

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Análise dos Efeitos de Difenoconazol em abelhas *Scaptotrigona postica*

THIAGO ROSA OLIVEIRA

São Carlos, SP

2024

THIAGO ROSA OLIVEIRA

Análise dos Efeitos de Difenoconazol em abelhas *Scaptotrigona postica*

Monografia apresentada ao Curso de Química,
do Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharel
em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos, SP

2024

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Aos meus pais, por me ensinarem a importância da dedicação, da persistência e por acreditarem em mim mesmo diante dos desafios. Ao meu irmão, pelo incentivo e por estar sempre ao meu lado, tornando essa jornada mais leve.

Aos meus amigos, que compartilharam comigo risos, desafios e conquistas ao longo dessa caminhada acadêmica. Obrigado por cada palavra de apoio, pelas horas de conversa e por sempre me motivarem a seguir em frente.

À minha orientadora, Professora Eny Maria Vieira, pela paciência, dedicação e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui minha mais profunda gratidão.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do fungicida difenoconazol em abelhas *Scaptotrigona postica*, utilizando a aplicação tópica como metodologia de exposição. A pesquisa incluiu a análise da mortalidade das abelhas em diferentes concentrações do composto (1 a 41 $\mu\text{g. L}^{-1}$) e períodos de exposição (4 h a 96 h). Os dados indicaram uma relação dose-resposta clara, com mortalidade crescente em concentrações mais altas, sendo o DL50 estimado em 22,96 $\mu\text{g. L}^{-1}$ após 96 horas. Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível quantificar a presença do difenoconazol nas abelhas expostas, com maior intensidade dos picos em concentrações mais altas e em amostras não liofilizadas. As diferenças observadas entre amostras liofilizadas e não liofilizadas indicam que o preparo das amostras pode influenciar os resultados analíticos. Além disso, concentrações subletais podem causar efeitos comportamentais adversos, comprometendo a sobrevivência das colônias e os serviços ecossistêmicos de polinização. Os resultados destacam a importância de regulamentar o uso do difenoconazol em ambientes agrícolas para proteger polinizadores e garantir a sustentabilidade ambiental.

Palavras-chave: *Scaptotrigona postica*, difenoconazol, toxicidade, aplicação tópica.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the toxic effects of the fungicide difenoconazole on *Scaptotrigona postica* bees using topical application as an exposure method. The research analyzed bee mortality at different concentrations of the compound (1 to 41 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and exposure periods (4 h to 96 h). The data indicated a clear dose-response relationship, with increasing mortality at higher concentrations, and the DL50 was estimated at 22,9 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ after 96 hours. Through high-performance liquid chromatography, the presence of difenoconazole in exposed bees was quantified, showing higher peak intensities at higher concentrations and in non-lyophilized samples. Differences between lyophilized and non-lyophilized samples suggest that sample preparation can influence analytical results. Additionally, sublethal concentrations may cause adverse behavioral effects, compromising colony survival and pollination ecosystem services. The results highlight the importance of regulating difenoconazole use in agricultural environments to protect pollinators and ensure environmental sustainability.

Keywords: *Scaptotrigona postica*, difenoconazole, toxicity, topical application.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Agrotóxicos.....	9
1.1.2 Difenoconazol.....	11
1.2 Abelhas e sua importância.....	13
1.2.1 Abelha Mandaguari.....	15
1.3 Método QuEChERS de preparo de amostra e técnica analítica para a detecção do difenoconazol.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 EXPERIMENTAL.....	21
3.1 Coleta de Abelhas.....	21
3.2 Aplicação tópica do difenoconazol sobre o dorso das abelhas.....	22
3.3 Extração pelo método QuEChERS.....	24
3.4 Técnica analítica HPLC.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Mortalidade das Abelhas Scaptotrigona postica.....	27
4.2 Determinação do DL50.....	30
4.3 Testes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para análise do difenoconazol.....	32
4.3.5 Implicações Ecológicas e Agrícolas.....	40
5 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a humanidade tem enfrentado desafios ambientais sem precedentes. Problemas como as mudanças climáticas, a destruição de ecossistemas e a contaminação de recursos naturais refletem o impacto das atividades humanas, especialmente na agricultura. Apesar de avanços em diversas áreas, o mundo natural ainda sofre com as ações prejudiciais do homem na natureza: "A biodiversidade está desaparecendo em uma velocidade sem precedentes na história da humanidade. Mais de 1 milhão de espécies estão ameaçadas de extinção devido às atividades humanas." (NAÇÕES UNIDAS, 2020). Essa perda maciça reflete o impacto direto das atividades humanas, como desmatamento e urbanização descontrolada, que comprometem o equilíbrio ecológico global. De acordo com o relatório do IPCC, as mudanças climáticas estão exacerbando os impactos ambientais globais, como eventos climáticos extremos, perda de ecossistemas e declínio de espécies, o que agrava a crise ambiental já intensificada pelas atividades humanas (WRI BRASIL, 2023).

Conforme ilustrado na Figura 1, os impactos das mudanças climáticas já são evidentes em diversos indicadores ambientais, como o aumento do nível do mar, o recuo das geleiras e o aquecimento dos oceanos (IPCC, 2023). Esses fatores intensificam a crise ambiental e afetam diretamente a biodiversidade, incluindo espécies essenciais como as abelhas.

Figura 1 - Impactos Observados do Aquecimento Global

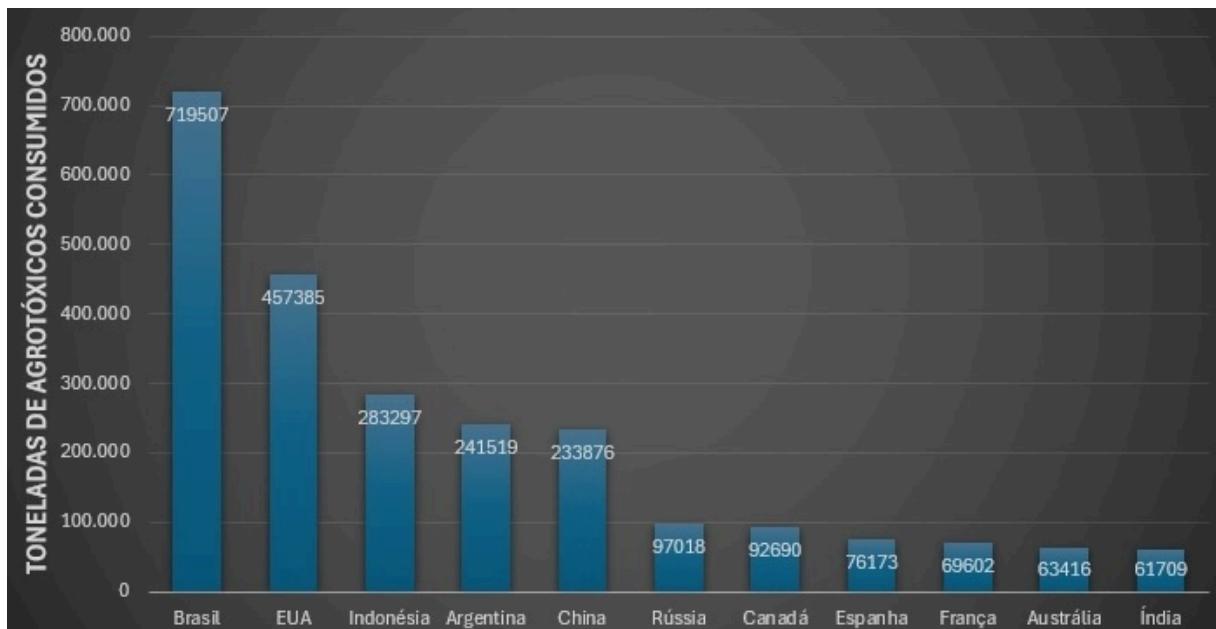
Evidências do aquecimento global já em andamento



Fonte: IPCC. *Sexto Relatório de Avaliação (AR6)*. Adaptado por WRI Brasil. Disponível em:
<https://www.wribrasil.org.br>.

Entre esses desafios observados, destaca-se o uso intensivo de agrotóxicos, que contribui significativamente para a degradação ambiental e a perda de biodiversidade. Segundo o site Agrolink (s.d.), o Brasil se destaca como um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo, sendo que o uso intensivo desses produtos é impulsionado pela grande extensão agrícola do país e pela busca por maior produtividade. Conforme ilustrado na Figura 2, esse dado reflete a dependência da agricultura brasileira em insumos químicos, o que gera preocupações sobre seus impactos ambientais e na biodiversidade.

Figura 2 - Países com maiores consumos de agrotóxicos (toneladas)



Fonte: Adaptado de Agrolink. Cenário atual do uso dos agrotóxicos. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br>.

Esse alto consumo reflete o modelo agrícola extensivo adotado pelo país e aponta para potenciais riscos ambientais e ecológicos, como a contaminação do solo e da água e os impactos sobre espécies sensíveis, como polinizadores.

1.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos, são substâncias químicas amplamente utilizadas na agricultura para controlar pragas, doenças e plantas daninhas que comprometem a produtividade das culturas. Cada tipo de defensivo agrícola tem uma função específica: os inseticidas combatem os insetos que danificam as culturas, os fungicidas atuam contra doenças causadas por fungos e os herbicidas são aplicados para eliminar ervas daninhas que competem com as plantas por nutrientes." (BELAGRO, 2018). O uso de agrotóxicos, no geral, tornou-se essencial para garantir o abastecimento de alimentos em escala global, principalmente devido à crescente demanda por produtos agrícolas." (INFOESCOLA, s.d.).

De acordo com a Embrapa, os agrotóxicos desempenham um papel crucial na produção agrícola global, garantindo a produtividade necessária para atender à demanda crescente por alimentos e outros produtos essenciais. Porém, apesar de sua importância para garantir a produtividade agrícola, o uso de agrotóxicos apresenta desafios significativos,

especialmente quando aplicados de forma indiscriminada ou inadequada, "O uso excessivo e inadequado de agrotóxicos tem gerado impactos negativos, como a contaminação de solos, águas superficiais e subterrâneas, além de representar risco à saúde humana e à biodiversidade." (EMBRAPA, 2014). Dos riscos à saúde humana, se destacam a possibilidade de intoxicações agudas, distúrbios neurológicos e doenças crônicas, como o câncer. Uma das formas de aplicação mais controversas, ilustrada na Figura 3, é a pulverização aérea de agrotóxicos, que, embora eficiente para grandes áreas, favorece a dispersão dos produtos químicos para além da área-alvo, contaminando solos, águas e comprometendo a sobrevivência de espécies locais (EMBRAPA, 2014).

Figura 3 - Pulverização aérea de agrotóxicos sobre plantação.



Fonte: BRASIL DE FATO. Estamos vivendo um retrocesso na regulamentação dos agrotóxicos, diz militante.

Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br>.

1.1.2 Difenoconazol

Entre as diversas ameaças enfrentadas pelas abelhas mandaguari, o uso de agrotóxicos é um dos fatores mais preocupantes, especialmente os fungicidas amplamente utilizados na agricultura. A Figura 4 apresenta o difenoconazol, um composto químico com fórmula molecular $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$ e massa molar de $406,26\text{ g}\cdot mol^{-1}$, apresenta baixa solubilidade em água e alta lipofiliação, o que facilita sua adsorção em materiais orgânicos. A Tabela 1 demonstra algumas de suas propriedades físico-químicas.

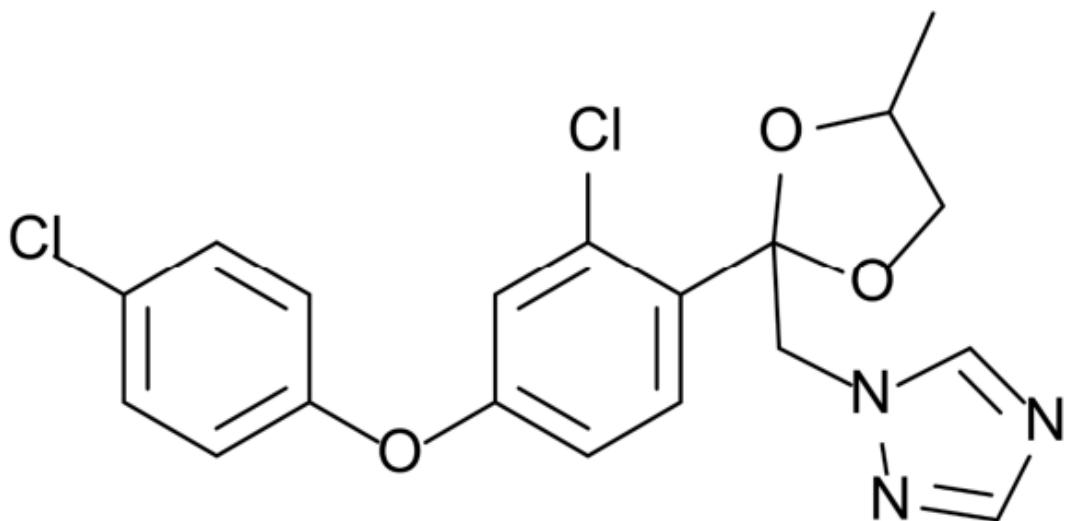
Tabela 1 - – Propriedades físicas e químicas do difenoconazol.

Propriedade	Valor
Fórmula molecular	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$
Massa molecular	$406,26\text{ g mol}^{-1}$
Ponto de fusão	$74\text{ }^{\circ}\text{C}$
Ponto de ebulição	$547\text{ }^{\circ}\text{C}$
Densidade	$1,33\text{ g/cm}^3$ ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
Constante de dissociação (pKa) a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$	pKa = 1,1
Pressão de vapor a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	11 mmHg
pH	8,3 ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Fonte: (IBAMA, 2019)

Sua estabilidade é notável, com ponto de fusão de $74\text{ }^{\circ}\text{C}$ e resistência à hidrólise e fotólise em amplas condições ambientais. O valor de pKa de 1,1 indica que o composto possui caráter básico moderado, sendo estável mesmo em variações de pH (ANVISA, 2019). Ele é pertencente à classe dos triazóis, tem ganhado destaque por seu uso em grandes culturas agrícolas. Contudo, os efeitos desse fungicida em espécies de polinizadores, como a *Scaptotrigona postica*, ainda são pouco compreendidos.

Figura 4 - Estrutura química do difenoconazol.



Fonte: Nufarm. Disponível em:

https://cdn.nufarm.com/wp-content/uploads/sites/50/2018/11/02032014/Disco_f.tecnica.pdf.

Sua estrutura molecular é composta por anéis aromáticos substituídos e um anel de triazol. Essas características químicas conferem ao difenoconazol sua capacidade de inibir a biossíntese de esteróis, essenciais para o crescimento de fungos patogênicos(NUFARM, 2018).

De acordo com Agrolink (s.d.), o difenoconazol é amplamente aplicado no manejo de doenças em culturas como soja, milho e trigo, sendo essencial para evitar perdas de produtividade causadas por fungos. "O produto é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis, com ação predominantemente preventiva. Atua como inibidor do transporte de elétrons nas mitocôndrias das células dos fungos, inibindo a formação de ATP, essencial nos processos metabólicos dos fungos. Sua excelente ação preventiva se apresenta devido à atuação na inibição da germinação dos esporos, desenvolvimentos e penetração dos tubos germinativos"(AGROLINK, s.d.).

De acordo com eCycle (s.d.), o uso indiscriminado do difenoconazol está associado a riscos ambientais, como poluição de corpos d'água e solos, bem como possíveis efeitos nocivos à saúde humana. Ele é enquadrado na classificação do potencial de periculosidade ambiental II. Esse fungicida é altamente persistente, permanecendo por muito tempo nos ecossistemas devido a sua difícil degradação. O difenoconazol também é bioacumulado no ambiente, o que provoca um aumento da sua concentração nos ecossistemas ao longo do tempo. A bioacumulação ocorre quando o difenoconazol se acumula nos organismos vivos, especialmente em cadeias alimentares aquáticas, o que pode levar a efeitos tóxicos em níveis

tróficos mais elevados. Sua persistência ambiental também dificulta a recuperação dos ecossistemas contaminados, aumentando os riscos para espécies não-alvo. Ele atua como um interferente endócrino em ambientes aquáticos, afetando o equilíbrio ecossistêmico(ECYCLE, s.d.).

Dado o amplo uso do difenoconazol na agricultura e seu potencial de causar impactos negativos ao meio ambiente e às espécies polinizadoras, como a *Scaptotrigona postica*, é essencial aprofundar os estudos sobre seus efeitos ecológicos. Essa investigação pode subsidiar políticas de uso mais sustentável e práticas agrícolas menos prejudiciais ao equilíbrio ambiental.

1.2 Abelhas e sua importância

Além dos impactos diretos na saúde humana e no meio ambiente, o uso indiscriminado de agrotóxicos afeta significativamente as populações de abelhas, insetos fundamentais para a polinização de diversas culturas agrícolas. A redução dessas populações compromete a produtividade agrícola e a biodiversidade. As abelhas desempenham um papel indispensável na polinização, sendo responsáveis por cerca de 73% das espécies cultivadas no mundo. Sua atuação melhora não apenas a produtividade, mas também a qualidade dos alimentos produzidos (AEGRO, 2019). A importância das abelhas para a agricultura vai além da polinização; elas contribuem diretamente para a produtividade e a qualidade de diversas culturas, muitas das quais têm alta dependência da polinização. A Tabela 2 destaca exemplos de culturas agrícolas no Brasil, evidenciando o impacto econômico da polinização em produtos como café, cacau e melancia, que dependem significativamente dos serviços prestados por abelhas.

Tabela 2 - Impacto econômico da polinização em diferentes culturas agrícolas no Brasil.

Cultura	Taxa de dependência	Produção anual (US\$) (Fonte: IBGE)*	Valor da polinização (US\$)
1. café	0.25	7.596.003.636	1.899.000.909
2. algodão herbáceo	0.25	3.697.680.455	924.420.114
3. cacau	0.95	560.980.455	532.931.432
4. laranja	0.25	2.089.013.636	522.253.409
5. melancia	0.95	453.730.000	431.043.500
6. tomate	0.25	1.525.605.000	381.401.250
7. maracujá	0.95	389.815.909	370.325.114
8. maçã	0.65	440.800.000	286.520.000
9. melão	0.95	216.216.364	205.405.545
10. feijão	0.05	2.825.852.727	141.292.636
11. coco	0.25	408.035.455	102.008.864
12. goiaba	0.65	150.857.727	98.057.523
13. pêssego	0.65	133.571.818	86.821.682
14. abacate	0.65	55.935.000	36.357.750

Fonte: IBGE. Disponível em: <https://blog.aegro.com.br>.

Como é observado na Tabela 2, a polinização realizada por abelhas e outros polinizadores é avaliada em bilhões de dólares anuais, mostrando que a preservação desses insetos é essencial não apenas para o equilíbrio ecológico, mas também para a economia global (AEGRO, s.d.).

Contudo, apesar da sua importância ecológica e econômica, as abelhas enfrentam sérios desafios devido ao uso intensivo de agrotóxicos, que comprometem tanto sua sobrevivência quanto sua capacidade de realizar a polinização.

Os agrotóxicos afetam as abelhas de diversas maneiras. De acordo com a Agência Brasil (2019), os neonicotinóides, uma classe de agrotóxicos amplamente utilizada, comprometem as habilidades cognitivas desses insetos, dificultando atividades essenciais como a navegação e o retorno às colmeias. Além disso, a exposição a esses produtos encurta significativamente o tempo de vida das abelhas, impactando diretamente a organização e a sustentabilidade das colônias. Esses prejuízos ao comportamento e à saúde das abelhas refletem negativamente na polinização, um processo fundamental para a produtividade de diversas culturas agrícolas.

Atualmente, a mortalidade de abelhas é um problema crítico no Brasil e no mundo, agravado pelo uso indiscriminado de agrotóxicos. Entre 2022 e 2023, mais de 300 milhões de

abelhas morreram no Brasil, com destaque para o impacto do inseticida fipronil, proibido na União Europeia devido à sua toxicidade (UM SÓ PLANETA, 2024).

A preservação das abelhas é, portanto, crucial para a biodiversidade, a segurança alimentar e a economia. A adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis e regulamentações rigorosas sobre o uso de agrotóxicos são passos fundamentais para garantir a sobrevivência desses polinizadores indispensáveis.

1.2.1 Abelha Mandaguari

A *Scaptotrigona postica*, também conhecida como abelha mandaguari, é uma espécie de abelha nativa do Brasil, ela pertence à família Meliponini e é considerada uma das polinizadoras mais importantes da flora brasileira, ela possui um tamanho médio, variando entre 6 e 8 milímetros de comprimento, e é uma abelha sem ferrão, então não representa um risco significativo para a saúde humana.. Sua coloração é predominantemente preta, com algumas manchas amarelas no abdômen, como pode ser observado na Figura 5. Essa espécie de abelha possui uma língua longa, adaptada para coletar néctar de flores com corolas longas e estreitas.(APISMEL, s.d.).

Figura 5 - Abelha mandaguari (*Scaptotrigona postica*).



Fonte: Biodiversity4All. Disponível em: <https://www.biodiversity4all.org/taxa/418525-Scaptotrigona-postica>.

De acordo com (APISMEL, s.d.), ela vive em colônias organizadas. Cada colônia é composta por uma rainha, operárias e zangões. A rainha é responsável pela reprodução, enquanto as operárias são encarregadas de coletar alimentos, construir e manter o ninho. Os zangões, por sua vez, são os machos responsáveis pela fecundação da rainha. Ela é conhecida por construir seus ninhos em ocos de árvores, cupinzeiros abandonados e outros locais protegidos. Os ninhos são compostos por células de cera, onde são depositados os ovos e armazenado o alimento para as larvas. São encontradas normalmente nos estados da Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Piauí, São Paulo e Tocantins. A Figura 6 ilustra um típico ninho construído em ocos de árvores, uma característica comum dessa espécie.

Figura 6 - Ninho de abelhas mandaguari



(*Scaptotrigona postica*) em ocos de árvores.

Fonte: Biodiversity4All. Disponível em: <https://www.biodiversity4all.org/taxa/418525-Scaptotrigona-postica>.

De acordo com (APISMEL, s.d.), a Abelha mandaguari se alimenta principalmente de néctar e pólen de flores. Essa espécie desempenha um papel fundamental na polinização de diversas plantas, contribuindo para a reprodução e diversidade da flora brasileira. Além disso, as abelhas mandaguari também coletam resinas vegetais, que são utilizadas na construção e manutenção do ninho.

Elas desempenham um papel crucial na polinização de plantas nativas, incluindo espécies frutíferas e ornamentais. Por meio da coleta de néctar e pólen, essas abelhas contribuem para a reprodução das plantas, garantindo a produção de frutos e sementes. Além disso, a polinização realizada pelas abelhas mandaguari também promove a diversidade genética das plantas, favorecendo a adaptação e sobrevivência das espécies(APISMEL, s.d.).

Mesmo com sua importância ecológica, a abelha mandaguari enfrenta diversas ameaças que colocam em risco sua sobrevivência. A destruição e fragmentação de habitats naturais, o uso indiscriminado de agrotóxicos e a competição com espécies exóticas são alguns dos principais fatores que afetam as populações dessa abelha(APISMEL, s.d.).

O foco deste estudo é compreender os efeitos do difenoconazol na *Scaptotrigona postica*, uma espécie que se prova de vital importância ecológica para a polinização de plantas nativas e cultivadas no Brasil. Dada sua vulnerabilidade diante da destruição de habitats, uso indiscriminado de agrotóxicos e competição com espécies exóticas, torna-se urgente investigar as consequências dessas ameaças para garantir sua preservação.

1.3 Método QuEChERS de preparo de amostra e técnica analítica para a detecção do difenoconazol

Neste trabalho, utilizou-se o método QuEChERS, amplamente empregado na extração e purificação de resíduos de agrotóxicos, aliado à técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*, HPLC), para analisar os efeitos do difenoconazol em *Scaptotrigona postica*. Essas técnicas foram escolhidas por sua alta sensibilidade e eficiência na detecção de compostos químicos em amostras ambientais.

O método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), foi desenvolvido em 2003 por Anastassiades e colaboradores, com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos multiresíduos de extração de agrotóxicos em alimentos disponíveis na época. O método destaca-se por ser rápido, fácil, econômico, eficaz, robusto e seguro, além de ser um procedimento dinâmico que pode ser realizado em diversos laboratórios. O método QuEChERS foi originalmente proposto para a extração de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais, porém tem sido amplamente estudado para a determinação de diferentes compostos nas mais diversas matrizes.(LACOM, n.d.)

Após a extração e purificação do difenoconazol com o método QuEChERS, as amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), garantindo alta precisão na separação e identificação dos compostos químicos presentes. A cromatografia líquida é uma técnica analítica utilizada na separação, identificação e purificação de compostos químicos. A cromatografia líquida de alta eficiência foi introduzida na década de 1960, proporcionando uma maior resolução e eficiência na separação dos componentes. A HPLC utiliza uma fase estacionária, como uma coluna recheada com partículas porosas, e

uma fase móvel, geralmente um solvente líquido, para separar os analitos. (MODUMTECH, 2023)

Assim, a integração do método QuEChERS com a técnica de HPLC foi utilizada para investigar a presença de resíduos de difenoconazol em amostras ambientais, contribuindo para a análise do impacto desse fungicida. Essas técnicas foram aplicadas com o objetivo de avaliar sua eficiência na obtenção de dados precisos e confiáveis sobre os impactos do fungicida nos polinizadores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da aplicação tópica do fungicida difenoconazol nas abelhas *Scaptotrigona postica*, considerando suas características fisiológicas, comportamentais e ecológicas, com base em análises realizadas utilizando as técnicas QuEChERS e HPLC.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar a presença e quantificar os resíduos de difenoconazol em amostras de abelhas *Scaptotrigona postica* utilizando o método QuEChERS e a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Avaliar os possíveis impactos do difenoconazol sobre a sobrevivência, comportamento e organização das colônias de abelhas *Scaptotrigona postica*;
- Relacionar os resultados obtidos com os riscos ambientais associados ao uso de difenoconazol e discutir possíveis implicações para a conservação de polinizadores.

3 EXPERIMENTAL

A parte experimental do estudo consistiu em quatro etapas principais: coleta de abelhas, aplicação tópica, extração pelo método QuEChERS e análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

3.1 Coleta de Abelhas

A coleta das abelhas foi realizada seguindo as diretrizes da OECD 214.

Foram escolhidas abelhas, provenientes de colônias saudáveis, sem sinais de doenças ou exposição recente a pesticidas. Para garantir uniformidade nos testes, apenas abelhas de idade similar foram selecionadas.

A coleta ocorreu pela manhã, horário em que as abelhas apresentam maior atividade, sob condições climáticas favoráveis, evitando períodos de chuva, ventos fortes ou temperaturas extremas.

As abelhas foram coletadas manualmente e transportadas em recipientes de plástico ventilados, com furos na tampa e laterais. Durante a coleta, os recipientes ventilados foram posicionados nas proximidades da entrada da colmeia, permitindo que as abelhas, atraídas pela abertura, entrassem espontaneamente nos recipientes. Esse método evitou o uso de intervenções mais invasivas, minimizando o estresse das abelhas coletadas e preservando o comportamento natural da colônia. Durante o transporte e o armazenamento, as abelhas foram mantidas em temperaturas controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa entre 50-70% e alimentadas com solução de sacarose a 50%.

A coleta foi dividida em 8 grupos, sendo 6 deles para as aplicações de diferentes contrações do difenoconazol, e 2 deles para as aplicações com água e acetonitrila. Cada grupo teve 4 recipientes com abelhas. O número exato em cada recipiente para cada grupo é descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Quantidade de Abelhas por Grupo Experimental

$\mu\text{g.L}^{-1}$	h20	acn	1	5	10	15	30	41
1	13	14	16	15	13	9	17	7
2	13	14	10	10	9	12	11	9
3	10	11	10	12	8	12	14	13
4	9	9	12	7	12	12	11	10
Total	45	48	48	44	42	45	53	39

Fonte: Autoria própria

Antes do início dos testes, as abelhas passaram por um período de estabilização de 4 horas, garantindo aclimatação e recuperação do estresse causado pelo transporte.

3.2 Aplicação tópica do difenoconazol sobre o dorso das abelhas

Este estudo foi conduzido como um teste toxicológico agudo, seguindo as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998). Testes agudos são projetados para avaliar os efeitos de uma exposição de curta duração, a diferentes concentrações de um composto químico, com o objetivo de determinar parâmetros como a mortalidade e a DL50. É importante destacar que a abelha *Scaptotrigona postica* apresenta um tempo de vida médio de até 90 dias, dependendo de fatores ambientais e de sua função na colônia (HEBORÁ MEL DO BRASIL, 2024). Assim, o período de 96 horas corresponde a uma pequena fração de sua vida total, caracterizando o estudo como um teste de toxicidade aguda voltado para efeitos imediatos.

Para os testes, foi utilizada uma solução estoque de difenoconazol a 1000 ppm (1 mg/mL). A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas para obter concentrações finais de 41; 30; 15; 10; 5; e $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Além disso, dois controles foram incluídos: água destilada e acetonitrila (ACN), o solvente utilizado para dissolver o difenoconazol.

A acetonitrila é utilizada pois ela é o solvente que dilui o difenoconazol, então, o grupo ACN serve para avaliar se o solvente por si só (sem o composto ativo) causa efeitos tóxicos nas abelhas. E a água é utilizada como um controle negativo absoluto, ou seja, um

grupo controle para verificar os efeitos das condições experimentais sem a interferência de nenhum composto químico, nem mesmo solventes como a acetonitrila.

A escolha das faixas de concentração de 1 a 41 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ foi baseada em dados da literatura e em estudos prévios realizados com abelhas nativas. Trabalhos anteriores, como o de Scavassa (2019) e Medina (2021), demonstraram que abelhas nativas, como *Melipona scutellaris* e *Tetragonisca angustula*, apresentam maior sensibilidade a agrotóxicos em comparação com a abelha africanizada *Apis mellifera*. Isso reforça a importância de utilizar faixas de concentração que englobam tanto níveis subletais quanto letais para espécies nativas de interesse. As faixas escolhidas incluem concentrações que refletem cenários de contaminação ambiental realista, além de permitirem a determinação de parâmetros importantes, como a Dose Letal 50%. Testes realizados anteriormente indicaram que concentrações próximas a 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ podem apresentar efeitos subletais, como alterações comportamentais, enquanto níveis mais altos, como 41 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, são importantes para avaliar os impactos letais diretos.

As abelhas foram anestesiadas com CO_2 antes da aplicação tópica, utilizando micropipetas de precisão.

Foram feitas no total, aplicações em 8 grupos diferentes, 6 deles sendo as concentrações de difenoconazol diluídas, um com água e um último com acetonitrila (ACN). Em cada um dos grupos foram feitos 4 testes com números de abelhas variados.

Após a aplicação, as abelhas foram armazenadas no escuro, sob as condições já mencionadas. As taxas de mortalidade foram registradas em intervalos de 4, 24, 48, 72 e 96 horas. Os tempos de monitoramento foram escolhidos com base em protocolos experimentais estabelecidos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998), adaptados para avaliação de toxicidade em abelhas. Essa abordagem permite capturar tanto os efeitos imediatos quanto os retardados da exposição ao difenoconazol. Estudos anteriores mostram que a mortalidade aguda pode ocorrer nas primeiras 24 horas, enquanto os efeitos cumulativos e subletais se tornam mais evidentes em tempos mais longos, como 72 ou 96 horas (SCAVASSA, 2019). O critério de mortalidade utilizado foi a ausência de resposta a estímulos externos, como um leve toque ou o chacoalhar do recipiente.

Com a taxa de mortalidade, foi feito o percentual de mortalidade e foi realizada uma análise estatística para determinar a DL_{50} (Dose Letal para 50% das abelhas).

3.3 Extração pelo método QuEChERS

Após o término do tempo de aplicação tópica, os corpos das abelhas foram triturados e submetidos ao método QuEChERS, que utiliza sais específicos para promover a separação das fases orgânica e aquosa, maximizando a recuperação dos compostos de interesse e minimizando as interferências da matriz.

Foram realizadas três variações do método QuEChERS, denominadas A, B e C, com subdivisões em A1 (abelhas in natura) e A2 (abelhas liofilizadas), e assim por diante. As extrações foram realizadas com dois tubos distintos:

- Tubo 1 (purificação): Contendo 50 mg de PSA, 50 mg de C18 e 0,15 g de MgSO₄.
- Tubo 2 (extração): Contendo 0,4 g de MgSO₄ e 0,1 g de sal específico para cada análise:
 - NaCl (análise A): Facilita a separação de fases pelo efeito salting-out.
 - Citrato de sódio (análise B): Ajusta a solução em pH ácido (4-5).
 - Acetato de sódio (análise C): Ajusta o pH para uma faixa levemente alcalina (8-9).

O efeito salting-out é um efeito que ocorre quando sais, como NaCl, são adicionados a uma solução para reduzir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa. Isso força os compostos de interesse a se concentrarem na fase orgânica (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2022). Para este experimento específico, o NaCl adicionado, aumenta a força iônica da solução aquosa, o que reduz a interação entre as moléculas de água e os compostos orgânicos, "empurrando" os compostos lipofílicos (difenoconazol) para a fase orgânica. Como resultado, a separação entre as fases aquosa e orgânica se torna mais eficiente, permitindo uma extração mais limpa e eficaz dos resíduos do fungicida.

O ajuste do pH nas análises B e C foi incluído como um teste metodológico baseado no protocolo padrão QuEChERS, que se propõe a realizar extrações de diversos compostos, incluindo aqueles menos estáveis que o difenoconazol.

A análise A1 utilizou abelhas in natura, enquanto a análise A2 empregou abelhas liofilizadas. A liofilização foi realizada para garantir uma matriz mais homogênea e reduzir

interferências hidrossolúveis, melhorando a eficiência de extração de resíduos de difenoconazol.

Na etapa de extração, as amostras foram misturadas com 10 mL de acetonitrila (ACN), solvente selecionado por sua eficiência na extração de compostos de diferentes polaridades. A mistura foi agitada manualmente por 1 minuto em Vortex. Em seguida, foi adicionado o conteúdo do Tubo 2, conforme o sal correspondente à análise (NaCl, citrato de sódio ou acetato de sódio), promovendo a separação de fases. Após agitação adicional, a fase orgânica (sobrenadante) foi coletada.

A fase orgânica foi submetida à purificação (clean-up) com extração em fase sólida dispersiva (D-SPE), utilizando o conteúdo do Tubo 1 (MgSO_4 , PSA e C18). O PSA removeu compostos polares, como ácidos graxos e açúcares, enquanto o C18 eliminou gorduras, lipídeos e ceras, garantindo um extrato limpo.

Após o clean-up, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos para separar o sobrenadante purificado. O sobrenadante foi evaporado em evaporador a 40°C e reconstituído em fase móvel apropriada para análise por HPLC. Essa etapa final assegurou a compatibilidade do extrato com a análise cromatográfica.

3.4 Técnica analítica HPLC

Após a etapa de purificação pelo método QuEChERS, os extratos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando parâmetros otimizados para a detecção e quantificação do difenoconazol.

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido acoplado a um detector UV-Vis, equipado com uma coluna de fase estacionária C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm). A fase móvel consistiu em uma mistura de água destilada e acetonitrila (60:40, v/v), acidificada com 0,1% de ácido fórmico, operando a uma vazão de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Os comprimentos de onda analisados foram 230, 233, 244 e 246 nm, escolhidos para maximizar a detecção do difenoconazol e de possíveis interferentes. A escolha de testar diferentes comprimentos de onda foi baseada na necessidade de identificar aquele que oferecesse maior sensibilidade para a detecção do difenoconazol, ao mesmo tempo em que minimizasse interferências de matriz. Trabalhos anteriores indicaram que o difenoconazol apresenta picos

de absorbância significativos em torno de 230 nm, mas outros comprimentos de onda próximos também podem ser explorados para melhorar a confiabilidade analítica em matrizes complexas (SCAVASSA, 2019). O volume de injeção foi de 20 μL por amostra. A quantificação baseou-se em uma curva de calibração linear construída com padrões analíticos de 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (0,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

As amostras reconstituídas na fase móvel foram injetadas diretamente no HPLC, e o tempo de retenção do difenoconazol foi comparado ao padrão analítico para identificação, enquanto a quantificação utilizou a resposta relativa do analito em relação à curva de calibração. Controles de qualidade, como amostras de recuperação e duplicatas, garantiram a precisão e a exatidão do método.

A coluna C18 foi escolhida pela sua eficiência na separação de compostos moderadamente apolares, como o difenoconazol, de interferentes presentes na matriz biológica (Valente, 2006). A mistura de acetonitrila e água acidificada foi selecionada por ser adequada para pesticidas, promovendo separações eficientes e reduzindo interações com a matriz (Ribani, 2004). A validação do método seguiu diretrizes da IUPAC e do INMETRO, avaliando parâmetros como linearidade, precisão, exatidão e os limites de detecção e quantificação (INMETRO, 2003; Thompson et al., 2002). A utilização de múltiplos comprimentos de onda (230, 233, 244 e 246 nm) permitiu monitorar a absorção máxima do analito e identificar interferentes, aumentando a confiabilidade dos resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mortalidade das Abelhas *Scaptotrigona postica*

Nesta seção, são apresentados os resultados da mortalidade de abelhas *Scaptotrigona postica* após a aplicação tópica de diferentes concentrações de difenoconazol. A mortalidade foi monitorada ao longo de 96 horas, em intervalos específicos, e os dados foram comparados aos controles negativos (H_2O e ACN), que confirmaram a ausência de toxicidade dos veículos utilizados. Os resultados foram expressos em porcentagens médias de mortalidade, permitindo a análise detalhada da relação dose-resposta. As informações estão organizadas na Tabela 4 e 5 e ilustradas graficamente na Figura 7.

Tabela 4 - Mortalidade Total e Sobrevida de Abelhas Expostas ao Difenoconazol

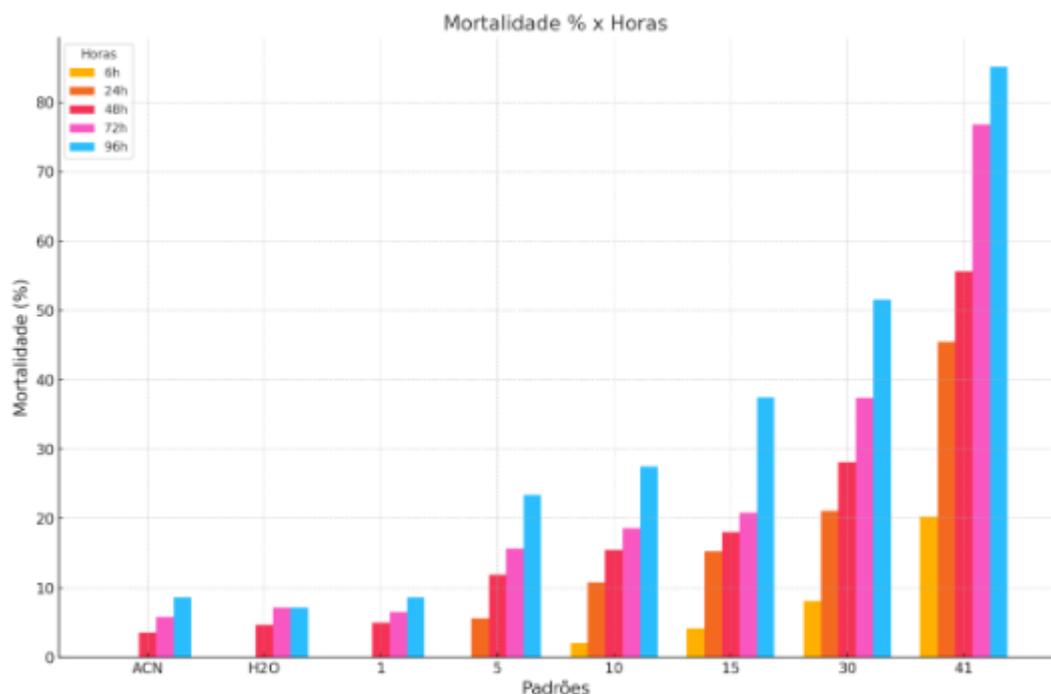
$\mu\text{g.L}^{-1}$	Vivos	Mortos (96 horas)	Vivos (96 horas)
h20	45	3	42
acn	48	4	44
41	39	33	6
30	53	27	26
15	45	17	28
10	42	12	30
5	44	10	34
1	48	4	44
total	364	110	254

Fonte: Autoria própria

Tabela 5 - Taxa de Mortalidade de Abelhas (%) em Diferentes Concentrações e Períodos de Exposição

$\mu\text{g.L}^{-1}$	6h	24h	48h	72h	96h
0	0.0	0.0	3.57	5.84	8.62
0	0.0	0.0	4.7	7.2	7.2
1	0.0	0.0	5.0	6.56	8.65
5	0.0	5.65	11.9	15.65	23.39
10	2.08	10.79	15.49	18.62	27.48
15	4.17	15.28	18.06	20.83	37.5
30	8.12	21.13	28.13	37.4	51.54
41	20.26	45.45	55.65	76.83	85.1

Fonte: Autoria própria

Figura 7 - Mortalidade de Abelhas (%) em Diferentes Concentrações ao Longo do Tempo

Fonte: Autoria própria

A mortalidade das abelhas foi avaliada em diferentes concentrações de difenoconazol (1, 5, 10, 15, 30 e 41 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e comparada aos controles negativos (H_2O e ACN), com dados coletados em intervalos de 4, 24, 48, 72 e 96 horas, apresentados como médias percentuais de mortalidade com seus desvios padrão. Nos controles negativos, a mortalidade foi baixa, não ultrapassando 8,65% após 96 horas, confirmando a ausência de toxicidade dos veículos utilizados. Em contrapartida, a concentração de 41 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ resultou na maior mortalidade, com 45,45% em 24 horas e 85,10% após 96 horas, apresentando alta variabilidade nos resultados. Já a concentração de 30 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ mostrou mortalidade de 21,13% em 24 horas e 51,54% em 96 horas, enquanto 15 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ alcançou 37,50% no mesmo período, representando um impacto intermediário. Concentrações mais baixas, como 5 e 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, apresentaram mortalidades de 23,39% e 8,65%, respectivamente, após 96 horas, sendo a última próxima aos valores dos controles.

A aplicação tópica de difenoconazol em abelhas *Scaptotrigona postica* permitiu avaliar os efeitos diretos desse fungicida em condições que simulam exposições ambientais reais. Os resultados demonstraram uma relação dose-resposta clara, com mortalidade crescente em função do aumento da concentração do composto.

Esses achados são consistentes com estudos anteriores que indicam que agrotóxicos podem causar mortalidade significativa em abelhas, mesmo em concentrações relativamente baixas (EMBRAPA, 2024). Além disso, a mortalidade observada nos controles negativos (H_2O e ACN) foi baixa, confirmando que os veículos utilizados não apresentaram toxicidade relevante para as abelhas.

Além da mortalidade, é também importante destacar que exposições a baixas concentrações de agrotóxicos podem causar alterações comportamentais que afetam o funcionamento da colônia e os serviços (EMBRAPA, 2024). Estudos indicam que o difenoconazol pode afetar a locomoção e a resposta fototrópica das abelhas, comprometendo atividades essenciais como forrageamento e navegação (IWASAKA, 2020). Esses efeitos subletais podem não ser imediatamente letais, mas comprometem a sobrevivência a longo prazo e a eficiência polinizadora das abelhas.

4.2 Determinação do DL50

O DL50, ou Dose Letal 50%, é um parâmetro amplamente utilizado na toxicologia para determinar a dose de uma substância capaz de causar 50% de mortalidade em uma população exposta. Neste estudo, o DL50 foi calculado com base na mortalidade em 96 horas, utilizando o ajuste de uma curva logística.

A curva logística é uma função matemática que descreve a relação entre a dose de um composto e a resposta observada (nesse caso, mortalidade). A fórmula geral usada foi:

$$y = \frac{L}{1+e^{-k(x-x_0)}}$$

Onde:

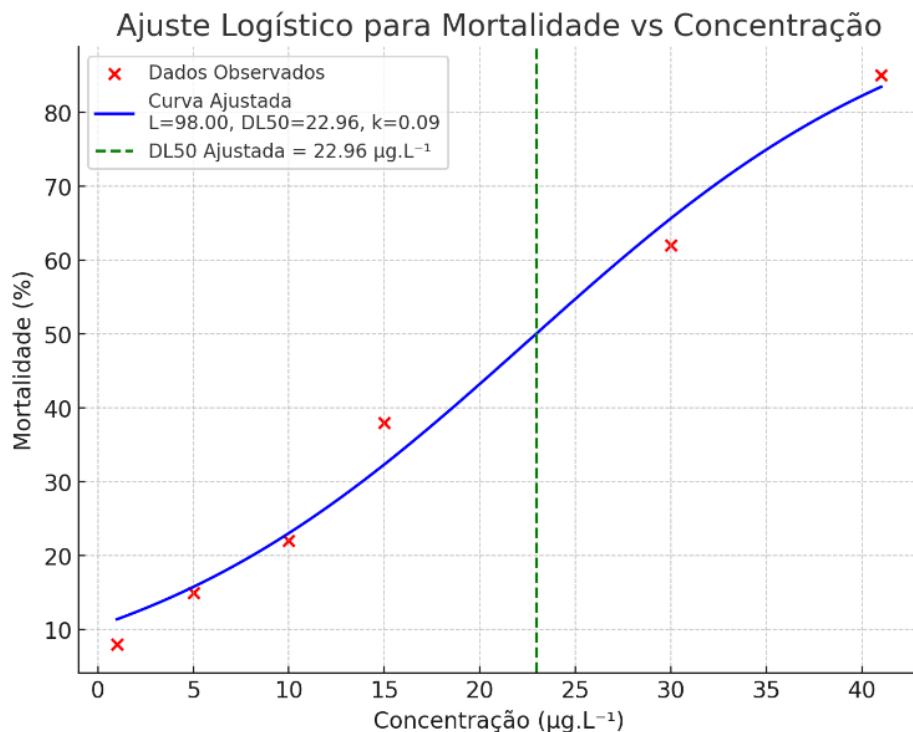
- y: mortalidade (%) observada;
- L: assíntota máxima (valor máximo que y pode atingir, geralmente 100%);
- x: concentração da substância (em $\mu g \cdot L^{-1}$);
- X_0 : valor da concentração correspondente a 50% de mortalidade (DL50);
- k: taxa de crescimento da curva (define a inclinação).

Os parâmetros iniciais utilizados foram:

- L = 100 (assumindo mortalidade máxima de 100%);
- $X_0 = 20$ (estimativa inicial da concentração para 50% de mortalidade);
- k = 1 (uma inclinação média).

A curva logística para a mortalidade após 96 horas, pode ser observada na figura 8.

Figura 8 - Curva Logística para Determinação do DL50 em Abelhas (96h)



Fonte: Autoria própria

Com o ajuste, o valor de X_0 , que corresponde ao DL50, foi calculado como:

$$DL50 \approx 22,96 \mu\text{g.L}^{-1}$$

A análise dos dados permitiu o cálculo do DL50 (Dose Letal 50%) em 96 horas, estimado em aproximadamente $22,96 \mu\text{g.L}^{-1}$. Este valor é superior aos limites documentados para DL50 de contato ($>101 \mu\text{g/abelha}$) e oral ($>187 \mu\text{g/abelha}$), sugerindo que a via tópica apresenta menor toxicidade em condições ambientais (SCAVASSA, 2020). No entanto, é importante considerar que, em condições de campo, as abelhas podem ser expostas a múltiplas fontes de agrotóxicos, potencializando os efeitos tóxicos.

4.3 Testes da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para análise do difenoconazol

A análise dos dados do HPLC para o difenoconazol, mostram que, em todas as concentrações, o comprimento de onda de 230 nm apresentou os maiores picos de intensidade em relação aos demais comprimentos, confirmando os dados do estudo anterior. Essa maior intensidade permite maior sensibilidade e confiabilidade na detecção do difenoconazol, especialmente em concentrações mais baixas.

Embora os comprimentos de onda de 233 nm e 244 nm também apresentem boa resposta, a superioridade de 230 nm no contexto deste estudo torna-o mais adequado para análises quantitativas precisas e reproduutíveis.

Com base nesses resultados, todas as demonstrações gráficas subsequentes foram realizadas com o comprimento de onda de 230 nm, garantindo consistência e maior sensibilidade nos resultados.

Os picos podem ser observados na Tabela 6 a seguir:

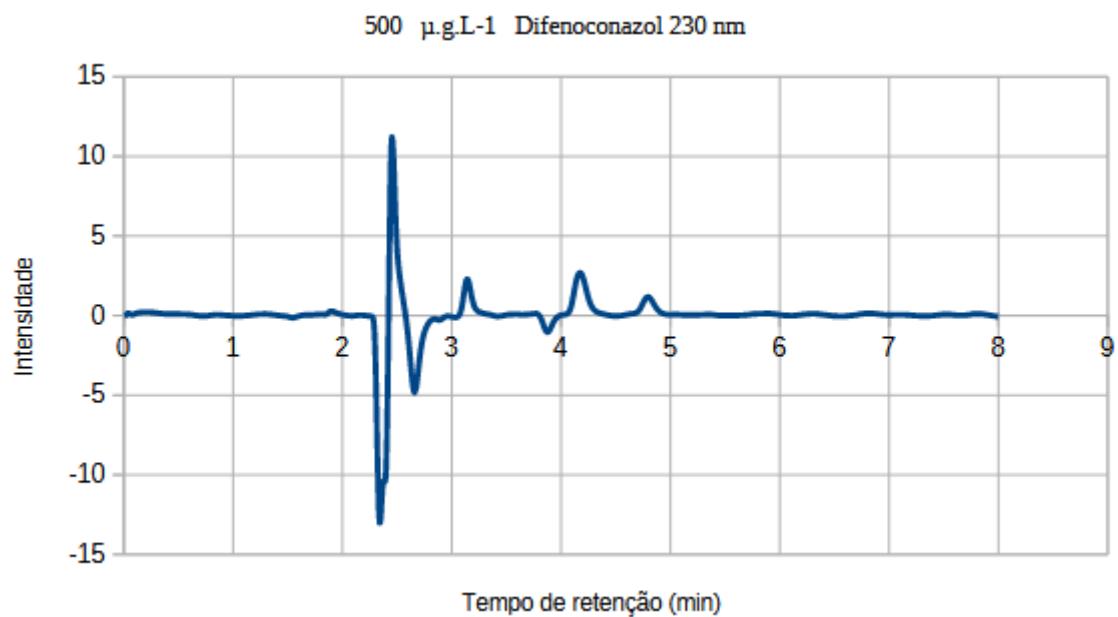
Tabela 6 - Picos de Intensidade por Comprimento de Onda e Concentração

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	230 nm	233 nm	244 nm	246 nm
500	2.68	2.48	1.63	1.43
1000	5.41	5.02	3.31	2.9
2000	11.48	10.66	6.13	5.95

Fonte: Autoria própria

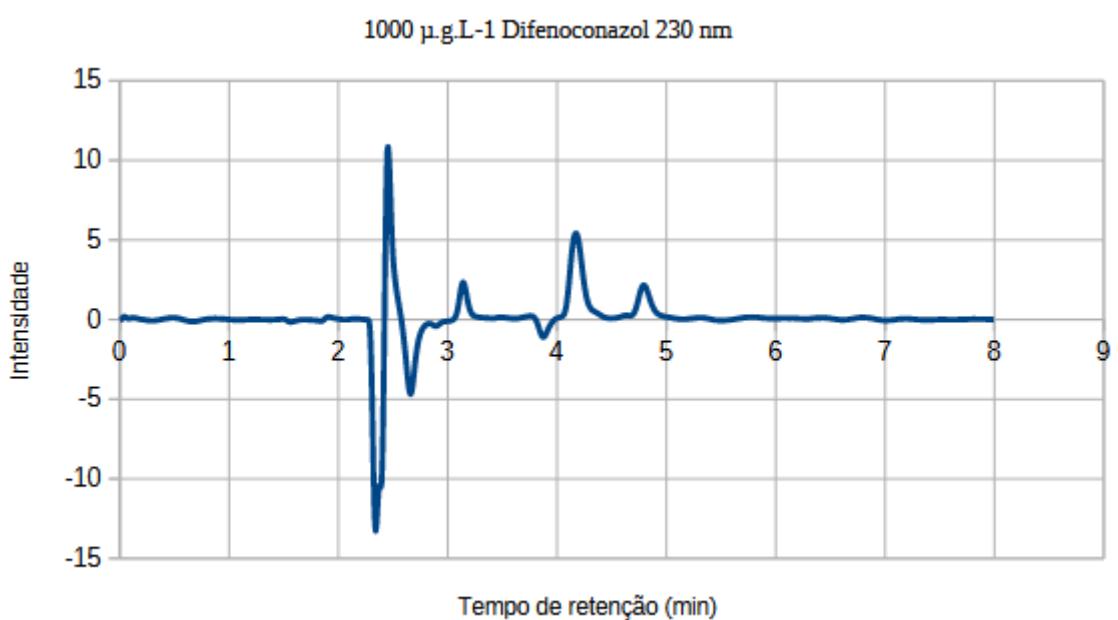
Os gráficos a seguir (Figuras 9, 10 e 11) ilustram o comportamento do difenoconazol em 230 nm, destacando a clara relação entre o aumento da concentração e a intensidade do pico no tempo de retenção. Essa maior intensidade em 230 nm em relação aos outros comprimentos de onda, permite maior sensibilidade e confiabilidade na detecção do composto.

Figura 9 - Cromatograma do Difenoconazol a $500 \mu\text{g. L}^{-1}$ em 230 nm



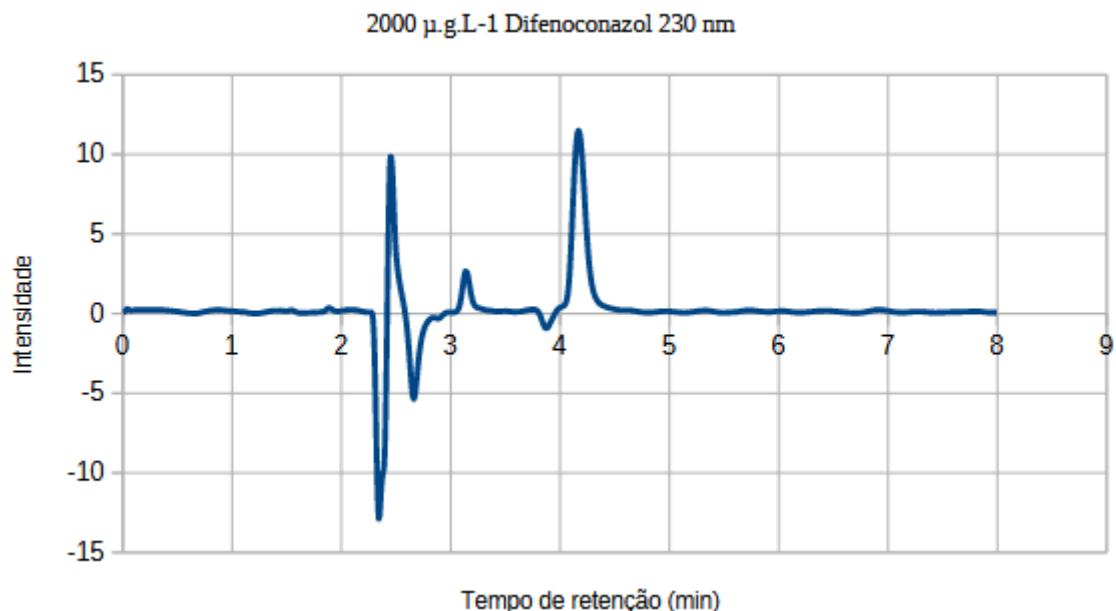
Fonte: Autoria própria

Figura 10 - Cromatograma do Difenoconazol a $1000 \mu\text{g. L}^{-1}$ em 230 nm



Fonte: Autoria própria

Figura 11 - Cromatograma do Difenoconazol a $2000 \mu\text{g. L}^{-1}$ em 230 nm

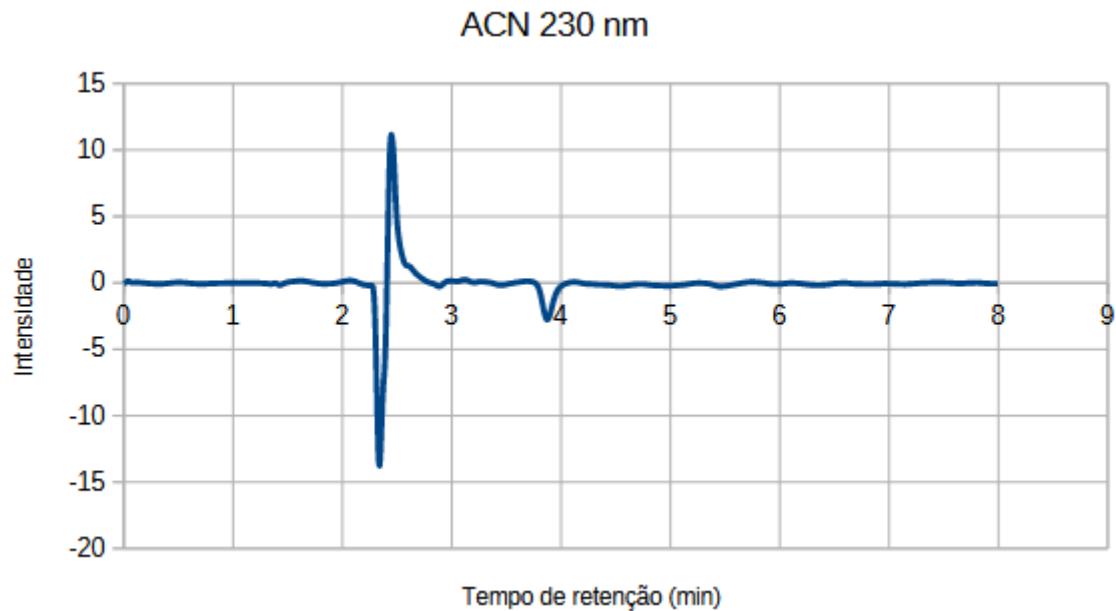


Fonte: Autoria própria

Em todas as amostras contendo apenas difenoconazol, foi identificado um pico bem definido no tempo de retenção próximo a 4,17 minutos, característico do composto.

O controle negativo (ACN) que pode ser observado na figura 12, não apresentou picos significativos, confirmando a especificidade do método analítico para o difenoconazol.

Figura 12 - Cromatograma da Amostra Controle Negativo (ACN) a 230 nm.



Fonte: Autoria própria

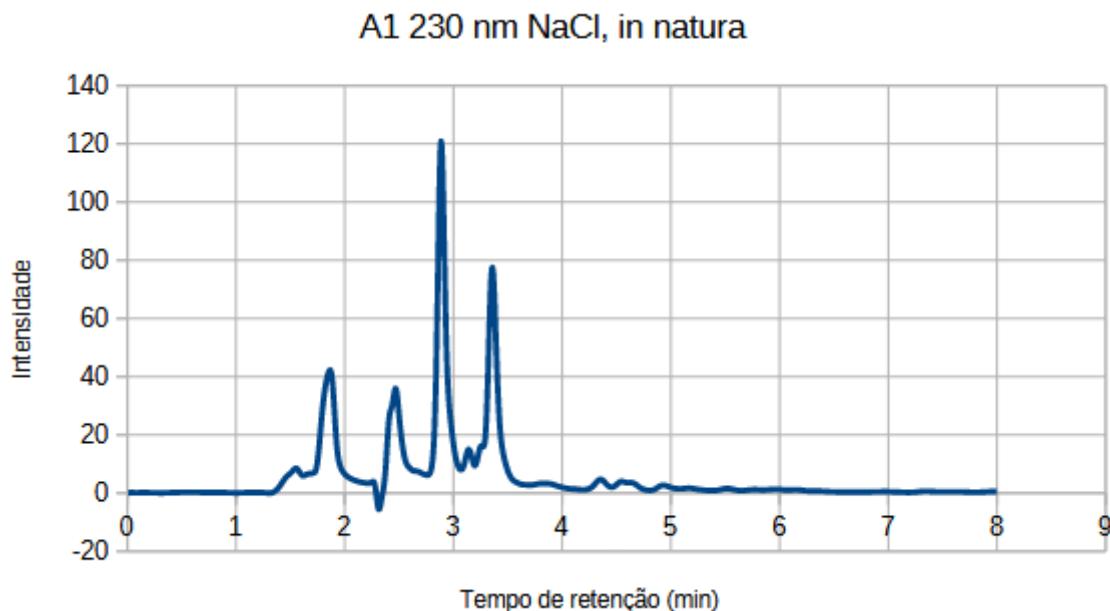
O cromatograma da amostra de controle negativo apresentou apenas ruído de fundo, sem picos significativos no tempo de retenção do difenoconazol (~4,17 minutos). Isso demonstra que o método é confiável e não apresenta interferências.

O restante dos resultados das amostras foi dividido em A1, A2, B1, B2, C1 e C2. Essa divisão foi estabelecida com a função de caracterizar as diferentes extrações realizadas nas amostras. Nas amostras A1 e A2 foi realizada a extração por QuEChERS com o sal de extração NaCl, devido a seu efeito salting-out. Na B1 e B2, foi feita a extração com o citrato de sódio, ele teria a função de ajustar a solução em pH ácido. E por último o C1 e C2, com a extração pelo acetato de sódio, que tem a função de ajustar o pH para uma faixa levemente alcalina.

A divisão da numeração nas amostras, de 1 e 2, se dá pelo processo de liofilização nas abelhas, sendo as amostras indicadas com 1, abelhas in natura, e amostras indicadas com 2, abelhas liofilizadas.

Os resultados das análises A1 até C2, podem ser observados nas Figuras 13 a 18, a seguir:

Figura 13 - Cromatograma da Amostra A1 a 230 nm.



Fonte: Autoria própria

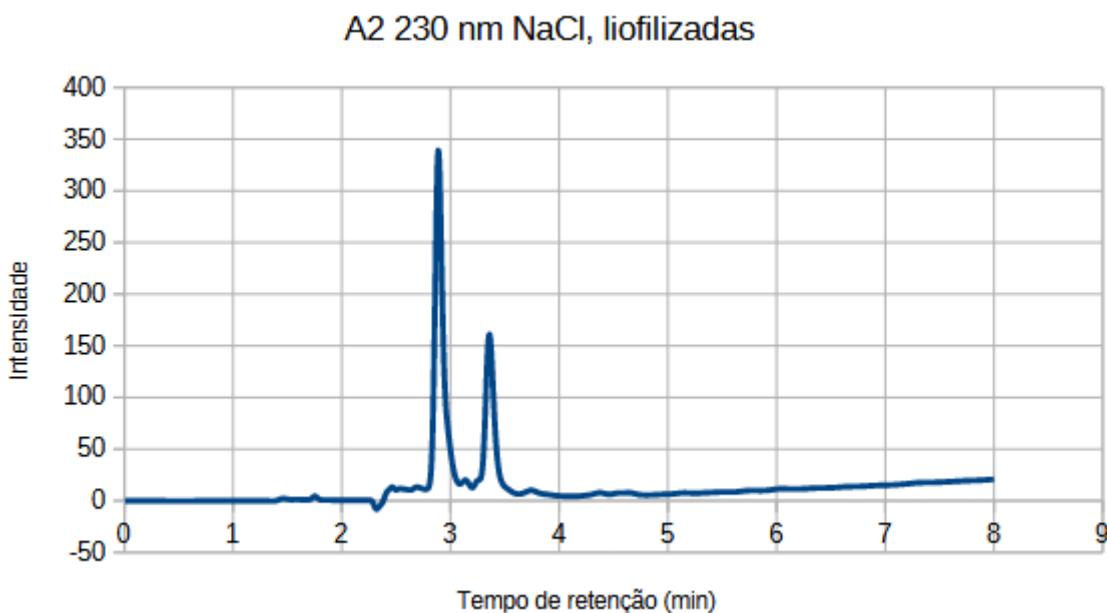
A amostra A1 apresentou um pico de intensidade moderada (~80 unidades), indicando presença detectável do difenoconazol, embora em menor quantidade comparada às próximas análises. Deve-se destacar, que tem uma diferença no tempo de retenção entre as medições conhecidas do difenoconazol (4,17 minutos) e as amostras experimentais A1, A2, B1, B2, C1 e C2, nas amostras experimentais, os picos são observados no tempo de 3,25 minutos.

A diferença nos tempos de retenção observada, pode ser atribuída a efeitos de matriz. Esses efeitos ocorrem quando componentes presentes na matriz da amostra interferem na análise, resultando em variações nos tempos de retenção e na resposta do detector. No contexto de análises cromatográficas, o efeito matriz é observado como um aumento ou supressão na resposta do detector na presença do analito no extrato da matriz, comparado com o mesmo analito presente em solvente orgânico.

Durante as análises cromatográficas realizadas, foram identificados problemas no sistema de bombeamento do equipamento HPLC, que provavelmente impactaram a qualidade inicial dos resultados. Variações nos tempos de retenção podem ser causadas por problemas no sistema de bombeamento do HPLC, como vazamentos nos encaixes ou vedações da bomba, resultando em cromatografia de baixa qualidade (SIGMA ALDRICH, 2024).

A robustez de um método cromatográfico também pode ser afetada por variações na concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel, o que pode influenciar os tempos de retenção obtidos (Ribani, 2004).

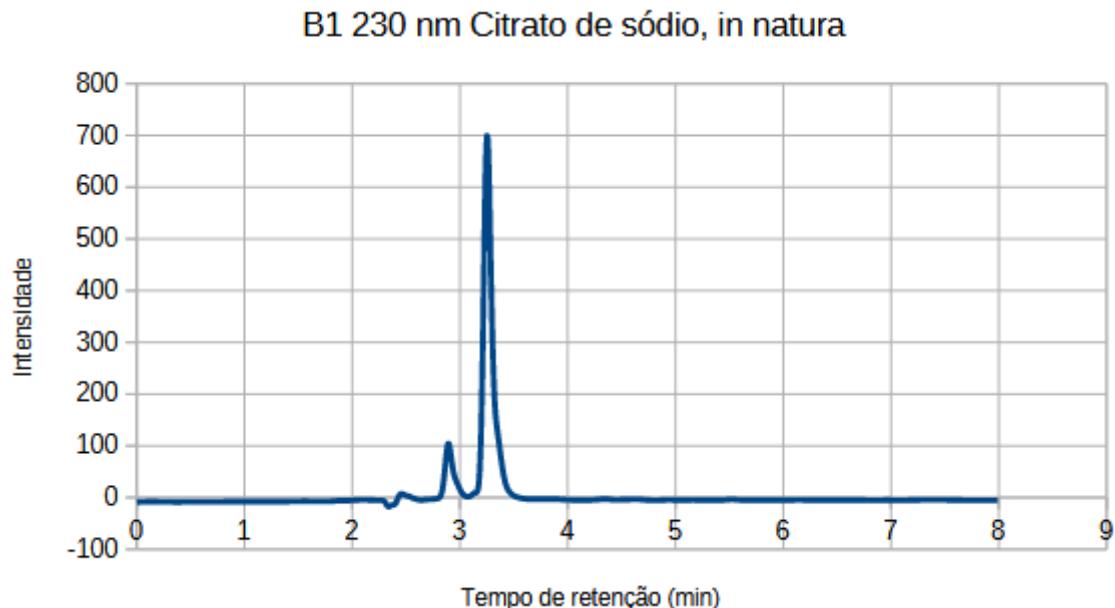
Figura 14 - Cromatograma da Amostra A2 a 230 nm.



Fonte: Autoria própria

Na amostra A2, foi observado um aumento na intensidade do pico em relação a A1 (~150 unidades), indicando maior concentração ou absorção do composto nesta amostra.

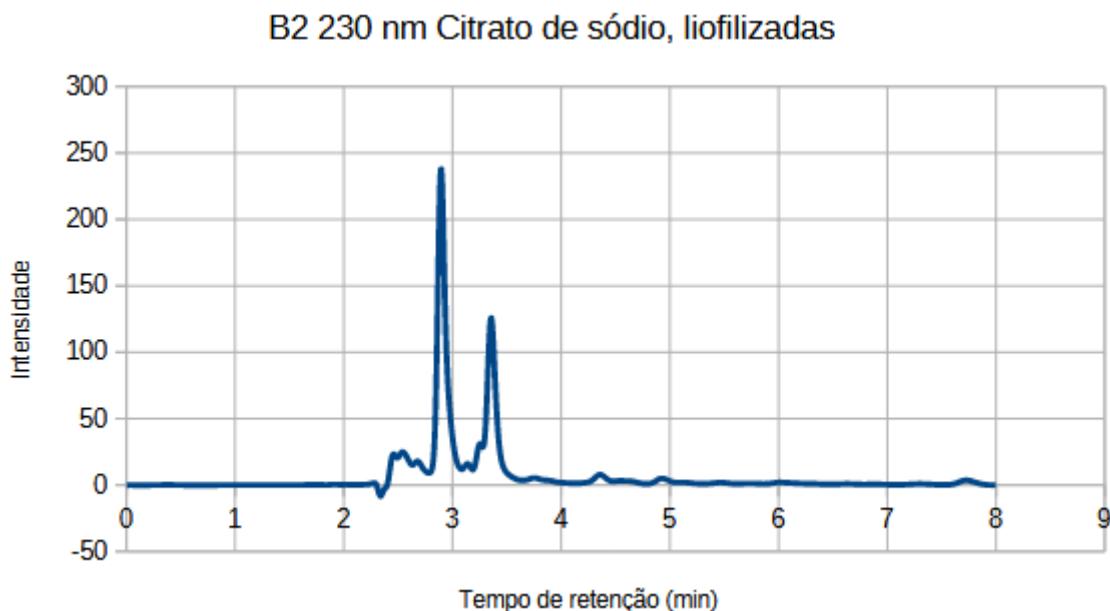
Figura 15 - Cromatograma da Amostra B1 a 230 nm.



Fonte: Autoria própria

A B1, de acordo com a Figura 15, mostrou um grande pico (~700 unidades), refletindo alta concentração de difenoconazol.

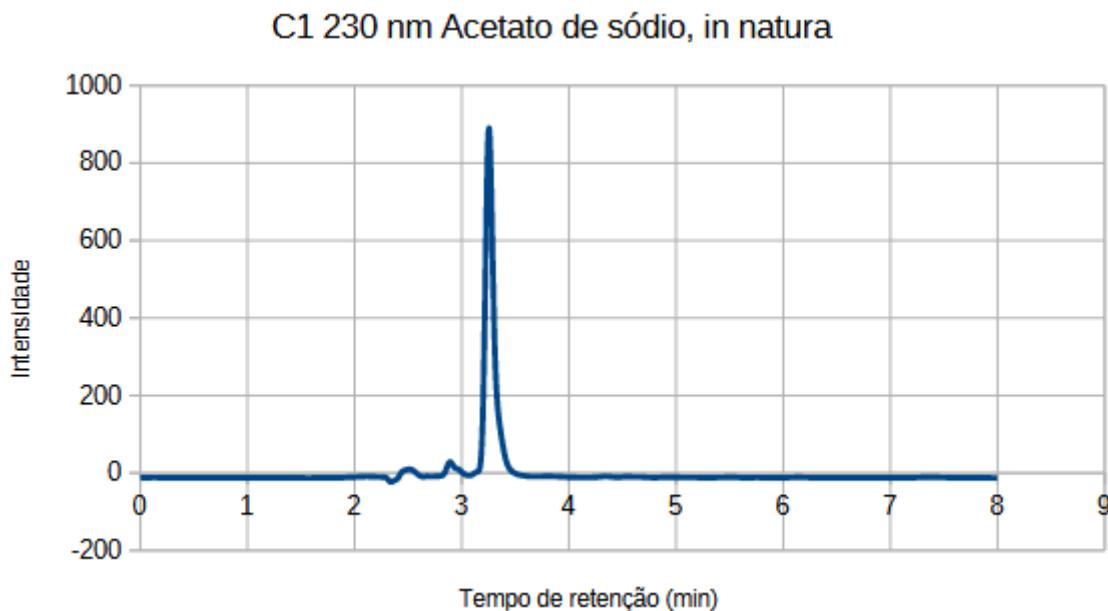
Figura 16 - Cromatograma da Amostra B2 a 230 nm.



Fonte: Autoria própria

A amostra B2 exibiu um pico menor (~130 unidades).

Figura 17 - Cromatograma da Amostra C1 a 230 nm.



Fonte: Autoria própria

A C1 apresentou o maior pico entre todas as amostras (~900 unidades), indicando a maior concentração de difenoconazol detectada.

Figura 18 - Cromatograma da Amostra C2 a 230 nm.



Fonte: Autoria própria

A C2, embora com menor intensidade (~200 unidades), ainda registrou níveis detectáveis do composto.

A aplicação tópica nas abelhas permitiu avaliar diretamente os efeitos do composto em organismos expostos a diferentes concentrações de difenoconazol. Os resultados mostram que as condições de tratamento influenciaram significativamente a presença do difenoconazol nas amostras analisadas. O método de aplicação tópica demonstrou ser eficaz para simular a exposição direta das abelhas ao composto, refletindo cenários ambientais onde o contato com resíduos de agroquímicos pode ocorrer.

A análise dos extratos revelou a presença de difenoconazol nas abelhas expostas, com picos de intensidade variando conforme a concentração aplicada. A escolha do comprimento de onda de 230 nm mostrou-se adequada para a detecção do composto, proporcionando maior sensibilidade nas análises. Observou-se que amostras liofilizadas (A2, B2 e C2) apresentaram picos de intensidade menores em comparação às não liofilizadas (A1, B1 e C1), sugerindo que o processo de liofilização pode afetar a detecção do difenoconazol.

Estudos anteriores confirmam que o difenoconazol pode se acumular em abelhas expostas, tanto por via oral quanto tópica, com maior mortalidade observada na exposição oral (SCAVASSA, 2020). A bioacumulação do fungicida em tecidos das abelhas pode levar a efeitos tóxicos prolongados, mesmo após a cessação da exposição.

4.3.5 Implicações Ecológicas e Agrícolas

A mortalidade e os efeitos subletais observados em *Scaptotrigona postica* expostas ao difenoconazol têm implicações significativas para a polinização e a saúde dos ecossistemas. Abelhas nativas desempenham um papel crucial na polinização de diversas culturas agrícolas e plantas silvestres. A redução de suas populações devido à exposição a agrotóxicos pode comprometer a produtividade agrícola e a manutenção da biodiversidade.

Além disso, a presença de resíduos de difenoconazol em produtos apícolas pode representar riscos à saúde humana, destacando a necessidade de práticas agrícolas que minimizem a exposição de polinizadores a agrotóxicos. A adoção de medidas como a

aplicação de agrotóxicos em horários de menor atividade das abelhas e o uso de produtos menos tóxicos pode contribuir para a proteção desses importantes insetos.

5 CONCLUSÃO

O estudo avaliou os efeitos do difenoconazol em abelhas *Scaptotrigona postica* por meio de aplicação tópica, abordando a toxicidade do composto e sua detecção em amostras biológicas. A pesquisa contribuiu para um melhor entendimento dos impactos de fungicidas amplamente utilizados em ambientes agrícolas, especialmente em organismos não-alvo, como polinizadores nativos.

Os resultados confirmaram que a aplicação tópica é uma metodologia eficaz para simular exposições ambientais reais. As abelhas expostas apresentaram uma relação dose-resposta clara, com mortalidade crescente em concentrações mais altas do difenoconazol, sendo que a taxa de mortalidade atingiu 85,10% em $41 \mu\text{g. L}^{-1}$ após 96 horas. A análise temporal demonstrou que os efeitos tóxicos do composto aumentam com o tempo de exposição, indicando sua persistência e absorção contínua pelas abelhas.

A análise cromatográfica (HPLC) permitiu confirmar a presença e quantificar os níveis de difenoconazol em todas as amostras tratadas, evidenciando a bioacumulação do composto em concentrações proporcionais à dose aplicada. O comprimento de onda de 230 nm foi identificado como o mais adequado para a detecção, devido à maior intensidade dos picos no tempo de retenção ($\sim 3,25$ minutos). As amostras liofilizadas apresentaram picos de intensidade menores em relação às amostras in natura, o que pode estar relacionado às diferenças nas características das matrizes após o preparo.

Em termos práticos, os resultados deste estudo reforçam a necessidade de regulamentação mais rigorosa no uso de fungicidas como o difenoconazol, com ênfase na proteção de polinizadores nativos. Medidas como a redução de doses aplicadas, o uso de produtos menos tóxicos e a aplicação em horários de baixa atividade das abelhas podem contribuir para minimizar os impactos negativos desse fungicida. Além disso, a preservação de áreas de refúgio para polinizadores é fundamental para garantir a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e a proteção da biodiversidade.

REFERÊNCIAS

AEGRO. A importância das abelhas na agricultura. Disponível em: <https://blog.aegro.com.br/importancia-das-abelhas-na-agricultura/>.

AGÊNCIA BRASIL. Agrotóxicos encurtam vida e modificam comportamento de abelhas. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2019-04/agrotoxicos-encurtam-vida-e-modificam-comportamento-de-abelhas>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Perfil Ambiental - Difenoconazol. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa>.

AGROLINK. Cenário atual do uso dos agrotóxicos. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/tecnologia-de-aplicacao/aspectos-gerais/cenario-atual-do-uso-dos-agrotoxicos_479334.html.

AGROLINK. Difenoconazol CCAB 250 EC. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/difenoconazol-ccab-250-ec_11468.html.

APISMEL. O que é a abelha mandaguari? Disponível em: <https://apismel.net/glossario/o-que-e-abelha-mandaguari/>.

BARBOSA-MEDINA, A. M. *Análise de resíduos de neonicotinóides no pólen forrageado e em tecidos das abelhas Apis mellifera africanizada e Tetragonisca angustula Latreille (1811)*. 2021. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021

BELAGRO. Herbicidas, inseticidas e fungicidas: saiba o que são e para que servem. Disponível em: <https://blog.belagro.com.br/herbicidas-inseticidas-e-fungicidas-saiba-o-que-sao-e-para-que-se-rvem/>.

BIODIVERSITY4ALL. Scaptotrigona postica. Disponível em: <https://www.biodiversity4all.org/taxa/418525-Scaptotrigona-postica>.

BRASIL DE FATO. Estamos vivendo um retrocesso na regulamentação dos agrotóxicos, diz militante. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2017/03/28/estamos-vivendo-um-retrocesso-na-regulamentacao-dos-agrotoxicos-diz-militante/>.

CRIAR ABELHAS. Abelhas mandaguari: manejo e características. Disponível em: <https://www.criarabelhas.com.br/abelhas-mandaguari/>.

ECYCLE. Difenoconazol: riscos e benefícios do uso do fungicida agrícola. Disponível em: <https://www.ecycle.com.br/difenoconazol/>.

EMBRAPA. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164063/1/Impactos-de-agrotoxicos-sobre-o-meio-ambiente.pdf>.

EMBRAPA. Riscos de Pesticidas sobre as Abelhas. Disponível em:
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>.
 HEBORÁ MEL DO BRASIL. *Mandaguari Amarela*. Disponível em:
<https://hebora.com.br/blogs/abelhas-do-brasil/mandaguari-amarela>.

INFOESCOLA. Pesticidas - Agrotóxicos: tipos, aplicações, malefícios. Disponível em:
<https://www.infoescola.com/agricultura/pesticidas/>.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos – DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01, Março/2003. Disponível em: <https://www.inmetro.gov.br>.

IPCC. AR6 Synthesis Report: Climate Change 2023. Disponível em:
<https://www.ipcc.ch/report/ar6/synthesis-report/>.

IWASAKA, G. K.; BRIGANTE, J. Análise do efeito subletal de produtos comerciais de Abamectina e Difenoconazol em abelhas da espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) com o auxílio do software de vídeo rastreamento SACAM. Disponível em:
<https://bdta.abcd.usp.br/item/003019118>.

LACOM - Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais. QuEChERS: Métodos de Extração. Disponível em: <https://lacom.furg.br/2-uncategorised/1303-quechers>.

MODUMTECH. O que é Cromatografia Líquida: Histórico e Evolução. Disponível em:
<https://modumtech.com.br/o-que-e-cromatografia-liquida-historico-e-evolucao/>.

NAÇÕES UNIDAS. Relatório das Nações Unidas alerta para perda de biodiversidade sem precedentes na história. Disponível em:
<https://brasil.un.org/pt-br/90967-relatorio-das-nacoes-unidas-alerta-para-perda-de-biodiversidade-sem-precedentes-na-historia>.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 214. Disponível em: <https://www.oecd.org>.

PRADO, F. S. R. *Análise cromatográfica da abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido de abelhas da espécie Melipona scutellaris e avaliação de efeitos de biomarcadores bioquímicos*. 2019. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/qn/a/BJq59mTbNC6HzTcSW5vpTp/>.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SCAVASSA, F. Análise cromatográfica de abamectina e do difenoconazol em amostras de tecido de abelhas da espécie *Melipona scutellaris* e avaliação de efeitos de biomarcadores bioquímicos. 6 mar. 2020.

SIGMA ALDRICH. NMR Chemical Shifts of Impurities. Merck, v. 1, n. 1, 2024.

UM SÓ PLANETA. O declínio das abelhas: iniciativas no Brasil buscam proteger polinizador essencial à segurança alimentar. Disponível em:

<https://umsoplaneta.globo.com/biodiversidade/noticia/2024/04/02/o-declinio-das-abelhas-iniciativas-no-brasil-buscam-proteger-polinizador-essencial-a-seguranca-alimentar.ghtml>.

Universidade de São Paulo. *QFL1444 - Físico-Química Experimental - Noturno: Estudo dirigido T2-L2 - Diagrama de Fases Ternário*. São Paulo: USP, 2022. Disponível em:
https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/7337574/mod_assign/introattachment/0/ED_L2_Noturno.pdf.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. Análise Quantitativa por Cromatografia. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, Brasil. 2006.

WRI BRASIL. 10 conclusões do relatório do IPCC sobre mudanças climáticas de 2023.

Disponível em:

<https://www.wribrasil.org.br/noticias/10-conclusoes-do-relatorio-do-ipcc-sobre-mudancas-climaticas-de-2023>.