, M. M. G.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1426, p. 161-173, 2015.
- VEIGA JUNIOR, W.G. O morango e sua evolução comercial. In: CARVALHO, S.P. (coord.). **Boletim de morango: cultivo convencional, segurança alimentar e cultivo orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 2006, p. 119-126.
- VOSSLER, F. G.; BLETTLER, D. C.; FAGUNDEZ, G. A.; DALMAZZO, M. Stingless bees as potencial pollinators in agroecosystems in Argentina: inferences from pot-pollen studies in natural environments. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. (ed.). **Pot-pollen in stingless bee mellittology**. Springer: New York, 2018, p. 155-175.
- WINSTON, M. L. **The biology of the honey bee**. Cambridge: Harvard University Press, 1991. 281 p.
- WITTER, S.; RADIN, B.; LISBOA, B. B.; TEIXEIRA, J. S. G.; BLOCHTEIN, B.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. C. Desempenho de cultivares de morango submetidas a diferentes tipos de polinização em cultivo protegido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 58-65, 2012.
- WU, J.Y.; ANELLI, C.M.; SHEPPARD, W.S. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2011.

WU, M.C.; CHANG, Y.W.; LU, K.H.; YANG, E.C. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 88, p. 12-20, 2017.

XAVIER, V. M.; MESSAGE, D.; PIKANÇO, M. C.; BACCI, L.; SILVA, G. A.; BENEVENUTE, J. S. Impact of botanical insecticides on indigenous stingless bees (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, v.56, n.3, p.1-14, 2010.