

Dourados, MS / Maio, 2024

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL



Método analítico multirresíduo para determinação de inseticidas e seus produtos de degradação em abelhas

Rômulo Penna Scorza Júnior⁽¹⁾, Karina Sayuri de Aquino Hayashida⁽²⁾ e Irzo Isaac Rosa Portilho⁽³⁾

⁽¹⁾ Pesquisador, Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS. ⁽²⁾ Estagiária, Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS. ⁽³⁾ Bolsista de Inovação Tecnológica, Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS.

Resumo – A apicultura é uma atividade essencial para a manutenção da biodiversidade e segurança alimentar global. Porém, vem sendo afetada com eventos de perdas de colmeias por contaminação com agrotóxicos, que são geralmente pulverizados em culturas vizinhas aos apiários. Diante disso, trabalhos de monitoramento são importantes, os quais precisam de métodos analíticos confiáveis. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico multirresíduo para identificação e quantificação de 21 inseticidas e seus produtos de degradação em abelhas. Para extração e limpeza dos extratos, utilizou-se o protocolo QuEChERS com adaptações, sendo a identificação e quantificação dos inseticidas e seus produtos de degradação feita por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os critérios de desempenho e aceitação do método foram seletividade, efeito de matriz, linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão. Observou-se efeito de matriz para grande parte dos analitos, indicando a necessidade de curvas analíticas baseadas na matriz (extratos de abelhas). Os valores de recuperação variaram de 82 a 109%, com precisão inferior a 20%. Os valores dos limites de quantificação (LQ) foram de 0,680 ng g⁻¹ para quase a totalidade dos agrotóxicos e produtos de degradação, com exceção do clorpirifós, que foi de 1,36 ng g⁻¹. Em síntese, o método desenvolvido pode ser utilizado como uma ferramenta em trabalhos de monitoramento, para avaliação da exposição e mortalidade de abelhas aos 21 inseticidas e produtos de degradação considerados, incluindo os neonicotinóides e o fipronil.

Termos para indexação: agrotóxicos, apicultura, QuEChERS, validação de método, UHPLC-MS-MS, mortalidade de abelhas.

Multiresidue analytical method for determination of insecticides and their degradation products in bees

Abstract – Beekeeping is an essential activity for maintaining biodiversity and global food security. However, it has been affected by events involving the loss of hives due to contamination with pesticides, which are generally sprayed on crops nearby apiaries. Therefore, monitoring work is important, which requires reliable analytical methods. This work aimed to develop and validate a

Embrapa Agropecuária Oeste

Rodovia BR-163, Km 253,6
Trecho Dourados-Caarapó
Caixa Postal 449
79804-970 Dourados, MS
www.embrapa.br/agropecuaria-oeste
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Rafael Zanoni Fontes

Secretário-executivo

Rômulo Penna Scorza Júnior

Secretário

Gustavo Henrique Pinto

Membros

Adriana Marlene Moreno Pires,
Alexandre Dinnys Roese, Fernando
Mendes Lamas, Guilherme
Lafourcade Asmus, Marciana
Retore, Maria Aparecida Viegas
Martins e Sílvia Mara Belloni

Edição executiva

Eliete do Nascimento Ferreira

Revisão de texto

Eliete do Nascimento Ferreira

Normalização bibliográfica

Sílvia Mara Belloni (CRB-1/1662)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Eliete do Nascimento Ferreira

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

multi-residue analytical method to identify and quantify 21 insecticides and degradation products in bees. For extraction and cleaning of the extracts, the QuEChERS protocol with adaptations was used, with the identification and quantification of insecticides and their degradation products carried out by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The performance and acceptance criteria of the method were selectivity, matrix effect, linearity, limits of detection and quantification, recovery, and precision. A matrix effect was observed for most of the analytes, indicating the need for matrix-matched analytical curves (bee extracts). Recovery values ranged from 82 to 109%, with precision below 20%. The values of limit of quantification (LQ) were 0.680 ng g⁻¹ for almost all pesticides and degradation products, except for chlorpyrifos where this value was 1.36 ng g⁻¹. In summary, the developed method can be used as a tool in monitoring work to evaluate the exposure and mortality of bees to the 21 insecticides and degradation products considered, including neonicotinoids and fipronil.

Index terms: pesticides, beekeeping, QuEChERS, method validation, UHPLC-MS-MS, bee mortality.

Introdução

A apicultura é uma importante prática socioeconômica no Brasil. Em 2022, estima-se que a produção de mel no Brasil foi de 61 mil toneladas, correspondendo a um valor de produção igual a R\$ 957 milhões (IBGE, 2024). Desse montante de produção, 61% são destinados à exportação para os Estados Unidos, Alemanha e Canadá (ABEMEL, 2024). Os principais estados brasileiros produtores de mel são Rio Grande do Sul, Paraná, Piauí, Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Santa Catarina. Mato Grosso do Sul ocupa a 14^a posição, com uma produção igual a 719 mil toneladas (IBGE, 2024). De maneira geral, a produção de mel no Brasil tem crescido ao longo dos anos, passando de 16 mil toneladas em 1990 para 61 mil toneladas em 2022 (aumento de 281% em 34 anos). Com base no último censo agropecuário de 2017, estima-se que o Brasil possuía em torno de 102 mil estabelecimentos com apicultura (IBGE, 2017). Salienta-se que, além do mel, outros produtos importantes com valor comercial são obtidos da apicultura, como, por exemplo, própolis, geleia real, pólen e cera.

Além da importância socioeconômica, a apicultura também presta um importante serviço ambiental. Por meio da polinização, as abelhas ajudam na manutenção da biodiversidade ao atuar na

reprodução das plantas e, dessa forma, ajudam no aumento sustentável da produtividade agrícola. Estima-se que 60% das culturas no Brasil, para produção de alimentos, bioenergia e fibras, dependem, em certo grau, de polinizadores, com as abelhas representando 87% dessas espécies polinizadoras (A.B.E.L.H.A., 2024). Algumas culturas são altamente dependentes da polinização, como, por exemplo, maracujá, maçã, melão, melancia, canola, caju, acerola, tomate, abóbora, cajá, girassol, goiaba, pepino e castanha-do-brasil. Já outras se beneficiam com aumento de produção quando visitadas pelas abelhas, dentre as quais soja, algodão, feijão, café e laranja. Importante salientar que alguns produtores têm utilizado a polinização assistida por meio de aluguel de colmeias, com o objetivo de aumentar a polinização e garantir a produção, como na cultura da maçã, em Santa Catarina, e do melão, no Rio Grande do Norte e Ceará (A.B.E.L.H.A., 2024).

Dentre as atividades que podem ser prejudiciais às abelhas, caso não sejam observadas as boas práticas agrícolas, têm-se o uso de agrotóxicos. Uma das principais rotas de exposição das abelhas aos agrotóxicos é a deriva desses produtos durante a pulverização, que corresponde aos deslocamentos das gotículas pelo vento para fora do alvo (área da cultura a ser tratada). A deriva é especialmente preocupante quando as pulverizações são feitas em áreas próximas às colmeias, pois podem facilmente atingi-las e causar intoxicação nas abelhas (Tudi et al., 2021). Outra rota de exposição das abelhas aos agrotóxicos ocorre durante sua visitação em áreas tratadas com esses produtos, principalmente quando as culturas estão em estágio de floração.

Assim, considerando a importância das abelhas para manutenção da biodiversidade e produção de alimentos, bem como o cenário agrícola atual de uso de agrotóxicos, é necessário que se tome medidas para mitigar ou atenuar possíveis impactos negativos dos agrotóxicos sobre elas. Para tal, é importante que se faça estudos de monitoramento confiáveis dos resíduos de agrotóxicos, principalmente os inseticidas, em eventos de perdas de colônias. Castilhos et al. (2019) realizaram um amplo monitoramento dos resíduos de inseticidas neonicotinoides e fipronil em áreas rurais de sete estados brasileiros (MT, MS, RS, SC, SP, MG e RN), tendo observado as maiores frequências de fipronil (55%) e tiametoxam (20%) nas abelhas vivas e mortas.

Uma das primeiras etapas em programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos é o desenvolvimento de um método analítico confiável, robusto e relevante (inclua os agrotóxicos de interesse). Um método bastante difundido na preparação de amostras para análise de agrotóxicos é o QuEChERS (acrônimo de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), que foi idealizado e desenvolvido por Anastassiades et al. (2003). Inicialmente, este método era utilizado para a análise de agrotóxicos em amostras de alimentos, mas, ao longo dos anos, foi sendo adaptado para outras matrizes, incluindo as ambientais (Kim et al., 2019; Perestrelo et al., 2019; Scorza Júnior & Portilho, 2021).

Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e a validação de um método analítico multirresíduo, incluindo 21 inseticidas e seus produtos de degradação, para identificação e quantificação de seus resíduos em amostras de abelhas.

Material e métodos

Seleção dos agrotóxicos e preparo das soluções

Os inseticidas e seus produtos de degradação considerados no método foram selecionados com base naqueles mais utilizados nas principais culturas do estado de Mato Grosso do Sul (soja, milho e cana-de-açúcar). Considerou-se, também, a obrigatoriedade de incluir alguns inseticidas da classe dos neonicotinoides, bem como o fipronil e seus produtos de degradação, diante das inúmeras evidências de maior efeito deletério desses às abelhas (Blacquièrre et al., 2012; Goñalons; Farina, 2015; Wright et al., 2015). Na Tabela 1 é apresentada a caracterização físico-química de cada inseticida e produto de degradação considerado no método. Observa-se uma variabilidade de solubilidade em água e polaridade entre os 21 compostos, sendo a maioria neutra ou não ionizável (ausência de valores de pKa).

Os padrões analíticos de cada inseticida e seus produtos de degradação foram obtidos das empresas Sigma Aldrich®, ChemService®, Dr. Ehrenstorfer GmbH® e Fluka®. Para cada solução estoque, pesou-se 10 mg do padrão analítico, que foi dissolvido em 10 mL de acetona grau HPLC (concentração de 1 mg mL⁻¹). A solução de trabalho, na concentração de 100 µg mL⁻¹ em metanol grau HPLC, foi preparada a partir da solução estoque, com evaporação total da acetona da alíquota utilizada. A partir das soluções de trabalho individuais, preparou-se uma solução “mix” de trabalho (contendo

todos os inseticidas e seus produtos de degradação) em metanol grau LC-MS na concentração de 100 µg L⁻¹. As soluções com as concentrações correspondentes aos pontos da curva analítica de calibração (0,500; 1; 2; 5; 10; 20, 50 e 100 µg L⁻¹) foram preparadas a partir da solução “mix” de trabalho.

Instrumentação e condições cromatográficas

Para identificação e quantificação dos inseticidas e seus produtos de degradação utilizou-se um cromatógrafo líquido de ultra performance (modelo H-Class) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (modelo Xevo-TQD), ambos da marca Waters®, bem como a coluna cromatográfica BEH C18 1,7 µm x 2,1 x 100 mm. O sistema operou em modo gradiente com fase móvel composta por: (A) água com acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ e (B) metanol com acetato de amônio 10 mmol L⁻¹. Utilizou-se 10 µL de amostra para a injeção e estabeleceu-se a temperatura da coluna em 45 °C com fluxo de 0,4 mL min⁻¹. A injeção da amostra iniciou com 50% de A e assim permaneceu até o tempo 0,8 min. Posteriormente, a proporção das soluções foi sendo alterada gradativamente até o tempo 8,75 min, onde B atingiu 99% da constituição da fase móvel, continuando assim até o tempo de 14 min, com tempo total da análise de 17 min.

As condições de otimização do espectrômetro de massas foram: capilar de 1 kV, extrator de 3 V, temperatura da fonte de 150 °C, temperatura de dessolvatação de 400 °C, fluxo do gás de dessolvatação igual a 1.000 L h⁻¹ e do cone igual a 70 L h⁻¹. Os parâmetros de detecção foram otimizados fazendo-se infusões individuais dos compostos em concentrações de 1,00 µg mL⁻¹. Foram monitorados dois íons de transição, sendo o mais intenso para quantificação e o segundo mais intenso para confirmação.

Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros de aquisição dos diferentes inseticidas e seus produtos de degradação. O método adotado para o monitoramento das amostras foi o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Para confirmação das moléculas foram adotados os seguintes critérios: tempo de retenção (variação máxima de ± 2,5%); presença dos íons precursor ou molecular, de quantificação e de confirmação; a razão entre os íons de quantificação e confirmação não ultrapasse 30%.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos inseticidas e produtos de degradação considerados no método analítico multirresíduo.

Inseticida ou produto de degradação	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	pKa	Log P
Acefato	183,20	600	8,4	-0,90
Carbofurano	221,30	322	—	1,80
Carbosulfano	380,50	0,110	—	7,40
Clorantraniliprole	483,20	0,880	10,9	2,90
Clorpirifós	350,60	1,05	—	4,70
Clotianidina	249,70	340	11,10	0,90
Dimetoato	229,30	25.900	—	0,80
Fipronil	437,10	3,78	—	3,80
Fipronil dessulfenil	389,10	0,950	—	...
Fipronil sulfeto	421,10	0,540	—	...
Fipronil sulfona	453,10	0,160	—	...
Flubendiamida	682,40	0,0290	—	4,10
Imidacloprido	255,60	610	—	0,60
Metamidofós	141,10	200.000	—	-0,80
Metomil	162,20	55.000	—	0,10
Metoxifenoazida	368,50	3,30	12,20	3,70
Novalurom	492,70	0,00300	—	4,30
Profenofós	373,60	28,0	—	1,70
Tebufofenazida	353,50	0,830	—	4,30
Tiametoxam	291,70	4.100	—	-0,10
Triflumurom	358,70	0,0400	—	4,90

pKa = constante de equilíbrio de ionização do ácido; Log P = coeficiente de partição entre n-octanol e água.

Três-pontos (...): informação não disponível.

Traço (—): informação não aplicável.

Fonte: Lewis et al. (2016).

Tabela 2. Parâmetros de aquisição do espectrômetro de massas para os inseticidas e produtos de degradação do método multirresíduo.

Inseticida ou produto de degradação	Modo ESI	TR (min)	Íon molecular (m/z)	Cone (V)	Íons fragmentos (m/z)	
					Quantificação	Confirmação
Acefato	+	0,93	184,1	17	143 (8) ⁽¹⁾	125,1 (18) ⁽¹⁾
Carbofurano	+	5,69	222,3	25	1.652 (12)	123 (20)
Carbosulfano	+	7,28	381,0	40	118 (22)	76 (34)
Clorantiraniliprole	+	6,86	484,0	30	453 (20)	286 (15)
Clorpirifós	+	9,07	349,9	25	97 (30)	198 (20)
Clotianidina	+	3,15	250,2	24	196 (12)	132 (18)
Dimetoato	+	3,63	230,1	20	199 (10)	125 (20)
Fipronil	-	7,91	435,1	30	330 (15)	250 (25)
Fipronil dessulfenil	-	7,79	389,0	25	351 (15)	331 (27)
Fipronil sulfeto	-	8,01	419,0	30	262 (28)	383 (13)
Fipronil sulfona	-	8,16	451,0	30	415 (17)	282 (27)
Flubendiamida	-	8,00	681,0	35	254 (30)	274 (15)
Imidacloprido	+	3,17	256,1	34	209,1 (15)	175,1 (20)
Metamidofós	+	0,87	142,0	28	93,9 (13)	124,9 (13)
Metomil	+	1,79	163,1	15	88 (10)	106 (10)
Metoxifenoazida	+	7,41	369,1	20	149,1 (20)	313,2 (5)
Novalurom	+	8,63	493,0	35	158 (20)	141 (45)
Profenofós	+	8,79	372,9	30	302,6 (20)	127,9 (40)
Tebufenozida	+	7,93	353,1	20	133 (25)	297 (10)
Tiametoxam	+	1,96	292,0	28	211,2 (12)	132 (22)
Triflumurom	+	8,28	359,0	31	156,1 (16)	139,1 (35)

ESI = ionização por eletrospray; TR = tempo de retenção.

⁽¹⁾O valor entre parêntesis se refere à energia de colisão (eV).

Preparo das amostras e método de extração

As amostras de abelhas utilizadas para o desenvolvimento e a validação do método analítico foram fornecidas por apicultores na região de Dourados, MS. As amostras de abelhas foram mantidas sob refrigeração a -20°C , no Laboratório de Análises Ambientais da Embrapa Agropecuária Oeste, após identificação. Posteriormente, as abelhas foram liofilizadas a -45°C durante um período de 48 horas e trituradas em moinho analítico, sendo novamente armazenadas a -20°C até o momento da análise (Figura 1).

O método desenvolvido e validado foi baseado no protocolo QuEChERS (Anastassiades et al., 2003; 2007) com algumas modificações. A Figura 2 apresenta um fluxograma detalhado do método. Para a extração dos compostos, utilizou-se 5 g da amostra triturada em um tubo de centrifuga (tipo Falcon) de 50 mL, onde foram adicionados 17 mL de acetonitrila (grau HPLC) e 4 mL de água ultrapura. Posteriormente, os tubos foram deixados em

banho-maria a 60°C por 5 minutos e, em seguida, para agitação a 2.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1,50 g de NaCl e 6 g de MgSO_4 e, novamente, levados para agitação a 2.000 rpm por 10 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm a 22°C por 10 minutos. A limpeza do extrato (6,5 mL do sobrenadante) foi feita adicionando-se 300 mg de PSA, 300 mg de C18 e 400 mg de MgSO_4 em um tubo tipo Falcon de 15 mL. Após a limpeza, os tubos foram levados para agitação a 2.000 rpm por 10 minutos e centrifugação a 10.000 rpm a 22°C por 10 minutos. Após a centrifugação, retirou-se 5 mL do sobrenadante, que foi levado para evaporação utilizando nitrogênio. O extrato totalmente seco foi retomado em 1 mL de $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (50:50 v/v) 10 mmol L^{-1} de acetato de amônio. Em seguida, procedeu-se com a filtração utilizando filtro para seringa de celulose regenerada 0,22 μm e injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

Fotos: Rômulo Perna Scorza Júnior

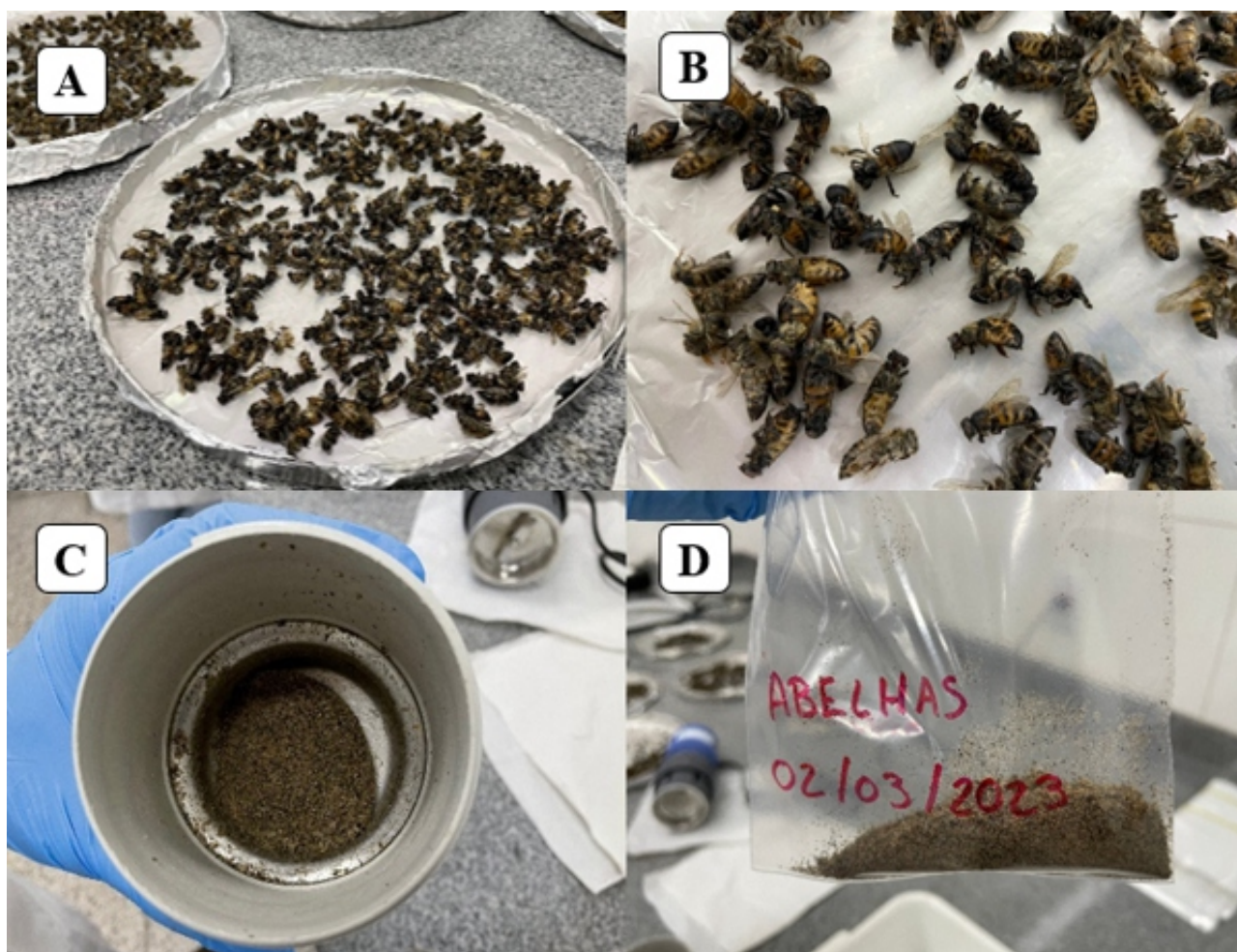


Figura 1. Amostras de abelhas preparadas para liofilização (A), abelhas liofilizadas (B), amostras de abelhas após a trituração (C) e amostras de abelhas prontas para o armazenamento e posterior extração (D).

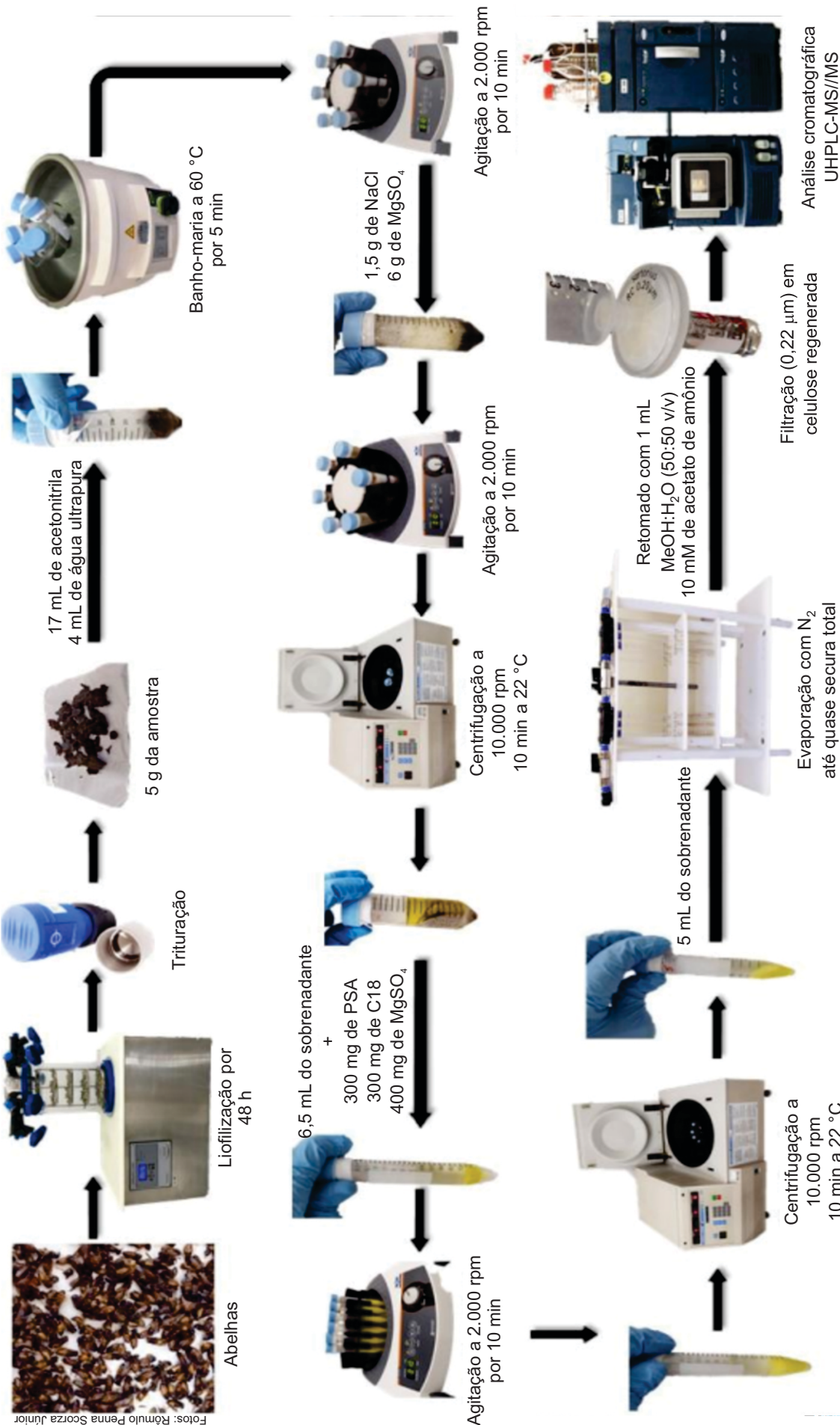


Figura 2. Fluxograma do método analítico para a detecção dos 21 inseticidas e produtos de degradação.

Ilustração: Thiago Luis Aguayo de Castro.

Parâmetros de validação do método

Para validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito de matriz, linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão. Os critérios de aceitação dos parâmetros foram baseados conforme o documento “Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008 do Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020).

A seletividade de um método corresponde a sua capacidade de distinguir e quantificar os analitos quando estão em meio a possíveis interferentes da matriz a ser analisada. Deve ser o primeiro parâmetro a ser avaliado na validação de um método analítico porque pode comprometer o desempenho dos outros parâmetros. Para avaliar a seletividade do método aos 21 inseticidas e produtos de degradação, comparou-se os cromatogramas de uma amostra “branco” (amostra não fortificada) com uma amostra preparada com as menores concentrações da solução “mix” de trabalho. Como critério de aceitação da seletividade, os cromatogramas da amostra “branco” não poderiam apresentar picos interferentes com áreas maiores que 30% em relação à amostra fortificada, nos respectivos tempos de retenção dos analitos.

A influência que a matriz do extrato de abelha tem sobre o sinal analítico dos 21 inseticidas e produtos de degradação deve ser avaliada na validação do método. Essa possível influência é denominada de efeito de matriz e ocorre porque alguns compostos presentes na matriz podem aumentar ou diminuir a ionização dos analitos na fonte de ionização do espectrômetro de massas e, por consequência, aumentar ou diminuir o sinal analítico (Saibt, 2022). Quando existe efeito de matriz, faz-se necessária a construção da curva de calibração na presença dessa matriz. A estimativa do efeito de matriz (EM) é calculada utilizando as inclinações das curvas de calibração na matriz e na fase móvel de cada composto (Vázquez et al., 2015), por meio da seguinte equação:

$$EM \% = \left(\frac{b_{matriz}}{b_{fase\ móvel}} - 1 \right) \times 100$$

em que

b_{matriz} : inclinação da curva analítica preparada na matriz.

$b_{fase\ móvel}$: inclinação da curva analítica preparada na fase móvel.

A linearidade é outro importante parâmetro a ser avaliado na validação de métodos, pois assegura que os resultados obtidos sejam proporcionais às concentrações dos analitos nas amostras em uma determinada faixa linear de trabalho (INMETRO, 2020). A linearidade do método é calculada por meio do coeficiente de determinação (R^2) das curvas analíticas de calibração, estabelecendo-se como aceitáveis valores superiores a 0,98.

A recuperação de um método mede sua eficiência de extração dos compostos de interesse (nesse caso os agrotóxicos e produtos de degradação) e a precisão mede a repetibilidade dos resultados obtidos (INMETRO, 2020). Para avaliar a recuperação do método em questão, as amostras de abelhas trituradas foram fortificadas com três concentrações (0,68; 1,36 e 3,40 ng g⁻¹) dos diferentes inseticidas e produtos de degradação, considerando cinco repetições para cada concentração avaliada. As amostras de cada repetição foram injetadas em duplicata. Foram considerados aceitáveis valores de recuperação entre 70 a 120% e precisão inferior a 20%, para cada agrotóxico ou produto de degradação.

O LQ do método foi estabelecido como sendo a menor concentração na curva analítica, que atendeu os parâmetros de recuperação entre 70 e 120% e precisão menor que 20% (INMETRO, 2020). O Limite de detecção (LD) do método foi considerado igual ao LQ.

Resultados e discussão

O método foi considerado seletivo para os 21 compostos em estudo, uma vez que o branco não apresentou picos interferentes com áreas maiores que 30% em relação à amostra fortificada, nos respectivos tempos de retenção dos analitos. A título de exemplo, na Figura 3 apresenta-se o cromatograma do experimento de seletividade para o inseticida novalurom. Verifica-se a ausência de picos interferentes em seu tempo de retenção (8,63 min) para ambos os íons de quantificação (m/z 158) e confirmação (m/z 141), na amostra “branco” da matriz abelha. Também são apresentados o cromatograma da curva de calibração analítica na concentração de 1,00 µg L⁻¹ na matriz abelha e o cromatograma do experimento de recuperação na concentração de 1,00 µg L⁻¹ (correspondente a 0,68 ng g⁻¹).

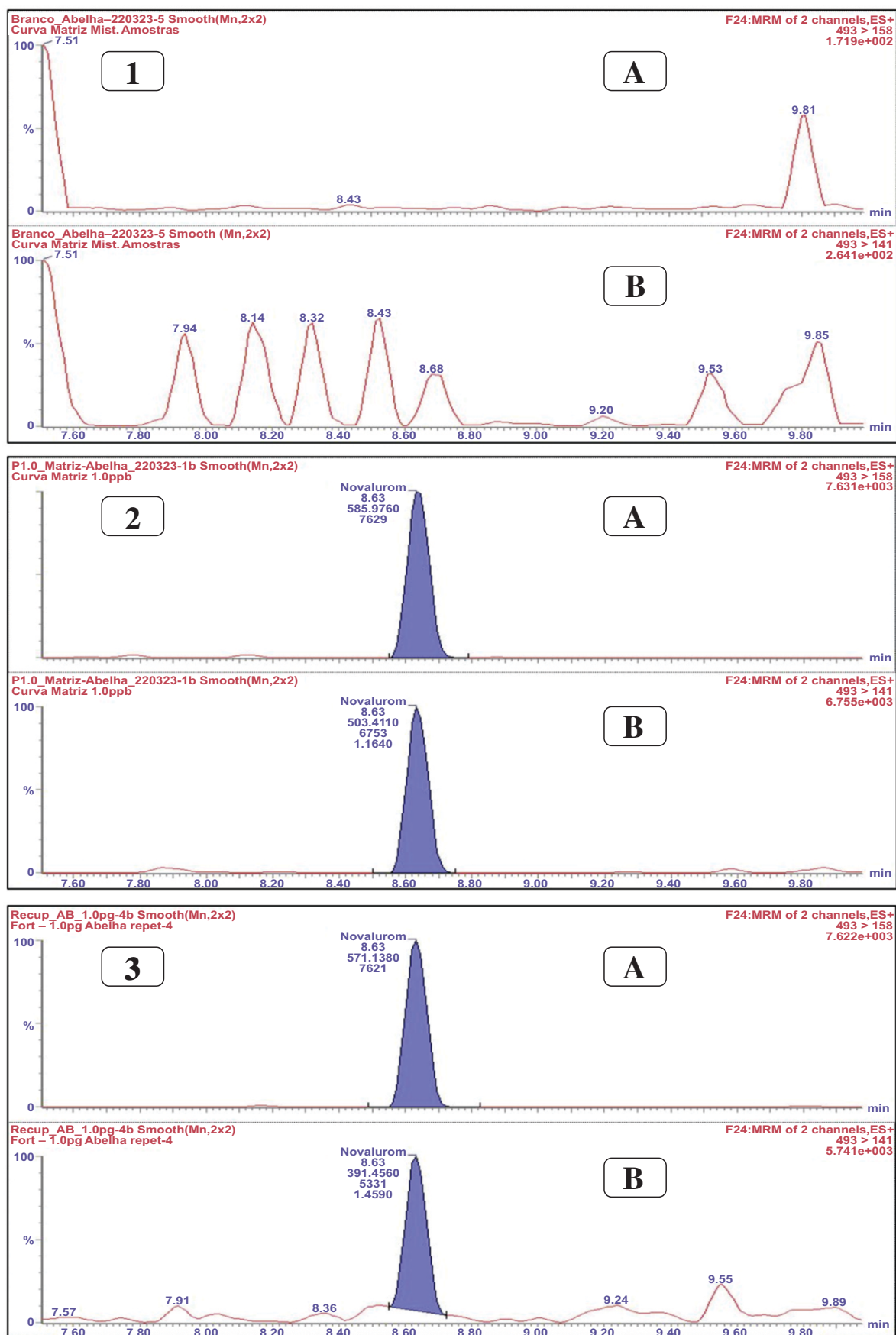


Figura 3. 1) Cromatograma do inseticida novaluron (TR = 8,63 min) na amostra “branco” na matriz abelha. 2) Cromatograma do inseticida novaluron na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizada na construção da curva analítica de calibração na matriz abelha. 3) Cromatograma do experimento de recuperação do inseticida novaluron na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $0,68 \text{ ng g}^{-1}$, correspondente ao limite de quantificação deste composto. A) íons de quantificação; B) íons de confirmação.

Os valores do efeito de matriz (%) para cada inseticida e produto de degradação são apresentados na Figura 4. Observa-se que os valores do efeito de matriz que extrapolam os limites de $\pm 20\%$ ocorreram para sete analitos (acefato, carbofurano, clotianidina, dimetoato, metamidofós, metomil e clorpirifós) dos 21 compostos analisados. Dentre esses, observa-se supressão de sinal (efeito de matriz negativo) para seis desses compostos, ao passo que para o clorpirifós houve aumento de sinal (efeito de matriz positivo). O efeito de matriz também é percebido na Figura 5, em que as inclinações das curvas analíticas na matriz e fase móvel são mais discrepantes para os compostos que apresentam os maiores valores de efeito de matriz (por exemplo, o metamidofós e o clorpirifós). Já para os compostos que apresentam baixo efeito de matriz, as curvas de calibração são próximas, ocasionando uma pequena diferença nas

inclinações (por exemplo, fipronil e flubendiamida). Diante disso, concluiu-se pela obrigatoriedade de construção da curva de calibração na matriz abelha e não na fase móvel. Dessa forma, tem-se uma correta quantificação dos agrotóxicos e produtos de degradação no método em questão. Importante salientar que o efeito de matriz é dependente da molécula e da matriz analisada (Niessen et al., 2006).

Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) das curvas de calibração e a faixa linear de trabalho de cada composto são mostrados na Tabela 3. Para a maioria dos compostos, os valores de R^2 foram superiores a 0,99, com exceção da flubendramida, que apresentou valor próximo de 0,98. Dessa forma, considera-se que as curvas de calibração apresentaram linearidade satisfatória.

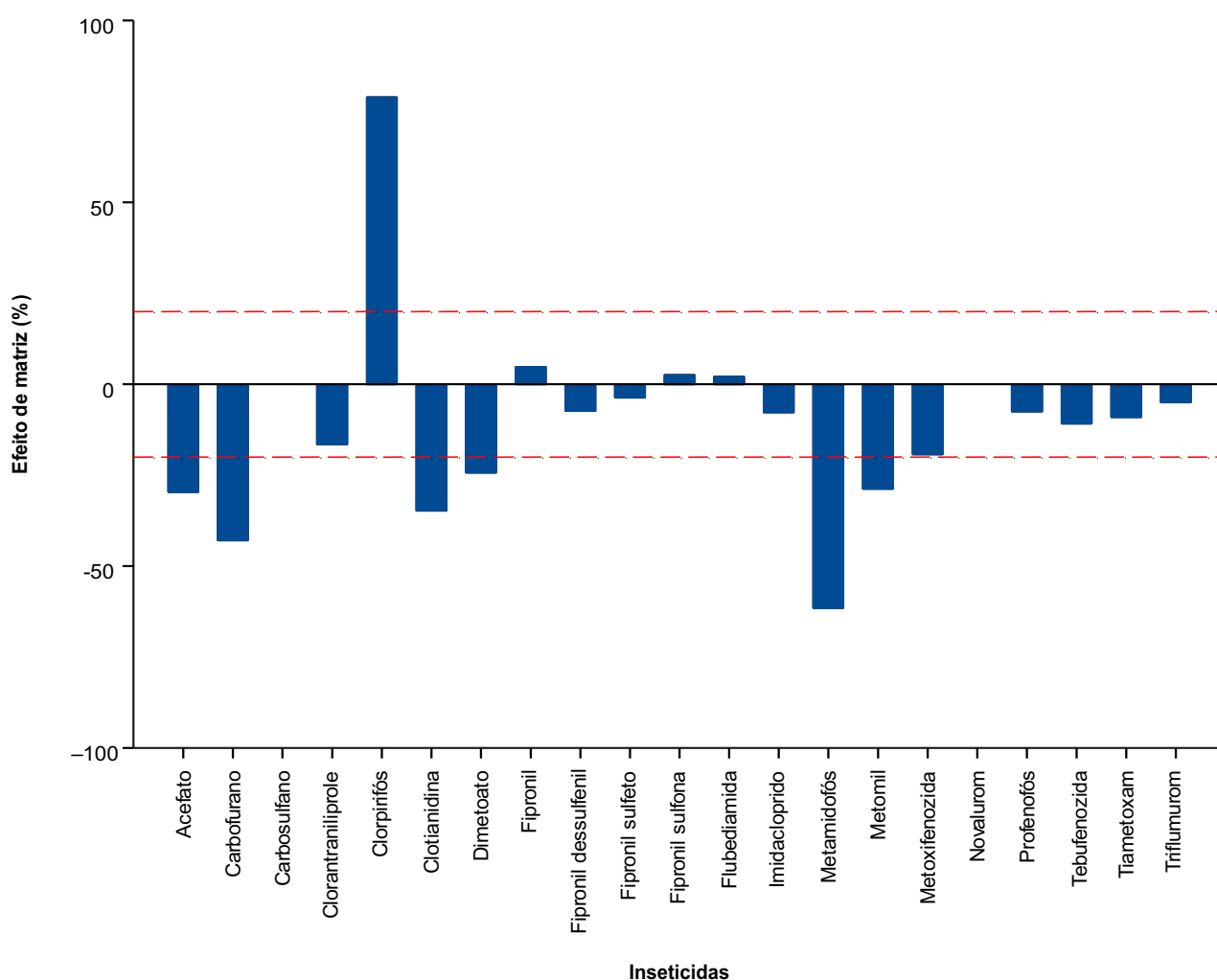


Figura 4. Efeitos de matriz dos 21 inseticidas e produtos de degradação na matriz de abelha. As linhas tracejadas na cor vermelha indicam os limites aceitáveis ($\pm 20\%$) do efeito de matriz.

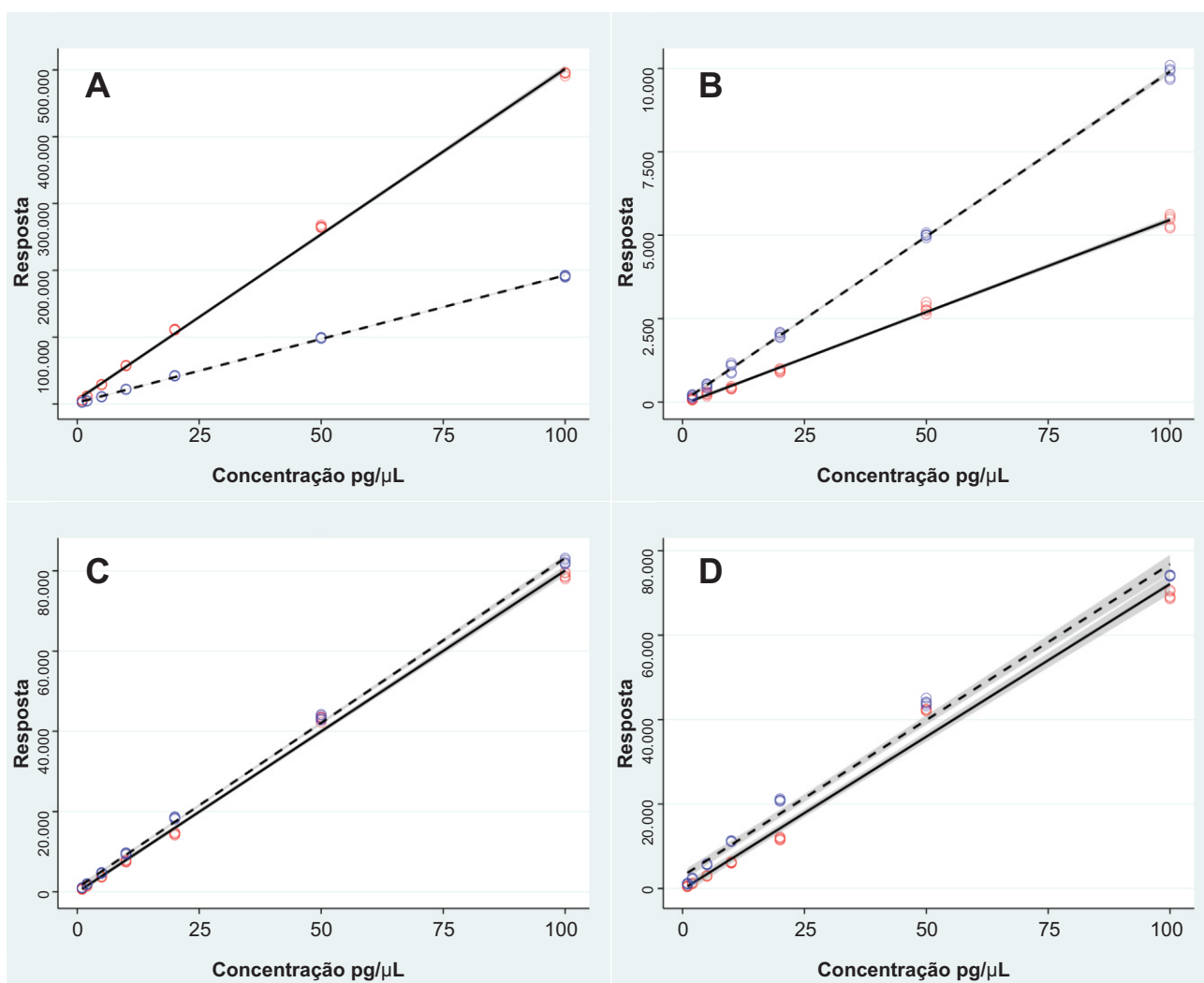


Figura 5. Curvas analíticas de calibração e visualização do efeito de matriz. A) metamidofós; B) clorpirifós; C) fipronil sulfona; D) flubendiamida. Linha tracejada: curva construída na matriz abelha; linha contínua: curva construída na fase móvel. Os eixos Y possuem diferentes escalas.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho para validação do método analítico multirresíduo.

Inseticida ou produto de degradação	R ²	LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)	Faixa linear (ng g ⁻¹)
Acefato	0,9984	0,68	0,68	0,68–3,40
Carbofurano	0,9994	0,68	0,68	0,68–3,40
Carbosulfano	0,9993	0,68	0,68	0,68–3,40
Clorantraniliprole	0,9995	0,68	0,68	0,68–3,40
Clorpirifós	0,9993	1,36	1,36	1,36–3,40
Clotianidina	0,9992	0,68	0,68	0,68–3,40
Dimetoato	0,9995	0,68	0,68	0,68–3,40
Fipronil	0,9978	0,68	0,68	0,68–3,40
Fipronil dessulfenil	0,9987	0,68	0,68	0,68–3,40
Fipronil sulfeto	0,9950	0,68	0,68	0,68–3,40
Fipronil sulfona	0,9989	0,68	0,68	0,68–3,40
Flubendiamida	0,9871	0,68	0,68	0,68–3,40
Imidacloprido	0,9992	0,68	0,68	0,68–3,40
Metamidofós	0,9995	0,68	0,68	0,68–3,40
Metomil	0,9996	0,68	0,68	0,68–3,40
Metoxifenoazida	0,9988	0,68	0,68	0,68–3,40
Novalurom	0,9986	0,68	0,68	0,68–3,40
Profenofós	0,9998	0,68	0,68	0,68–3,40
Tebufoenoazida	0,9982	0,68	0,68	0,68–3,40
Tiametoxam	0,9992	0,68	0,68	0,68–3,40
Triflumurom	0,9994	0,68	0,68	0,68–3,40

R² = coeficiente de determinação da curva analítica de calibração preparada na matriz; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação.

Os valores da recuperação e precisão do método para os 21 inseticidas e produtos de degradação na matriz abelha são mostrados nas Figuras 6, 7 e 8. Observa-se que os valores de recuperação variaram de 82 a 108% para concentração de $0,68 \text{ ng g}^{-1}$, de 77 a 104% para a concentração de $1,36 \text{ ng g}^{-1}$ e de 84 a 109% para a concentração de $3,40 \text{ ng g}^{-1}$. Já os valores de precisão variaram de 2 a 17% para a concentração de $0,68 \text{ ng g}^{-1}$, de 3 a 17% para a concentração de $1,36 \text{ ng g}^{-1}$ e de 2 a 16% para a concentração de $3,40 \text{ ng g}^{-1}$. Portanto, o método apresentou valores satisfatórios para esses dois

parâmetros (70 a 120% para recuperação e precisão inferior a 20%).

O LQ do método foi igual a $0,68 \text{ ng g}^{-1}$ de abelha para quase a totalidade dos inseticidas e produtos de degradação, com exceção do clorpirifós, em que o LQ foi igual a $1,36 \text{ ng g}^{-1}$ (Tabela 3). Os valores do LD do método foram iguais aos valores de LQ, já que representam a menor concentração da curva analítica em que a recuperação ficou entre 70 e 120% e a precisão inferior a 20%.

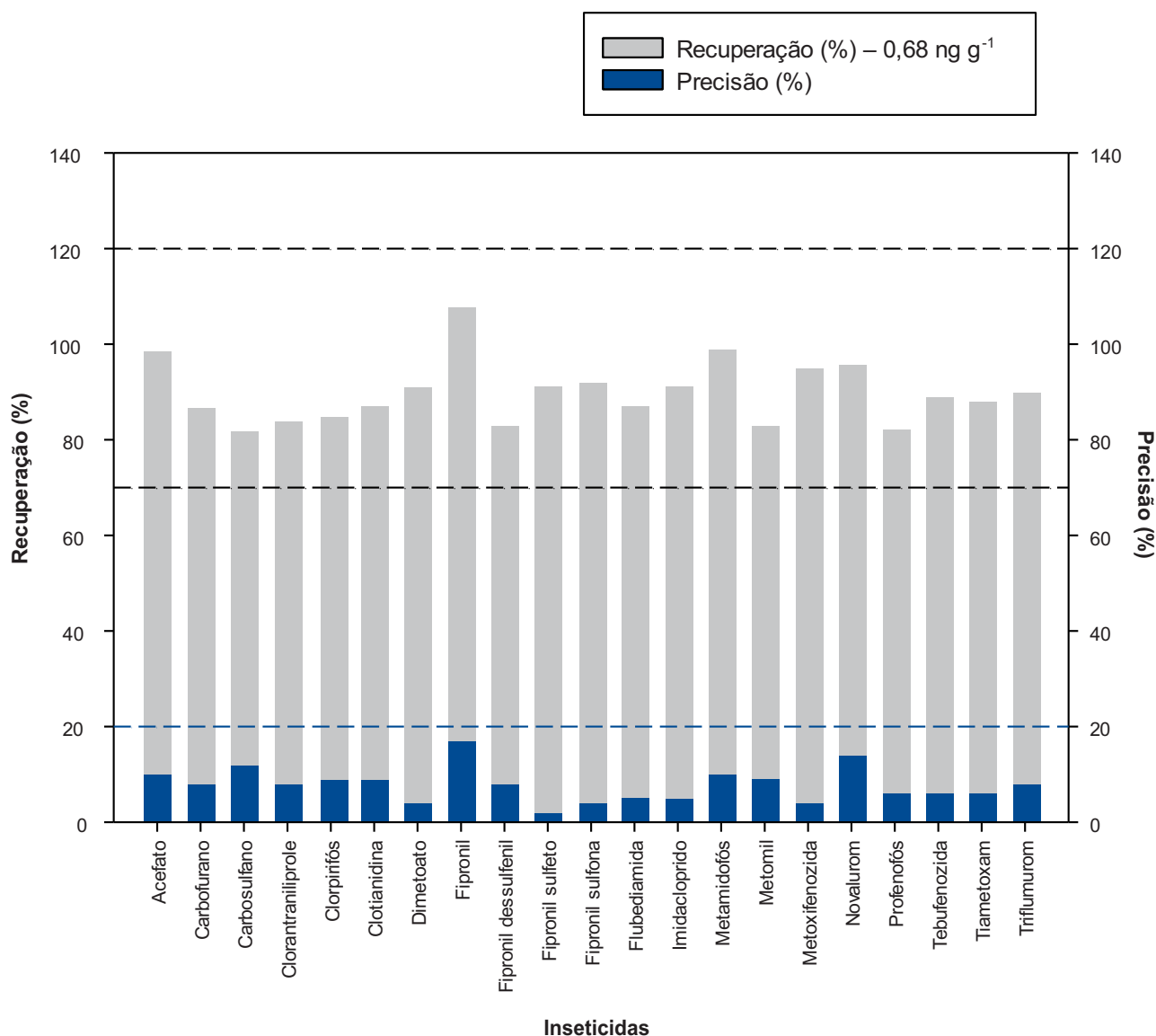


Figura 6. Valores de recuperação (%) e precisão (%) dos 21 inseticidas e produtos de degradação em abelhas na concentração de $0,68 \text{ ng g}^{-1}$. Linhas tracejadas na cor preta delimitam o intervalo de recuperação aceitável e a linha tracejada azul delimita o limite máximo aceitável da precisão.

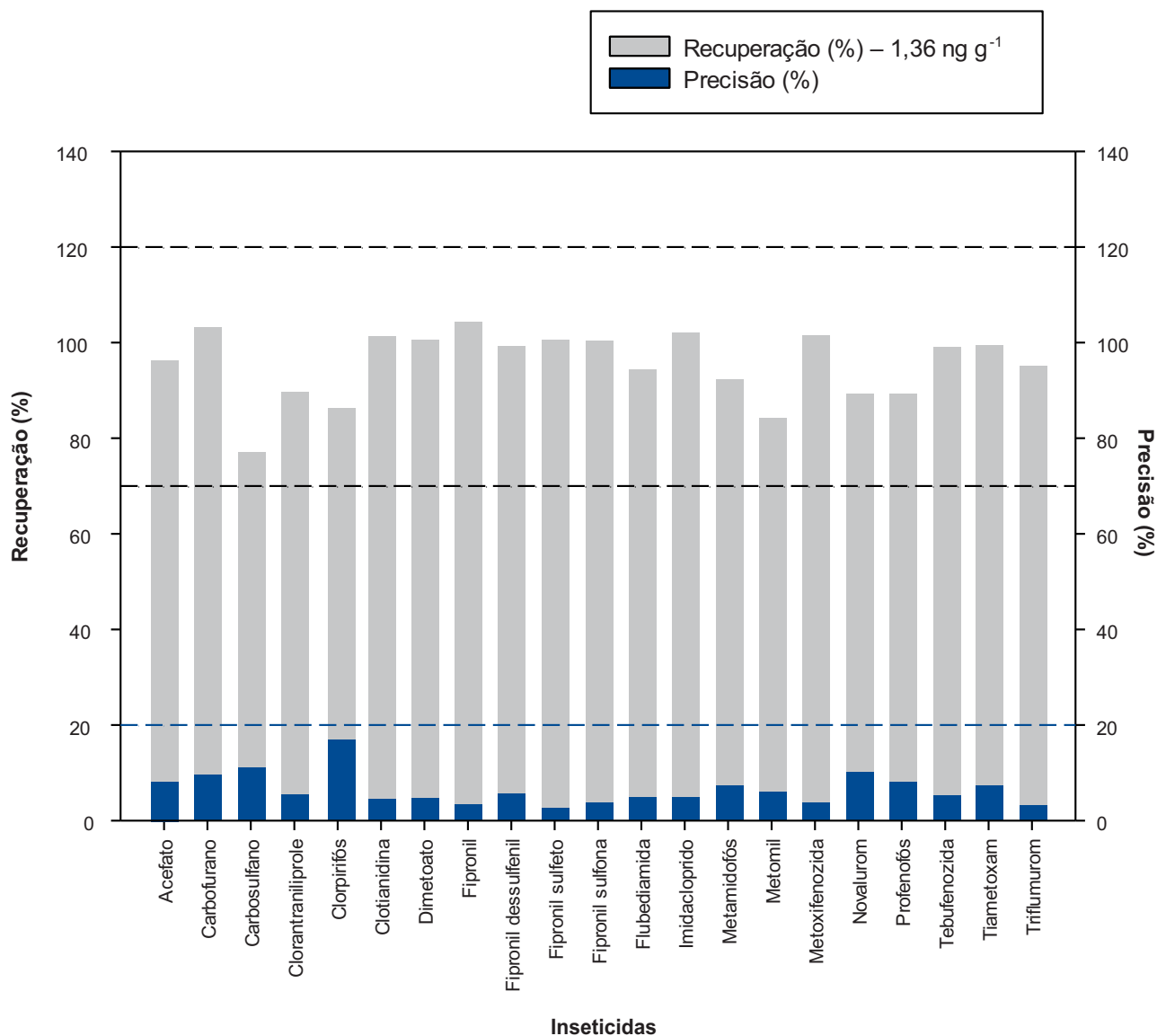


Figura 7. Valores de recuperação (%) e precisão (%) dos 21 inseticidas e produtos de degradação em abelhas na concentração de 1,36 ng g⁻¹. Linhas tracejadas na cor preta delimitam o intervalo de recuperação aceitável e a linha tracejada azul delimita o limite máximo aceitável da precisão.

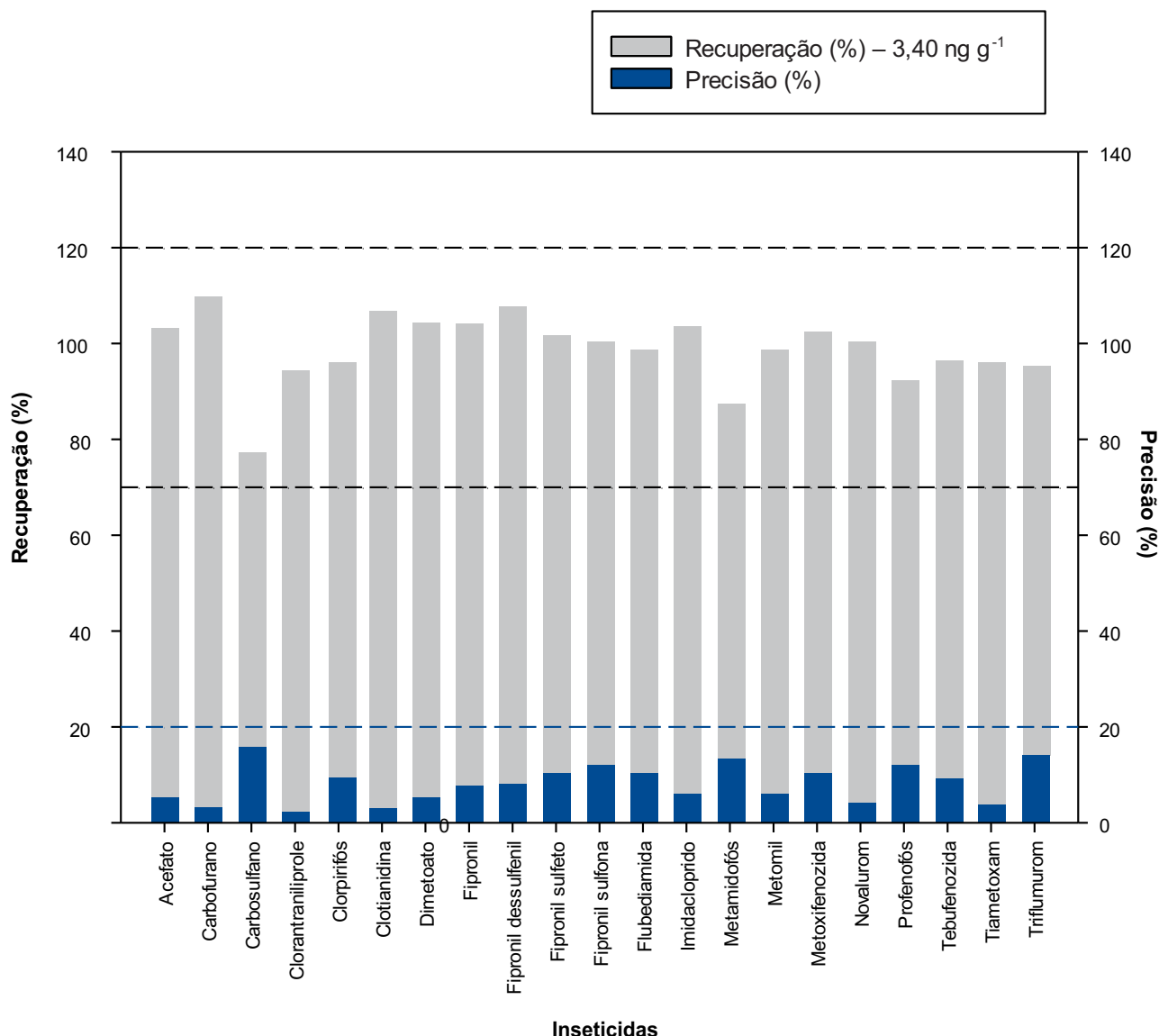


Figura 8. Valores de recuperação (%) e precisão (%) dos 21 inseticidas e produtos de degradação em abelhas na concentração de $3,40 \text{ ng g}^{-1}$. Linhas tracejadas na cor preta delimitam o intervalo de recuperação aceitável e a linha tracejada azul delimita o limite máximo aceitável da precisão.

Metodologias analíticas para a determinação de resíduos de agrotóxicos em abelhas têm sido relatadas na literatura considerando diferentes métodos de extração, agrotóxicos e valores de LQ. Saibt (2022) desenvolveu um método QuEChERS para a detecção de 176 diferentes agrotóxicos utilizando 1 g de abelha e extração com acetonitrila contendo 1,00% (v/v) de ácido fórmico, resultando em LQ entre 5 e 100 ng g^{-1} . Gbylik-Sikorska et al. (2015) desenvolveram um método analítico para determinação dos resíduos de inseticidas neonicotinoides e seus produtos de degradação em abelhas utilizando 2 g de amostra congelada e extração com a mistura acetonitrila:acetato de etila (8:2 v/v), seguida da purificação dos extratos

utilizando alumina como fase sólida. Após a validação do método, Gbylik-Sikorska et al. (2015) relataram valores de LQ entre 0,10 e $0,50 \text{ ng g}^{-1}$ e classificaram o método como rápido e sensível. Bargańska et al. (2014) desenvolveram e validaram um método QuEChERS para determinação de 19 agrotóxicos (herbicidas, fungicidas e inseticidas) em abelhas, obtendo ao final LQ entre 3 ng g^{-1} para maioria dos compostos (com exceção do herbicida alaclor onde o LQ foi de 75 ng g^{-1}). Calatayud-Vernich et al. (2016) avaliaram a eficiência de métodos analíticos baseados em QuEChERS e outros tipos (SPE e partição líquido-líquido) para determinação de 52 diferentes agrotóxicos em abelhas e concluíram que aqueles baseados em QuEChERS

foram os mais econômicos e demandaram menor tempo, resultando em LQ entre 0,03 e 10 ng g⁻¹. Amulen et al. (2017) desenvolveram um método multirresíduo bastante sensível para determinação de 18 diferentes agrotóxicos em abelhas utilizando QuEChERS com LQ entre 0,0280 e 0,0940 ng g⁻¹. Wiest et al. (2011) se basearam na modificação do protocolo QuEChERS para desenvolver e validar um método analítico multirresíduo para determinação de 80 diferentes agrotóxicos e produtos veterinários em abelhas, obtendo ao final um LQ igual a 10 ng g⁻¹. Comparando-se o método desenvolvido e validado neste trabalho com os relatos acima, observa-se que os LQ obtidos de 0,68 e 1,36 ng g⁻¹ são ligeiramente inferiores ou estão dentro dos intervalos da maioria dos métodos desenvolvidos para monitoramento dos resíduos de agrotóxicos em abelhas. Portanto, o método desenvolvido neste trabalho é uma ferramenta sensível e pode ser usado para o monitoramento de inseticidas e produtos de degradação em abelhas no Brasil.

Os LQ do método desenvolvido (0,68 e 1,36 ng g⁻¹) são menores que os valores da Dose Média Letal por contato para abelhas (DL₅₀) para alguns inseticidas neonicotinoides, como, por exemplo, clotianidina (DL₅₀ = 632 ng g⁻¹ de abelha), imidacloprido (DL₅₀ = 115 ng g⁻¹), tiametoxam (DL₅₀ = 600 ng g⁻¹) e fipronil (DL₅₀ = 85 ng g⁻¹), considerando nesse cálculo o peso médio de uma abelha igual 70 mg (IBAMA, 2019). Diante disso, a sensibilidade do método desenvolvido garante sua viabilidade e empregabilidade no monitoramento de eventos de mortalidade em abelhas causados por contaminação por inseticidas.

Conclusões

- 1) O método analítico multirresíduo desenvolvido e validado permite a detecção, identificação e quantificação de 21 inseticidas e seus produtos de degradação na matriz abelha.
- 2) O método desenvolvido pode ser utilizado como uma ferramenta em trabalhos de monitoramento para avaliação da exposição e mortalidade de abelhas aos inseticidas, incluindo os neonicotinoides e o fipronil.
- 3) O método analítico descrito nesta publicação, e que trata da determinação de resíduos de inseticidas em abelhas, é uma importante ferramenta para ser utilizada em laboratórios, com o objetivo de subsidiar estudos para monitoramento e preservação desses importantes insetos polinizadores. Assim,

contribui para o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 15: “proteger, restaurar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, travar e reverter a degradação dos solos e travar a perda da biodiversidade”, por meio do alcance da meta 15.5: “tomar medidas urgentes e significativas para reduzir a degradação de habitat naturais, deter a perda de biodiversidade e, até 2020, proteger e evitar a extinção de espécies ameaçadas” (ONU, 2019).

Agradecimentos

Ao técnico de laboratório Paulo Henrique Vitro, pelo auxílio na execução das análises laboratoriais e cromatográficas, e ao estagiário Thiago Luis Aguayo de Castro, pela elaboração da Figura 2.

Referências

A.B.E.L.H.A. **Associação Brasileira de Estudos das Abelhas**: tudo sobre abelhas. 2024. Disponível em: <https://abelha.org.br/canal-tudo-sobre-abelhas/>. Acesso em: 13 mar. 2024.

ABEMEL. **Associação Brasileira dos Exportadores de Mel**. 2023. Disponível em: <https://brazilletsbee.com.br/default.aspx>. Acesso em: 13 mar. 2024.

AMULEN, D. R.; SPANOGHE, P.; HOUBRAKEN, M.; TAMALE, A.; GRAAF, D. C.; CROSS, P.; SMAGGHE, G. Environmental contaminants of honeybee products in Uganda detected using LC-MS/MS and GC-ECD. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p.1-14, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0178546.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003. DOI: 10.1093/jaoac/86.2.412.

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

BARGANSKA, Z.; SLEBIODA, M.; NAMIESNIK, J. Determination of pesticide residues in honeybees using modified QuEChERS sample work-up and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 19, p. 2911-2924, 2014. DOI: 10.3390/molecules19032911.

- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; VAN GESTEL, C.A.M.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 973-992, 2012. DOI: 10.1007/s10646-012-0863-x.
- CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMÓ, E.; PICÓ, Y. Efficiency of QuChERS approach for determining 52 pesticides residues in honey and honey bees. **MethodsX**, v. 3, p. 452-458, 2016. DOI: 10.1016/j.mex.2016.05.005.
- CASTILHOS, A.; DOMBROSKI, J. L. D.; BERGAMO, G. C.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in Brazilian agricultural áreas. **Apidologie**, v. 50, p. 657-668, 2019. DOI: 10.1007/s13592-019-00676-x.
- GBYLIK-SIKORSKA, M.; SNIĘGOCKI, T.; POSYNIK, A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 990, p. 132-140, 2015. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.03.016.
- GOÑALONS, C. M.; FARINA, W. M. Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. **PLoS One**, v. 10, e0140814, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0140814.
- IBAMA – **Perfis Ambientais de Agrotóxicos**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/perfis-ambientais#lista-perfis>. Acesso em: 13 mar. 2024.
- IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal – PPM**. 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/>. Acesso em: 5 mar. 2024.
- IBGE. **Censo Agropecuário**. 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuaria.html>. Acesso em: 5 mar. 2024.
- INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo**. DOQ-CGCRE-008: revisão 09 – junho 2020. Brasília, DF, 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 13 mar. 2024.
- KIM, L.; LEE, D.; CHO, H.K.; CHOI, S. D. Review of the QuChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, p. 1-16, 2019. DOI: 10.1016/j.teac.2019.e00063.
- LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An international Journal**, v. 22, n. 4, p. 1050-1064, 2016. DOI: 10.1080/10807039.2015.1133242.
- NIESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 881-899, 2006. DOI: 10.1002/mas.20097.
- PERESTRELO, R.; SILVA, P.; PORTO-FIGUEIRA, P.; PEREIRA, J. A. M.; SILVA, C.; MEDINA, S.; CÂMARA, J. S. QuEChERS – Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 1070, p. 1-28, 2019. DOI: 10.1016/j.aca.2019.02.036.
- SAIBT, N. **Determinação multirresíduo de agrotóxicos em abelha (*Apis mellifera*) empregando mini-QuEChERS e UHPLC-MS/MS**. 2022. 108 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/27590>. Acesso em: 14 mar. 2024.
- SCORZA JÚNIOR, R.P.; PORTILHO, I.I.R. **Método analítico multirresíduo para determinação de inseticidas no bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.)**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2021. 30p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 89). Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1136504/metodo-analitico-multirresiduo-para-determinacao-de-inseticidas-no-bicho-da-seda-bombyx-mori-l>. Acesso em: 13 mar. 2024.
- TUDI, M.; RUAN, H.D.; WANG, L.; LYU, J.; SADLER, R.; CONNELL, D.; CHU, C.; PHUNG, D.T. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 1-24, 2021. DOI: 10.3390%2Fijerph18031112.
- VÁZQUEZ, P. P.; LOZANO, A.; UCLÉS, S.; RAMOS, M.M.G.; FERNÁNDEZ-ALBA, R.R. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1426, p. 161-173, 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.081.
- WIEST, L.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; FRATTA, C.; AMIC, S.; LAMBERT, O.; POULIQUEN, H.; ARNAUDGUILHEM, C. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 34, p. 5743-5756, 2011. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.06.079.

WRIGHT, G.A.; SOFLEY, S.; EARNSHAW, H. Low doses of neonicotinoid pesticides in food rewards impair short-term olfactory memory in foraging-age honeybees.

Scientific Reports, v. 5, n. 15322, 2015. DOI: 10.1038/srep15322.