

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

HENRIQUE LUIS DA SILVA SANTOS

Análise cromatográfica da abamectina e do difenoconazol em
amostras de abelhas jataí, morango, mel e a utilização de
biomarcadores para avaliação das alterações bioquímicas
em abelhas jataí

São Carlos - SP
2019

Henrique Luis da Silva Santos

Análise cromatográfica da abamectina e do difenoconazol em amostras de abelhas jataí, morango, mel e a utilização de biomarcadores para avaliação das alterações bioquímicas em abelhas jataí

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Vieira

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original está disponível na Unidade que aloja o Programa.

**São Carlos - SP
2019**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

S518a Santos, Henrique Luis da Silva
Análise cromatográfica da abamectina e do
difenoconazol em amostras de abelhas Jataí, morango,
mel e a utilização de biomarcadores para avaliação das
alterações bioquímicas em abelhas jataí / Henrique
Luis da Silva Santos; orientador Eny Maria Vieira.
São Carlos, 2019.

- Programa de e Área de Concentração em --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2019.

1. QuEChERS. 2. Abamectina. 3. Difenoconazol. 4.
Toxicidade. 5. SDS-PAGE. 6. LCMSMS. 7. Morango . 8.
Abelha e mel. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **HENRIQUE LUIS DA SILVA SANTOS**.

Título da tese: "Análise cromatográfica da abamectina e do difenoconazol em amostras de abelhas Jataí, morango, mel e a utilização de biomarcadores para avaliação das alterações bioquímicas em abelhas Jataí".

Data da defesa: 12/09/2019.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. **Eny Maria Vieira**
(Orientadora)
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC-USP)

Profa. Dra. **Fernanda Canduri**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC-USP)

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EEESC)

Dr. **Silvio Crestana**
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA)

Profa. Dra. **Simone de Andrade Gualberto**
(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/UESB)

Resultado:

APROVADO

A PROVA DO

APROVADO

APROVADO

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Henrique Santos Silva, Maisa da Silva Santos, a minha tia Vera Lúcia, ao meu irmão Sérgio Murilo, ao meu filho Lorenzo Alexandrino Santos, Victoria Alexandrino Knoeller e ao meu grande e verdadeiro amor Daniela Marques Alexandrino... Precisamos seguir decididos nessa estrada sempre juntos.

AGRADECIMENTOS

Neste momento em que finalizo minha caminhada no doutoramento, agradeço o apoio das pessoas e instituições que contribuíram para a execução do trabalho, sem os quais não teria conseguido. Meus sinceros agradecimentos:

Aos meus amigos de Doutoramento, Cristiano Pereira da Cunha, Obede Rodrigues Alves e ao Raphael Gotardi Brússolo, obrigado por todos os momentos de descontração, introspecção e acima de tudo respeito.

Ao meu querido amigo Dr. Boaventura Rodrigues Vaz Horta Santy, com a sua sensatez e sabedoria me disse: “fique tranquilo, você conseguirá sua aprovação no doutorado, é notório o seu potencial”. Meu muito obrigado a você e à sua linda família.

À minha primeira amiga que tive ao chegar em São Carlos, Mariana Miguel, nem tenho palavras para descrever o quanto lhe admiro, lhe respeito. Só posso dizer: gratidão, gratidão e mais gratidão.

A Escola de Engenharia de São Carlos e à Universidade de São Paulo (USP), pela excelência acadêmica e o comprometimento com o Ensino, Pesquisa e Extensão, ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC), a Veroneide Maria da Silva Athayde e a Claudia Nascimento de Almeida.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Eny Maria Vieira pelo seu aceite e por acreditar em meu potencial, reconhecimento de sua competência, dedicação, orientação atenciosa ao longo desses anos.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do PPGSEA pela atenção e presteza no atendimento, principalmente a José Luiz e Nelson pelo apoio nas etapas finais.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Rio Claro, pela disponibilização das abelhas para a realização de parte dos estudos.

Aos participantes da banca de qualificação Prof. Dr. Silvio Crestana (EMBRAPA) Instrumentação e a Dr^ª. Janete Brigante, pelas valiosas críticas, recomendações e sugestões ao trabalho.

À professora Dr^ª. Fernanda Canduri por todas as contribuições durante o processo de aprendizagem Bioquímica, toda a sua equipe, que foi de fundamental importância para o aprendizado da técnica desenvolvida com os biomarcadores bioquímicos em abelhas. O meu muito obrigado.

Aos colegas do laboratório de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e à Ecossistemas Aquáticos e Terrestres. À minha amiga, companheira de estudos, de busca de novos horizontes, conselheira e amiga para a eternidade, Ana Maria Barbosa Medina, obrigado por tudo e tenha certeza que ficará para sempre em meu coração.

Os envolvidos no meu fortalecimento espiritual, Centro de Umbanda Cabocla Yara (especial à mãe Hérica Ponce e minha querida amiga Bruna Bullo), muito obrigado por proporcionar-me momentos de muito aprendizado e possibilitar-me ajudar outros irmãos durante nossas giras.

À banca examinadora, que aceitou ao meu convite, de contribuir para o enriquecimento do meu trabalho.

À CAPES, CNPq (Bolsa de doutorado institucional, processo: 140372/2018-0) e à FAPESP (pelo apoio financeiro, processo 15/26008-3).

À Prof^a. Dr^a. Maria Olímpia de Oliveira Rezende que gentilmente aceitou-me como estagiário PAE em sua disciplina junto aos alunos do curso de Engenharia Ambiental, o meu muito obrigado. À querida amiga Dr^a. Maria Diva Landgraf, por ser sempre atenciosa comigo e por nossos longos e divertidos papos.

Em especial, agradeço:

À Daniela Alexandrino, que me presenteou com um filho muito especial, Lorenzo, essa criança linda, educada, inteligente e cientista nato. Minha companheira de vida e acadêmica.

À minha “filha” Victoria Alexandrino que desde muito nova me deu o prazer de saborear a sensação de ter um filho, minha companheira de aventuras na Chapada Diamantina.

Aos meus pais Henrique e Maisa, que são minha fortaleza, meus exemplos de vida e minha Tia Vera, meu exemplo de amor incondicional, e meu irmão Sérgio por todo amor e respeito. Meus alicerces para que fosse possível sonhar e voar cada vez mais alto.

EPÍGRAFE

*Primeiro vem a paz
Depois vem a ciência
Prefiro andar a pé
Pensar com paciência é
Andando devagar
Eu deixo a mente voar
Posso até esperar para ver o pôr do sol chegar
Para ver o pôr do sol chegar
Eu sei nenhuma máquina vai nos salvar
Eu sei só eu mesmo posso encontrar
Sem vacilar todo o amor te ofertar
Primeiro vem o se depois vem a certeza
Prefiro a opinião que vem da natureza é
Que vem da natureza
Não tenha mágoa, não guarde rancor
A paciência é quem semeia o amor
Toda fortuna é uma ilusão
Se não carregar paz no coração
Ter paz é ter ciência é... Rafael Pondé¹*

¹<https://www.rafaelponde.com.br/>

RESUMO

SANTOS, S.L.H. **Análise cromatográfica da abamectina e do difenoconazol em amostras de abelhas Jataí, morango, mel e a utilização de biomarcadores para avaliação das alterações bioquímicas em abelhas jataí**, 2019. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

Este trabalho envolve o desenvolvimento e a validação de um método analítico para determinação de abamectina e difenoconazol em amostras de morango, abelhas jataí e mel por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LCMSMS), bem como a utilização de biomarcadores para avaliação das alterações bioquímicas em abelhas jataí. Atualmente, uma das maiores barreiras comerciais que o Brasil tem encontrado para a comercialização de seus produtos é a falta de informações sobre a presença de resíduos em alimentos produzidos no país. Devido à complexidade das matrizes de origem vegetal e das baixas concentrações dos agrotóxicos presentes, há uma grande necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e confiáveis para a identificação e quantificação dos resíduos.

O método desenvolvido foi validado por meio dos parâmetros analíticos de seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, exatidão e precisão, conforme o guia Sanco para análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos e, posteriormente, amostras de morango, mel e abelhas da região de Bom Repouso foram analisadas. Os agrotóxicos são considerados um dos principais fatores do declínio populacional das abelhas e substâncias antioxidantes podem auxiliar na proteção desses insetos contra esses produtos. Foram avaliados o efeito oxidante da abamectina e do difenoconazol em abelhas sem ferrão (*Tetragonisca angustula*). As abelhas submetidas aos tratamentos tópicos foram anestesiadas com CO₂ e receberam 0,5 µL de solução dos agrotóxicos no pronoto com doses previamente estabelecidas (0,0, 3,0, 6,0, 12,0, 24,0, 48,0 e 96,0 ng de abamectina e difenoconazol/µL de solução), aplicadas com uma micropipeta. Abelhas submetidas aos tratamentos de contaminação oral receberam solução de sacarose com as concentrações de abamectina e difenoconazol determinadas anteriormente (0,0, 0,005, 0,01, 0,03, 0,1, e 0,5) durante 24 e 48 horas. O inseticida abamectina foi considerado altamente tóxico para essas abelhas, tanto por via tópica como oral. A intoxicação tópica resultou em uma DL50 (48 horas) de 1,61 ngi.a./abelha. A contaminação oral resultou em uma CL50 (48 horas) de 0,73 ngi.a./µL de solução de sacarose. Após os testes de toxicidade 48 horas da alimentação e com a mortalidade de 50% dos indivíduos, foi preparado homogenato do cérebro e avaliados: atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), glutathione reduzida (GR), glutathione oxidada (GSSG), superóxido dismutase (SOD). Portanto, concluiu-se que o método proposto pode ser aplicado de forma eficiente para a determinação de resíduos de agrotóxicos nas diferentes matrizes avaliadas, com as adaptações necessárias no método desenvolvido, mostrou-se eficiente para a extração e *clean-up* dos extratos de morango, abelha e mel. Em todos os homogenato de cérebros analisados foram encontradas bandas polipeptídicas diferenciais de 20 e 118 kDa. Desta forma, esses resultados abrem perspectivas para estudo de biomarcadores protéicos da qualidade ambiental das abelhas sem ferrão expostas aos xenobióticos utilizados em lavouras.

Palavras-chave: QuEChERS, Abamectina, Difenconazol, LCMSMS, Toxicidade, SDS-PAGE, Biomarcadores, Morango, Abelha e Mel

ABSTRACT

SANTOS, S.L.H. Chromatographic analysis of abamectin and difenoconazole in *jataí*, strawberry, honey bees and the use of biomarkers to assess biochemical changes in *jataí* bees, 2019. Thesis (Doctorate) - São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil.

This work involves the development and validation of an analytical method for the determination of abamectin and difenoconazole in strawberry, *Tetragonisca angustula* bees and honey samples by liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS), as well as the use of biomarkers to evaluate the biochemical changes in *Tetragonisca angustula* bees. Currently, one of the biggest trade barriers that Brazil has encountered for marketing its products is the lack of information about the presence of residues in food produced in the country. Due to the complexity of matrices of plant origin and the low concentrations of pesticides present, there is a great need for the development of efficient and reliable analytical methods for the identification and quantification of residues. The developed method was validated by the figures of merit of specificity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, precision and trueness, according to the SANTE/11813/2017 guide for analysis of pesticide residues in food. Subsequently, samples of strawberry, honey and bees from the Bom Repouso - Brazil region were analyzed. Pesticides are considered one of the main factors in the population decline of bees and antioxidants can help protect these insects against these products. The oxidizing effect of abamectin and difenoconazole in stingless bees (*Tetragonisca angustula*) was evaluated. The bees submitted to topical treatments were anesthetized with CO₂ and received 0.5 µL of pesticide solution in the pronotum with previously established doses (0.0, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0, 48.0 and 96.0 ng abamectin and difenoconazole/µL solution) applied with a micropipette. The bees subjected to oral contamination treatments received sucrose solution with the abamectin and difenoconazole concentrations previously determined (0.0, 0.005, 0.01, 0.03, 0.1, and 0.5) for 24 and 48 hours. The insecticide abamectin was considered highly toxic to these bees, both topically and orally. Topical poisoning resulted in an LD 50 (48 hours) of 1.61 ng a.i./bee. Oral contamination resulted in an LC 50 (48 hours) of 0.73 ng i.a./µL sucrose solution. After 48 hours of feeding toxicity tests and with 50 % mortality, brain homogenate was prepared and evaluated: activity of glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), reduced glutathione (GR), oxidized glutathione (GSSG), superoxide dismutase (SOD). Therefore, it was concluded that the proposed method can be applied efficiently for the determination of pesticide residues in the different evaluated matrices, with the necessary adaptations in the developed method, proved to be efficient for the extraction and clean-up of strawberry extracts, bee and honey. In all brain homogenates analyzed, differential polypeptide bands of 20 and 118 kDa were found. Thus, these results open perspectives for the study of protein biomarkers of environmental quality of stingless bees exposed to xenobiotics used in crops.

Keywords: QuEChERS, Abamectin, Difenoconazole, LC-MS/MS, Toxicity, SDS-PAGE, Biomarkers, Strawberry, Bee and honey

LISTA DE ABREVEATURA

- Abiquim** - Associação Brasileira da Indústria Química
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AO** - Agricultura Orgânica
- APCI** - Ionização Química a Pressão Atmosférica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
- APPI** - Fotoionização à Pressão Atmosférica (Atmospheric Pressure Photoionization)
- BPA** - Boas Práticas Agrícolas
- C18** – Octadecil
- CAT** – Catalase
- CID** - Dissociação Induzida por Colisão (Collision Induced Dissociation)
- CV** - Coeficiente de Variação (Coefficient of Variation)
- DAD** - Detector por Arranjo de Diodos (Diode-Array Detector)
- d-SPE** - Extração em Fase Sólida Dispersiva (Dispersive Solid-Phase Extraction)
- EFSA** - Comissão da European Food Safety Authority
- ESI** - Ionização por Eletrospray (Electrospray Ionization)
- GPx** – Glutathione Peroxidase
- GR** – Glutathione Redutase
- GSH** – Glutathione Reduzida
- LC** - Cromatografia Líquida (Liquid Chromatography)
- LCMSMS** - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry)
- LLE** - Extração Líquido-Líquido (Liquid-Liquid Extraction)
- LMR** - Limites Máximos de Resíduos
- LOD** - Limite de Detecção (Limit of Detection)
- LOQ** - Limite de Quantificação (Limit of Quantification)
- ME** - Efeito Matriz (Matrix Effect)
- MP** - Fase Móvel (Mobile Phase)
- MRM** - Monitoramento de Reações Múltiplas (Multiple Reaction Monitoring)
- PI** - Produção Integrada
- PARA** - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
- PSA** - Amina Primária e Secundária (Primary-Secondary Amine)

QqQ - Triplo Quadrupolo

QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

Sindiveg- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

SOD- Superóxido dismutase

SLE - Extração Sólido-Líquido (Solid-Liquid Extraction)

S/N - Razão sinal/ruído (Signal to Noise)

SP - Fase Estacionária (Stationary Phase)

SPE - Extração em Fase Sólida (Solid-Phase Extraction)

SPME - Microextração em Fase Sólida (Solid-Phase Microextraction)

TIC- Cromatograma de Íon Total (Total Ion Chromatogram)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Crescimento da venda de agrotóxicos de 2000 a 2017 no Brasil.*Para os anos de 2007 e 2008 não foram fornecidos dados referentes a comercialização de Agrotóxico no período.....	8
Figura 2: Fórmula química das avermectinas (B1a e B1b) AbamectinaFonte: ANVISA.....	9
Figura 3: Fórmula química do ingrediente ativo difenoconazol da família dos triazóis.Fonte: ANVISA	10
Figura 4: Mapa indicando a localização do município de Bom Repouso, MG (em destaque) e demais municípios adjacentes	21
Figura 5: Caixa racional implantada no local do experimento.....	22
Figura 6: Representação esquemática do designer da caixa empregada no presente estudo com a abelha Jataí (<i>Tetragonista angustula</i>).	26
Figura 7: Sistema de coleta das abelhas Jataí (<i>Tetragonista angustula</i>).....	26
Figura 8: Etapas da coleta das amostras de morango (A) coleta do fruto, (B) amostra composta, (C) retirada das sepalas e (C) acondicionamento das amostras para análises	27
Figura 9: Características físico-químicas e LMR dos agrotóxicos empregados na cultura do morango.	3
Figura 10: Fluxograma geral do QuEChERS empregado nas análises de morango, abelha e mel.	30
Figura 11: Representação esquemática do ensaio 1 (método QuEChERS modificado) para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel.	33
Figura 12: Representação esquemática do ensaio 2 (método QuEChERS modificado) para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel.	34
Figura 13: Representação esquemática do ensaio 3 (método QuEChERS modificado) para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel.	34
Figura 14: Cromatograma dos padrões analíticos de difenoconazol e abamectina na concentração de 0,2 mg L ⁻¹	44
Figura 15: Espectro de íons fragmentos de m/z 895 (Abamectina, MM=872 g mol ⁻¹).	44
Figura 16: Espectro de íons fragmentos de m/z 406 (Difenoconazol, MM=405 g mol ⁻¹).	45
Figura 17: TIC (cromatograma de íons totais) da solução 1,0 mg L ⁻¹ , XIC (cromatograma de íons extraídos) de difenoconazol e abamectina, respectivamente.	45
Figura 18: Cromatograma do íon total obtido por LCMSMS para amostra branco de morango (A), padrão analítico (B) e solução analítica no extrato da matriz (C), contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de 1,0 mg L ⁻¹	47
Figura 19: Cromatograma do íon total obtido por LCMSMS para amostra branco de abelha Jataí (A), padrão analítico (B) e solução analítica no extrato da matriz (C), contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de 1,0 mg L ⁻¹	48

Figura 20: Cromatograma do íon total obtido por LCMSMS para amostra branco de mel (A), padrão analítico (B) e solução analítica no extrato da matriz (C), contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de 1,0 mg L ⁻¹ .	48
Figura 21: Curva analítica dos agrotóxicos determinados por LC-MS/MS: Curva em padrão analítico (azul), Curva com fortificação no extrato final (verde) e no branco da matriz (vermelho). (Continua).	52
Figura 22: Gráfico de resíduos versus a concentração dos analitos estudados. (Continua).	54
Figura 23: Recuperações obtidas após as modificações no processo de extração.	56
Figura 24: Cromatogramas dos agrotóxicos presentes nas amostras de morango, determinados pelo método analítico desenvolvido e validado.	59
Figura 25: Cromatogramas dos agrotóxicos presentes nas amostras de abelha, determinados pelo método analítico desenvolvido e validado.	60
Figura 26: Cromatogramas dos agrotóxicos presentes nas amostras de abelha, determinados pelo método analítico desenvolvido e validado.	60
Figura 27: Relação do log da concentração ao valor do probit para <i>Tetragonisca angustula</i> (24 horas) após intoxicação com abamectina.	85
Figura 28: Relação do log da concentração ao valor do probit para <i>Tetragonisca angustula</i> (48 horas) após intoxicação com abamectina.	86
Figura 29: Relação do log da concentração ao valor do probit para <i>Tetragonisca angustula</i> (48 horas) após intoxicação com difenoconazol.	87
Figura 30: Perfil eletroforético dos cérebros de abelhas expostos aos agrotóxicos abamectina e difenoconazol. Da esquerda para a direita, 1 = marcador, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 sobrenadante do cérebro.	89
Figura 31: Flor e frutos do morango. Fonte: Autoria própria.	97
Figura 32: Marcador molecular de proteína.	97
Figura 33: Cuba de eletroforese.	98
Figura 34: Homogenato de cérebro de abelhas jataí com marcadores.	98

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Gradiente de eluição da fase móvel utilizado na análise cromatográfica dos agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel no sistema LCDAD.	31
Tabela 2: Comprimentos de onda selecionados para análise dos compostos estudados	32
Tabela 3: Relação dos testes realizados para análise de remoção dos coextrativos para 4 mL de extrato	37
Tabela 4: Gradiente de eluição da fase móvel utilizado na análise cromatográfica dos agrotóxicos (difenoconazol e abamectina) em amostras de morango, mel e abelha jataí no sistema LCMSMS.	41
Tabela 5: Parâmetros de operação do espectrômetro de massas para análise dos agrotóxicos (difenoconazol e abamectina) em morango, abelha jataí e mel no modo positivo.....	42
Tabela 6: Parâmetros de ionização dos agrotóxicos (difenoconazol e abamectina) estudados em morango, abelha jataí e mel no modo positivo	42
Tabela 7: Parâmetros relativos às curvas analíticas obtidas para os analitos em estudo	49
Tabela 8: Percentuais de recuperação dos agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado, para as matrizes morango, abelha e mel.	56
Tabela 9: Percentuais de RSD para a precisão intradias (n=5), precisão interdias (n=10) e exatidão do método QuEChERS modificado, nos níveis 0,01 mg L ⁻¹ (baixo), 0,5 mg L ⁻¹ (médio) e 1 mg L ⁻¹ (alto)	58
Tabela 10: Concentrações de agrotóxicos em abelha, mel e morangos, empregando o método desenvolvido e validado.....	59
Tabela 11: Valores da toxicidade aguda da abamectina para <i>Tetraginisca angustula</i>	84
Tabela 12: Valores da toxicidade aguda do difenoconazol para <i>Tetraginisca angustula</i>	86

Sumário

CAPÍTULO 1: Contextualização, importância e objetivos da pesquisa	3
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 Revisão bibliográfica.....	6
2.1 Agrotóxicos: aspectos negativos e impacto ambiental	6
3 Os agrotóxicos abamectina e difenoconazol	9
4 Justificativa	11
5 Objetivos.....	11
5.1 Geral 11	
5.2 Específico	12
6 Referência	13
Capítulo 2: Desenvolvimento, validação e aplicação do método analítico para determinação de abamectina e difenoconazol em morango, abelha jataí e mel	16
1 Introdução.....	16
2 Material e método	20
2.1 Área de estudo	20
2.2 Instalação das colmeias.....	21
2.3 Coleta das amostras	24
3 Solventes, reagentes e padrões analíticos	27
3.1 Preparo das soluções padrão.....	28
3.2 Preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos	28
4 Aplicação do método QuEChERS na determinação de agrotóxicos em morango, abelha e mel.....	30
5 Condições cromatográficas utilizadas em cromatógrafo a líquido acoplado em um detector com arranjo de díodos (LCDAD).....	31
6 Desenvolvimento do método de extração para a análise de resíduos de agrotóxicos em morango, abelha e mel.....	32
7 Validação do método	37
7.1 Seletividade.....	38
7.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	38
7.3 Linearidade.....	39
7.4 Precisão e exatidão.....	39
7.5 Efeito matriz (EM) e recuperação do método (RM)	40
8 Resultados e discussão	41

8.1	Determinação das condições cromatográficas empregado por LCMSMS para determinação de difenoconazol e abamectina em morango, abelha jataí e mel	41
9	Validação do método.....	46
9.1	Seletividade	46
9.2	Lineridade	49
9.4	Limite de detecção e limite de quantificação	50
9.3	Efeito matriz.....	51
9.5	Recuperação	55
9.6	Precisão e exatidão	57
9.7	Aplicação do método	59
10	Conclusão	63
11	Referência.....	64
	Capítulo 3: Teste de toxicidade de abamectina, difenoconazol e análise de biomarcadores em abelhas jataí	76
1	Introdução	76
2	Material e método.....	79
3	Espécies de abelhas escolhidas	79
4	Inseticidas testados.....	79
5	Controle acetona tópico e oral	80
6	Determinação da DL ₅₀ via tópico.....	80
7	Determinação da CL ₅₀ via oral e o consumo do alimento diário pela abelha jataí 81	
8	Principais grupos de biomarcadores	81
9	Estresse oxidativo e mecanismo de proteção antioxidante.....	82
10	Resultados e discussão	84
10.1	Avaliação da toxicidade tóxica e de ingestão para a abelha jataí a abamectina e o difenoconazol.....	84
10.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	88
11	Conclusão	91
12	Referência.....	92
	Capítulo 4: Conclusões gerais	95
	Capítulo 5: Considerações finais e recomendações para trabalhos futuros	96
	Apêndices	97

CAPÍTULO 1: Contextualização, importância e objetivos da pesquisa

1 INTRODUÇÃO

Há mais de dois séculos, que os agricultores utilizam substâncias que preveniam os danos causados por pragas, sendo uma das primeiras o enxofre. No início do século XV começaram a utilizar outras substâncias tóxicas como arsênio, mercúrio e chumbo e no século XVII começaram a empregar o sulfato de nicotina que era extraído das folhas de tabaco (EM et al., 2006), o que contribuiu para que o ser humano alcançou uma de suas maiores conquistas, conferindo um marco histórico em seu desenvolvimento, que foi o cultivo de plantas e animais para sua subsistência. Assim, surgiu a agricultura que, em decorrência da crescente necessidade de produção de energia, alimentos e outros bens de consumo para os seres humanos, tem se intensificado, alterando cada vez mais os ambientes naturais (MAZOYER & ROUDART, 2010).

Uma das formas de potencialização da produção agrícola é feita pela adição de compostos químicos à área agricultável, seja para correções de solo, seja para adubação ou para o controle de organismos invasores, com os chamados agrotóxicos. Em especial, a partir dos anos 60, o uso destes produtos químicos foi intensificado devido à chamada Revolução Verde, que, por meio da mecanização e da inserção de novos produtos químicos, modificou o processo tradicional de produção agrícola (MAZOYER & ROUDART, 2010).

No Brasil, os agrotóxicos têm papel relevante na agricultura atual, tendo em vista que, segundo Palaez et al (2013), somos o maior consumidor mundial destes produtos químicos. Dois dos grandes problemas nesta prática de produção é a falta de especificidade dos agroquímicos e o recorrente transporte dos compostos aos diversos compartimentos ambientais. Uma vez na natureza, eles passam não somente a atingir os invasores, mas também afetam organismos não-alvo (DORES & DE-LAMONICA, 1999), exercendo efeito tóxico à biota e passando a exercer papel de contaminante ambiental

O ministério da saúde segundo a Portaria nº 329, de 2 de setembro de 1985 (BRASIL, 1985) proibiu a comercialização, o uso e a distribuição de produtos organoclorados destinados à agropecuária, exceto, para uso como iscas formicidas e de cupimicidas, combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias, em uso emergencial na agricultura e na preservação de madeiras.

O DDT, como todos os demais organoclorados, foi banido, tendo em vista seus efeitos nocivos baseados na neurotoxicidade, no aumento de câncer de mama em mulheres, em alterações causadas pelos efeitos estrogênicos, além dos problemas ambientais, como rápida absorção e bioconcentração nos organismos, redução da capacidade reprodutiva das aves e alta estabilidade à decomposição ou à degradação no meio ambiente (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

Um tema bastante controverso é o que se refere a classificação dos agrotóxicos, devido a várias denominações que têm sido empregadas para designar sua ação ou organismo alvo (defensivos agrícolas, biocidas, pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários e agrotóxicos). (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009) Para a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA, (US EPA, 2017) o termo agrotóxico foi definido como sendo uma substância química ou mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, ou mesmo, para regular, desfolhar e dessecar plantas.

Pesticida, segundo o Codex Alimentarius é toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal (ou que seja fornecido aos animais para controle de ectoparasitas).

O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, ou inibidores de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte (FAO, 2005).

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802 de 11 de Julho de 1989, conhecida como “Lei de Agrotóxicos”, estabelece que os defensivos agrícolas, ou 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 empregadas como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Em 2002 o decreto nº 4.074 regulamenta a Lei nº 7802/1989 adota e define o termo “agrotóxico” para ser utilizado em todos os casos, substituindo os demais termos supra-citados.

É notória uma diferença importante entre as duas definições, tendo em vista que a definição empregada pela FAO contempla substâncias que possam virem a serem utilizadas não somente durante o plantio, mas em todas as etapas do cultivo propriamente dito e também após a colheita, como nas etapas de armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento. Os agrotóxicos podem ser classificados quanto a: Finalidade (acaricida, aficida, formicida, fungicida, herbicida, inseticida, larvicida, ovicida, raticida, entre outros); Modo de Ação (ingestão, contato, microbiano e fumegante); Origem, provenientes de compostos orgânicos ou inorgânicos, de vegetais, bactérias ou fungos (RIBEIRO; et al., 2008).

Neste contexto, ressalta-se a importância dos estudos de contaminação de alimentos tanto pelo cenário de risco em que os ambientes de produção podem estar expostos frente ao uso excessivo de agrotóxicos, até mesmo pela necessidade da compreensão dos efeitos nocivos destes agrotóxicos ao meio ambiente e à saúde pública. Assim, esta pesquisa visa contribuir com discussões congruente aos problemas causados pela contaminação de alimento e mortandade de abelhas.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Agrotóxicos: aspectos negativos e impacto ambiental

Os agrotóxicos são potencialmente tóxicos ao homem, como também ao meio ambiente, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou serem cancerígenos, mimetizadores de hormônios, entre outros. (LINTELMANN, JATAYAMA et al., 2003). A contaminação dos alimentos por resíduos de agrotóxicos pode vir de uma aplicação direta em uma das fases da produção da cultura, do transporte ou do armazenamento. (ARAÚJO; NOGUEIRA; AUGUSTO, 2000)

Os agrotóxicos possuem vários caminhos que podem gerar rotas de contaminação no ar, solo, água e águas subterrâneas. Os agrotóxicos, quando aplicados diretamente no solo, podem ser degradados por via química, fotólise ou microrganismos, produzindo metabólitos ou compostos mais simples. Entretanto, as substâncias com alta persistência ou baixa taxa de degradação podem permanecer no ambiente sem serem alterados e podem ser adsorvidas pelas plantas ou nas partículas do solo, e serem, posteriormente, desorvidas e lixiviadas pela presença das chuvas. Os agrotóxicos podem ser transportados para regiões distantes das de aplicação ou atingirem as águas superficiais ou percolarem para os lençóis subterrâneos. Nos ambientes aquáticos, os agrotóxicos podem ser adsorvidos nas partículas dos sedimentos, serem degradados por via química, biológica ou fotólise, ou serem volatilizados.

Na atmosfera, o transporte depende das propriedades dos agrotóxicos (solubilidade, pressão de vapor, coeficiente de partição octanol/água, coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo, tempo de meia-vida, constante de ionização, entre outros); condições ambientais (clima, textura e conteúdo de água no solo); topografia e práticas de manejo (tipo de cultura e método de aplicação dos agrotóxicos). (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001)

Os agrotóxicos estão sendo largamente utilizados desde a metade do século XX. De acordo com os dados do British CropProtectionCouncil (BCPC), aproximadamente 860 substâncias ativas são comercializadas como agrotóxicos nos mais variados tipos de formulações. Estas substâncias estão divididas em mais de 100 classes, sendo benzoiluréias, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretróides, sulfoniluréias e triazinas os grupos mais importantes (BCPC, 2010).

As características físicas e químicas dos agrotóxicos são consideravelmente diferentes, uma vez que podem apresentar caráter ácido, básico e neutro. Estes compostos podem conter em sua estrutura: halogêneos, fósforo, enxofre ou nitrogênio, heteroátomos que possuem uma grande relevância no método de detecção destes compostos. Um grande número de agrotóxicos é muito volátil, outros não, e esta grande diversidade causa sérios problemas no desenvolvimento de um método “universal” para análise de resíduos destes compostos (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Os agrotóxicos podem apresentar diferentes rotas de degradação no meio ambiente e serem transferidos em partes para diferentes compartimentos ambientais. Quando aplicados em pulverização, os agrotóxicos podem ser transportados pelo vento para locais distantes dos quais foram aplicados. Quando aplicados diretamente no solo, podem ser levados pela água de chuva ou irrigação e atingir os mananciais de águas superficiais ou as reservas subterrâneas através da lixiviação. Embora existam muitas possibilidades para que os agrotóxicos sejam transportados no ambiente e contaminem as fontes de água, nem todos os produtos apresentam a mesma persistência e mobilidade no ambiente (BARRIGOSI; LANNA; FERREIRA, 2005).

Um fenômeno ecológico chamado de biomagnificação, no qual ocorre acumulação de agrotóxicos ao longo da cadeia alimentar, leva a um aumento da concentração de uma determinada substância com o aumento do nível trófico. Mesmo em concentrações baixas, os agrotóxicos representam riscos para algumas espécies de organismos (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001).

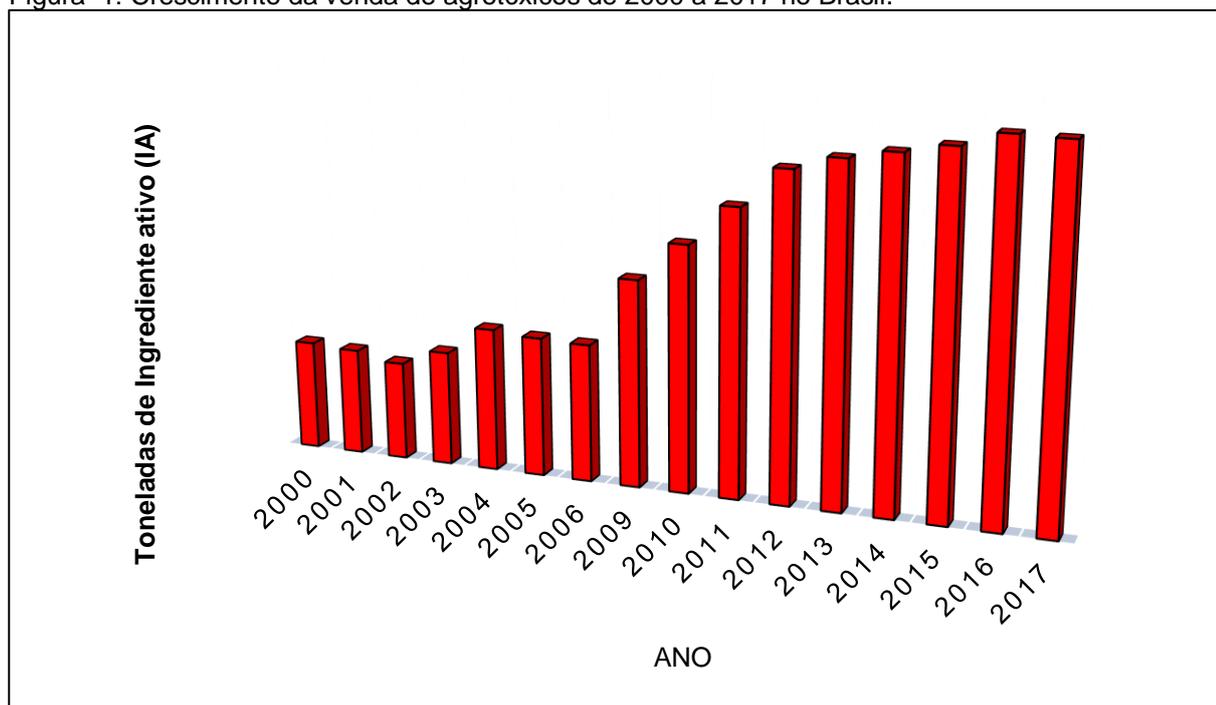
No Brasil, o setor agrícola é um dos principais responsáveis pela economia e pelo PIB. Estudos sobre agrotóxicos têm mostrado um uso elevado de diferentes substâncias com o intuito de melhorar a produção. Isso tem levado o Brasil a sucessivos recordes de produção agrícola e, conseqüentemente, tornando o país líder mundial no consumo de agrotóxicos, de acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014)

Anualmente, é gerado pelo IBAMA o “Boletim Anual sobre Produção, Importação, Exportação e Vendas de Produtos Agrotóxicos no Brasil” tendo por base os dados dos relatórios semestrais emitidos pelas empresas que possuem registro

de agrotóxicos e afins, seguindo a exigência presente no Art. 41 do decreto nº 4.074/2002 (BRASIL, 2017).

A partir desses dados, o IBAMA realizou a consolidação destas informações em um gráfico com o histórico da comercialização de agrotóxicos desde o ano 2000 até o ano de 2017, conforme pode ser observado a seguir (Figura 1):

Figura 1: Crescimento da venda de agrotóxicos de 2000 a 2017 no Brasil.



*Para os anos de 2007 e 2008 não foram fornecidos dados referentes a comercialização de Agrotóxico no período

Fonte: IBAMA (2019) <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicasqa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>

De acordo com dados do relatório de comercialização de agrotóxicos as regiões que mais consomem agrotóxicos no Brasil são, em ordem decrescente de consumo: Centro-Oeste (178.543,82 ton de i.a); Sul (165.282,77 ton de i.a); Sudeste (118.154,86 ton de i.a); Nordeste (50.142,20 ton de i.a) e a região Norte (27.821,30 ton de i.a)

Dentre os produtos, os que compõem maiores quantidades em toneladas de ingredientes ativos são, em primeiro lugar, os herbicidas (315.573,38), seguido dos fungicidas (65.114,91) e os inseticidas (54.54,00). Do total de agrotóxicos comercializados no Brasil atualmente, a grande maioria é pertencente às classes II (60%) e III (32%), o que correspondem a produtos perigosos ao meio ambiente e

produtos muito perigosos ao meio ambiente, respectivamente. Ressalta-se ainda que 1% das 539.944,95ton de i.a., ou seja, 5 mil toneladas de i.a. comercializados no Brasil, são altamente perigosos ao meio ambiente (IBAMA, 2019).

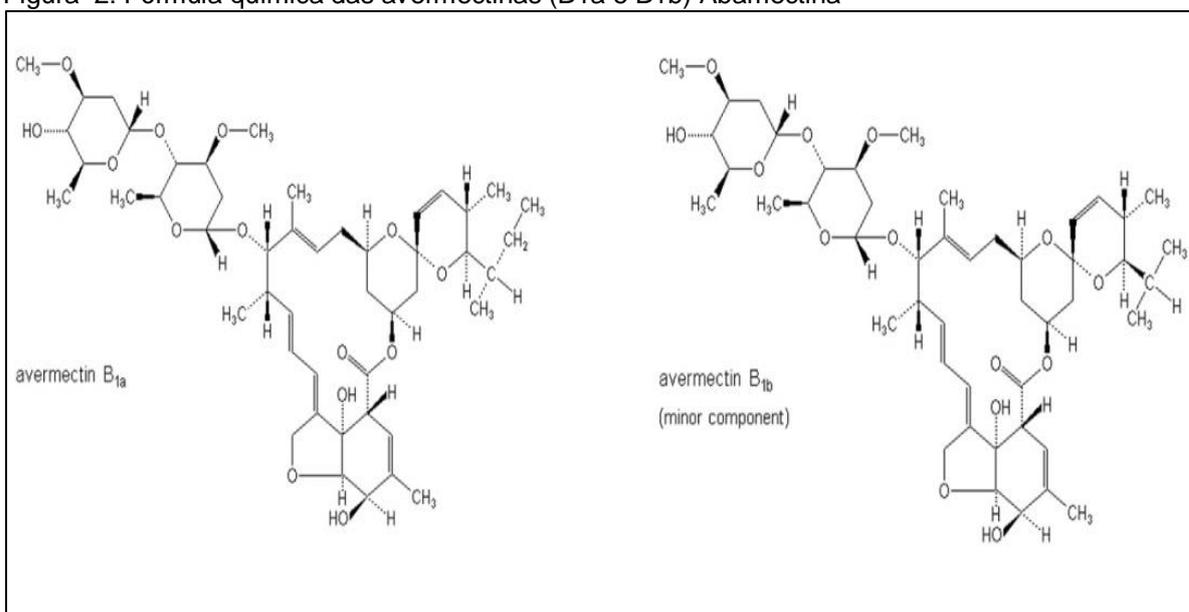
3 Os agrotóxicos abamectina e difenoconazol

O agrotóxico A abamectina (

Figura 2), juntamente a outros dois compostos (ivermectina e doramectina), pertence ao grupo químico das avermectinas, derivados da fermentação da bactéria do solo *Streptomyces avermitilis*. Ela é composta pela mistura de duas moléculas, a Avermectina B1a (mais de 80%) e a Avermectina B1b (demais 20%), cuja única diferença estrutural é a presença de um grupo etil (Avermectina B1a) ou um grupo metil (Avermectina B1b) na posição 26-C da cadeia (CAMPBELL, 1989; DAR, 2006).

A funcionalidade é classificada como um inseticida/acaricida/nematicida de origem biológica, além de ser um agente antiparasitário em animais de criação e estimação (KOLAR et al., 2008). Seu mecanismo de ação estimula a liberação do ácido gama aminobutírico (GABA) que resulta num estado de repouso forçado, ataxia e paralisia. A toxicidade é classificada pela ANVISA como extremamente tóxico a saúde humana (classe 1) e como muito tóxico ao meio ambiente pelo IBAMA (classe 2).

Figura 2: Fórmula química das avermectinas (B1a e B1b) Abamectina



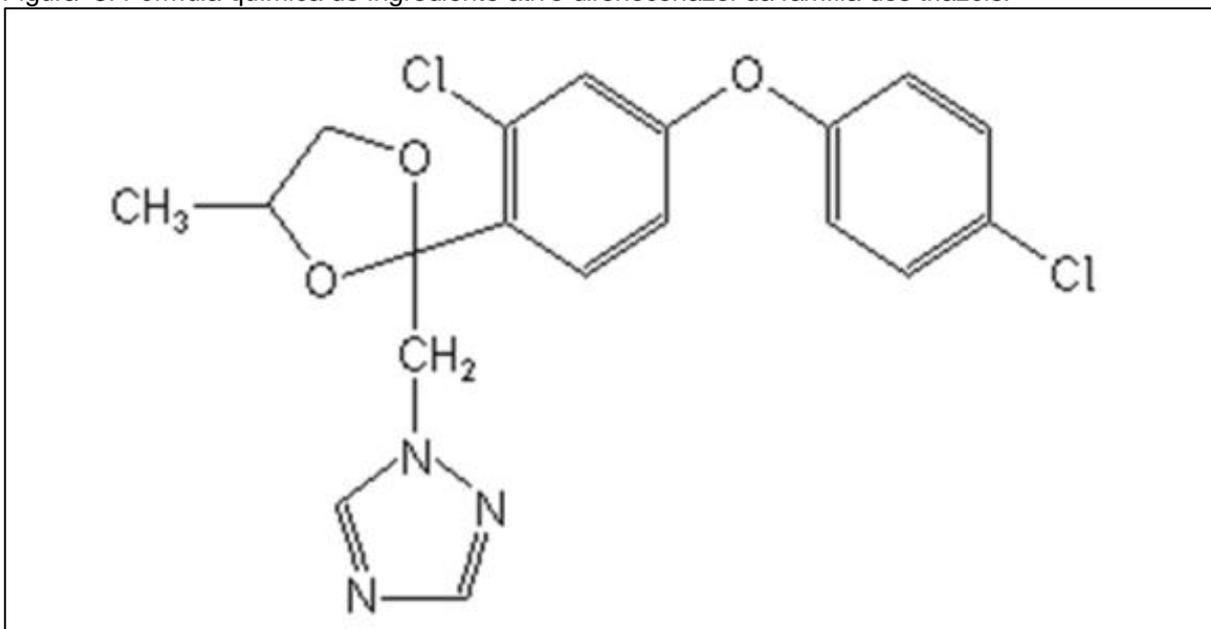
Fonte: ANVISA

O grupo químico das avermectinas, pode ser utilizado como defensivo agrícola em diversas culturas agrícolas e em diferentes modalidades de emprego, como algodão, cebola, cenoura e feijão aplicado nas sementes, batata, berinjela, pimentão e tomate aplicado no solo, amendoim, maçã, mamão, manga e morango aplicação foliar. Para o morango, o produto formulado costuma ser aplicado para erradicação do ácaro-rajado da espécie *Tetranychusurticae*, segundo recomendações, respeitando-se a dose de 75 mL p.c/100L de água aplicada na plantação e um máximo de duas intervaladas de sete dias.

O difenoconazol (Figura 3), pertence ao grupo químico do triazoltriazido para o mercado em 1989 e é um fungicida sistêmico destinado ao controle de doenças de frutas, vegetais e plantas ornamentais. É inibidor da biosíntese de ergosterol provocando rompimentos na biosíntese da parede celular de fungos além de inibir a germinação de esporos destes organismos.

Quanto a sua toxicidade, assim como a abamectina é classificado pela ANVISA como extremamente tóxico a saúde humana (classe 1) e como muito tóxico ao meio ambiente pelo IBAMA (classe 2), além de ser considerado altamente persistente no meio ambiente.

Figura 3: Fórmula química do ingrediente ativo difenoconazol da família dos triazóis.



Fonte: ANVISA

Os triazóis pode ser utilizado como defensivo agrícola em diversas culturas como também em diversas modalidades de emprego como, aplicação em sementes de algodão, amendoim, cevada, feijão, soja e trigo, aplicação foliar nas culturas de abacate, abóbora, abobrinha, álamo, alface, algodão, alho, ameixa, melão, pepino, pimentão, soja, uva e morango. Nesta última, o produto costuma ser aplicado para erradicação da mancha *mycosphaerella* causada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae*, segundo recomendações técnicas deve respeitar a dose de 40ml a cada 100L de água aplicada na plantação com intervalos mínimos de 14 dias.

4 Justificativa

O panorama de utilização de agrotóxicos no Brasil e no mundo, vem levantando discursões sobre as problemáticas causadas pelo uso excessivo desses produtos. Considerando a forma inadequada de inserção dos agrotóxicos na agricultura, na qual gera uma série de misturas e interações, cujo efeitos não são previstos sobre a biota local, necessitando assim de mais estudos.

Neste cenário, encontra-se também a imprevisível ação dos ingredientes ativos presentes nos agroquímicos que, apresenta incógnitas quanto aos possíveis efeitos tóxicos para organismos não alvos.

Desta maneira o que se propõe é o desenvolvimento de um método analítico que possibilite a identificação e quantificação de resíduos de pesticidas do grupo químico Avermectina (Abamectina) inseticidas utilizados no controle ácaro-rajado da espécie *Tetranychus urticae* do morango, bem como, do grupo químico Triazol (Difenoconazol) utilizado para erradicação da mancha *mycosphaerella* causada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae* contribuindo com novos dados referentes aos produtos. Espera-se, avaliar estudos relacionados a marcadores bioquímicos em abelhas.

5 Objetivos

5.1 Geral

Desenvolver um método analítico usando a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa LCMSMS para detecção de contaminação de

abamectina e difenoconazol nas matrizes abelha, mel e morango e análises dos biomarcadores bioquímicos em abelhas, do município de Bom Repouso- MG.

5.2Específico

- i. Avaliar a concentração de resíduos de abamectina e difenoconazol em morangos;
- ii. Avaliar os efeitos da abamectina e difenoconazol em abelhas sem ferrão;
- iii. Avaliar o grau de estresse oxidativo causado pelos compostos estudados em diferentes modos de exposição (contato e ingestão), por meio de sistemas

6 Referência

AENDA. **Aenda - Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos**. Disponível em: <<https://www.aenda.org.br/>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

ANDRIGUETO, J. R. ET AAL. Produção Integrada de Frutas e Sistema Agropecuário de Produção Integrada no Brasil. v. 5350, n. 61, p. 1–24, 2008.

ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S. Impacto dos praguicidas na saúde: Estudo da cultura de tomante. **Revista de Saude Publica**, v. 34, n. 3, p. 309–313, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. **O DESEMPENHO DA INDÚSTRIA QUÍMICA EM 2017**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.abiquim.org.br/uploads/guias_estudos/desempenho_industria_quimica_2017.pdf>. Acesso em: 14 maio. 2019.

BARBOSA, P. H.; ABREU, D. E. **O AGRICULTOR FAMILIAR E O USO (IN)SEGURO DE AGROTÓXICOS NO MUNICÍPIO DE LAVRAS, MG; CAMPINAS 2014 UNICAMP**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2014.

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Inseticidas Registrados para a Cultura do Arroz e Análise de Parâmetros Indicadores de seu Comportamento no Ambiente. **Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 4 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular Técnica, 74)**, 2005.

BRAIBANTE, M. E. F. & ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. *Química Nova na escola*. V. 34, n 1, p. 10-15, 2012

BRASIL, 2006 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/15967/1/documentos58.pdf> (acessado em 20/10/2013).

BRASIL, Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/> . Acessado em: 15/06/2017.

BRASIL. 1989. Ministério do Meio-Ambiente (MMA). Informativo MMA. Disponível em: (acessado em 15/06/2014). BRASIL. 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n.4704, de 21 de fevereiro de 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/> . Acessado em 12/06/2017.

BRASIL. 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consulta Pública nº 12, de 13 de fevereiro de 2007. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acessado em 07/06/2017.

BRASIL. 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/> . Acessado em 07/006/2018.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Proíbe em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados que especifica. Diário Oficial da Repú.** Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mapa_gm/1985/prt0329_02_09_1985.html>. Acesso em: 15 mar. 2019.

BRASIL. **Presidência da República, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 25 ago. 2018.

BRASIL. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos.** Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

CAMPBELL, W. C. Invermectin and Abamectin. Springer-Verlag, 1989, 363p

CORREIA, A. M.; MARINHO, P. **Contextos e contornos da modernização agrícola em municípios do Baixo Jaguaribe-Ce: o espelho do (des)envolvimento e seus reflexos na saúde, trabalho e ambiente.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6135/tde-08112010-100604/publico/AlicePequeno.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

CASTRO, V. L. S. S. DE. Uso de Misturas de Agrotóxicos na Agricultura e Suas Implicações Toxicológicas na Saúde. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, p. 87–94, 2009.

DORES, E. F. G. DE C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27–36, fev. 2001.

EM, A. C. et al. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saude Publica**, v. 40, n. 2, p. 361–363, 2006.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção.** Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/#morango>>. Acesso em: 9 maio. 2017.

FADINI, M. A. M.; PALLINI, A.; VENZON, M. Controle de ácaros em sistema de produção integrada de morango. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1271–1277, ago. 2004.

FAO/WHO. **Understanding the codex Alimentarius. 30ª ed. Roma: FAO.** [s.l: s.n.].

FIRPO, M. et al. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora* Development model, pesticides, and health: a panorama of the Brazilian agricultural reality and proposals for an innovative research agenda. **Rev. bras. Saúde ocup**, v. 37, n. 125, p. 17–50, 2012.

IBAMA, 2014 - Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-deagrototoxicos/pagina-3>. Acessado em: agosto de 2015.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. DE A.; QUEIROZ, S. C. DO N. DE. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996–1012, 2009.

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

LINTELMANN, JATAYAMA, A. et al. ENDOCRINE DISRUPTORS IN THE ENVIRONMENT. **Pure Appl. Chem**, v. 75, n. 5, p. 1994–2001, 2003.

MADAIL, J. C. M.; PEREIRA, V. M.; SILVA, B. A. DA. Frutas como alimento e renda nos assentamentos daregião sul do RS. 2007.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009b.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51–64, 2011.

RIBEIRO, M. . et al. PESTICIDES : USE AND RISKS FOR THE ENVIRONMENT. n. June 2017, 2008.

US EPA, O. **Pesticides**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticides>>. Acesso em: 23 ago. 2017.

Capítulo 2: Desenvolvimento, validação e aplicação do método analítico para determinação de abamectina e difenoconazol em morango, abelha jataí e mel

1 Introdução

A utilização de agrotóxicos na produção agrícola e a consequente contaminação dos alimentos têm sido alvo de preocupação constante no âmbito da saúde pública, suscitando a necessidade de realização da avaliação toxicológica e do estabelecimento de parâmetros de segurança relativos à sua utilização.

Programas e ações de controle, cientificamente embasados e tecnicamente aplicáveis (CORREIA; MARINHO, 2010) consequentemente vem obtendo ainda mais destaque no cenário mundial.

Esse modelo de desenvolvimento vem gerando impactos sociais e ambientais de curto, médio e longo prazos, os quais são custeados por toda a população por meio de gastos públicos com recuperação de áreas contaminadas, prevenção, diagnóstico e tratamento de intoxicações agudas e crônicas. De acordo com estudo publicado pela Universidade de Oxford em 2013 o Brasil passa a ser considerado o maior consumidor mundial de agrotóxicos, seguido pelo Estados Unidos da América. Embora seja considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos, o Brasil segundo dados da Abquin a venda de agrotóxicos sofreu um declínio no ano de 2017, declínio causado em decorrência da crise econômica mundial que ocorreu no período. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2017; BARBOSA; ABREU, 2014).

A constatação do uso excessivo de agrotóxicos está diretamente relacionada à saúde pública, seja na função dos riscos à saúde humana, seja na contaminação do meio ambiente, e que são atualmente responsáveis pelo comércio de bilhões de dólares em todo o mundo.

A utilização destes compostos químicos, que por um lado gera benefícios, por outro, é responsável pela contaminação do solo, água e alimentos. A determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais é importante devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação (PRESTES et al., 2009a).

É de notório saber que o consumo desses resíduos são altamente maléficos ao corpo humano, refletindo em patologias gastrointestinais, dérmicas, hepáticas, re-

nais, neurológicas, alérgicas, bem como a redução da imunidade, alterações de humor, diabetes, hipotireoidismo, infertilidade, abortos, câncer, malformações fetais e até alteração do DNA.

O Brasil vem se destacando cada vez mais no cenário mundial na produção de alimentos, principalmente para exportação de frutas in natura. Este avanço na produção e produtividade está relacionado diretamente à introdução de novas variedades e ao aprimoramento dos sistemas de produção e como consequência tornando-os mais modernos.

Com o crescente uso de agrotóxicos na produção agrícola e a consequente presença de resíduos acima dos níveis autorizados nos alimentos. No ano de 2001 foi criada no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um programa denominado Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) visando monitorar a quantidade de resíduos de agrotóxicos encontrados em diversas culturas.

De acordo com o último relatório de atividades do PARA publicado em 2016 no balanço geral das 12.501 amostras de 25 alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira: abacaxi, abobrinha, alface, arroz, banana, batata, cebola, cenoura, feijão laranja, maçã, morango, pimentão, tomate, por exemplo, foram pesquisados até 232 agrotóxicos diferentes nas amostras monitoradas.

Neste contexto, o uso excessivo de agrotóxicos pode ocasionar impacto ambiental, contaminações e preocupações com o bem-estar dos consumidores que podem estar ingerindo alimentos contendo resíduos em concentrações superiores aos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos, com a saúde dos trabalhadores rurais, tanto pela exposição excessiva como pela falta de cuidados básicos, e com a exigência de certificação de qualidade dos alimentos para exportação que contribui para à expansão econômica nacional.

O LMR é definido como a quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos oficialmente aceita para a cultura, desde a sua produção até o consumo, expressa em partes de agrotóxicos por milhão de partes de alimento (mg kg^{-1}), sendo que, estes valores são fornecidos pelos órgãos reguladores nacionais ou internacionais.

No Brasil, a cultura do morangueiro destaca-se pela sua importância socioeconômica e ambiental nas regiões onde ela se desenvolve, pois emprega um

grande contingente de mão-de-obra e exige constante irrigação e rigoroso controle fitossanitário, com um grande impacto sobre o meio ambiente, a população consumidora ou não e os seres vivos que compartilham o mesmo ambiente da produção agrícola desse fruto ou aqueles para os quais os agrotóxicos foram lixiviados com o decorrer do tempo.

Neste contexto, a presença de uma diversidade de abelhas nas flores do morangueiro melhora a produtividade, a qualidade e até aumenta a durabilidade da fruta. Estudos demonstram que morangos polinizados por diferentes espécies desses insetos são mais pesados (possuem maior massa fresca), apresentam menos deformações, coloração vermelha mais intensa e atingem grades de classificação comercial mais elevadas. Eles também são mais firmes e apresentam maior tempo de prateleira.

Assim a apicultura é considerada uma atividade importante para o setor agropecuário em nível nacional. Além disso, é uma das atividades capazes de causar impactos positivos, tanto sociais quanto econômicos, e contribuir para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes (EMBRAPA, 2003).

O setor apícola une a capacidade geradora de riquezas relacionadas tanto ao aumento da produtividade agrícola quanto à manutenção e desenvolvimento das faunas e floras da biodiversidade nacional.

As abelhas são consideradas os principais agentes polinizadores dos vegetais, sendo a mesma responsável pela produção de muitas culturas por meio da polinização. A polinização consiste no transporte do grão de pólen para o estigma da flor ou com a transferência dos grãos de pólen na antera de uma flor para o estigma de outra flor de outra espécie ou da mesma espécie, e como recompensa os vegetais e as flores produzem substâncias adocicadas para as abelhas. O pólen é de extrema importância para as abelhas, pois é utilizado como fonte proteica na sua dieta (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007) .

O setor apícola vem desenvolvendo esforço de organização e aprimoramento técnico com vista ao aprimoramento da utilização racional de colmeias para fins de polinização de espécies arbóreas e de interesse agrícola, visando à compreensão das propriedades do mel nacional, da melhoria das técnicas de a melhoria da técnica de manejo, do fortalecimento da cadeia produtiva como um todo e da

comercialização nacional e internacional dos produtos derivados das abelhas (ABEMEL, 2015).

O mel é um produto natural amplamente utilizado para fins nutricionais e medicinais, por isso, necessita de uma análise segura que confirme sua origem, assim como leis que controlem e regularizem a produção, manipulação, esterilização e rotulagem AL-WAILI et. al 2012.

Ao longo dos anos a densidade populacional de muitos polinizadores está sendo reduzida a níveis que podem reprimir os serviços de polinização dos ecossistemas naturais e agrícolas e afetando a própria manutenção da capacidade reprodutiva de plantas silvestres (RICKETTS et al., 2008).

Várias causas podem ser responsáveis pelo declínio da população de polinizadores em áreas agrícolas, dentre essas possíveis causas tem-se o desmatamento de áreas com vegetação nativa para a implantação e/ou expansão de cidades (hiperurbanização) ou áreas agrícolas, e o inadequado uso de práticas de cultivo, dentre as quais se destaca a utilização abusiva de agrotóxicos, principalmente nas extensas áreas de monocultivo (AHMAD et al., 2006).

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais requer a utilização de métodos analíticos confiáveis, de forma a garantir a identificação e a quantificação destes resíduos.

Segundo VEKEY (2001), a cromatografia combinada com diferentes técnicas de detecção é um dos melhores e mais utilizados métodos analíticos, tendo em vista que combina as vantagens de alta seletividade e eficiência na separação cromatográfica, potencializada quando utilizada com a espectrometria de massas em série (MSMS), sendo as técnicas analíticas mais importantes na determinação de resíduos de agrotóxicos.

Neste âmbito, a análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel apícola é de extrema importância em termos de segurança e do equilíbrio ambiental. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a otimização e validação de um método multirresíduos de extração para abamectina e difenoconazol, com posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (LCMSMS).

O método proposto foi aplicado para análise de amostras de morango, abelha e de mel apícola do município de Bom Repouso- MG. Este estudo torna-se relevante

devido à existência de poucos trabalhos científicos sobre a extração simultânea de resíduos de abamectina e difenoconazol nas matrizes supracitadas. Além disso, este trabalho contribuirá para o desenvolvimento de método analítico validado empregando técnicas modernas de extração e determinação de resíduos de agrotóxicos e por LCMSMS. Por este motivo, monitorar as possíveis contaminações em amostras de alimentos tornou-se um assunto de extrema relevância, devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, além da persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação.

2 Material e método

2.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido com uma amostragem de campo baseada nas problemáticas reais que ocorrem no município de Bom Repouso, localizado no estado de Minas Gerais (MG), região do sudeste brasileiro. As especificações metodológicas adotadas e descritas são fundamentadas nas características locais e nas práticas agrícolas adotadas nessa região.

A cidade de Bom Repouso possui área total de 231 km² e está localizada no alto da serra da Mantiqueira (Brigante & Espíndola, 2003) pertencendo à bacia hidrográfica do Rio Grande, formada pelos afluentes mineiros, rio Mogi-Guaçu e Pardo. O município se localiza em uma região de montante de grande potencial hídrico cujo levantamento (Cunha, 2009) indica que o local abrange cerca de 1.000 nascentes, sendo que 759 foram catalogadas somente dentro do município. Dentre estas, a 1.594 m de altitude está a nascente do rio Mogi Guaçu, rio de grandes dimensões, de comprimento total de 473 km e área de drenagem total de 17.450 km². À margem esquerda estão seus efluentes: rio Espirado, rio Eleutério, rio do Peixe, Rio Cachoeirinha e rio das Antas, enquanto na margem direita destaca-se o rio Jaguari Mirim.

Além da riqueza hídrica característica desta região, o município apresenta contribuição agrícola ocupando importante posição nacional no cultivo de morangos, cuja produção representa 40% do montante comercializado nacionalmente (Brigante & Espíndola, 2003). Juntamente a intensa atividade agrícola está a ampla aplicação de defensivos associados à melhoria do potencial de produção agrícola. Neste local,

os agroquímicos mais utilizados são o acaricida a abamectina como ingrediente ativo, e o fungicida difenoconazol.

Nesse contexto, o local selecionado (Figura 4) foi utilizado como base para o estudo dos compostos devido ao seu amplo uso nas lavouras produtoras de morango e com a finalidade de se obter dados reais da sanidade das amostras coletadas de morango, abelhas e mel.

Figura 4: Mapa indicando a localização do município de Bom Repouso, MG (em destaque) e demais municípios adjacentes



Fonte: Espíndola & Brigante, 2009.

2.2 Instalação das colmeias

As abelhas utilizadas nesse projeto foram a *Tetragonisca angustula* –jataí, espécie de abelha indígena sem ferrão. Esta espécie apresenta comportamento dócil e é de condução relativamente fácil. Elas se adaptam facilmente à caixas racionais, que é uma caixa de madeira, estrutura artificial que fornece condição para

o crescimento da colmeia (Figura 5). Para a avaliação da contribuição do ambiente no mel e nas próprias abelhas, foram avaliados os produtos das colmeias de seis locais dentro da área do plantio de morango. Nas plantações, locais onde não pré existiam as caixas racionais com as colmeias de abelha jataí, as colmeias sadias inseridas nos locais foram adquiridas em meliponário isento dos agrotóxicos objetos de estudo. Anterior a instalação dessas colmeias foram retirados o excedente de mel e pólen, obrigando as abelhas a fazerem novas coletas. Apenas após seis meses de instalação é que se iniciaram as amostragens de mel e abelhas.

Figura 5: Caixa racional implantada no local do experimento



Fonte: Aatoria própria

As caixas racionais foram instaladas nos locais com a entrada voltada para o nascer do sol, instaladas de forma firme e estável, ao ar livre, sobre cavaletes ou suportes, protegidas da chuva com telhas de barro ou brasilite, seguindo as orientações de (FABICHAK, 2000).

2.3 Coleta das amostras

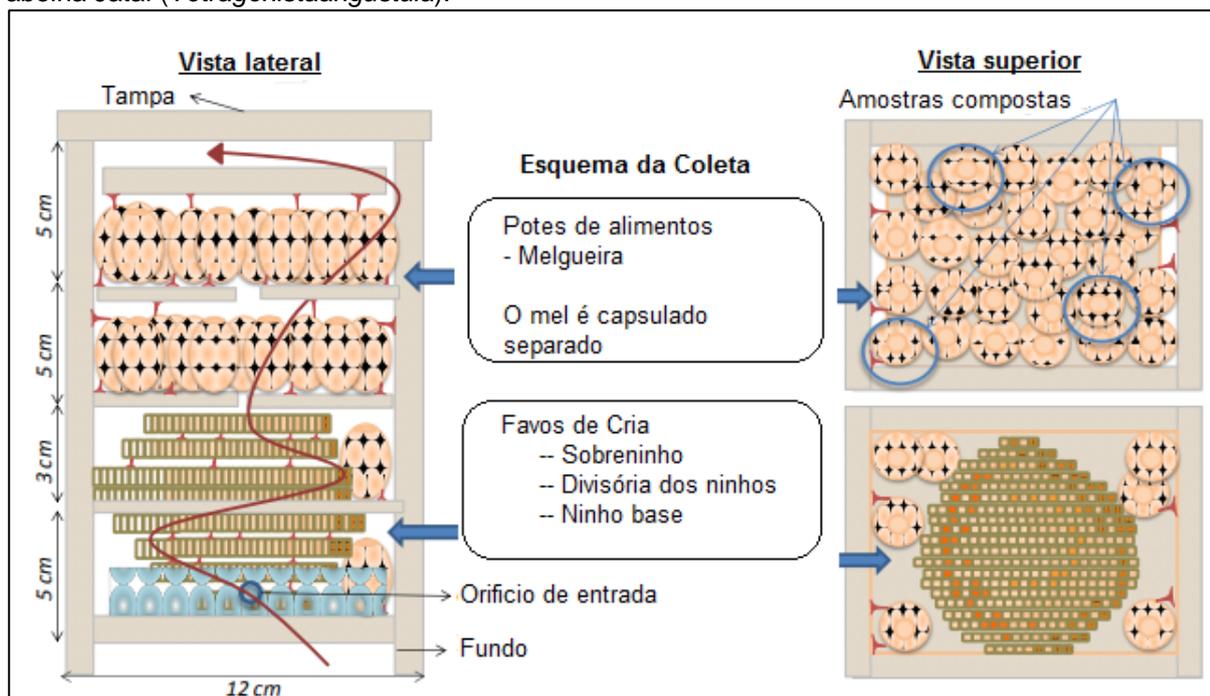
A coleta do mel e das abelhas foram feitas em dias relativamente quentes com temperatura em torno do 23°C, sem ventos fortes e sem chuva, buscando evitar que as colmeias ficassem expostas as variações climáticas que poderia ocasionar a ocorrência de doenças. Durante as amostragens foi avaliada a existência de vespas pilhadoras de mel, ou formigas que comumente atacam a colmeia. Em caso da presença de insetos e ácaros indesejáveis foram realizadas práticas naturais para combatê-los. O mel das abelhas sem ferrão é disposto de maneira diferente da *Apis*, ao invés da estrutura hexagonal, eles são armazenados em potes pequenos e individuais.

O mel é armazenado em diferentes potes o que facilita a coleta desses produtos. As primeiras coletas de mel foram realizadas com o auxílio de seringas descartáveis, mas foi observado que muito do mel ainda ficava dentro dos potes. o esquema de conjuntos de potes e a estrutura da colmeia estão representados na Figura 6 e Figura 5. Dessa forma, as coletas passaram a ser realizadas coletando-se o conjunto de potes, chamado de cachos. Os cachos com mel foram coletados de forma aleatória formando amostras compostas.

No campo, as amostras foram colocadas em tubos tipo falcon transparentes e identificados, reservando 50% do mel na colmeia, a fim de garantir a manutenção e o alimento das abelhas principalmente no período de inverno, as abelhas da espécie *Tetragonisca angustula* – jataí foram coletadas utilizando potes plásticos com diâmetro de 5 cm (Figura 7) conectados na entrada das colmeias. Em cada pote plástico foi coletado por volta de ± 10 abelhas, as amostras foram mantidas em caixa de isopor contendo gelo e levado ao Laboratório de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e a Ecossistemas Aquáticos – QAAMEA, da Universidade de São Paulo, campus São Carlos. No QAAMEA as amostras de mel coletadas foram retiradas dos potes e transferidas cuidadosamente para frascos plásticos previamente identificados, conservadas sobre refrigeração até o dia anterior a análise.

As amostras foram coletadas e armazenadas em tubos tipo falcon identificados. No laboratório, foram transferidas para frascos plásticos identificados e mantidas em freezer até o dia da análise.

Figura 6: Representação esquemática do designer da caixa empregada no presente estudo com a abelha Jataí (*Tetragonistaangustula*).



Fonte: (Modificada da Embrapa, site: <http://mel.cpatu.embrapa.br/criacoes/caixas>).

Figura 7: Sistema de coleta das abelhas Jataí (*Tetragonistaangustula*).



Fonte: A autoria própria

A coleta das amostras de morango foi de maneira a circular no mínimo 6 plantas representativas da área (rua de plantio), e foram excluídas aquelas que se encontram nas extremidades (bordadura). Foi coletado frutas de todas as suas partes (superior, mediana, inferior), inclusive as expostas e protegidas pelas folhagens. A quantidade a ser coletada foi determinada pela densidade de frutas na

planta, coletou-se mais frutas onde estava mais carregado, além de selecionar frutas grandes e pequenas, mas não tão pequenas ou danificadas que não possam ser comercializadas de acordo com a Figura 8.

Figura 8: Etapas da coleta das amostras de morango (A) coleta do fruto, (B) amostra composta, (C) retirada das sepalas e (D) acondicionamento das amostras para análises



Fonte: Autoria própria

3 Solventes, reagentes e padrões analíticos

Os reagentes e os solventes utilizados no preparo de amostra, preparo e nas análises cromatográficas foram grau HPLC, respectivamente. Acetonitrila, foi obtido da Tedia® (Ohio, USA), ácido fórmico com pureza de 98% foi adquirido da Sigma-Aldrich (Alemanha), sulfato de magnésio anidro da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), cloreto de sódio da Ecibra (São Paulo, Brasil) e PSA (40 μm) da Varian (California, USA), C18 (50 μm) da J. T. Baker (USA). A água ultrapura foi obtida no sistema Milli-

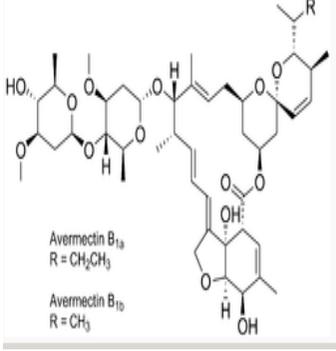
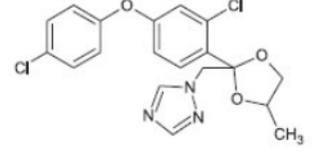
Q Plus system da Millipore (Massachusetts, USA) com 18,2 MΩcm de resistividade e foi usada para preparar todas as soluções e as fase móvel.

Os agrotóxicos empregados neste trabalho foram selecionados por constarem nas listas dos órgãos reguladores nacionais e/ou internacionais e apresentarem valores de LMR definidos para cultura do morango. Ainda como critério, foi utilizado as classes químicas diferentes como: avermectina, e triazol, sendo essas a utilizadas no em larga escala no município de Bom Repouso MG.

Os agrotóxicos selecionados foram adquiridos da Sigma-Aldrich todos com pureza maior que 99%.

Na Figura 9 encontram-se as características físico-químicas como, coeficiente de partição (K_{ow}), estrutura molecular, grupo químico, classe, classificação toxicológica e LMR dos agrotóxicos estudados neste trabalho. Os valores de LMR estabelecidos pelas agências reguladoras, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), CODEX Alimentarius e União Européia (EU), apresentam grandes diversidades de valores, assim como também não há concordância entre os agrotóxicos que são ou não autorizados para utilizar em morango.

Figura 9: Características físico-químicas e LMR dos agrotóxicos empregados na cultura do morango.

Agrotóxicos (KOW)	Estrutura Molecular	Fórmula	Grupo Químico	Classe	Classificação Toxicológica	Número de CAS	Anvisa ^a (mg kg ⁻¹)	Codex ^b (mg kg ⁻¹)	EU ^c (mg kg ⁻¹)	IDA ^d (mg kg ⁻¹ p.c)
(1) Abamectina (4,4)	 <p>Avermectin B_{1a} R = CH₂CH₃ Avermectin B_{1b} R = CH₃</p>	B1a: C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄ B1b: C ₄₈ H ₇₀ O ₁₄	Avermectina	Acaricida Inseticida Nematicida	I	71751-41-2	0,02	0,02	0,1	0,002
(2) Difenoconazol (4,2)		C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	Triazol	Fungicida	I	119446-68-3	0,5	----	0,4	0,6

Fonte: (a) Anvisa, 2011; (b) CODEX ALIMENTARIUS; (c) Limites de Resíduos permitidos pela União Européia; (d) Índice Diário Aceitável; (e) I – extremamente tóxico

Os valores de LMR foram utilizados para estabelecer os valores das concentrações a serem estudados neste trabalho, sendo que, o objetivo primordial é atingir valores inferiores aos LMR estabelecidos.

3.1 Preparo das soluções padrão

A solução estoque individuais de cada agrotóxico foi preparada em acetonitrila na concentração de 1 mg L⁻¹ diluídas em ACN:H₂O (50:50 v/v), neste preparo foi considerado a pureza analítica de cada agrotóxico analisado. A partir da solução estoque, foram realizadas diluições adequadas para preparar as soluções de trabalho. Soluções estoques individuais foram preparados pela solubilização dos analitos em acetonitrila.

Objetivando reduzir o manuseio das soluções estoques individuais, as soluções intermediárias individuais foram preparadas nas concentrações: de 0,01; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 mg L⁻¹ em acetonitrila.

Estas soluções consistiram em uma mistura de todos os agrotóxicos em acetonitrila e foram utilizadas na fortificação dos brancos da amostra para obtenção dos parâmetros analíticos de validação. As soluções foram estocadas em freezer a -18 °C, sendo que as soluções estoque foram armazenadas por até três meses e as soluções de trabalho foram preparadas semanalmente.

3.2 Preparo de amostra para extração de resíduos de agrotóxicos em alimentos

Devido às baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$ e ng kg^{-1}) em que os contaminantes são encontrados no ambiente é imprescindível que sejam desenvolvidos métodos de preparo de amostras que possam isolar e concentrar os analitos.

O monitoramento de resíduos de agrotóxicos é feito empregando uma técnica de preparo de amostra, visando a extração dos analitos e o clean-up dos interferentes, associado a uma técnica de determinação dos agrotóxicos que engloba separação, identificação e quantificação dos analitos, e caso necessário, confirmação do resultado para uma análise mais segura, sendo a cromatografia líquida (Liquid Chromatography - LC) e a cromatografia gasosa (Gas Chromatography - GC).

- GC) as mais utilizadas nas análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos (Cajka et. al., 2008).

No desenvolvimento de um método analítico de análises de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, uma etapa que deve ter uma atenção maior é o preparo de amostra, uma vez que analisa matrizes complexas contendo analitos com propriedades físico-químicas diversificadas e em concentrações baixas, que são algumas das adversidades a serem superadas, além disso, compreendem etapas laboriosas, que demandam tempo, são de custo elevado e geram grandes quantidades de resíduos tóxicos (Prestes, Friggi, Adaime, & Zanella, 2009).

A análise de resíduos de agrotóxicos teve início na década de 60, com determinações de organoclorados. Na década de 70 foram introduzidas mudanças no método para ampliar o intervalo de polaridade dos compostos analisados, que se estenderam para os organofosforados e nitrogenados; e nas décadas posteriores, começaram a surgir preocupações com a utilização dos solventes clorados e com a quantidade de resíduos gerados na etapa de extração, exigindo mudanças nas técnicas de preparo de amostra. (Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher, & Schenck, 2003).

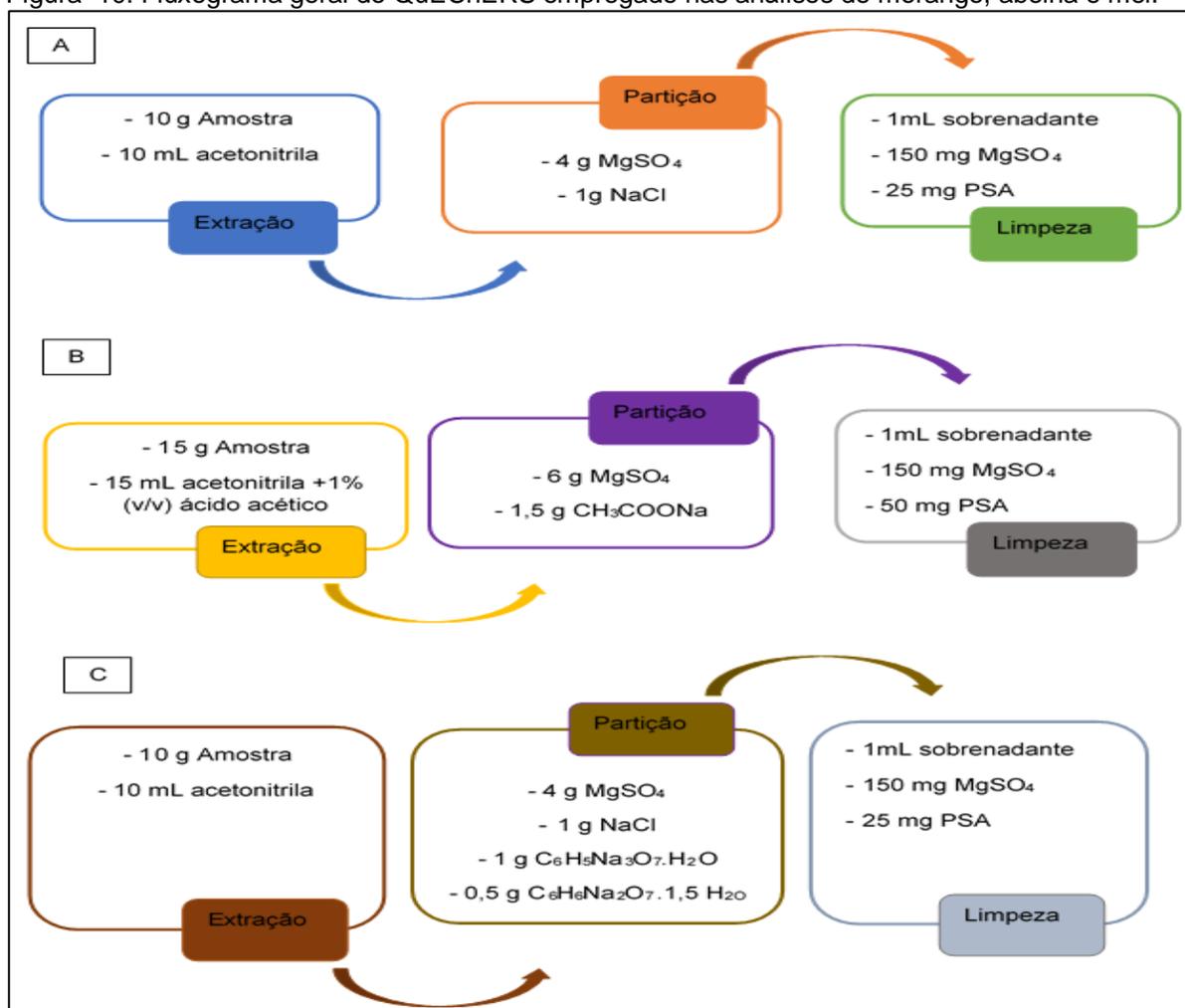
Embora seja descrito na literatura a existência de várias técnicas de preparo de amostras para alimentos, é imprescindível que o analista deva levar em consideração parâmetros que visa a garantir a integridade física e química do material coletado, e que possa optar por uma técnica de extração que proporcione um número e classes de agrotóxicos, limites de quantificação que devem ser atingidos e composição da amostra a ser analisada. O preparo de amostra apresenta vantagens e desvantagens que vão depender de: volume de solvente, extração de coextrativos, uso de solventes não clorados, quantidade de amostra, extração específica ou seletiva, processamento manual ou automatizado.

4 Aplicação do método QuEChERS na determinação de agrotóxicos em morango, abelha e mel

O desenvolvimento do método de preparo de amostra é uma das etapas mais importantes e trabalhoso na determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Para selecionar o método de preparo de amostra foram testadas as três versões: (A) Original, (B) acetato e (C) citrato.

Para avaliação dos métodos foram utilizadas concentrações dos agrotóxicos de 0,01; à 1,0 mg L⁻¹, que foram adicionadas em amostras de morango, abelha e mel segundo o procedimento geral mostrado na Figura 10.

Figura 10: Fluxograma geral do QuEChERS empregado nas análises de morango, abelha e mel.



Fonte: Adaptado de Prestes, 2011

A versão do método QuEChERS mais adequada e com as devidas modificações foi selecionada para extração de multirresíduos de agrotóxicos em morango, abelha e mel e empregada nos experimentos posteriores. A fortificação dos brancos das amostras, com os padrões analíticos, foi feita no início da primeira etapa experimental.

5 Condições cromatográficas utilizadas em cromatógrafo a líquido acoplado em um detector com arranjo de diodos (LCDAD)

As condições cromatográficas para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos foram predefinidas utilizando um cromatógrafo à líquido Agilent série 1200, equipado com coluna Zorbax Eclipse Plus-C18 (4,6 x 100 mm; 3,5 μ m). O sistema é composto por um injetor automático, bomba quaternária, sistema degaseificador, detector UV-Vis com arranjo de diodos e software ChemStation (ver. B.03.01) para aquisição e processamento dos dados.

A fase móvel consistiu em água purificada (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico, utilizando o gradiente de eluição conforme Tabela 1. Como fase móvel, utilizou-se água purificada contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila mais 0,1% ácido fórmico (B), conforme o gradiente utilizado na Tabela 1, com um volume de amostra injetado de 1 mL⁻¹.

Tabela 1: Gradiente de eluição da fase móvel utilizado na análise cromatográfica dos agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel no sistema LCDAD.

Tempo (min)	A (H₂O + 0,1 % Ac. Fórmico) (%)	B (ACN + 0,1 % Ac. Fórmico) (%)
0	30	70
3,0	35	65
5,0	40	60
8,0	45	55
12,0	60	40
15,0	65	35
15,1	70	30
20,0	80	20
30,0	100	0

Fonte: Autoria própria

A vazão utilizada no método foi de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 μ L e temperatura do forno de 25°C. A seleção dos comprimentos de onda foi feita por

meio da análise de amostras individuais, na concentração de 1 mg L⁻¹, a varredura foi feita entre 200 e 300 nm e os comprimentos de onda monitorados variaram conforme a máxima absorvância dos analitos (Tabela 2).

Tabela 2: Comprimentos de onda selecionados para análise dos compostos estudados

Padrões Analíticos	Comprimento de onda (nm)	
Abamectina	245	Fonte: Auto ria
Difenoconazol	230	

própria

6 Desenvolvimento do método de extração para a análise de resíduos de agrotóxicos em morango, abelha e mel

Os métodos de preparo de amostra propostos neste trabalho foram desenvolvidos com base em trabalhos da literatura para determinação multirresíduos de agrotóxicos em alimentos: QuEChERS original (ANASTASSIADES et al., 2003), QuEChERS acetato (LEHOTAY et al., 2005), QuEChERS citrato (ANASTASSIADES et al., 2007).

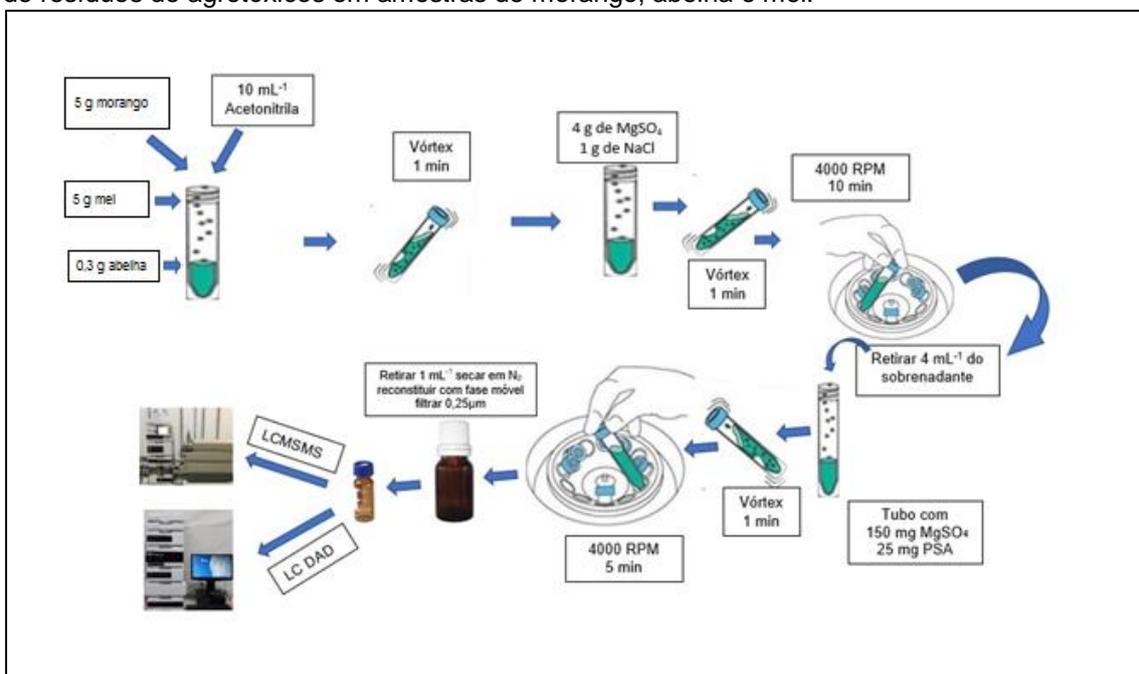
Devido às dificuldades de quantificação dos analitos em estudo em amostras ambientais, é imprescindível que seja desenvolvido um método de preparo de amostras que possa isolar e concentrar os analitos. Assim, neste trabalho foram feitas modificações no método QuEChERS original, proposto por ANASTASSIADES et al. (2003).

Para garantir a eficiência da extração algumas modificações destes métodos foram realizadas, devido às características das amostras em estudo. Visando uma melhor homogeneidade uma quantidade menor de amostra foi utilizada e para as amostras de mel foi adicionado água. Esta etapa é comumente utilizada para matrizes que apresentam baixo teor de água (MASTOVSKA et al., 2010).

Desta forma, as (Figura 11, Figura 12 e Figura 13) apresentam os testes preliminares que tiveram por objetivo encontrar as melhores condições de extração dos compostos em estudo. Os ensaios foram realizados em triplicata de fortificações, na concentração de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Destes, o teste com melhores resultados foi avaliado quanto à recuperação, exatidão, precisão em diferentes concentrações para a validação do método com suas devidas modificações.

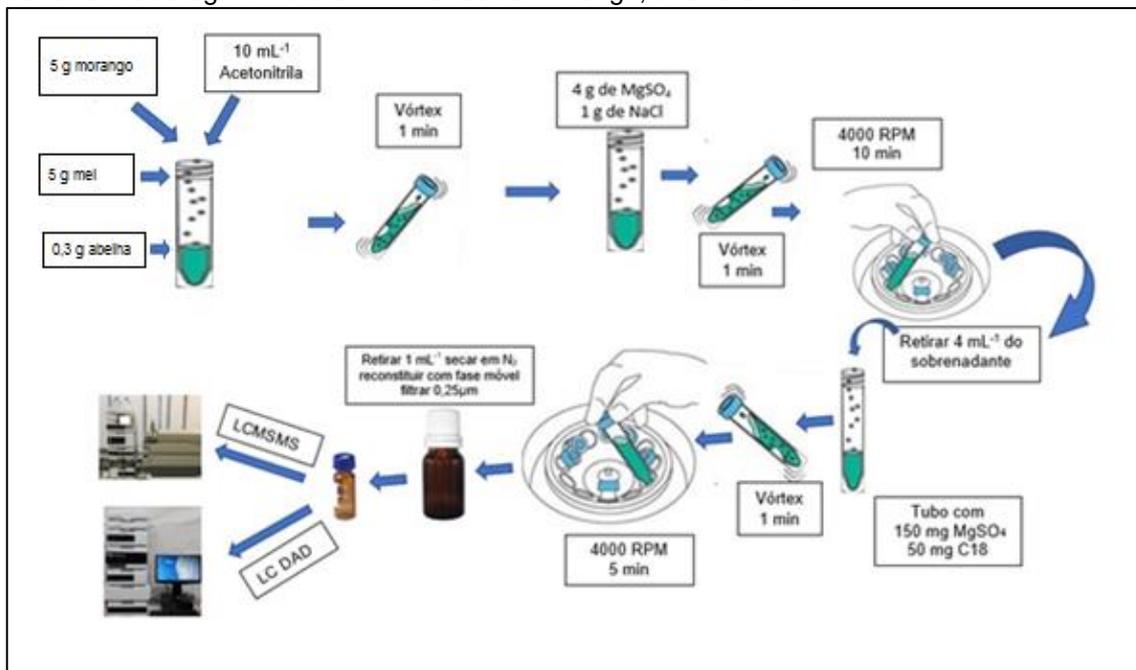
Os ensaios foram novamente realizados em triplicata de fortificações, nas concentrações de $0,01$; $0,5$ e $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$.

Figura 11: Representação esquemática do ensaio 1 (método QuEChERS modificado) para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel.



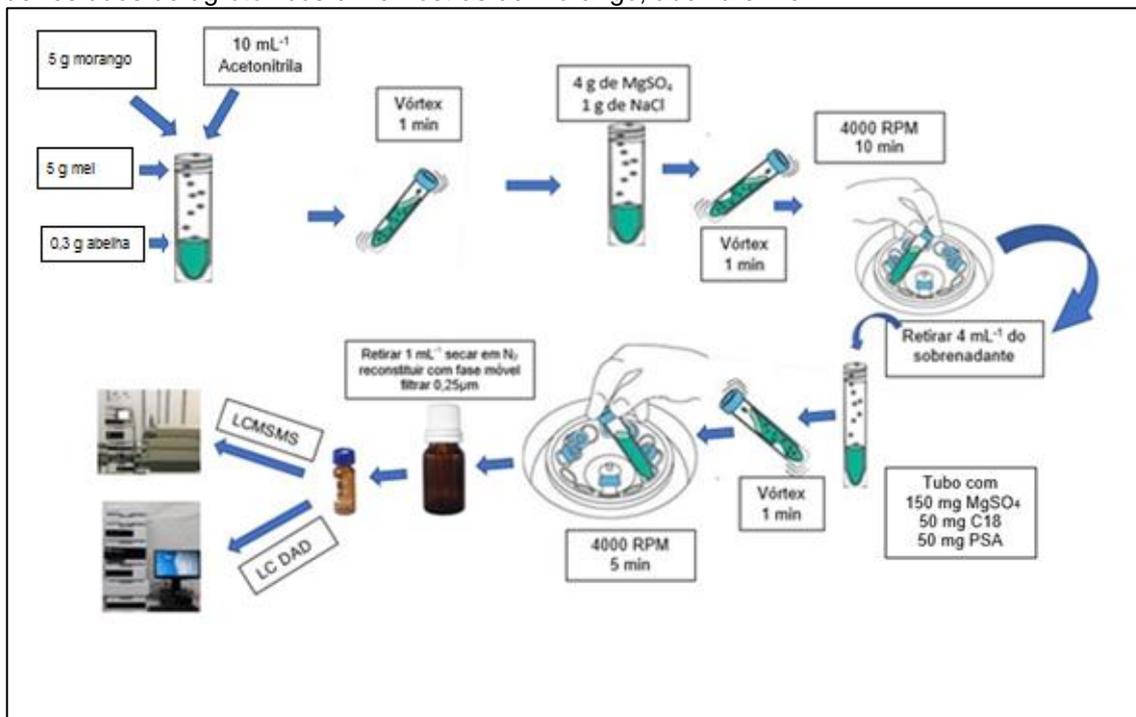
Fonte: Autoria própria

Figura 12: Representação esquemática do ensaio 2 (método QuEChERS modificado) para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel.



Fonte: Autoria própria

Figura 13: Representação esquemática do ensaio 3 (método QuEChERS modificado) para análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel.



Fonte: Autoria própria

Em um segundo momento, a etapa de limpeza do extrato foi avaliada. Após a extração utilizando o método QuEChERS modificado, os extratos foram submetidos a etapa de limpeza, avaliando-se diferentes peso do sorventes, conforme Tabela 3. Os testes de 1 a 10 foram avaliados em termo de recuperação dos compostos em estudo. Os ensaios foram realizados em triplicata de fortificações, na concentração de 1,0 mg L⁻¹. Todos os testes foram realizados nas matrizes morango, abelha e mel.

Para avaliar a capacidade de limpeza e concentração do método QuEChERS foram coletadas amostras de morango, abelha e mel do município de Bom Repouso MG. Este município foi escolhido devido a sua importância na produção de morango a nível estadual e nacional. Quanto ao uso do solo 280 ha são utilizados para a produção de morango (Andrade e Brandão, 2013).

As amostras foram coletadas e armazenadas em caixas térmicas contendo gelo permanecendo por cerca de 24 h, após foram retiradas da caixa térmica e permanecendo em temperatura ambiente até o momento da aplicação do método de extração. Este método consistiu na adição de 5,00 g de amostra de morango, 5,00 g de amostra de mel e 0,3 g de amostra de abelha jatai pesados diretamente em tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL⁻¹ e com tampa rosqueada a 10,00 mL⁻¹ de acetonitrila (ACN), os quais foram agitados durante 1 minuto em vórtex (extração). Posteriormente, foram adicionados 4,00 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) e 1,00 g de cloreto de sódio (NaCl), sendo agitados em vórtex por 1 minuto e levados à centrifugação durante 15 minutos a 4000 rotações por minuto (rpm) (partição).

Após o período de centrifugação, 4,00 mL⁻¹ do sobrenadante foram transferidos para tubo de polipropileno com capacidade de 15 mL, contendo 150 mg de MgSO₄, 25 mg de fase PSA, levado a agitação por 1 minuto, seguido de centrifugação durante 5 minutos a 4000 rpm (clean-up). Do sobrenadante, aproximadamente 4,00 mL, foram retiradas alíquotas de 1,00 mL e estas foram secas em fluxo de nitrogênio (Figura3). Em seguida as amostras foram ressuspensas em solução de ACN, em 1,00 mL⁻¹ (concentração da amostra), sendo então filtradas em filtro de celulose regenerada (RC 25 mm 0,45 µm) e procedendo a análise em LCMSMS.

Tabela 3: Relação dos testes realizados para análise de remoção dos coextrativos para 4 mL de extrato

Ensaio	MgSO ₄ (mg)	C18 (mg)	PSA (mg)	Fonte: Autoria própria
1	150	25	-	7 Validação do método
2	150	25	25	
3	150	-	-	
4	150	-	25	
5	150	25	50	
6	150	50	25	
7	150	50	-	
8	150	-	100	
9	150	100	100	
10	150	100	-	

Para garantir que um método analítico é capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis ele deve ser submetido a uma série de estudos experimentais denominados validação. As agências reguladoras do Brasil e de outros países têm estabelecido documentos oficiais que contêm as diretrizes a serem adotadas no processo de validação que possibilitem a obtenção, de forma clara e objetiva, de evidências de que um método analítico é adequado para o uso desejado. As variáveis utilizadas na validação de métodos são conhecidas como parâmetros analíticos de validação e algumas vezes como figuras analíticas de mérito. São elas: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Considerando a necessidade de validação do método analítico para análise de multirresíduos de agrotóxicos em amostras de alimentos por LCMSMS, os parâmetros analíticos de validação ou figuras de mérito considerados mais importantes e usuais propostos nos guias das agências reguladoras internacionais, como seletividade, limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão e exatidão (recuperação).

As formas de obtenção e os critérios de aceitação foram baseados, principalmente, no guia Sanco por ser bem elaborado e direcionado para estas análises.

7.1 Seletividade

A seletividade representa a capacidade do método em discriminar entre o analito e as substâncias análogas como, metabólitos, isômeros, componentes da matriz e entre outros, que são considerados interferentes da amostra. O termo seletividade pode ser confundido com especificidade, sendo que o método seletivo analisa um grupo de compostos com uma característica em comum, com distinção entre eles, enquanto a especificidade é a capacidade de diferenciar um único analito de todos os componentes na amostra.

7.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor concentração do analito na matriz, na qual ocorre uma identificação positiva e não quantitativa, que pode ser atingida sob condições experimentais estabelecidas. A determinação do limite de detecção como, do método baseado nos parâmetros da equação da reta da curva analítica, das medidas de dispersão dos brancos da amostra ou da razão sinal/ruído 3:1.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito na matriz que pode ser quantificada sob condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado da mesma forma que o limite de detecção, porém com razão sinal/ruído 10:1.

7.3 Linearidade

A linearidade é obtida pela resposta do sinal do detector em função da concentração do analito, sendo que, a faixa linear é definida como o intervalo no qual a sensibilidade pode ser considerada constante ou a resposta do detector é diretamente proporcional à concentração.

As curvas analíticas utilizadas para a quantificação dos analitos foram preparadas em amostras de morango, abelhas e mel, por meio da fortificação com os analitos antes da extração. As concentrações dos analitos variaram de 0,01 à 1,0 mg L⁻¹, totalizando cinco níveis de concentração. Para cada nível de concentração da curva foi preparado em triplicata.

7.4 Precisão e exatidão

A precisão descreve o grau de concordância ou dispersão entre os resultados obtidos de uma mesma amostra em condições definidas. A precisão foi avaliada em termos de repetitividade ou repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão intradia do método foi determinada em três níveis de concentração: baixo (0,01 mg L⁻¹), médio (0,5 mg L⁻¹) e alto (1,0 mg L⁻¹). Cinco réplicas foram feitas para cada nível, e os resultados foram expressos como estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV).

O desvio padrão e o CV foram obtidos utilizando-se das equações 1 e 2, respectivamente.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Equação 1}$$

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

X_i = valor individual

\bar{X} = média aritmética

n = número de medições

s = estimativa do desvio padrão

A exatidão do método comparação com os resultados obtidos por outro métodos analíticos de referência e pelo parâmetro da recuperação, que pode ser estimado pela comparação entre as intensidades dos sinais analíticos em amostras adicionadas de soluções de padrões, também conhecida como fortificação ou "spiking", antes e após o preparo da amostra ou pode ser realizado pela

determinação da concentração da amostra fortificada antes do preparo de amostra pela equação da reta construída com o extrato final da amostra também foi calculada em três níveis de concentração (0,2 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹).

A recuperação pode ser calculada utilizando-se a Equação 3.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{área (fortificação branco da matris)}}{\text{área (fortificação extrato final)}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

7.5 Efeito matriz (EM) e recuperação do método (RM)

O EM pode ser avaliado pela razão da resposta analítica do extrato final da amostra, que foi fortificado com a solução dos agrotóxicos, pela solução dos padrões em solvente, na mesma concentração. O EM pode ser calculado pela Equação 4.

$$EM (\%) = \frac{\text{área (fortificação extrato final)}}{\text{área (padrão em solvente)}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

A recuperação foi calculada utilizando-se a Equação 5.

$$R (\%) = \frac{\text{área (fortificação branco da matris)}}{\text{área (fortificação extrato final)}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

8 Resultados e discussão

8.1 Determinação das condições cromatográficas empregado por LCMSMS para determinação de difenoconazol e abamectina em morango, abelha jataí e mel

As condições cromatográficas pré-estabelecidas no LCUVDAD foram utilizadas como base para a definição do método e com os parâmetros do detector otimizados foram verificadas novamente as transições de quantificação e confirmação, que são recomendadas na análise de multirresíduos, para garantir uma determinação analítica mais segura.

Para melhorar a sensibilidade e a seletividade do método analítico, foram ajustadas as condições cromatográficas já estabelecidas para o seu uso em um cromatógrafo à líquido acoplado à um detector de espectrometria de massas (LCMSMS). Para isto, foi utilizado um cromatógrafo Agilent 1200 equipado com bomba quaternária, amostrador automático de alta eficiência e detector de diodo Agilent 1260 acoplado com espectrômetro de massas 3200 QTRAP - SCIEX (Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer) com fonte de ionização por eletrospray (ESI).

Utilizou-se também a coluna Nucleodur 100-5 μ m C8ec (250 x 4,6mm) da Macherey-Nagel. Foi usada uma vazão constante de 1 mL min⁻¹, um volume de injeção de 20 μ L e se manteve a coluna a uma temperatura de 20 °C. A fase móvel consistiu em água purificada (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico, utilizando o gradiente de eluição conforme Tabela 4:

Tabela 4: Gradiente de eluição da fase móvel utilizado na análise cromatográfica dos agrotóxicos (difenoconazol e abamectina) em amostras de morango, mel e abelha jataí no sistema LCMSMS.

Tempo (min)	A (H ₂ O + 0,1 % Ac. Fórmico) (%)	B (ACN + 0,1 % Ac. Fórmico) (%)
0	60	40
0,5	60	40
8,0	0	100
12,0	0	100
12,5	60	40
18,0	60	40

Fonte: Autoria própria

A detecção por espectrometria de massas foi feita por meio do experimento de varredura de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) baseado nas condições

utilizadas por Kiljanek et al (2016), utilizando o analisador íon *trap* linear. Para isto, realizou-se previamente a otimização das condições de ionização e parâmetros da fonte para os analitos. As condições de análise para cada agrotóxico foram otimizadas individualmente no espectrômetro de massas via infusão direta, usando soluções de 1000 µg kg⁻¹ em acetonitrila:água (1:1, v/v) contendo 0,1 % de ácido fórmico. A ionização foi obtida por meio de uma fonte de Turbo Ion Spray (*electrospray* - ESI) operada no modo positivo. Os parâmetros de operação do espectrômetro de massas são apresentados na Tabela 5e os parâmetros de ionização dos analitos na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de operação do espectrômetro de massas para análise dos agrotóxicos (difenoconazol e abamectina) em morango, abelha jataí e mel no modo positivo.

Parâmetro	Valor
<i>CurtainGas</i> (CUR)	15 psi
Gás 1 (gás nebulizador)	50 psi
Gás 2 (gás aquecedor)	50 psi
<i>IonSpray</i>	5500 V
Fragmentação Ativada por Colisão (CAD)	Médio
Temperatura	700 °C
<i>Interface Heater</i>	ON

Fonte: Autoria própria

Tabela 6: Parâmetros de ionização dos agrotóxicos (difenoconazol e abamectina) estudados em morango, abelha jataí e mel no modo positivo

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

Dwell time=Tempo de residência; DP=Potencial de orifício; EP=Potencial de entrada; CEP=Potencial de entrada na cela de colisão; CE=Energia de colisão; CXP=potencial de saída da cela de colisão.

Fonte: Autoria própria

A Figura 14 apresenta um cromatograma obtido por LCUVDAD a partir da injeção direta dos padrões analíticos de difenoconazol e abamectina na concentração de 1,0 mg L⁻¹.

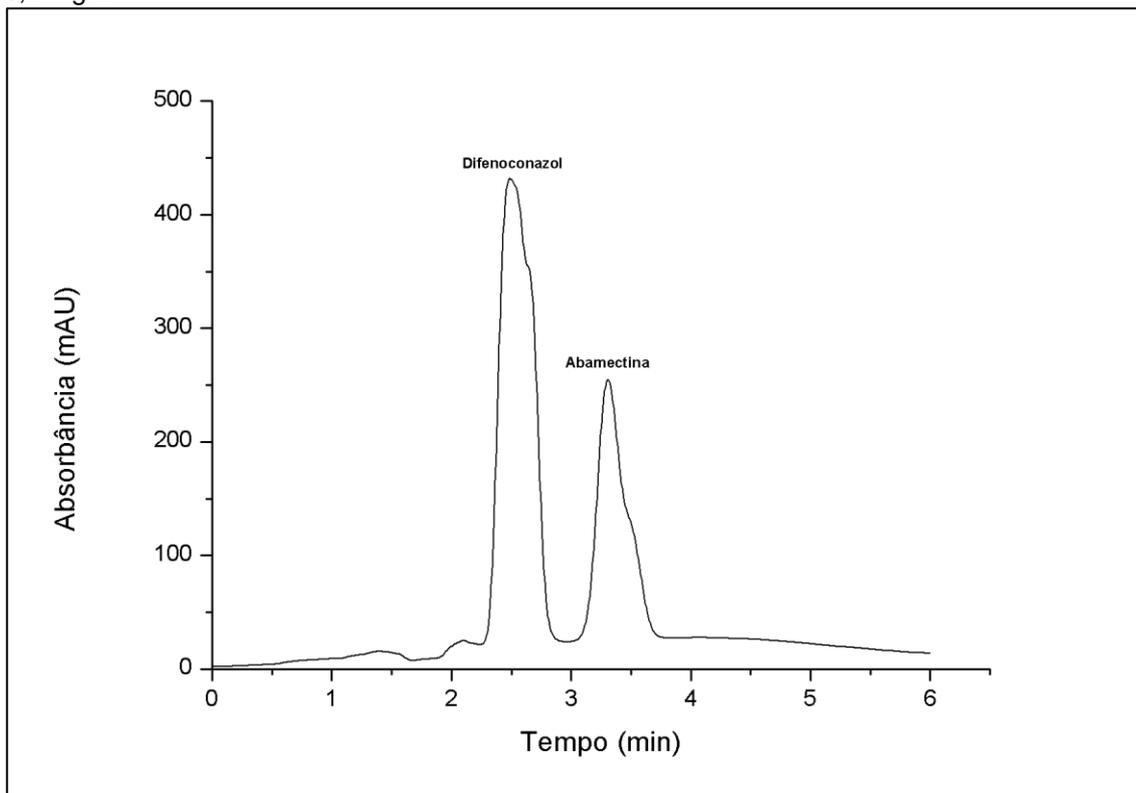
O desenvolvimento do método de análise por LC-MS/MS foi feito por meio da otimização dos parâmetros da fonte de íons por análise em fluxo (FIA) e a otimização das condições da cromatografia líquida. Assim, foram feitas análises preliminares por meio de infusão direta de soluções individuais de 1 mg L⁻¹ em acetonitrila:água (1:1, v/v) contendo 0,1 % de ácido fórmico em um sistema LC-ESI-QTRAP/MS com ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI +). A infusão direta permitiu observar uma resposta imediata do sinal enquanto são feitas mudanças nos parâmetros de massas e, por conseguinte possibilita a otimização da ionização e fragmentação do analito. Desta forma foi possível determinar a fragmentação ativada por colisão (CAD), o potencial de orifício (DP), o potencial de entrada (EP), o potencial de saída da cela de colisão (CXP) e a energia de colisão (CE).

Por outro lado, as condições de ionização do analito são melhoradas na análise de infusão em fluxo (FIA), pelo que a maior quantidade possível de moléculas do analito são convertidas para a forma ionizada. Nesta etapa foi possível otimizar os parâmetros do gás de cortina (CUR), o gás nebulizador (Gás 1), o gás aquecedor (Gás 2), a temperatura do *heater* e o potencial do *spray* de íons (*IonSpray*).

Por fim, se obtiveram os espectros *full scan* no primeiro quadrupolo (Q1) dos íons precursores dos analitos e os *productionscan* no terceiro quadrupolo (Q3) dos principais produtos. Os espectros de íons fragmentos da abamectina e difenoconazol são apresentadas nas Figura 15 e a Figura 16 e na Figura 17 os íons totais.

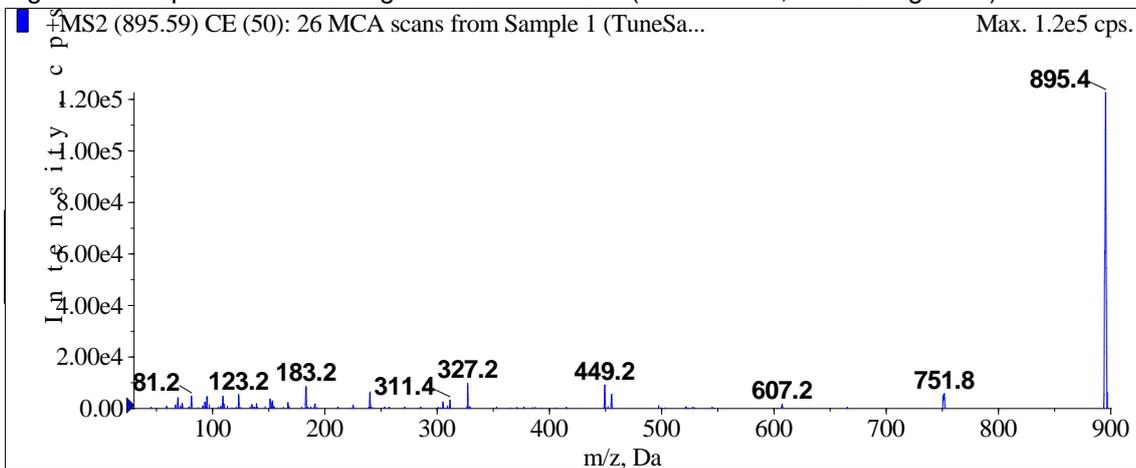
A quantificação dos analitos foi feita no modo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) baseado nas condições utilizadas por Kiljanek et. al (2016), onde foram selecionadas três transições mais abundantes para cada agrotóxico, tomando a mais intensa como a quantificadora e a segunda como a qualificadora para confirmação. A abamectina foi detectada como *m/z* 895 ([M+Na]⁺), mas o íon *m/z* 873 não foi detectado. Assim que foi feita ionização da abamectina com 5 mM de formiato de amônio e observou-se o *m/z* 890 ([M+NH₄]⁺) mais intenso, porém como os demais compostos foram detectados utilizando ácido fórmico, decidiu-se continuar com o ácido fórmico. Na Tabela 4 foram apresentados os parâmetros de operação do espectrômetro de massas e na Tabela 5 foram apresentados os parâmetros de ionização dos analitos.

Figura 14: Cromatograma dos padrões analíticos de difenoconazol e abamectina na concentração de 0,2 mg L⁻¹.



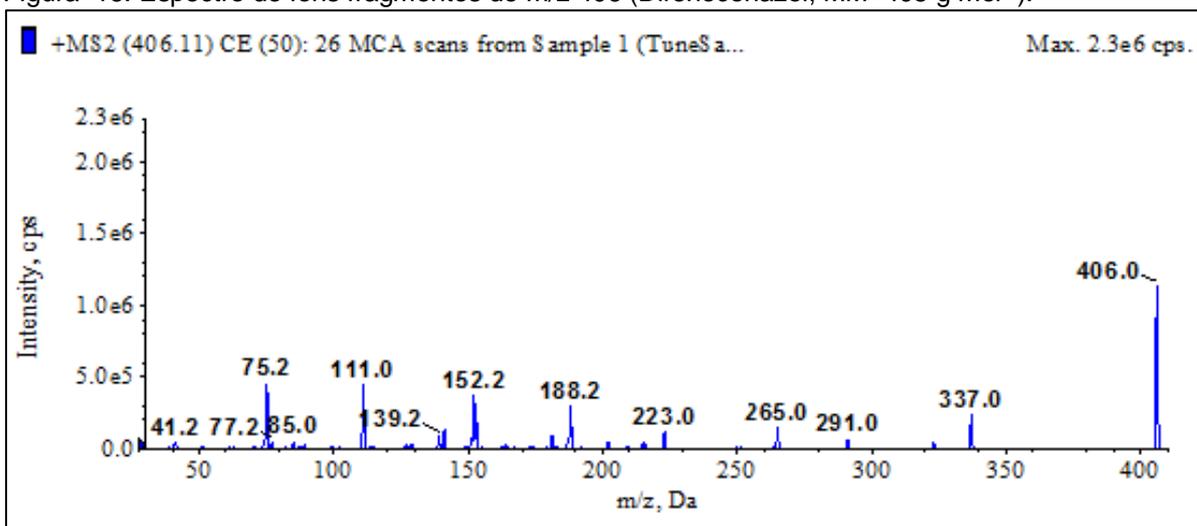
Fonte: Autoria própria

Figura 15: Espectro de íons fragmentos de m/z 895 (Abamectina, MM=872 g mol⁻¹).



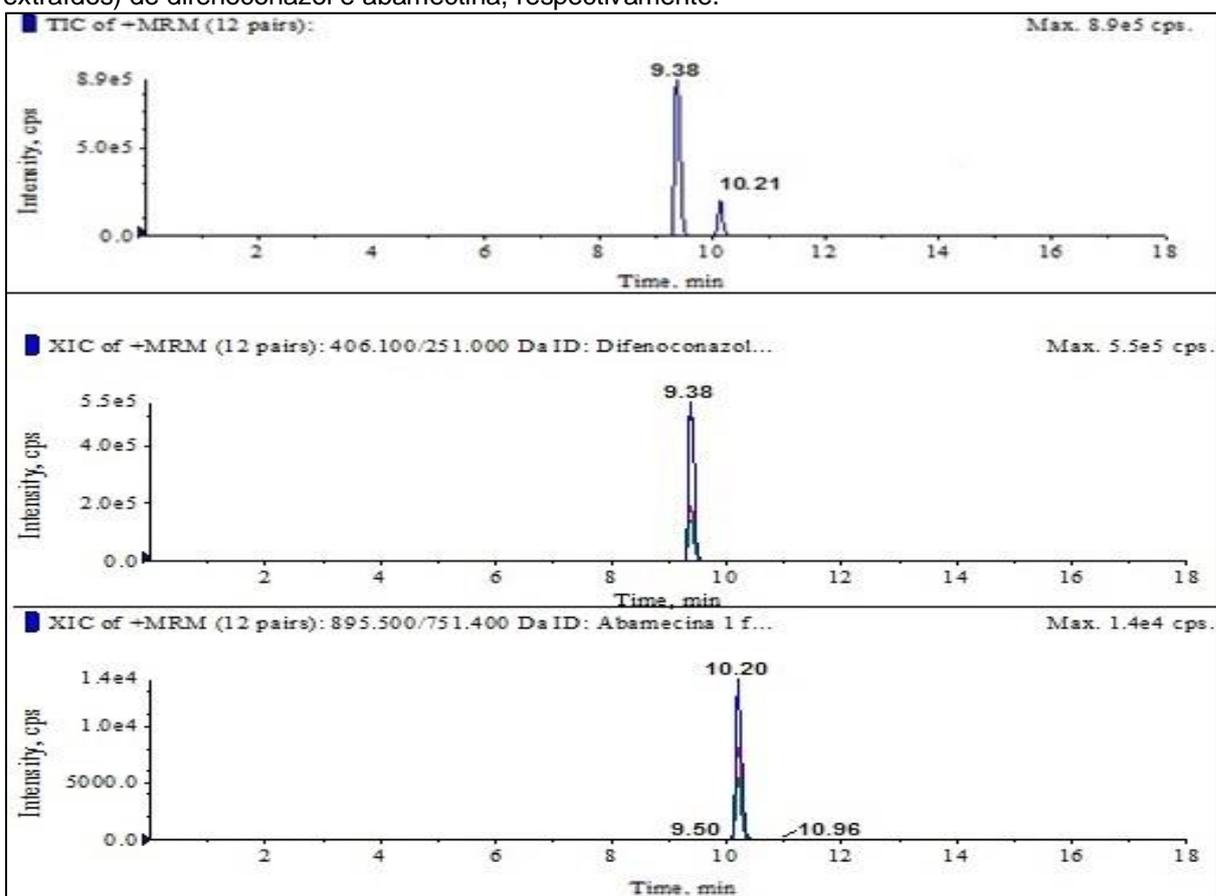
Fonte: Autoria própria

Figura 16: Espectro de íons fragmentos de m/z 406 (Difenoconazol, MM=405 g mol⁻¹).



Fonte: Autorias própria

Figura 17: TIC (cromatograma de íons totais) da solução 1,0 mg L⁻¹, XIC (cromatograma de íons extraídos) de difenoconazol e abamectina, respectivamente.



Fonte: Autoria própria

Devido à elevada seletividade do espectrômetro de massas é possível identificar os agrotóxicos sem necessidade de separá-los completamente, pois os

analitos podem coeluírem sem causar problemas de interferência no modo de aquisição MRM, em que se consegue identificar individualmente os analitos, em canais isolados, mesmo que não tenham sido separados totalmente. No entanto, a separação dos picos dos analitos aumenta a detectabilidade no analisador Triplo Quadrupolo, conseqüentemente quanto menor o número de analitos nas janelas de aquisição do detector, maior será a área obtida, conseqüentemente, melhor a detectabilidade do método analítico desenvolvido.

Como o objetivo de buscar as melhores condições de separação cromatográfica e a obtenção de um método confiável de análise e que alcançasse os LMR de cada agrotóxico, na ordem de mg kg^{-1} , para não se ter perda significativa na detectabilidade e para obter o número mínimo de pontos recomendados para cada pico cromatográfico em função do tempo de aquisição (dwell time) para o monitoramento de cada transição.

9 Validação do método

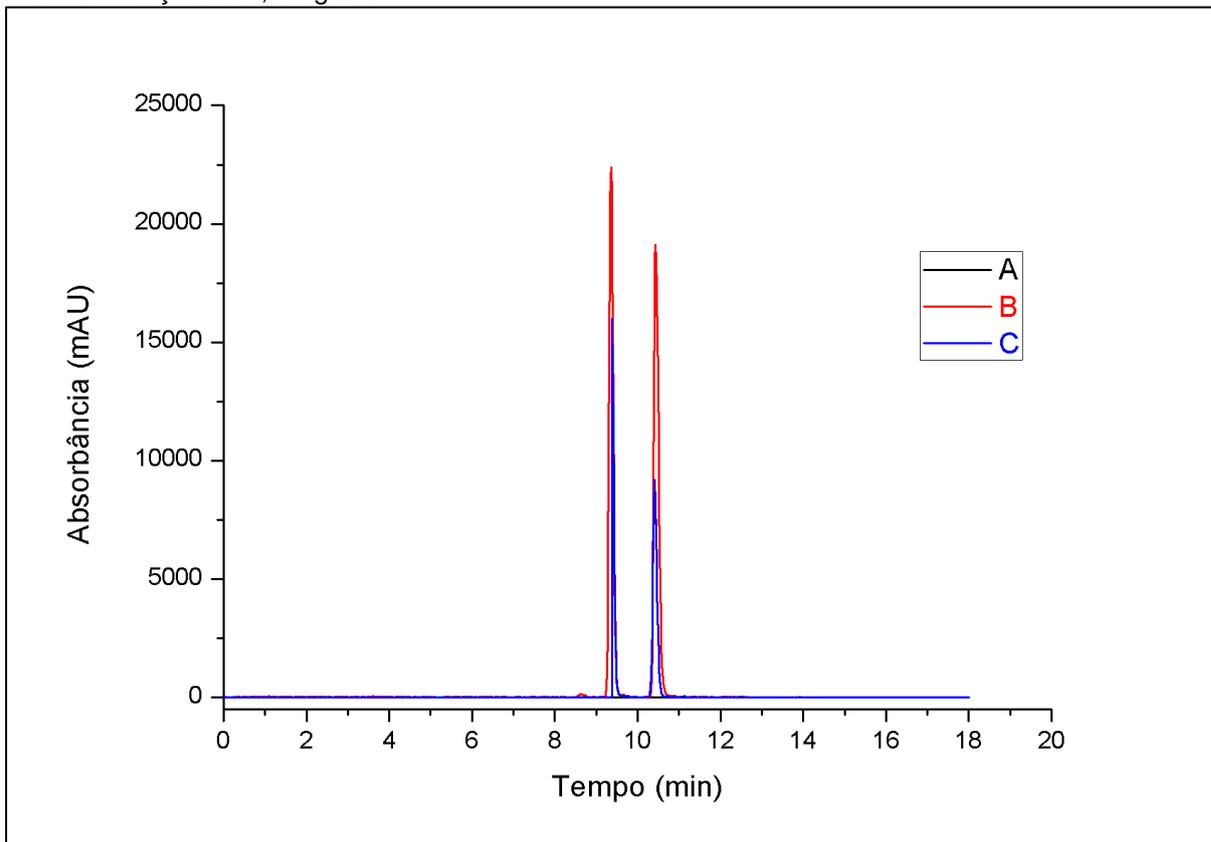
9.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas obtidos por injeção do extrato de amostra “branco” e extrato de amostra fortificada no sistema cromatográfico. Esta avaliação tem por objetivo verificar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo. No caso das matrizes em estudo, foi possível encontrar amostras isentas de agrotóxicos, não sendo necessário descontar a área dos analitos presentes nas amostras “branco”.

O método desenvolvido é seletivo visto que foi possível quantificar os analitos claramente na presença de outros componentes presentes na matriz. Nenhum pico interferente sobrepôs-se ou coeluiu-se com os compostos de interesse, como apresentado no cromatograma de íons totais obtidos por LCMSMS, da amostra “branco” de morango, padrão analítico e solução analítica no extrato do matriz morango na concentração de 1 mg L^{-1} (Figura 18), da amostra “branco” de abelha jataí, padrão analítico e solução analítica no extrato do matriz abelha jataí na concentração de 1 mg L^{-1} , (Figura 19) e da amostra “branco” de mel, padrão

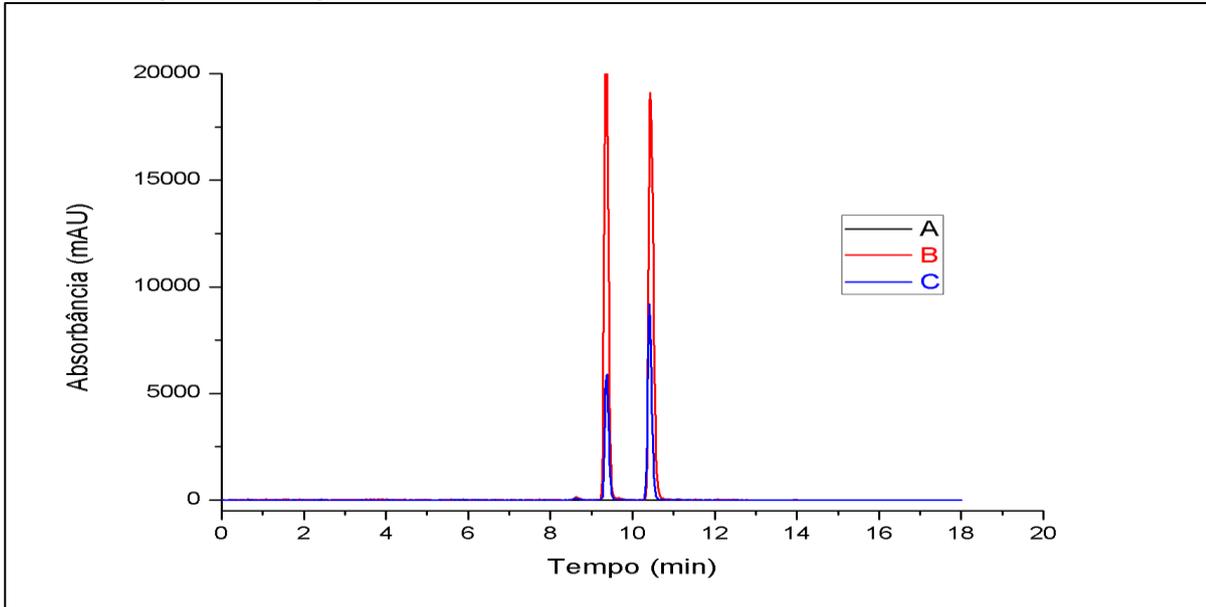
analítico e solução analítica no extrato do matriz mel na concentração de 1 mg L^{-1} , figura 17.

Figura 18: Cromatograma do íon total obtido por LCMSMS para amostra branco de morango (A), padrão analítico (B) e solução analítica no extrato da matriz (C), contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.



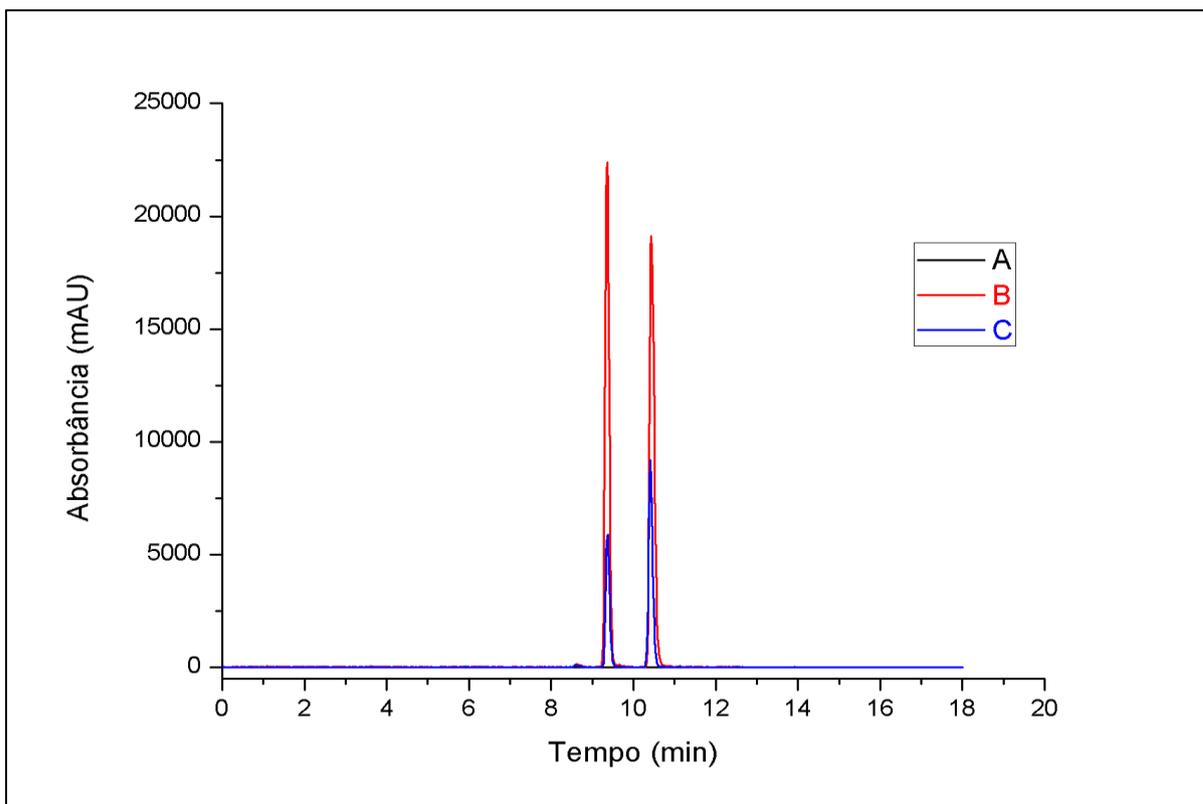
Fonte: Autoria própria

Figura 19: Cromatograma do íon total obtido por LCMSMS para amostra branco de abelha Jataí (A), padrão analítico (B) e solução analítica no extrato da matriz (C), contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de 1,0 mg L⁻¹.



Fonte: Autoria própria

Figura 20: Cromatograma do íon total obtido por LCMSMS para amostra branco de mel (A), padrão analítico (B) e solução analítica no extrato da matriz (C), contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de 1,0 mg L⁻¹.



Fonte: Autoria própria

9.2 Linearidade

As curvas analíticas foram construídas para verificar a linearidade do método desenvolvido. Os dados referentes ao intervalo linear, coeficiente de determinação e equação de regressão linear para os agrotóxicos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros relativos às curvas analíticas obtidas para os analitos em estudo

Analitos	Intervalo Linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	r ²
Abamectina (Abelha)	0,01 à 1,0	Y= 533,6x -339,75	0,9997
Difenoconazol (Abelha)	0,01 à 1,0	Y= 533,6x -339,75	0,9997
Abamectina (Mel)	0,01 à 1,0	Y= 554,8x - 168,07	0,9979
Difenoconazol (Mel)	0,01 à 1,0	Y= 533,3x -209,05	0,9979
Abamectina (Morango)	0,01 à 1,0	Y= 86,9x - 125,46	0,9956
Difenoconazol (Morango)	0,01 à 1,0	Y= 570,9x -290,43	0,9989

Fonte: Autoria própria

Conforme observado na Tabela 7, os coeficientes de determinação (r^2) obtidos são maiores que 0,99, o que mostra que, o modelo é linear no intervalo que varia de 0,01 à 1,0 mg L⁻¹ para todos os analitos.

9.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Neste estudo para as matrizes morango, abelha e mel a faixa de limite de detecção (LD) foi de 0,005 mg L⁻¹, enquanto o limite de quantificação (LQ) foi de 0,0025 mg L⁻¹. Estes valores são considerados satisfatórios, pois com os limites de quantificação alcançados, consegue-se atingir aos valores máximos permitidos (LMR) para os agrotóxicos morango, estabelecidos pela legislação brasileira, embora não tenhamos registro de LMR para as matrizes mel e abelhas, foram considerados os LMR de outros órgãos, principalmente SANCO, para verificar a concentração estabelecida pelo método desenvolvido estava abaixo destes valores.

9.3 Efeito matriz

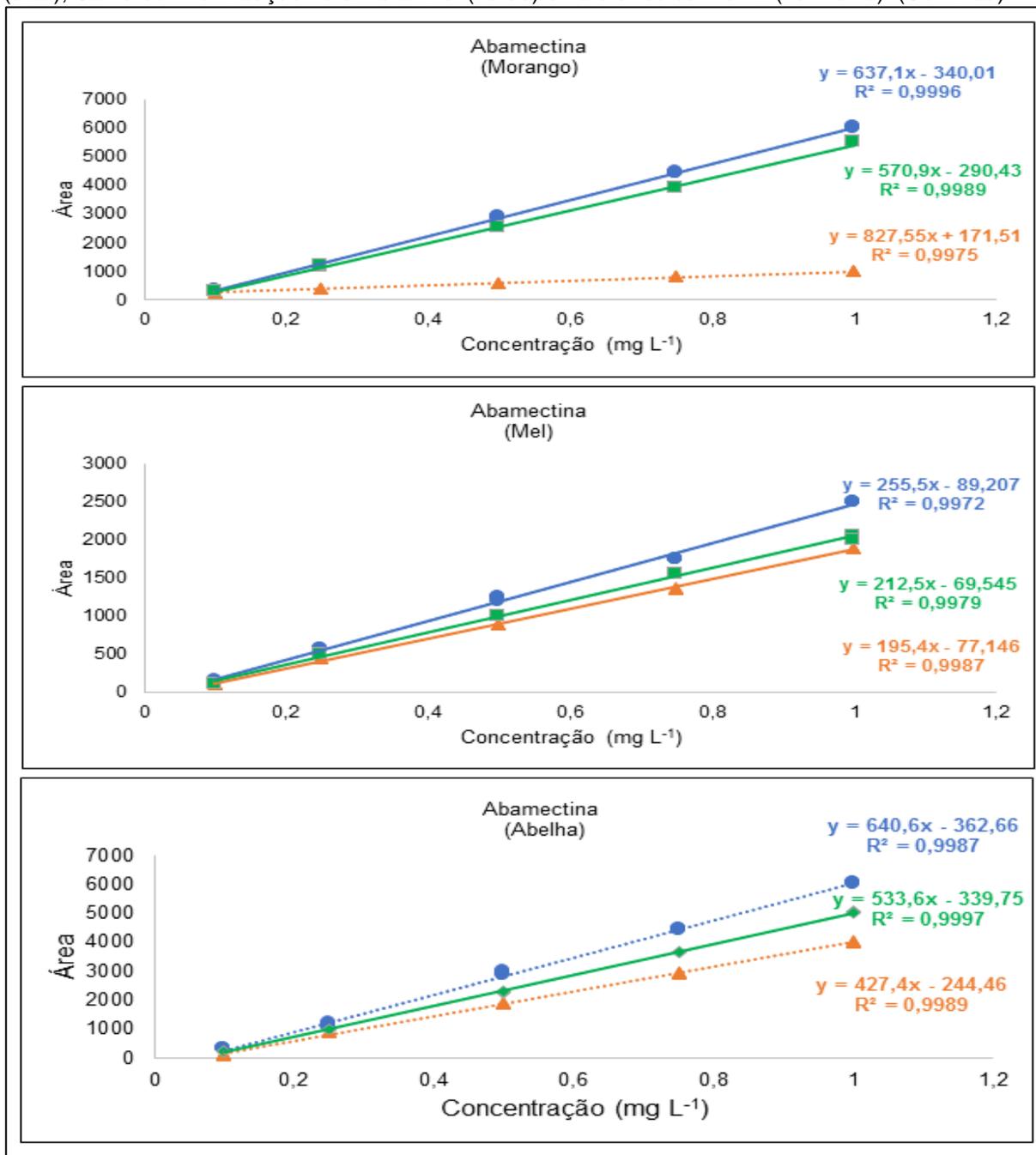
O preparo da curva analítica foi realizado pela avaliação da presença ou ausência do efeito matriz (EM). O EM é gerado pelas interações entre analito e coextrativos da matriz. Esta seleção fundamentou-se na análise da sensibilidade do método ou inclinação da curva analítica obtida em padrão analítico e fortificação dos agrotóxicos nas matrizes, no extrato final (depois do preparo de amostra). Pela Figura 18 pode-se analisar os comportamentos dos agrotóxicos em amostras de morango, abelha e mel.

Verificou-se comportamentos distintos dos agrotóxicos selecionados que são aplicados na cultura do morango e conseqüentemente causa a contaminação das abelhas, que ao visitarem as flores do morangueiro coletando pólen contaminado e levando para as colmeias e assim contaminando o mel produzidos por estes insetos.

Os agrotóxicos essencialmente não apresentaram efeito matriz, pois todas as curvas analíticas tiveram comportamentos semelhantes. Imprescindível evidenciar que, a ausência de efeito matriz pode ser comprovada pela equação do efeito matriz (Equação 4), com a determinação da sobreposição total das curvas, aquilo que é muito difícil de ocorrer ou uma porcentagem de EM, de aproximadamente 100%. por meio.

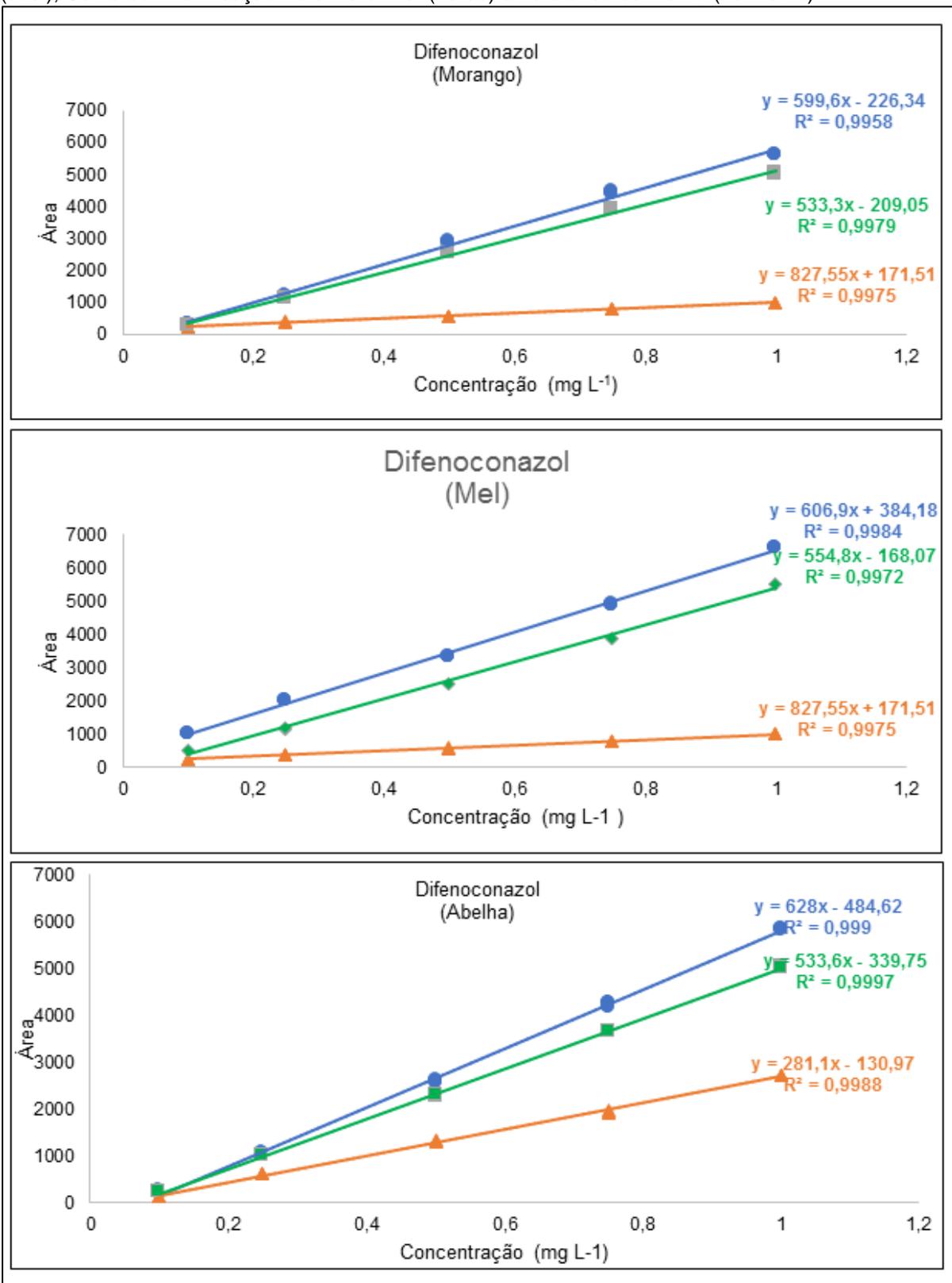
As características físico-químicas dos agrotóxicos e do sistema de determinação analítica, que engloba a separação cromatográfica e os efeitos no detector por espectrometria de massas, podendo suprimir ou aumentar a ionização do analito na fonte de ionização, resultando em um menor ou maior sinal medido o que afeta a exatidão do resultado quantitativo. Para garantir um comportamento mais semelhante possível entre a curva e as amostras analisadas deve-se construir a curva na matriz, e assim, optou-se pela curva com fortificação no extrato do morango, abelha e no mel.

Figura 21: Curva analítica dos agrotóxicos determinados por LC-MS/MS: Curva em padrão analítico (azul), Curva com fortificação no extrato final (verde) e no branco da matriz (vermelho). (Continua).



Fonte: Autoria própria

Figura 21: Curva analítica dos agrotóxicos determinados por LC-MS/MS: Curva em padrão analítico (azul), Curva com fortificação no extrato final (verde) e no branco da matriz (vermelho).



Fonte: Autoria própria

Figura 22: Gráfico de resíduos versus a concentração dos analitos estudados. (Continua)

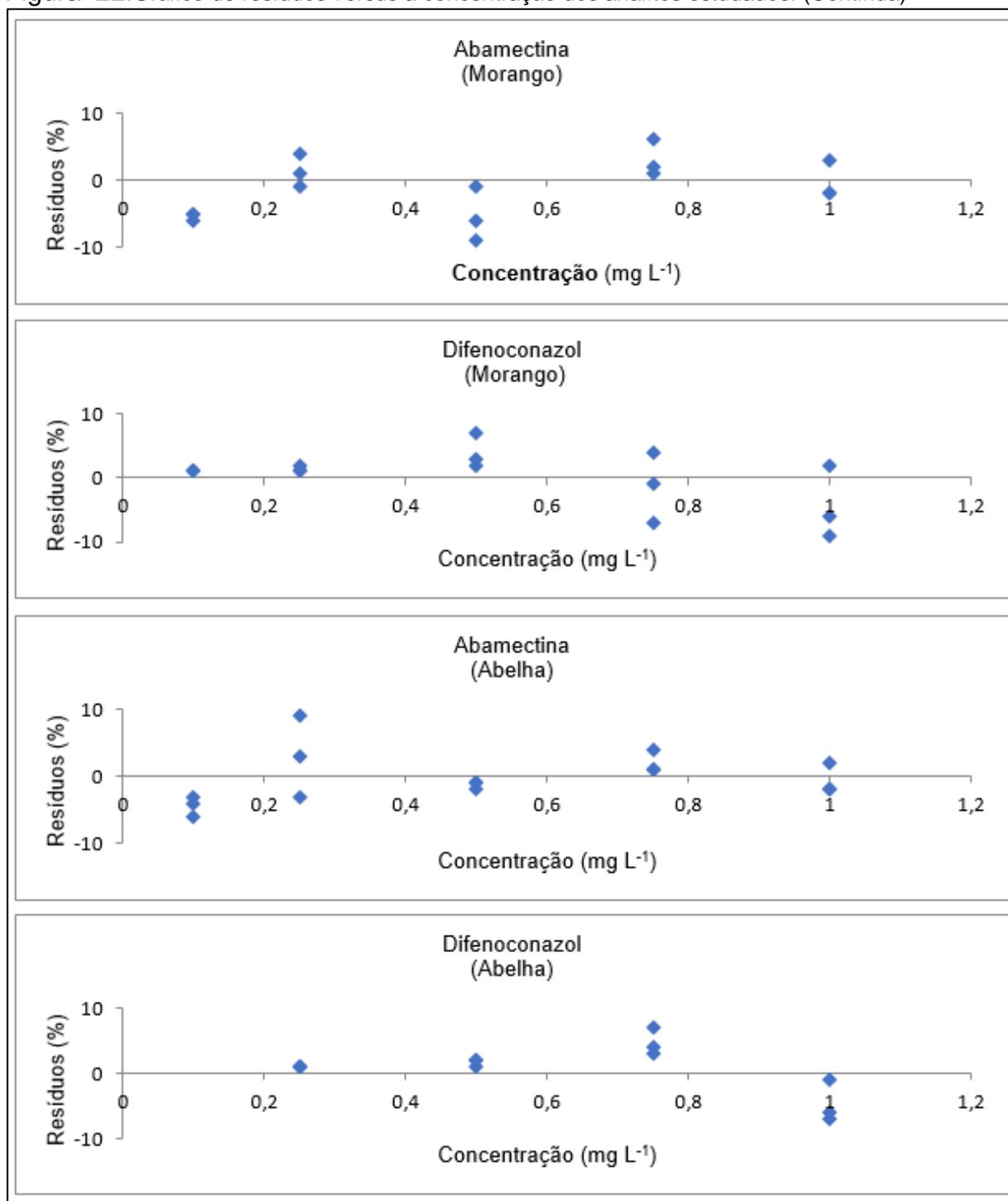
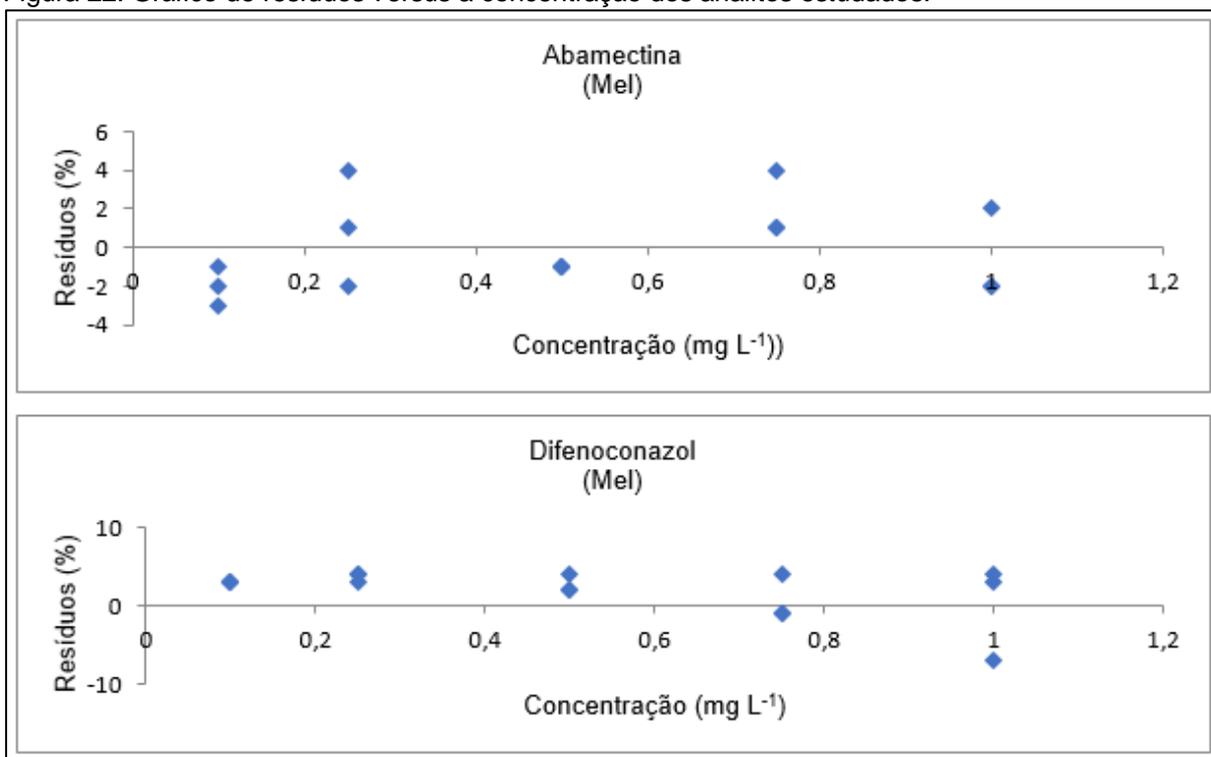


Figura 22: Gráfico de resíduos versus a concentração dos analitos estudados.



Fonte: Autoria própria

As curvas analíticas para os agrotóxicos abamectina e difenoconazol apresentaram, por meio da regressão linear, valores de coeficiente de correlação (r) $> 0,99$ e valores de resíduos $< \pm 20\%$. Portanto, a homocedasticidade dos dados foi confirmada na avaliação dos resíduos, além disso é evidenciado na figura 15 que os resíduos são distribuídos de forma aleatória ao redor do eixo x, o que demonstra mais uma vez que o modelo é linear intervalo $0,01 - 1 \text{ mg L}^{-1}$ para todos os analitos

9.5 Recuperação

Os parâmetros de recuperação dos analitos foram avaliados através da injeção de três níveis de concentração $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 1 mg L^{-1} em três repetições. A Tabela 8 apresenta os resultados das recuperações (%) para os agrotóxicos que foram fortificados em morango, abelha e mel, e extraídos pelo método QuEChERS modificado.

Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se as curvas analíticas preparadas no extrato, no padrão analítico e no "branco" das matrizes. Neste trabalho seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, no

qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120%, com RSD \leq 20% (SANTE, 2015).

O efeito matriz sempre sofre variações ao longo do tempo e varia dependendo da condição do instrumento utilizado, devendo, por isso, ser constantemente avaliado, tanto na etapa de desenvolvimento do método quanto na aplicação deste método nas análises de rotina (PRESTES, 2007).

Tabela 8: Percentuais de recuperação dos agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado, para as matrizes morango, abelha e mel.

Análitos	RA (%)		
	Método QuEChERS Original modificado	Método QuEChERS Acetado	Método QuEChERS Citrato
Abamectina (abelha)	90,1	60,2	60,2
Difenoconazol (abelha)	93,5	71,5	71,5
Abamectina (mel)	89,7	50,5	50,5
Difenoconazol (mel)	98,2	61,2	61,2
Abamectina (morango)	90,3	55,1	55,1
Difenoconazol (morango)	105,9	73,4	73,4

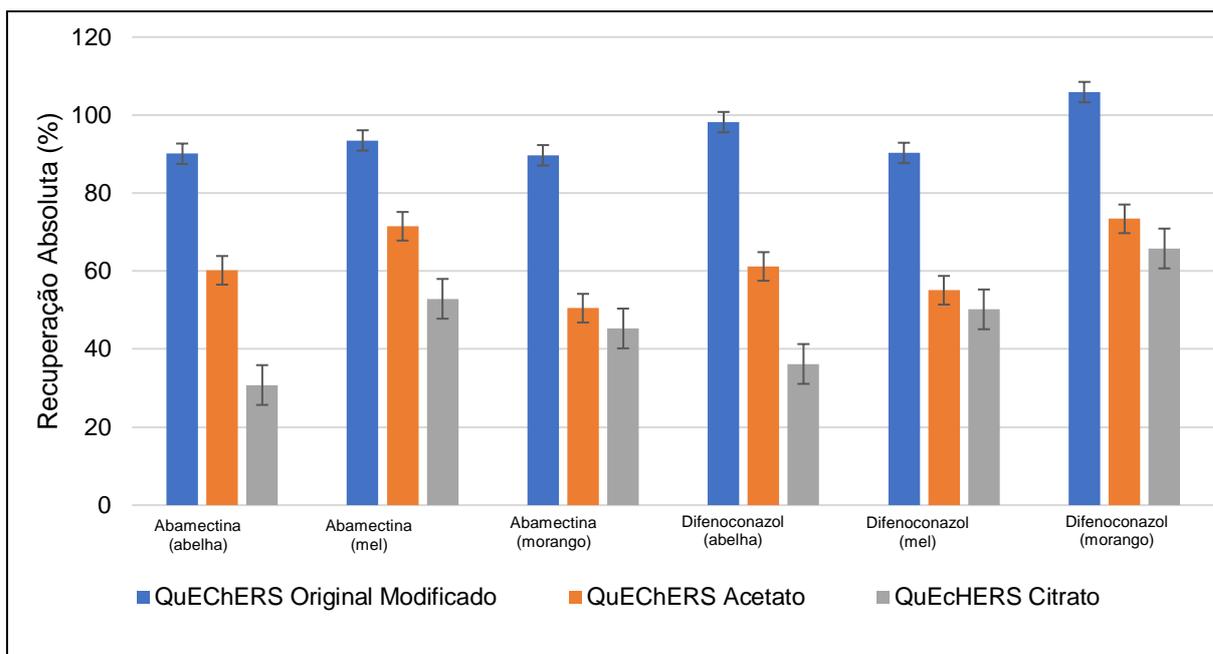
Fonte: Autoria própria

A avaliação dos dados de recuperação para as matrizes morango, abelha e mel, em relação à repetibilidade do método demonstra-se adequados, devido aos resultados para os compostos em níveis de 0,01 mg kg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹, os quais apresentaram recuperações superiores a 80%.

As variações nos resultados de recuperação foram observadas com ajuste da quantidade de sais utilizados no processo de clean-up. Estes resultados corroboram com os dados obtidos por Oshita (2013); Saibt, 2017.

Após a seleção das melhores condições de trabalho (limpeza no processo de clean-up), os resultados de recuperação foram avaliados para as extrações com as modificações prevista no peso dos saís a ser aplicado nas amostras durante o desenvolvimento do método, conforme a Figura 23.

Figura 23: Recuperações obtidas após as modificações no processo de extração.



Fonte: Autoria própria

Os resultados confirmam que as modificações realizadas no método QuEChERS proporcionou melhor recuperação dos analitos, portanto o método final empregado na extração dos analitos de interesse foi apresentado na figura 10.

9.6 Precisão e exatidão

A precisão do método QuEChERS modificado foi avaliada em função da repetitividade e da precisão intermediária, estimadas de acordo com as recomendações da ANVISA.

Por meio dos resultados gerados pela validação analítica, pode-se avaliar que neste estudo, que erros aleatórios e sistemáticos não foram significativos para influenciar negativamente a determinação analítica de resíduos de agrotóxicos nas matrizes estudadas.

Os parâmetros analíticos de validação indicaram que, o método desenvolvido para extração de agrotóxicos empregando o método QuEChERS modificado, com acetonitrila como solvente extrator, $MgSO_4$ como agente secante, NaCl para efeito salting out, C18 para efeito tamponante e PSA como sorvente para clean-up e determinação analítica por LCMSMS, pode ser aplicado em análises de amostras de matrizes como: abelhas, mel e morango.

Os valores mais detalhados de RSD intradias e RSD interdias são apresentados juntamente aos resultados de recuperação, na Tabela 9.

Tabela 9: Percentuais de RSD para a precisão intradias (n=5), precisão interdias (n=10) e exatidão do método QuEChERS modificado, nos níveis 0,01 mg L⁻¹(baixo), 0,5 mg L⁻¹ (médio) e 1 mg L⁻¹ (alto)

Analitos	Níveis	Precisão intradia RSD (%) n = 5	Precisão interdias RSD (%) n=10	Exatidão (%), n=3
Abamectina (abelha)	Baixo	3,95	12,05	93,4
	Médio	3,44	5,12	96,99
	Alto	1,93	4,13	99,85
Difenoconazol (abelha)	Baixo	7,05	6,93	95,25
	Médio	3,12	2,87	99,23
	Alto	0,35	2,99	105,2
Abamectina (mel)	Baixo	2,05	6,04	84,96
	Médio	6,98	14,12	98,86
	Alto	1,48	2,42	101,84
Difenoconazol (mel)	Baixo	2,61	5,59	88,46
	Médio	1,25	3,41	103,22
	Alto	1,03	8,99	98,018
Abamectina (morango)	Baixo	2,05	6,04	84,96
	Médio	6,98	15,14	98,86
	Alto	1,57	3,51	102,87
Difenoconazol (morango)	Baixo	5,49	5,51	103,25
	Médio	1,98	5,42	93,02
	Alto	2,53	2,84	97,7

Fonte: Autoriaprópria

O desvio padrão relativo dos ensaios de precisão intradias e interdias foram menores que 15% para os analitos abamectina e difenoconazol nas matrizes morango, abelha e mel, nos três níveis de fortificação. No tocante à exatidão, todos os resultados continuaram a apresentar valores de recuperação dentro da faixa recomendada (entre 80 e 120%).

Portanto, os valores de precisão e de exatidão atenderam aos requisitos recomendados pelas agências regulamentadoras para validação do método.

9.7 Aplicação do método

Após o método desenvolvido e validado, amostras de morango, abelha e mel obtidas de produtores rurais do município de Bom Repouso – MG foram analisadas para verificar se elas estavam contaminadas com os agrotóxicos abamectina e difenoconazol e em que concentração.

Para as amostras de morango analisadas, em todas foram detectadas resíduos de abamectina e difenoconazol acima do LMR (0,02 mg/kg⁻¹ e 0,5 mg/kg⁻¹) respectivamente. Nas amostras de abelha foram detectados resíduos dos agrotóxicos estudados em concentrações de 0,02 mg/ kg⁻¹ para abamectina e 0,2mg/kg⁻¹ para o difenoconazol, sendo valores abaixo do limite de quantificação. Embora não tenha LMR estabelecidos de abamectina em amostras de mel, o composto foi identificado nas amostras 3, 4 ,5 e 6, em concentrações de 0,03 mg/kg⁻¹ e para o difenoconazol as amostras apresentaram resíduo na concentração de 0,06 mg/kg⁻¹ ficando acima do LMR permitido que é de 50 µg/kg⁻¹.

As concentrações dos agrotóxicos encontrados nas amostras analisadas estão apresentas na Tabela 10e um exemplo do cromatograma obtido com a amostra, que continha vários agrotóxicos,pode ser visualizado na Figura 24, Figura 25 e Figura 26.

Tabela 10: Concentrações de agrotóxicos em abelha, mel e morangos, empregando o método desenvolvido e validado.

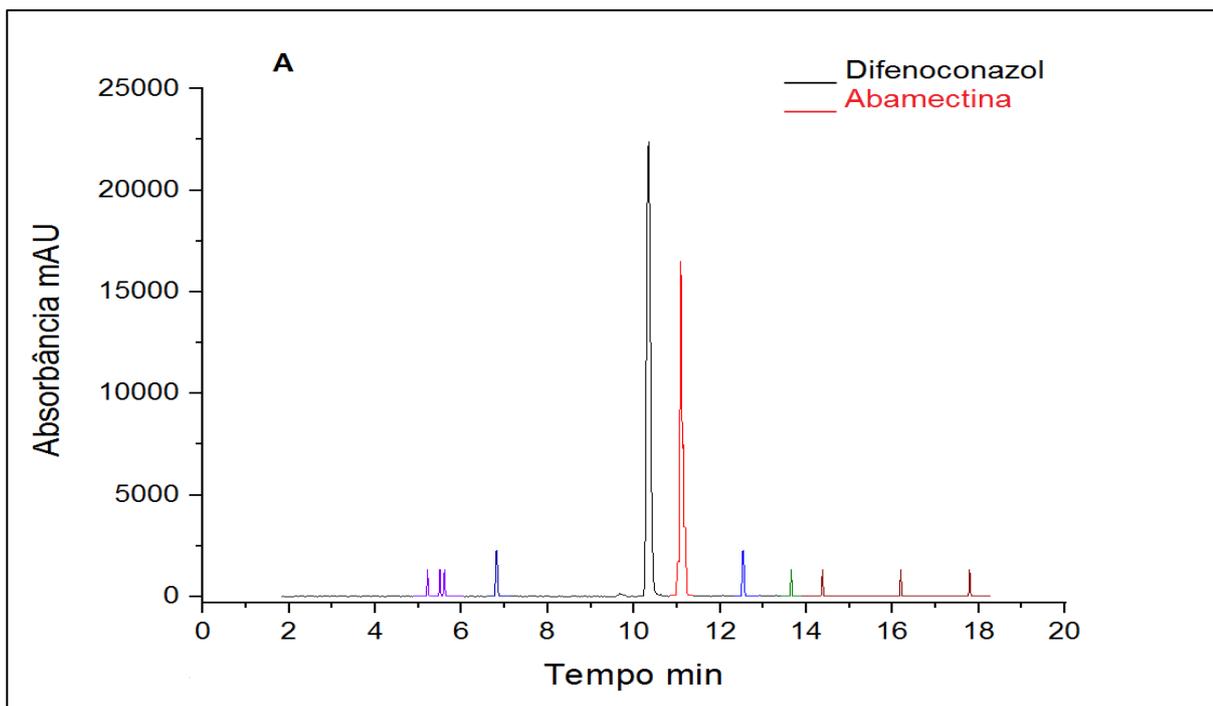
Amostra	Agrotóxicos (mg kg ⁻¹)								
	Controle Morango	Controle Abelha	Controle Mel	1	2	3	4	5	6
Abelha	NA	NA	NA	0,02 ^(a) 0,2 ^(b)	0,01 ^(a) 0,2 ^(b)	0,02 ^(a) 0,2 ^(b)	0,02 ^(a) 0,4 ^(b)	0,02 ^(a) 0,2 ^(b)	0,02 ^(a) 0,3 ^(b)
Mel	NA	NA	NA	0,02 ^(a) NA	0,02 ^(a) NA	0,03 ^(a) 0,6 ^(b)	0,03 ^(a) 0,6 ^(b)	0,03 ^(a) 0,6 ^(b)	0,03 ^(a) 0,6 ^(b)
Morango	NA	NA	NA	0,02 ^(a) 0,5 ^(b)	0,03 ^(a) 0,5 ^(b)	0,03 ^(a) 0,5 ^(b)	0,04 ^(a) 0,7 ^(b)	0,04 ^(a) 0,7 ^(b)	0,04 ^(a) 0,7 ^(b)

^aLMR ≥ que o estabelecido pela ANVISA para abamectina

^b LMR ≥ que o estabelecido pela ANVISA para difenoconazol

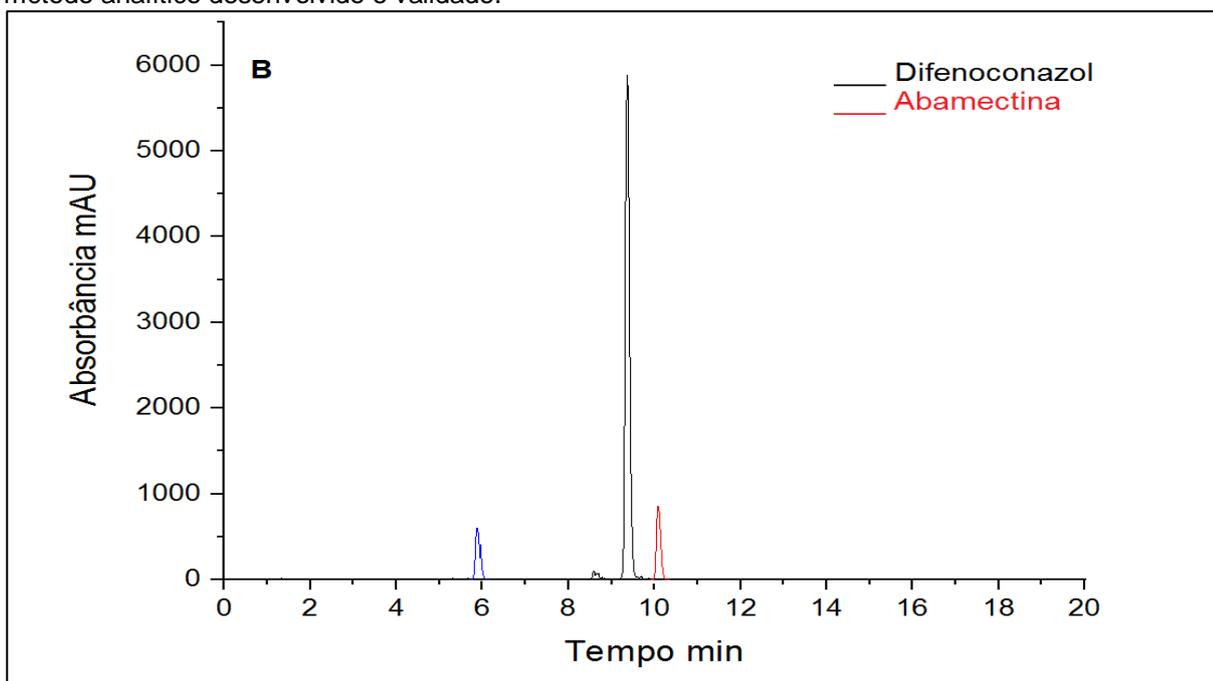
Fonte: Autoria própria

Figura 24: Cromatogramas dos agrotóxicos presentes nas amostras de morango, determinados pelo método analítico desenvolvido e validado.



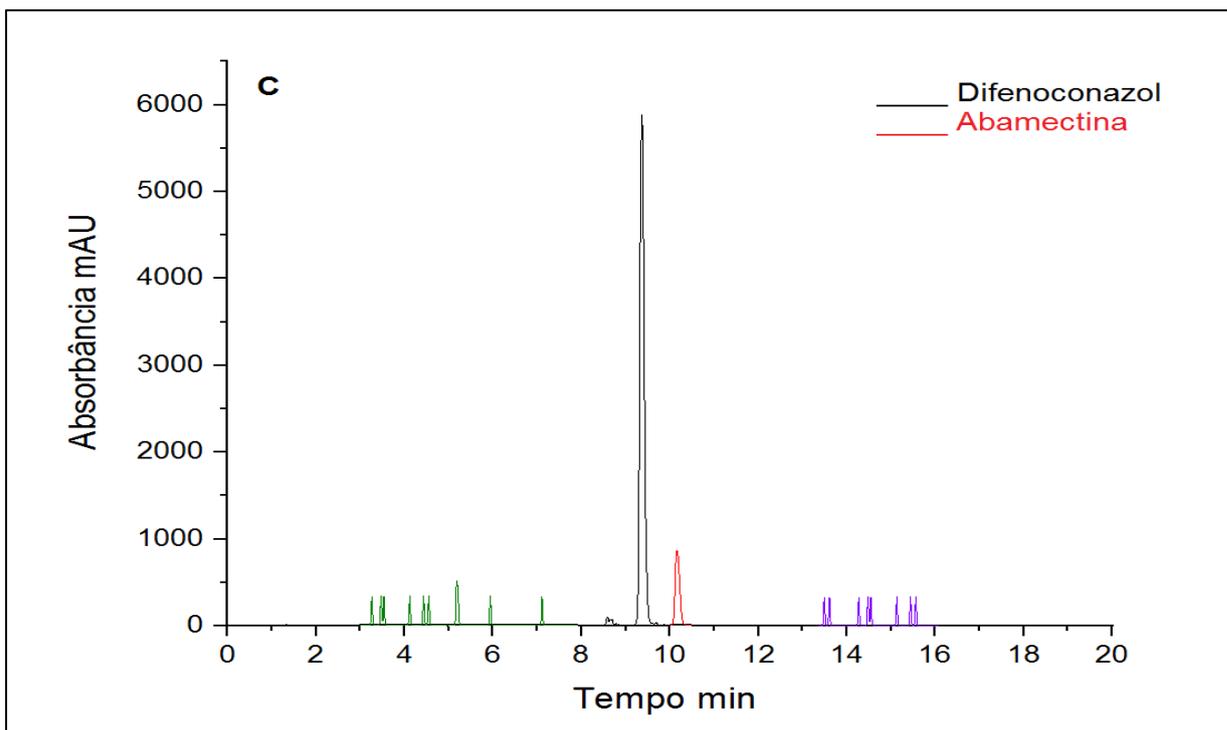
Fonte: A autoria própria

Figura 25: Cromatogramas dos agrotóxicos presentes nas amostras de abelha, determinados pelo método analítico desenvolvido e validado.



Fonte: A autoria própria

Figura 26: Cromatogramas dos agrotóxicos presentes nas amostras de abelha, determinados pelo método analítico desenvolvido e validado.



Fonte: Autoria própria

É importante destacar que se devem analisar cuidadosamente os valores de concentração dos agrotóxicos encontrados em amostras ambientais, pois os valores de LMR disponibilizados pela legislação nacional ou pela internacional podem variar muito, dependendo do país considerado. Dessa forma, uma concentração pode ser considerada problemática em um país, porém não em outro, necessitando que mais estudos sejam realizados neste campo, a fim de que haja uma globalização nos valores de concentração dos LMR.

Assim, os cromatogramas apresentados nas Figuras 24, Figura 25 e Figura 26 mostram que, em todas as amostras estudadas (morango, abelha e mel) apresenta contaminações com os analitos objeto de estudo e outros analitos que manifestaram em concentrações relevantes e que alerta para o uso de novos compostos. Para os cromatogramas das amostras de morango representados por (A) abelha (B) e mel (C) enfatiza a presença de outros compostos que infelizmente não pode ser identificado devido à dificuldade de obtenção das informações por parte dos produtores sobre a utilização de novos agrotóxicos, assim outro aspecto a ser considerado na determinação de resíduos de agrotóxicos é a presença dos metabólitos, dos produtos de degradação ou a formação de produtos secundários, juntamente com a molécula original, na composição das amostras ou são

encontrados agrotóxicos não autorizados para a cultura analisada. A consequência dessa interação muitas vezes traz taxas de toxicidade geralmente maiores, em relação a molécula original, pode ter consequências mais drásticas tanto no meio ambiente como no organismo dos consumidores.

Este estudo confirmou a grande preocupação com a presença de resíduos de agrotóxicos aplicados nas culturas de morango, na abelha e no mel principalmente, quando estão acima dos valores de LMR. As amostras de morangos, abelha e mel (controle) que foram analisadas não apresentaram os agrotóxicos estudados, o que demonstra que nenhum controle químico foi aplicado.

10 Conclusão

O método de extração QuEChERS modificado, otimizado e validado neste estudo, dispõe como vantagem ser um procedimento moderno e dinâmico, que pode ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplicidade das etapas de trabalho empregada no método de extração. Dessa maneira, o método de extração proposto e empregado nesse estudo, apresenta como vantagens: possibilita um procedimento rápido e simples; menor número de etapas analíticas, o que proporciona diminuir a probabilidade de erros, além de ser barato e ambientalmente correto, devido ao baixo consumo de solventes orgânicos (somente 10 mL de acetonitrila).

A determinação dos agrotóxicos por LCMSMS foi adequada, o que permitiu a realização de uma análise qualitativa, obtida a partir de fragmentos de massa característicos de cada analito, e quantitativa, através do modo de aquisição MRM.

As condições cromatográficas otimizadas para a determinação por LCMSMS permitiu a quantificação e identificação dos compostos estudados além de outros compostos, em um tempo total de análise de 20 min.

Logo, conclui-se que o método mostrou-se adequado à análises simultâneas de agrotóxicos em alimentos (morango e mel) e em abelha, podendo ser usado na rotina de laboratórios de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos, uma vez que todos os parâmetros de validação cromatográfica encontraram-se dentro dos limites exigidos pelas agências reguladoras, desta maneira atendendo satisfatoriamente os objetivos proposto para este estudo.

11 Referência

ADAMS, S. M. et al. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton : Lewis Publishers, 1990. p. 457.

AENDA. **Aenda - Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos**. Disponível em: <<https://www.aenda.org.br/>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

AGUILAR, J. A comunidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) da reserva florestal de Morro Grande, Cotia, São Paulo. 1999.

AHMAD, F. et al. **Pollinators and pollination: a resource book for policy and practice**. [s.l.: s.n.].

ALMEIDA DO CARMO, D. et al. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. **Revista Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science: v**, v. 8, n. 1, 2013.

AL-WAILI, N; SALOM, K; AL-GHAMDI, A; ANSARI, MJ. Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. [Internet]. 2012. [Acesso em 2015 maio 15]; volume 2012: p.9. Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/930849>

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANDRIGUETO, J. R. ET AAL. Produção Integrada de Frutas e Sistema Agropecuário de Produção Integrada no Brasil. v. 5350, n. 61, p. 1–24, 2008.

ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. DOS. A cultura do morango. **Embrapa Informação Tecnológica**, v. 2a edição, p. 52, 2011.

ANVISA. **Cartilha sobre Agrotóxicos S**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/451956/Cartilha+sobre+Agrotóxicos+Série+Trilhas+do+Campo/6304f09d-871f-467b-9c4a-73040c716676>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

ANVISA. **PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS (PARA)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%252BPARA%252B2011-12%252B-%252B30_10_13_1.pdf/d5e91ef0-4235-4872-b180-99610507d8d5>. Acesso em: 14 maio. 2019.

ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S. Impacto dos praguicidas na saúde: Estudo da cultura de tomante. **Revista de Saude Publica**, v. 34, n. 3, p. 309–313, 2000.

ARROMBA, R. D. S.; SILVA, C. N. DA; ORLANDO, R. **Apostila de Apoio PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE ELEMENTAR**. Juíz de Fora:

[s.n.]. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/07/Apostila-PREPARO-DE-AMOSTRAS-Analítica-Avançada.pdf>>. Acesso em: 15 maio. 2017.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, out. 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA. **O DESEMPENHO DA INDÚSTRIA QUÍMICA EM 2017**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.abiquim.org.br/uploads/guias_estudos/desempenho_industria_quimica_2017.pdf>. Acesso em: 14 maio. 2019.

BALTUSSEN, E. et al. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, n. 10, p. 737–747, 1999.

BARBOSA, P. H.; ABREU, D. E. **O AGRICULTOR FAMILIAR E O USO (IN)SEGURO DE AGROTÓXICOS NO MUNICÍPIO DE LAVRAS, MG** " **CAMPINAS 2014 UNICAMP**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2014.

BARRETT, J. C. et al. 12th meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals: Susceptibility to environmental hazards. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. SUPPL. 4, p. 699–737, 1997.

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Inseticidas Registrados para a Cultura do Arroz e Análise de Parâmetros Indicadores de seu Comportamento no Ambiente. **Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 4 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Circular Técnica, 74)**, 2005.

BAWA, K. S. et al. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. **American Journal of Botany**, v. 72, n. 3, p. 346–356, 1985.

BERNHARDT, E. et al. Ecology: ecology for a crowded planet. **Science**, v. 304, n. 5675, p. 1251, 2004.

BIROLO, F. **Dia de Campo na TV - Polinização de abelhas na produtividade do melão - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/dia-de-campo-na-tv/busca-de-noticias/-/noticia/2194956/dia-de-campo-na-tv---polinizacao-de-abelhas-na-produtividade-do-melao>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

BORDIGNON JR., C. L. et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 183–188, 2009.

BOSCH, J.; KEMP, W. P. **How to manage the vlue orchard bee**. [s.l.: s.n.].

BRANDÃO, F. P. et al. Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and behavioural effects. **Aquatic Toxicology**, v. 144–145, p. 218–229, 2013.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985. Proíbe em todo o território nacional, a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados que especifica. Diário Oficial da Repú.** Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mapa_gm/1985/prt0329_02_09_1985.ht>

ml>. Acesso em: 15 mar. 2019.

BRASIL. **Presidência da República, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos.** Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 25 ago. 2018.

BRASIL. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos.** Disponível em:

<<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 23 jun. 2019.

BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Limnologia fluvial : um estudo no rio Mogi-Guaçu.** [s.l.] RiMa, 2003.

BUCHMANN, S. L.; NABHAN, G. P. **The forgotten pollinators.** [s.l: s.n.].

BUETTNER, G. R. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535–543, 1 fev. 1993.

CAJKA, T. et al. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, n. 1–2, p. 281–294, 2008.

CAMARGO, J. M. F. DE. **Manual de apicultura.** 9. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, - p.252, 1972.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Elsevier**, 2000.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1–2, p. 1–17, 30 set. 2005.

CASTRO, V. L. S. S. DE. Uso de Misturas de Agrotóxicos na Agricultura e Suas Implicações Toxicológicas na Saúde. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, p. 87–94, 2009.

CHACOFF, N. P.; AIZEN, M. A. Edge effects on flower-visiting insects in grapefruit plantations bordering premontane subtropical forest. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, n. 1, p. 18–27, 2006.

CICCO, L. H. S. **Abelha - As abelhas e a História - Saúde Animal | Saúde Animal.** Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/2015/11/27/as-abelhas-e-a-historia/>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

COLETTI-SILVA, A. **IMPLANTAÇÃO DA MELIPONICULTURA E ETNOBIOLOGIA DE ABELHAS SEM FERRÃO (Melipona) EM COMUNIDADES MANAUS – AM INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA UNIVE.** [s.l: s.n.].

CORREIA, A. M.; MARINHO, P. **Contextos e contornos da modernização agrícola em municípios do Baixo Jaguaribe-Ce: o espelho do**

(des)envolvimento e seus reflexos na saúde, trabalho e ambiente. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6135/tde-08112010-100604/publico/AlicePequeno.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

CORREIA, N. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente. 2018.

COSTANZA, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253–260, 1997.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura : manejo e produtos.** [s.l.] FUNEP, 2006.

CUNHA, G. DE P. Q. **Caracterização ambiental da região de montante do rio Mogi-Guaçu (Bom Repouso - MG): estratégias para replicabilidade e diretrizes para elaboração do plano de adequação ambiental.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

DAILY, G. C. Nature's services: societal dependence on natural ecosystems. **Brittonia**, v. 45, n. 1, p. 392, 1997.

DANDEKAR, S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes. **Sakarya Medical Journal**, v. 48, n. 3, p. 186–89, 2002.

DECOURTYE, A. et al. Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 242–250, 15 fev. 2005.

DELAPLANE, K. S.; MAYER, D. F. **Crop pollination by bees.** [s.l.] CABI, 2000.

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 161–172, set. 1994.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 340–351, 1 jun. 2003.

DORES, E. F. G. DE C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27–36, fev. 2001.

EM, A. C. et al. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saude Publica**, v. 40, n. 2, p. 361–363, 2006.

EMBRAPA. **Sistemas de Produção.** Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/#morango>>. Acesso em: 9 maio. 2017.

EPA. A Review of the Environmental Protection Agency. n. May, p. 101, 2011.

EPPO. Schemes for the production of healthy plants for planting. **EPPO Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 435–440, 2001.

FABICHAK, I. **ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO JATAÍ.** [s.l.] Nobel, 2000. v. 9

FADINI, M. A. M.; PALLINI, A.; VENZON, M. Controle de ácaros em sistema de produção integrada de morango. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1271–1277, ago. 2004.

FAO/WHO. **Understanding the codex Alimentarius. 30^a ed. Roma: FAO.** [s.l.: s.n.].

FIRPO, M. et al. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora* Development model, pesticides, and health: a panorama of the Brazilian agricultural reality and proposals for an innovative research agenda. **Rev. bras. Saúde ocup**, v. 37, n. 125, p. 17–50, 2012.

FOSSI, M. C.; LEONZIO, C. **Nondestructive biomarkers in vertebrates.** [s.l.] Lewis Publishers, 1994.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops.** [s.l.] Academic Press, 1993.

FREITAS, B. The Pollination Efficiency of Foraging Bees on Apple (*Malus Domestica* Borkh) and Cashew (*Anacardium Occidentale* L.). 1995.

FREITAS, B. M. Conhecendo as abelhas. 2003.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Polinizadores e Pesticidas:Princípios de Manejo para os Agroecossistemas Brasileiro. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, p. 1–116, 2012.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, n. 3, p. 810–821, 2009.

GIMÉNEZ, G.; ANDRIOLO, J.; GODOI, R. Cultivo sem solo do morangueiro. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 273–279, 2007.

GODFRAY, H. C. J. et al. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1786, 2014.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research**, v. 99, n. 3, p. 273–91, nov. 1982.

GREENPEACE. The Environmental Risks of Neonicotinoid Pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**, n. January, 2017.

HALL, A. G. Glutathione and the Regulation of Cell Death. In: G. J. L. KASPERS R. PIETERS AND A. J. P. VEERMAN UNIVERSITY HOSPITAL VRIJE UNIVERSITEIT AMSTERDAM, T. N. (Ed.). . **Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III.** [s.l.: s.n.]. v. 457p. 613.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HERMES-LIMA, M. OXYGEN IN BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY: ROLE OF FREE
68

RADICALS. In: **OXYGEN IN BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY : ROLE OF FREE RADICALS**. [s.l: s.n.]. p. 616.

HESS, S. C.; PORTO, M. F. D. S. Agrotóxicos : é preciso controlar. p. 1–16, 2014.

HODGSON, & GOLDSTEIN, J. . **Introduction to Biochemical Toxicology : Ernest Hodgson : 9780471333340**. 3. ed. New York: John Wiley and Sons Ltd, 2001.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **As abelhas sociais sem ferrão**. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/beelife/>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

ISLAS-FLORES, H. et al. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 32–38, 2013.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. DE A.; QUEIROZ, S. C. DO N. DE. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996–1012, 2009.

JESUS, T. B. DE; & CARVALHO, C. E. V. DE. UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR MERCÚRIO (Hg). **Oecologia Australis**, v. 12, n. 04, p. 680–693, 2008.

KERAMBRUN, E. et al. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 154, n. 3, p. 187–95, set. 2011.

KERR, W. E. et al. Parcerias Estratégicas. Biodiversidade e Amazônia. **Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica**, p. 20–41, set. 2001.

KEVAN;, P. G.; IMPERATRIZ-FONSECA;, V. L. **Pollinating Bees - the Conservation Link Between Agriculture And Nature**. Brasília: [s.n.].

KLAASSEN, C. D. Casarett & Doull's Toxicology. 2001.

KLEE, J. et al. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 1, p. 1–10, 2007.

KREMEN, C. POLLINATION SERVICES AND COMMUNITY COMPOSITION: DOES IT DEPEND ON DIVERSITY, ABUNDANCE, BIOMASS, OR SPECIES TRAITS? In: PEREIRA, B. M. F. E J. O. P. (Ed.). . **Solitary Bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza - CE: [s.n.].

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 71–88, 30 dez. 2002.

LACKNER, R. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. **Fish Ecotoxicology**, p. 204–224, 1998.

LARSEN, T. H.; WILLIAMS, N. M.; KREMEN, C. Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. **Ecology Letters**, v. 8, n.

5, p. 538–547, 2005.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, 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**, v. 88, n. 2, p. 615–629, 2005.

LINTELMANN, JATAYAMA, A. et al. ENDOCRINE DISRUPTORS IN THE ENVIRONMENT. **Pure Appl. Chem**, v. 75, n. 5, p. 1994–2001, 2003.

LONG, A. R.; SHORT, C. R.; BARKER, S. A. Method for the isolation and liquid chromatographic determination of eight sulfonamides in milk. **Journal of Chromatography A**, v. 502, p. 87–94, 1 jan. 1990.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. DOS. Abelhas sem-ferrão : a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, n. 4, p. 7–9, 2005.

LORENZ, J. G. et al. Multivariate Optimization of the QuEChERS-GC-ECD Method and Pesticide Investigation Residues in Apples, Strawberries, and Tomatoes Produced in Brazilian South. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 9, p. 1583–1591, 2014.

MADAIL, J. C. M.; PEREIRA, V. M.; SILVA, B. A. DA. Frutas como alimento e renda nos assentamentos daregião sul do RS. 2007.

MALASPINA, O. et al. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: **Anais do VIII Encontro sobre Abelhas**. Ribeirão Preto: [s.n.]. p. 41–48.

MARGNI, M. et al. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 93, n. 1–3, p. 379–392, 2002.

MARTINHO, M. R. **A criação de abelhas**. 2. ed. São Paulo: [s.n.].

MAYER, D. F.; LUNDEN, J. D. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. **Journal of Apicultural Research**, v. 38, n. 3–4, p. 191–197, 1999.

MCGEE, H. **Comida & Cozinha - Ciência e Cultura da Culinária - 2ª Ed. 2014**. 2ª ed. São Paulo: [s.n.].

MEIRA, A. P. G. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão Techniques of analysis for pesticide residue in plant foods: a review. **Campinas**, v. 130, n. 2, p. 766–777, 2015.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. **GLUTATHIONE**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.annualreviews.org>. Acesso em: 5 fev. 2019.

MENDIOLA, J. et al. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Elsevier**, 2007.

MERTZ, W. Trace minerals and atherosclerosis. **Federation proceedings**, v. 41, n. 11, p. 2807–2812, 1982.

MESSAGE, D.; TEIXEIRA, É. W.; JONG, D. D. . Situação da sanidade das abelhas no Brasil. In: EDUSP, E. DA U. DE S. P.- (Ed.). . **Polinizadores do Brasil**. 1ª ed. São Paulo: [s.n.]. p. 488.

MICHENER, C. **The Bees of theWorld**. [s.l: s.n.]. v. 78

MILHOME, M. A. L. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 363–372, set. 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Quantidade de Agrotóxico Comercializado por Classe de Periculosidade Ambiental**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/component/k2/item/11294-quantidade-de-agrotoxico.html>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299–311, 2002.

NARITA, K. et al. Selecting pesticides for inclusion in drinking water quality guidelines on the basis of detection probability and ranking. **Environment International**, v. 63, p. 114–120, 2014.

NASCIMENTO, I. A. Biomarcadores como Instrumentos ' Preventivos de Polui ~ ao. In: [s.l.] In book: Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações Edition: 1st Edition Chapter: Chapter17 Publisher: Ed. RIMA, São Paulo Editors: Zagatto, P.A. & Bertoletti, E. (ORG, 2006.

NAUMANN, K.; CURRIE, R. W.; ISMAN, M. B. Evaluation of the Repellent Effects of a Neem Insecticide on Foraging Honey Bees and Other Pollinators. **The Canadian Entomologist**, v. 126, n. 02, p. 225–230, 2009.

NEPA - UNICAMP. Tabela brasileira de composição de alimentos. **NEPA - Unicamp**, p. 161, 2011.

NIELL, S. et al. Análisis multiresiduo de 41 pesticidas en miel por LC-MS/MS: evaluación de dos métodos de clean-up. **Agrociencia Uruguay**, v. 17, n. 1, p. 101–107, 2013.

NOGUEIRA-NETO, P. **Notas sobre a história da apicultura brasileira**. São Paulo: SIn: CAMARGO, J. M. F. (Org.). Manual de apicultura: Ed. Agronômica Ceres, p. 17-32, 1972.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. [s.l: s.n.]. v. 34

OECD. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, n. September, p. 8, 1998a.

OECD. Test No 214: Guidelines for the Testing of Chemicals. n. September, p. 1–7, 1998b.

OLIVEIRA, R. P. DE; SCIVITTARO, W. B. Desempenho produtivo de mudas nacionais e importadas de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28,

p. 520–522, 2006a.

OLIVEIRA, R. P. DE; SCIVITTARO, W. B. Desempenho produtivo de mudas nacionais e importadas de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 520–522, dez. 2006b.

ONG, C.-N.; SHEN, H.-M.; CHIA, S.-E. Biomarkers for Male Reproductive health hazards: Are they available? **Toxicology Letters**, v. 134, n. 1–3, p. 17–30, 5 ago. 2002.

ORGA, H. Saúde e segurança alimentar : a questão dos agrotóxicos Health and food safety : the pesticides issue. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 0, p. 1–10, 2005.

OTTO, R. F. et al. Cultivares de morango de dia neutro: produção em função de doses de nitrogênio durante o verão. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2001, p. 217–221, 2009.

OWEN, J. B.; BUTTERFIELD, D. A. Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. In: [s.l.] Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 269–277.

ÖZCAN, M.; ARSLAN, D.; ALI CEYLAN, D. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 24–29, 1 jan. 2006.

PACHECO, M.; & SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331–347, 2002.

PALAZUELOS BALLIVIÁN, J. M. **Abelhas nativas sem ferrão**. Oikos ed. São Leopoldo: [s.n.]. v. 2

PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 157–160, 1994.

PEREIRA, F. DE M. M. T. DO R. L. R. C. R. DE C. **Produção do Mel**. 1ª edição ed. [s.l: s.n.]. v. 3

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, n. 1, p. 45–85, 1 jan. 2004.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 266–281, 2010.

PITTS-SINGER, T. L.; CANE, J. H. The Alfalfa Leafcutting Bee, *Megachile rotundata* : The World's Most Intensively Managed Solitary Bee . **Annual Review of Entomology**, v. 56, n. 1, p. 221–237, 2010.

PIZZUTTI, I. R. et al. A multi-residue method for pesticides analysis in green coffee beans using gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry in selective ion monitoring mode. **Journal of Chromatography A**, v. 1251, p. 16–26, 2012.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009a.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009b.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51–64, 2011.

RANGEL, M. A. **A HISTÓRIA DO SETOR DE APICULTURA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**, 2006.

RIBEIRO, M. . et al. PESTICIDES : USE AND RISKS FOR THE ENVIRONMENT. n. June 2017, 2008.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.

RICKETTS, T. H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology letters**, v. 11, n. 5, p. 499–515, 2008.

ROCHA, D. A. et al. Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 1124–1128, dez. 2008.

ROCHA, J. S. MANUAL TÉCNICO, 05 ISSN 1983-5671 Jean Samel Rocha 05. 2008.

RODRIGUES, S. R. et al. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 2, p. 181–188, 2011.

ROSA, H. T. et al. Vegetative growth and production of two strawberry cultivars for different planting times in a subtropical environment. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 3, p. 604–613, 2013.

RUSSELL, K. N. .; IKERD, H.; DROEGE, S. The potential conservation value of unmowed powerline strips for native bees. **Biological Conservation**, v. 124, n. 1, p. 133–148, 2005.

SANCHEZ-CASTILLO, C. P. et al. The Mineral Content of Mexican Fruits and Vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 11, n. 4, p. 340–356, 1 dez. 1998.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. [s.l: s.n.]. v. 1959

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. **Belo Horizonte: Min. Meio Ambiente/Fund**. [s.l: s.n.].

SLAA, E. J. et al. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 293–315, 2006.

SOARES, A. E. E. **CAPTURE DE ENXAMES COM CAIXAS ISCAS E SUA IMPORTÂNCIA NO MELHORAMENTO DE ABELHAS AFRICANIZADAS**, 2004.

SOLOMON, M. G.; HOOKER, K. J. M. Chemical Repellents for Reducing Pesticide Hazard to Honeybees in Apple Orchards. **Journal of Apicultural Research**, v. 28, n. 4, p. 223–227, 24 jan. 1989.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. DO S. DE C. ET. AL. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. VIII, n. 3, p. 1–7, 2007.

STEFFAN-DEWENTER, I. et al. Pollinator diversity and crop pollination services are at risk [3] (multiple letters). **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 12, p. 651–652, 2005.

STEGEMAN, J. J. et al. Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: **Marine mammal ecotoxicology : impacts of multiple stressors on population health**. Boca Raton: En: Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Huggett R.J.; R.A. Kimerle, P.M. Mehrle Jr. & H.L. Bergman, Eds.; SETAC-Lewis Publishers, Boca Raton, 235-335., 1992. p. 512.

STOPPELLI, I. M. DE B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. suppl, p. 91–100, dez. 2005.

STRAPAZZON, R. et al. Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 990–997, 2009.

TEIXEIRA, E. W. et al. Virus infections in Brazilian honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, n. 1, p. 117–119, 2008.

THOMPSON, H. M. Behavioural effects of pesticides in bees - Their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 12, n. 1–4, p. 317–330, 2003.

US EPA, O. **Pesticides**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticides>>. Acesso em: 23 ago. 2017.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Elsevier**, v. 13, p. 57–149, 2003.

VELASCO, L. O. M. DE; CAPANEMA, L. X. DE L. **O setor de agroquímicos**. [s.l.: s.n.]. v. 29

VENTURIERI, G. Meliponicultura: Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. p. 1–4, 2004a.

VENTURIERI, G. C. Contribuições da Embrapa Amazônia Oriental para a criação racional de meliponíneos amazônicos. n. January, 2004b.

VENTURIERI, G. C. et al. Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In: **Polinizadores no Brasil**. [s.l.: s.n.]. p. 488.

VILELA, S. L. D. O. A CADEIA PRODUTIVA DO MEL NO ESTADO DO PIAUÍ. In: **ANAIS DO II CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL**. [s.l.: s.n.]. v. 1p. 233–239.

VON MÜHLEN, C.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 747–753, 2004.

WALKER, C. H. (COLIN H. **Principles of ecotoxicology**. [s.l.] CRC Press, 2012.

WARDENCKI, W.; MICHULEC, M.; CURYLO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 703–717, 1 ago. 2004.

WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 803–812, 1 abr. 2011.

WILLIAMS, I. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. **agris.fao.org**, 1994.

WINZER, K. et al. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 2, p. 143–155, 2001.

WONG, C. M. et al. Cell Signaling by Protein Carbonylation and Decarbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 393–404, 2010.

YAMAMOTO;, P. T.; ROBERTO;, S. R.; PRIA JR., W. D. Inseticidas sistêmicos aplicados via tronco para controle de *Oncometopia facialis*, *Phyllocnistis citrella* e *Toxoptera citricida* em citros. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 415–420, set. 2000.

ZITKA, O. et al. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. **Oncology Letters**, v. 4, n. 6, p. 1247–1253, 2012.

ZORITA, I. et al. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. **Elsevier**, v. 153, p. 157–168, 2008.

Capítulo 3: Teste de toxicidade de abamectina, difenoconazol e análise de biomarcadores em abelhas jataí

1 Introdução

No Brasil existem mais de 1.500 espécies de abelhas nativas além da *Apis mellifera* africanizada (MALASPINA, 1979; SILVEIRA et al., 2002). A polinização realizada por abelhas chega a até 90% em flora nativa, dependendo do ambiente (KERR et al., 2001).

As abelhas sem ferrão, ou meliponídeos, são um grupo de abelhas eussociais de distribuição pantropical, representadas aproximadamente por seiscentas espécies, sendo 330 encontradas no Brasil, vivem em colônias perenes formadas por operárias, machos e uma rainha fisiogástrica. (Cortopassi-Laurino Nogueira-Neto, 2016). O trabalho realizado por estas abelhas é essencial para a manutenção da diversidade vegetal e para a manutenção da flora nativa e, indiretamente, da fauna que dela se alimenta, desempenhando uma tarefa importantíssima para a nidificação das matas e dos ecossistemas, contribuindo na preservação da fauna e da flora, que, em conjunto com outros seres, mantêm o nosso planeta em equilíbrio. O que não é muito divulgado é que 90% das árvores brasileiras dependem da polinização realizada pelas abelhas nativas e que, sem diversidade, não há sustentabilidade.

As áreas cobertas com vegetação nativa apresentam, em geral, um número considerável de espécies de plantas que servem como fonte de néctar e pólen para insetos polinizadores, por meio de florescimento contínuo ou complementar, ao longo do ano, sendo também usadas para descanso, nidificação e reprodução (FREITAS, 1991; FREITAS, 1995a). A substituição destas áreas por monoculturas, que normalmente florescem por um curto período, leva a uma severa redução no número e diversidade de polinizadores (OSBORNE et al., 1991; KREMEN et al., 2002; LARSEN et al., 2005).

Os inseticidas, principalmente aqueles de ação neurotóxica, amplificam aquele efeito, e os herbicidas e as capinas (manuais e mecanizadas) reduzem os locais de nidificação e o número de flores silvestres, fornecidos por plantas consideradas daninhas, pela destruição de áreas e/ou faixas naturais e artificiais,

como, por exemplo, estações de refúgio e vegetação existente nas entrelinhas de culturas frutíferas, principalmente (SUBBA REDDI & REDDI, 1984a; OSBORNE et al., 1991; FREE, 1993).

Tudo isto contribui para a perda de biodiversidade e serviços de polinização na área, pois as espécies remanescentes não conseguem compensar a perda de polinização resultante do desaparecimento das demais espécies (KREMEN, 2004). Alguns fungicidas podem, também, ter um grande impacto sobre os polinizadores, por reduzirem o número de visita às flores das culturas, ao exercerem ação repelente (SOLOMON & HOOKER, 1989) ou reduzirem a viabilidade do pólen, decorrentes de aberrações cromossômicas induzidas durante a meiose (GRANT, 1982). Deste modo, hoje, níveis de polinização insatisfatórios são um dos principais problemas que limitam a produtividade das culturas, particularmente daquelas que dependem de agentes polinizadores bióticos (SUBBA REDDI & REDDI, 1984b; FREITAS, 1995a).

Apicultores europeus no ano de 2007 obtiveram uma perda significativa em suas colmeias, essas perdas chegaram até 80% de todas as colmeias, ocasionando a morte de toda a colônia, seja pela ausência de alimento ou pelos cuidados com as crias. Esse ocorrido ainda não explicado totalmente ficou conhecido mundialmente como “desordem do colapso das colônias” (Guimaraes 2007). No Brasil fato semelhante foi observado em 2008 por Malaspina et. al, que relataram a perda de aproximadamente 400 colmeias em diferentes estados do Brasil, e que a maioria dos casos não poderão ser realizados análises para a verificação da ocorrência ou não de contaminação por agentes químicos.

A toxicidade de agrotóxicos em abelhas começou a ser estudada nos países de clima temperado, os quais foram os principais realizadores deste tipo de estudo, mesmo antes da introdução do DDT em 1942 (Paschoal, 1979; Moraes et al., 2000). Isso ocorreu principalmente no caso da espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Apidae), devido à sua importância nos serviços de polinização comercial de várias culturas (Free, 1970; McGregor, 1976; Crane & Walker, 1984) e a importância econômica e social da Apicultura (Williams, 1994; Pham-Delègue et al., 2002).

O efeito que os inseticidas causam nas abelhas, pode não ser observado imediatamente, sendo necessário o uso de doses subletais para futuros estudos relacionados a sobrevivência, comportamento e fisiologia (MEDRZYCHI et al., 2003).

Um método eficiente para identificar alterações fisiológicas nas células é o uso de marcadores celulares que podem ser proteínas de desintoxicação celular, proteínas indicadoras de estresse oxidativos, de estresse celular ou proteínas ligadas à respiração celular. Além do processo de desintoxicação metabólica, a ativação das proteínas de estresse oxidativo e celular pode contribuir para a resistência das abelhas aos xenobióticos.

Neste contexto, considerando-se a necessidade e da extrema importância identificar o alcance dos agrotóxicos no ambiente e entender o impacto que os mesmos têm sobre a diversidade dos polinizadores e, conseqüentemente, sobre o processo de polinização, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação da toxicidade e avaliar a presença dos biomarcadores bioquímicos através de análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em abelhas *Tetragonisca angustulata* submetidas aos efeitos da abamectina e ao difenoconazol.

2 Material e método

Para avaliar a toxicidade aguda letal (DL₅₀) e a concentração letal (CL₅₀) foi utilizado como base os protocolos preconizados pela “European and Mediterranean Plant Protection Organization” (EPPO), “International Commission for Plant-Bee Relationships” (ICPBR) e “Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)” que estabelecem métodos para testes de laboratório para avaliar o impacto de pesticidas em abelhas, (OEPP/EPPO, 2001; Felton et al., 1986; OECD/OCDE – 213a e 214b, 1998).

Para o estudo de biomarcadores foi utilizado a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3 Espécies de abelhas escolhidas

Os experimentos para determinar a toxicidade dos inseticidas usados na cultura do morango foram realizados com operárias adultas (forrageiras) de seis colônias da abelha-sem-ferrão. À espécie é mantida no Apiário do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada – CHREA da Escola de Engenharia de São Carlos- EESC.

A espécie de abelha-sem-ferrão foi escolhida, principalmente, por ser considerada potencial polinizadora da cultura do morango e por ser relativamente comum na região.

Embora não exista um protocolo específico para a espécie *Tetragonisca angustula*, foi tomado como base o protocolo os testes para *A. melífera* por ser realizados com espécie indicadora em protocolos padronizados para testes ecotoxicológicos (OECD/OCDE, 213a e 214b, 1998; OEPP/EPPO, 2001).

4 Inseticidas testados

Foram testadas inseticidas e acaricidas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para a cultura do morango e frequentemente utilizados no município de Bom Repouso – MG.

5 Controle acetona tópico e oral

Considerando que os ingredientes ativos foram diluídos em acetona 99%, foi necessário realizar um teste inicial para a avaliação de algum efeito tóxico causado pela acetona para essas abelhas. Dois grupos de bioensaios foi realizado, sendo um para o controle de acetona (tópico), um grupo de controle para acetona (oral) e um grupo controle sem uso de acetona.

As abelhas do grupo controle (tópico) foram anestesiadas com o auxílio de CO₂ por cerca de 10 segundos e colocadas em bandejas plásticas onde foi aplicado 0,5µL com o auxílio de uma micropipeta no pronoto de cada abelha. Após aplicação todas as abelhas utilizadas no teste foram recolocadas em suas respectivas gaiolas, onde permanecera, até a conclusão dos testes.

O grupo controle (oral) recebeu uma solução de sacarose contendo 2% de acetona sendo o valor máximo permitido da concentração de acetona presente nas dietas contaminadas para determinação da CL₅₀.

O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento e todos os grupos foram mantido em estufa incubadora para BOD (BiochemicalOxygenDemand) e seguindo os protocolos da OECD 2213 e 214 até a conclusão dos testes.

6 Determinação da DL₅₀ via tópico

Para a determinação da DL₅₀ via tópico dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol para as abelhas forrageiras de *Tetragoniscaangustula* foram determinadas seis concentrações dos agrotóxicos objeto do estudo 3, 6, 12, 24, 48 e 96 ng agrotóxicos/µL⁻¹ de solução.

Um grupo experimental para cada concentração, correspondendo a dose única que cada abelha recebeu por tratamento, além do grupo controle, o qual não teve nenhum tratamento.

As abelhas coletadas foram anestesiadas com CO₂ nas próprias gaiolas transferidas para bandejas plásticas e aplicado 0,5 µL da solução dos agrotóxicos

com as concentrações pré-determinadas. A aplicação foi feita no pronoto de cada abelha e posteriormente foram recolocadas em suas gaiolas e mantidas em B.O.D.

As abelhas, após a anestesia e antes que fosse aplicada os tratamentos com as respectivas concentrações, foram pesadas individualmente em balança analítica de alta precisão afim de transformar o resultado da DL_{50} de $ngi.a/abelha$ para $ngi.a/g$ de abelha.

7 Determinação da CL_{50} via oral e o consumo do alimento diário pela abelha jataí

Para a determinação da CL_{50} via oral dos agrotóxicos abamectina e difenocanazol para abelhas operarias de *Tetragonisca angustula* jataí foram determinadas cinco concentrações dos agrotóxicos nas CL_{50} 0,005; 0,01, 0,03, 0,1 e 0,5 ng de agrotóxicos/ μL^{-1} de solução de sacarose, além do grupo controle.

Os grupos de abelhas tratados receberam única e exclusivamente como alimentação solução de sacarose contaminada com as concentrações pré-estabelecidas. O grupo controle recebeu solução de sacarose sem tratamento.

Para avaliar a quantidade de solução de sacarose consumida por abelhas/dia, os alimentadores do grupo controle foram pesados em balança analítica de alta precisão e anotados, posteriormente devolvidos para as gaiolas e retornados para a B.O.D. Foram adicionados 3 alimentadores em gaiolas vazias e realizado o mesmo procedimento de pesagem, a fim de determinar o quanto do alimento é evaporado, e não consumido. A partir desses dados foi determinada a média de solução consumida por dia.

8 Principais grupos de biomarcadores

A literatura atual descreve a existência de diversos grupos de biomarcadores que têm sido objeto de intensa investigação, principalmente há nível de ecossistemas aquáticos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), embora novos estudos venham sendo desenvolvidos, como por exemplo a ação dos agrotóxicos sobre as abelhas.

O processo de biotransformação pode ser definido como a conversão, catalisada por enzimas, de um composto xenobiótico em uma forma mais solúvel em

água, que pode ser mais facilmente excretada(VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A maioria dos xenobióticos que entra no organismo é lipofílica, uma propriedade que permite que esses compostos exógenos penetrem as membranas lipídicas e sejam transportados por lipoproteínas nos fluidos corpóreos.

9 Estresse oxidativo e mecanismo de proteção antioxidante

Estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o grau de proteção dos mecanismos antioxidantes(ONG; SHEN; CHIA, 2002). Entre os radicais livres, estão às espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo as mais importantes o radical hidroxila (OH^\cdot), o ânion superóxido (O_2^\cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dentre essas, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as ERO formadas primariamente, sendo o H_2O_2 gerado por meio da dismutação (enzimática ou não enzimática) do ânion superóxido(HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Para se proteger contra o processo oxidativo, o organismo desenvolveu mecanismos que recebeu como nome antioxidante. São classificadas como agentes antioxidantes as vitaminas, minerais e enzimas, que podem restabelecer o balanço entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, mantendo a integridade das membranas celulares e prevenindo danos oxidativo ao DNA(WONG et al., 2010).

O sistema de proteção antioxidante não enzimático é composto pelas vitaminas C e E, e pela glutathiona reduzida (GSH). As vitaminas C e E, atuam como proteção das membranas lipídicas sobre os danos oxidativos(BUETTNER, 1993). A GSH é um tripeptídeo que está presente na maioria das células e é a molécula com grupamentos tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular(MEISTER; ANDERSON, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, sendo que na inativação de um agente oxidante ocorre produção de glutathiona oxidada (GSSG). Em situações em que o sistema antioxidante está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Assim, a razão GSH/GSSG pode ser

usada como marcador do estresse oxidativo(OWEN; BUTTERFIELD, 2010; ZITKA et al., 2012).

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), de modo que o organismo mantém as concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro dos limites fisiológicos(DANDEKAR et al., 2002).

A enzima catalase tem papel importante sobre a eliminação do H_2O_2 citosólico, promovendo a sua catálise até água. Nas mitocôndrias, o H_2O_2 é convertido a H_2O pela glutathione reduzida (GSH) por ação da glutathione peroxidase (GPx), sendo que a manutenção dos níveis adequados de GSH é feita à custa da atividade da glutathione redutase (GR), a qual utiliza equivalentes redutores no NADPH, o qual é produzido pela Via das Pentoses Fosfato ou por meio de enzimas transidrogenases(RIBEIRO et al., 2005).

10 Resultados e discussão

10.1 Avaliação da toxicidade tópica e de ingestão para a abelha jataí a abamectina e o difenoconazol

Os valores obtidos para LD₅₀ tópico para abamectina em *Tetragoniscaangustula* foram: 2,73 e 1,61 ngi.a./ abelha (tabela 14 e figuras 35 e 32) pelo período de 24 e 48 horas, respectivamente. Os valores para LC₅₀ orais obtidas foram de 1,94 e 0,73 ngi.a./μL, por 24 e 48 horas, respectivamente.

Tabela 11: Valores da toxicidade aguda da abamectina para *Tetragoniscaangustula*

Modo de Exposição	Tempo (horas)	LD ₅₀	LC ₅₀	C.I. _{95%}	X ²	D.F.
Tópico ngi.a./abelha	24	2,73	-	1,18 4,23	1,73	5
	48	1,61	-	0,61 2,53	6,42	5
Ingestão ngi.a./dieta μL	24	-	1,94	0,86 3,02	3,57	5
	48	-	0,73	0,48 2,66	2,77	5

(LD₅₀) média da dose letal; (LC₅₀) Concentração letal; (C.I._{95%}) Intervalo de confiança 95%; (x²) qui-quadrado e (D.F.) grau de liberdade.

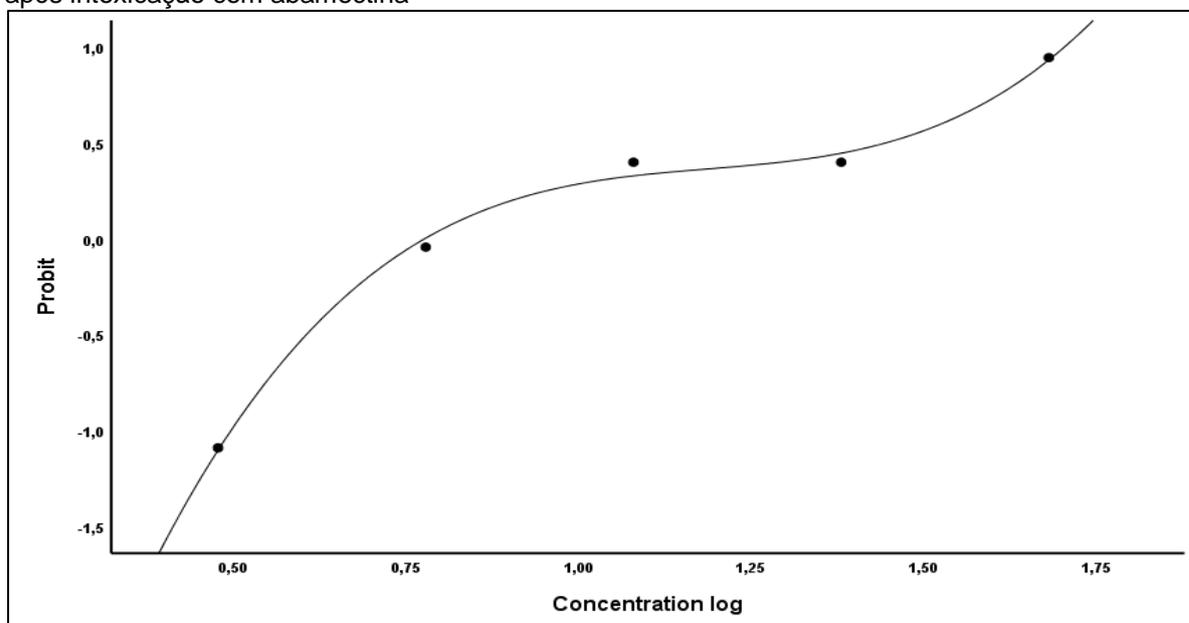
Fonte: Autoria própria

Segundo a classificação de Johansen e Mayer (1990), consideraram que agrotóxicos com LD₅₀ < 2.000 ng/abelha como extremamente tóxico para as abelhas. Embora exista poucos estudos relacionados a toxicidade da abamectina para as abelhas *Tetragoniscaangustula*, os testes realizados com a abamectina, mostrou-se extremamente tóxica para as abelhas. Estudos vêm testando o efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas. Assim, Carvalho et al. (2009) comprovaram que independente do modo de aplicação dos agrotóxicos utilizados na cultura de cítricos os mesmos são extremamente tóxicos para *A. mellifera* africanizada. Assim, o estudo realizado demonstra que os valores médios de LD₅₀ com 95% de confiança determinados para *Tetragoniscaangustula* após a exposição tópica a abamectina são altamente tóxicos.

Os valores médios LD₅₀ determinados para *Tetragoniscaangustula* foram: (24) 2,73ng/abelha, com limite inferior de 1,18 ng/abelha e limite superior de 4,23 ng/abelha e (48h) 1,61 ng/abelha, limites inferior 0,61 ng/abelha e limite superior 2,53 ng/abelha, com valores de qui-quadrado (χ^2) 1,73-6,42 respectivamente. Considerando os valores médios obtidos de LD₅₀ 24 h da exposição tópica para *Tetragoniscaangustula* (2,73 ng/abelha) comparando-o com a abelha *A. mellifera* exposta ao ingrediente ativo (0,0022 μ g/ abelha) DAR (2006)), mostra que *A.mellifera* foi 1,25 vezes mais sensível que a *Tetragoniscaangustula*, por outro lado, ao comparar com o estudo feito por Del Sarto et.al (2014) que utilizou o produto comercial Vertimec (abamectina) e duas espécies de abelhas a *A. mellifera* e a *Meliponaquadrifasciata*, determinaram que a LD₅₀ 7,8 μ g/abelha e LD₅₀ 136,6 μ g/abelha para *Meliponaquadrifasciata* respectivamente, a *A. mellifera* foi 2889 vezes mais sensível que a nativa e essa última por sua vez foi 49 mil vezes mais sensível que a *M. quadrifasciata*.

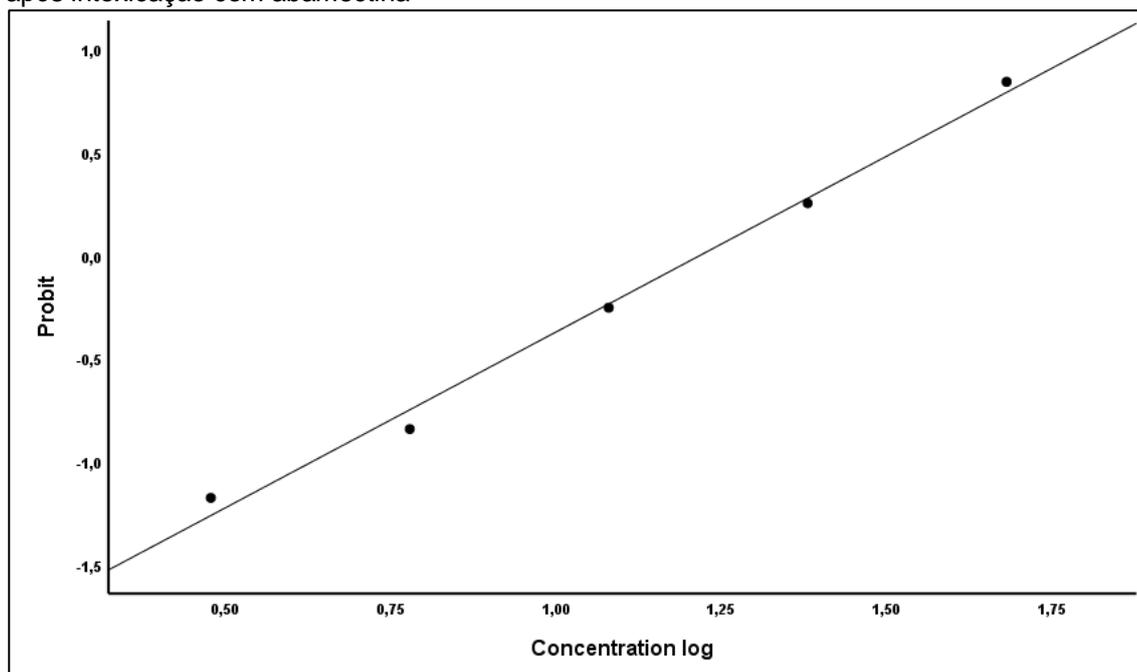
Assim, constata-se que abelha da espécie *A. mellifera* foi mais sensível à abamectina quando exposta topicamente ao composto.

Figura 27: Relação do log da concentração ao valor do probit para *Tetragoniscaangustula* (24 horas) após intoxicação com abamectina



Fonte: Autoria própria

Figura 28: Relação do log da concentração ao valor do probit para *Tetragoniscaangustula* (48 horas) após intoxicação com abamectina



Fonte: Autoria própria

Nossos resultados corroboram com as tendências de avaliação de risco causado por agrotóxicos para as abelhas envolvendo outras espécies além da *A. mellifera*, outros agrotóxicos. A toxicidade dos agrotóxicos (pesticidas) pertencentes da classe das Avermectinas para as abelhas está relacionado ao modo de ação que as avermectinas tem sobre os organismos. Estes compostos atuam como agonistas do ácido gama-aminobutírico (GABA) (Bloomquist, 1996), ligando-se aos receptores GABAérgicos presentes na membrana pós-sináptica estimula o fluxo de íons cloreto para o interior das células nervosas causando a interrupção dos sinais neurais (Tišler e Erŕten, 2006), sendo considerado altamente tóxico para abelhas.

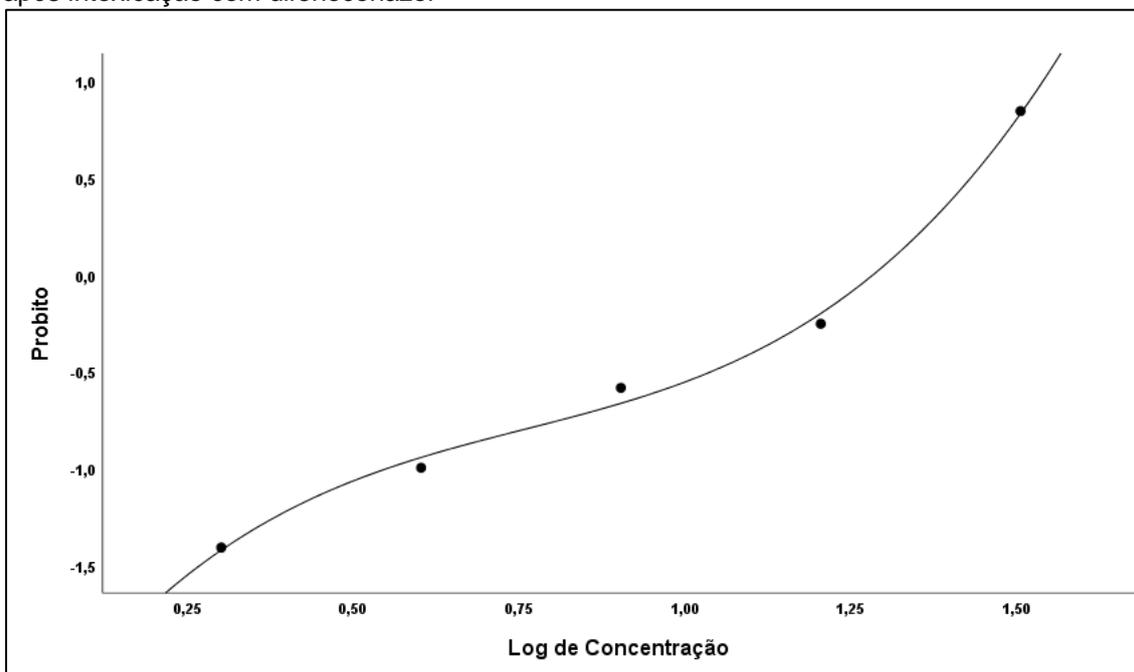
Tabela 12: Valores da toxicidade aguda do difenoconazol para *Tetraginiscaangustula*

Modo de Exposição	Tempo (horas)	LD ₅₀	LC ₅₀	C.I. _{95%}	X ²	D.F.
Tópico ngi.a./abelha	24	-	-	-	-	-
	48	17,70	-	3,80 23,50	1,85	5
Ingestão ngi.a./dieta µL	24	-	-	-	-	-
	48	-	21,00	6,23 27,40	1,94	5

(LD₅₀) média da dose letal; (LC₅₀) Concentração letal; (C.I._{95%}) Intervalo de confiança 95%; (x²) qui-quadrado e (D.F.) grau de liberdade.

Fonte: Autoria própria

Figura 29: Relação do log da concentração ao valor do probit para *Tetragonisca angustula* (48 horas) após intoxicação com difenoconazol



Fonte: Autoria própria

Para o difenoconazol LD_{50} 17,70 ng/ abelha (3,80 – 23,50) ng/abelha e LC_{50} 20,98 ngi.a./ μ L (6,3 – 27,4 ngi.a./ μ L). Dados de 24 horas não foram obtidos estatisticamente. De acordo com Felton et al. (1986) e Johansen & Mayer (1990), que consideram valores de LD_{50} menores do que 1 μ g i.a./abelha como altamente tóxico, o estudo mostrou que a abamectina e o difenoconazol foram altamente tóxicos e moderadamente tóxicos, respectivamente, quando administrados via contato. Mussen et al., (2004), Thompson & Wilkison, (2003) em estudos anteriores indicaram que fungicidas (difenoconazol) comportaram-se como tóxicos para as abelhas, embora ainda sejam escassas as pesquisas e não existem dados sobre o seu efeito tóxico em abelhas nativas. Em termos de relevância ecológica, as doses recomendadas em campo de abamectina e difenoconazol para diferentes cultivos mostram que a DL_{50} tóxica (48h) obtida para o difenoconazol (fungicida) é cerca de 23 vezes mais alta do que a maior dose recomendada (0,75 μ g i.a./uL).

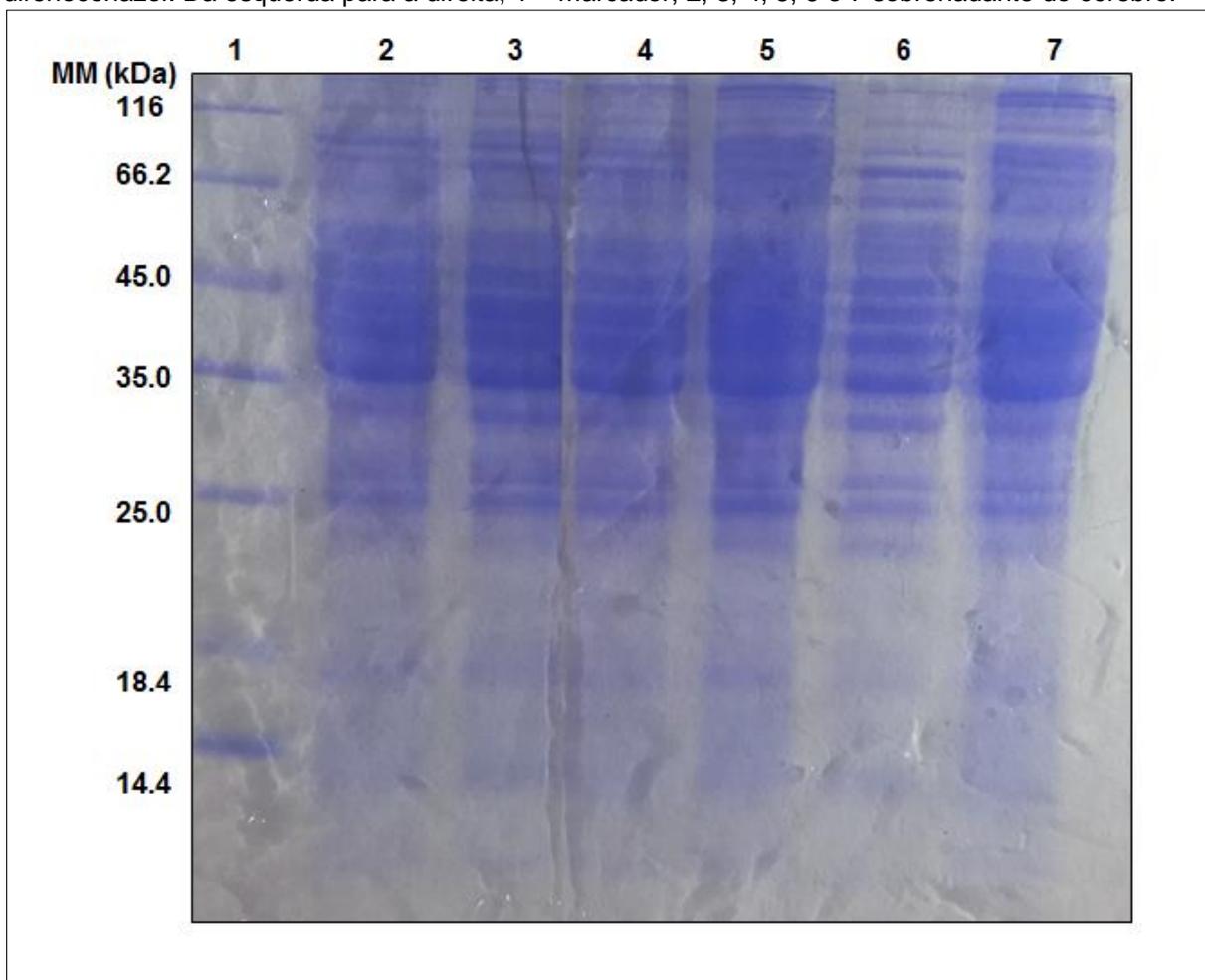
10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A fim de avaliar o conteúdo proteico das amostras obtidas ao final dos testes de toxicidade em abelhas, foi realizada a técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). Em seguida, todas as amostras a serem analisadas receberam tampão de amostra desnaturante (glicerol 20%, β -mercaptoetanol 200 nM, SDS 4 %, Tris-HCl 100 nM pH 6,8)na proporção volumétrica 2 :1 (duas partes da amostra para uma parte do tampão) e foram aquecidas a 95 °C por 5 min antes da aplicação no gel. Além das amostras, foi aplicado ao gel o marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoScientific) para a comparação das bandas de proteínas e estimativa das massas moleculares. A eletroforese foi realizada segundo a metodologia de LAEMMLI (1970), com voltagem entre 120 e 160 V.

Após a eletroforese, o gel foi impregnado com solução corante de Coomassie Brilliant Blue R e então descorado com solução descorante (50% etanol, 10% ácido acético) ou por aquecimento em água destilada para a visualização das bandas proteicas.

As análises em SDS-PAGE (Figura 4) mostraram que os extratos proteicos de cérebro de abelha *Tetragonista angustula* obtidos com o tampão de amostra com β -mercaptoetanol apresentaram bandas que variaram de 20 a 118 kDa. Comparando-se os padrões das bandas, pode-se observar que as amostras obtidas com os tampões β -mercaptoetanol apresentaram na maioria das amostras observadas bandas mais abundantes as proteínas Glutathione Redutase (GR), Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione peroxidase (GPx), que quando analisadas em condições desnaturantes (SDS-PAGE) é visualizada na forma de subunidades maior ou menor, como peso molecular de 118 kDa, 32 kDa e 20kDa, respectivamente

Figura 30: Perfil eletroforético dos cérebros de abelhas expostos aos agrotóxicos abamectina e difenoconazol. Da esquerda para a direita, 1 = marcador, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 sobrenadante do cérebro.



Fonte: Autoria própria

Como foram observadas diferentes bandas em amostras com o tampão, apontou a presença de bandas com massas variando de 20, 32, 40, 57 e 118 kDa, assim, é sugerido que seja realizada uma análise em géis bidimensionais seja utilizadas amostras extraídas com esses dois tipos de tampões, a fim de obter informações precisas acerca dos grupos que pertence às bandas identificadas.

Estudos de proteômica têm sido reportados em diversas matrizes como por exemplo, culturas economicamente importantes, como algodão, café, e soja Morgano et al., (2005), estudo proteômico em fertilidade de machos de espécies domésticas, Barros et al., 2013, análise proteômica da abelha *Apis mellifera* Texeira et al., 2007.

Neste contexto, os estudos proteômicos do cérebro de abelhas *A. mellifera* (HERNANDEZ et al., 2007; ROAT et al., 2007; HUMMON et al., 2006) revelaram

proteínas diferencialmente expressas como resultado de mudanças no comportamento, e na memória e aprendizagem.

Os dados gerados no presente trabalho não nos permitem estimar os números de proteínas obtidos com os diferentes tampões, visto que as análises ficaram restritas a géis unidimensionais, contudo etapas futuras a obtenção de extrato proteico de cérebro de abelhas *Tetragonista angustula* expostas a abamectina e difenoconazol e a subsequente análises em géis bidimensionais proporcionando assim a confirmação da presença de outras proteínas levando ao aprofundamento das alterações causadas por este xenobiotico as abelhas.

11 Conclusão

No presente trabalho, concluímos que o tamanho também pode influenciar na exposição das abelhas aos agrotóxicos. Na exposição por contato por exemplo, para a maioria dos inseticidas, as abelhas são mais susceptíveis provavelmente em função do tamanho corporal, o que corresponde a uma maior superfície de contato proporcionando maior aderência do inseticida ao corpo da abelha Johansen et al. (1983) citado por Mayer and Lunden (1999). Quanto maior é a abelha, menos suscetível ela é a pesticidas concluindo que existe uma relação significativa entre o tamanho e sua susceptibilidade. Thompson (2001), citando estudos de Van der Steen (1994), mostrou que a toxicidade aguda do dimetoato por via de exposição contato e oral para a espécie *B. terrestris* é correlacionado ao tamanho da abelha. Portanto, diferenças de tamanho e peso entre abelhas parecem ser componentes importantes de susceptibilidade das abelhas a inseticidas.

Portanto, diferentes espécies respondem de formas distintas quando expostas a um inseticida. Mesmo dentro de uma espécie, pode haver grandes diferenças entre os indivíduos, atribuída a polimorfismo genético. Estas diferenças podem ser responsáveis por reações idiossincrásicas a um produto e na resposta tóxica entre os indivíduos (Gallo, 2003).

As análises bioquímicas refletiram a capacidade de bioacumulação dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol nos cérebros das abelhas jataí, apesar das diferenças nas concentrações dos agrotóxicos que variaram conforme o tipo de exposição oral e tópica a qual a abelha foi tratada. Os biomarcadores bioquímicos responderam de forma semelhante para as formas de exposição ao contaminante através da inibição da atividade da SOD (superóxido dismutase), porém o tempo de exposição foi um fator importante para diferenciar significativamente a inibição desta enzima indicando que maiores tempos de exposição devem resultar numa maior confiabilidade no uso da atividade da SOD como ferramenta para o monitoramento ambiental dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol.

12 Referência

ADAMS, S. M. et al. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton : Lewis Publishers, 1990. p. 457.

AGUILAR, J. A comunidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) da reserva florestal de Morro Grande, Cotia, São Paulo. 1999.

AHMAD, F. et al. **Pollinators and pollination: a resource book for policy and practice**. [s.l: s.n.].

ALMEIDA DO CARMO, D. et al. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. **Revista Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science: v**, v. 8, n. 1, 2013.

AL-WAILI, N; SALOM, K; AL-GHAMDI, A; ANSARI, MJ. Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. [Internet]. 2012. [Acesso em 2015 maio 15]; volume 2012: p.9. Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/930849>

BIROLO, F. **Dia de Campo na TV - Polinização de abelhas na produtividade do melão - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/dia-de-campo-na-tv/busca-de-noticias/-/noticia/2194956/dia-de-campo-na-tv---polinizacao-de-abelhas-na-productividade-do-melao>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

BUCHMANN, S. L.; NABHAN, G. P. **The forgotten pollinators**. [s.l: s.n.].

BUETTNER, G. R. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535–543, 1 fev. 1993.

CHACOFF, N. P.; AIZEN, M. A. Edge effects on flower-visiting insects in grapefruit plantations bordering premontane subtropical forest. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, n. 1, p. 18–27, 2006.

CICCO, L. H. S. **Abelha - As abelhas e a História - Saúde Animal | Saúde Animal**. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/2015/11/27/as-abelhas-e-a-historia/>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

COLETTI-SILVA, A. **IMPLANTAÇÃO DA MELIPONICULTURA E ETNOBIOLOGIA DE ABELHAS SEM FERRÃO (Melipona) EM COMUNIDADES MANAUS – AM INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA UNIVE**. [s.l: s.n.].

DEPLEDGE, M. H.; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 3, n. 3, p. 161–172, set. 1994.

Freitas, B. M. 1998. Uso de programas racionais de polinização em áreas agrícolas. *MensagemDoce*, 46: 1-6.

Gallo, M. A. 2003. History and scope of toxicology, pp 3-4. In: Klaassen, C. D. & Watkins, J. B (Eds.). *Essentials of Toxicology*. Nova York, McGraw-Hill.

Gusmão, M. R.; Picanço, M.; Goring, A. H. R.; Moura, M. F. 2000. Seletividade Fisiológica de inseticidas a Vespidae Predadores do Bicho-Mineiro-do-Cafeeiro. *Pes. Agropec. Bras.*, Brasília, 35: 681-686.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HERMES-LIMA, M. OXYGEN IN BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY: ROLE OF FREE RADICALS. In: **OXYGEN IN BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY : ROLE OF FREE RADICALS**. [s.l.: s.n.]. p. 616.

HESS, S. C.; PORTO, M. F. D. S. Agrotóxicos : é preciso controlar. p. 1–16, 2014.

HODGSON, & GOLDSTEIN, J. . **Introduction to Biochemical Toxicology : Ernest Hodgson : 9780471333340**. 3. ed. New York: John Wiley and Sons Ltd, 2001.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **As abelhas sociais sem ferrão**. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/beelife/>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

ISLAS-FLORES, H. et al. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 32–38, 2013.

KREMEN, C. POLLINATION SERVICES AND COMMUNITY COMPOSITION: DOES IT DEPEND ON DIVERSITY, ABUNDANCE, BIOMASS, OR SPECIES TRAITS? In: PEREIRA, B. M. F. E J. O. P. (Ed.). . **Solitary Bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza - CE: [s.n.].

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 71–88, 30 dez. 2002.

LACKNER, R. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. **Fish Ecotoxicology**, p. 204–224, 1998.

LARSEN, T. H.; WILLIAMS, N. M.; KREMEN, C. Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. **Ecology Letters**, v. 8, n. 5, p. 538–547, 2005.

Melo, M. A. 2004. Efeito de *Apismellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) sobre a utilização de fontes de pólen por *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apidae) na região de Viçosa, MG. UFV. 58p. Tese de Doutorado em

Entomologia, Universidade Federal de Viçosa.

SOARES, A. E. E. **CAPTURA DE ENXAMES COM CAIXAS ISCAS E SUA IMPORTÂNCIA NO MELHORAMENTO DE ABELHAS AFRICANIZADAS**, 2004.

SOLOMON, M. G.; HOOKER, K. J. M. Chemical Repellents for Reducing Pesticide Hazard to Honeybees in Apple Orchards. **Journal of Apicultural Research**, v. 28, n. 4, p. 223–227, 24 jan. 1989.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. DO S. DE C. ET. AL. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. VIII, n. 3, p. 1–7, 2007.

STEFFAN-DEWENTER, I. et al. Pollinator diversity and crop pollination services are at risk [3] (multiple letters). **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 12, p. 651–652, 2005.

STEGEMAN, J. J. et al. Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. In: **Marine mammal ecotoxicology : impacts of multiple stressors on population health**. Boca Raton: En: Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Huggett R.J.; R.A. Kimerle, P.M. Mehrle Jr. & H.L. Bergman, Eds.; SETAC-Lewis Publishers, Boca Raton, 235-335., 1992. p. 512.

STOPPELLI, I. M. DE B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. suppl, p. 91–100, dez. 2005.

Capítulo 4: Conclusões gerais

Os resultados indicam que o método desenvolvido para determinação por LCMSMS dos agrotóxicos abamectina e difenocoanazol, em morango, abelha e mel, em obteve o melhor preparo de amostra utilizando a versão QuEChERS CEN15662 modificada, o solvente de extração acetonitrila, 4 g de sulfato de magnésio por 5 g de amostra de morango e mel e 0,3 g de abelhas como agente secante e 50 mg do sorvente PSA e 50 mg de C18 para a etapa de clean-up.

O método desenvolvido e validado para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de morango por determinação LCMSMS apresentou-se seletivo, exato e preciso, com valores de recuperação e CV nos intervalos recomendados pelos guias de validações, e permitiu detectar e quantificar analitos em concentrações inferiores aos LMR impostos pelas agências reguladoras.

Os ensaios toxicológico e bioquímico com abamectina e difenoconazol apresentaram resultados relevantes, reforçando assim a validade do uso de espécies nativas em ensaios ecotoxicológicos;

Os ensaios de toxicidade feitos com *Tetragonistaangustula* mostraram que os testes de toxicidade aguda são testes rápidos, de fácil execução, de baixo custo e excelentes indicadores dos efeitos danosos dos compostos-teste.

Capítulo 5: Considerações finais e recomendações para trabalhos futuros

Através da determinação de multirresíduos de agrotóxicos utilizando a técnica LCMSMS é possível mensurar os impactos dos contaminantes sobre os alimentos objeto de estudo, a biota local, podendo estabelecer limites para descarte de efluentes que contenham essas substâncias. No presente estudo, foram feitos testes de toxicidade aguda para os agrotóxicos abamectina e difenoconazol. Dados de toxicidade aguda para espécies de abelhas nativas são escassos na literatura, bem como as distribuições de sensibilidade dessas espécies aos agrotóxicos, além disso, testes de toxicidade elaborados com abelhas nativas mostraram-se um importante endpointecotoxicológico a ser mais explorado.

Dessa forma, os resultados gerados neste estudo mostram-se de vital importância para a conscientização e a divulgação da problemática associada ao uso dos excessivo de agrotóxicos, seus problemas em relação com os organismos não alvos com por exemplo as abelhas e impactos no meio ambiente.

Em relação às recomendações para trabalhos futuros, percebe-se a necessidade de ampliar os estudos referentes aos biomarcadores, o estudo da palinologia, afinal existe diversas espécies botânicas devido à diversidade da flora apícola, mas provavelmente inúmeras espécies ainda não foram observadas pelo produtor apícola ou descritas na literatura científica.

Explorar novos organismos não alvos para avaliar o risco dos agrotóxicos abamectina e difenoconazol e aos produtos de degradação, bem como aos metabólitos gerados pela interação com os organismos e explorar estudos com misturas de compostos, e estudos para identificar outros mecanismos de ação desses compostos.

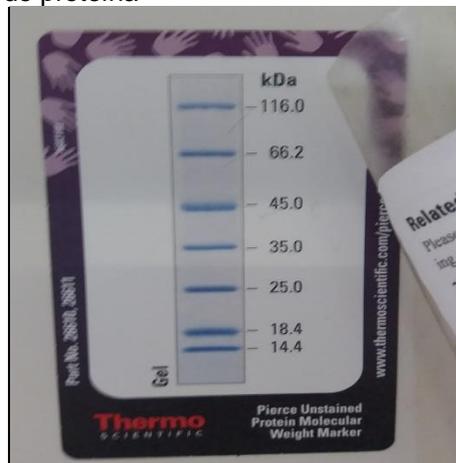
Apêndices

Figura 31: Flore e frutos do morango



Fonte: Autoria própria

Figura 32: Marcador molecular de proteína



Fonte: Autoria própria

Figura 33: Cuba de eletroforese

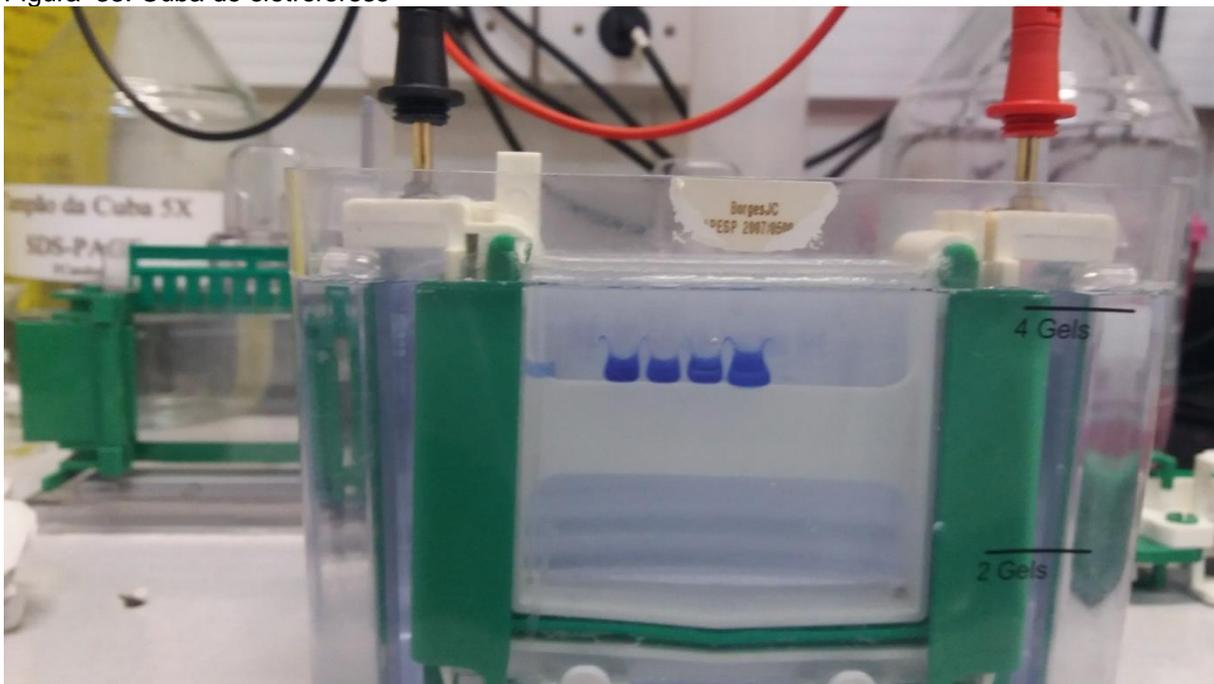


Figura 34: Homogenato de cérebro de abelhas jataí com marcadores

