UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

ISABELLE LETÍCIA BENDER DE SOUZA

MELIPONA MANDACAIA: UM MODELO NA AVALIAÇÃO DO IMPACTO ANTROPOGÊNICO EM ABELHAS, SEUS PRODUTOS E SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS

CASCAVEL-PR (Agosto/2024)

ISABELLE LETÍCIA BENDER DE SOUZA

MELIPONA MANDACAIA: UM MODELO NA AVALIAÇÃO DO IMPACTO ANTROPOGÊNICO EM ABELHAS, SEUS PRODUTOS E SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Biologia, processo saúdedoença e políticas de saúde

ORIENTADOR: Gicele Galvan COORIENTADOR: Nuno Gonçalo de Carvalho Ferreira

CASCAVEL-PR (Janeiro/2025)



Cascavel - PARANÁ



ISABELLE LETÍCIA BENDER DE SOUZA

Melipona mandacaia: um modelo na avaliação do impacto antropogênico em abelhas, seus produtos e serviços ecossistêmicos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde, linha de pesquisa Fatores que influenciam a morfofisiologia orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Gicelle Galvan Machineski

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

UIIS FRANCISCO ANGELI ALVES Data: 24/01/2025 17:57:46-0300 verifique em https://validar.iti.gov.br

Luis Francisco Angeli Alves

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Documento assinado digitalmente CINTIA MARA RIBAS DE OLIVEIRA Data: 24/01/2025 10:28:39-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.pr

Cíntia Mara Ribas de Oliveira

Universidade Positivo

Cascavel, 23 de janeiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que nunca deixaram de estar ao meu lado e sempre me apoiaram, fazendo o possível e o impossível para que eu chegasse aonde estou hoje. Se nunca desisti de sonhar, foi graças a eles e ao amor incondicional que sempre demonstraram. Vocês são a minha maior inspiração e o porto seguro que me guia em todas as jornadas da vida.

À Ana Tereza Bittencourt Guimarães, por me dar a chance e confiar em mim, e mesmo enfrentando momentos difíceis, esteve ao meu lado, oferecendo suporte muito além do âmbito acadêmico, tornando-se uma verdadeira mãe. E graças a ela, o LINBIO deixou de ser apenas um laboratório e se tornou uma família, a qual também agradeço imensamente.

Ao Gonçalo e a todos os amigos de Portugal, que me acolheram de braços abertos e compartilharam comigo conhecimentos e experiências que levarei para toda a vida. Vocês foram parte essencial desta jornada, trazendo momentos de aprendizado, alegria e crescimento pessoal que jamais esquecerei.

A Associação de apicultores e Meliponicultores da Fazenda Santarém, e a Meliponicultura Sanctórum, por abrirem as portas para as coletas, e iniciando uma longa e linda jornada de cooperação.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado, seja fisicamente ou à distância, que fizeram parte desde o começo ou que chegaram no meio do caminho, pela paciência e por fazerem esse período ser leve e feliz.

Por fim, agradeço à vida pelas lições e desafios, e por ter me proporcionado mais este incrível capítulo na minha história.

Do or do not. There is no try -Mestre Yoda.

RESUMO

A agricultura brasileira é uma das principais atividades econômicas do país, e as abelhas desempenham um papel vital nesse contexto, facilitando a polinização de plantas, essencial para a produção de frutos e sementes, e sustentando a biodiversidade e a economia global. A meliponicultura, a criação de abelhas sem ferrão, é economicamente significativa, especialmente para comunidades rurais e indígenas, devido à venda de mel. No entanto, recentemente, tem-se observado um declínio acentuado nas populações de insetos, incluindo a Melipona mandacaia, uma espécie de abelha endêmica da região da Caatinga, devido às alterações antrópicas. Este estudo utiliza biomarcadores para avaliar o estado de saúde de Melipona mandacaia, uma abelha sem ferrão nativa do bioma Caatinga, como indicadores de estresse antropogênico. Os biomarcadores incluem colinesterases (ChE) para avaliar a neurotoxicidade, catalase (CAT) para medir as respostas antioxidantes, glutationa S-transferase (GST) para as vias de desintoxicação, e peroxidação lipídica (LPO) como um indicador de estresse oxidativo. Os resultados revelam que a inibição da ChE pode estar associada a níveis de stress mais elevados devido a atividades humanas, enquanto os restantes biomarcadores apresentaram respostas mistas nas diferentes áreas de nível de stress. Isto pode ser parcialmente explicado pelas práticas de apicultura em alguns locais, que podem ter atenuado os efeitos dos pesticidas e da combustão de combustível até um certo ponto. Esses resultados ressaltam a importância de monitorar a saúde das abelhas silvestres na Caatinga. Além de analisar os organismos, também é possível investigar a contaminação ambiental em produtos apícolas, como o mel. A espetroscopia Raman é uma técnica eficiente para a análise não destrutiva, rápida e precisa para a caraterização química e autenticação do mel. A revisão sistemática da literatura identificou artigos com o termo de busca "HONEY AND RAMAN" para identificar e organizar picos Raman associados ao mel, analisando artigos publicados entre 2000 e 2024. Foram avaliados comprimentos de onda variados, como 532 nm, 785 nm e 1064 nm, resultando na descrição de 411 picos relevantes. A técnica demonstrou divergências na descrição de picos entre estudos. Para o laser de 532 nm e a maior discrepância se tratava da categoria "moléculas iguais e modos vibracionais diferentes", enquanto em 785 nm e 1064 a maior parte da divergência foi relacionada a descrição "moléculas e modos vibracionais iguais". Essa diferença indica desafios, como a sobreposição espectral e

a ambiguidade na atribuição de picos. Conclui-se que a espectroscopia Raman, pode contribuir para identificação e autenticação do mel, fortalecendo sua aplicabilidade em estudos ambientais e na garantia da qualidade do produto.

Palavras-Chave: Melipona mandacaia; Biomarcadores; Espectroscopia Raman; Antropização.

ABSTRACT

MELIPONA MANDACAIA: A MODEL FOR EVALUATING ANTHROPOGENIC IMPACTS ON BEES, THEIR PRODUCTS AND ECOSYSTEM SERVICES

Brazilian agriculture is one of the country's main economic activities, and bees play a vital role in this context, facilitating plant pollination, which is essential for fruit and seed production, and sustaining biodiversity and the global economy. Meliponiculture, the breeding of stingless bees, is economically significant, especially for rural and indigenous communities, due to the sale of honey. However, recently there has been a marked decline in insect populations, including Melipona mandacaia, a bee species endemic to the Caatinga region, due to anthropogenic changes. This study uses biomarkers to assess the health status of *Melipona mandacaia*, a stingless bee native to the Caatinga biome, as indicators of anthropogenic stress. The biomarkers include cholinesterases (ChE) to assess neurotoxicity, catalase (CAT) to measure antioxidant responses, glutathione S-transferase (GST) for detoxification pathways, and lipid peroxidation (LPO) as an indicator of oxidative stress. The results reveal that ChE inhibition may be associated with higher stress levels due to human activities, while the other biomarkers showed mixed responses in the different stress level areas. This may be partially explained by beekeeping practices at some sites, which may have mitigated the effects of pesticides and fuel combustion to a certain extent. These results highlight the importance of monitoring the health of wild bees in the Caatinga. In addition to analyzing the organisms, it is also possible to investigate environmental contamination in bee products such as honey. Raman spectroscopy is an efficient technique for non-destructive, fast and accurate analysis for the chemical characterization and authentication of honey. The systematic literature review identified articles with the search term "HONEY AND RAMAN" to identify and organize Raman peaks associated with honey, analyzing articles published between 2000 and 2024. Varied wavelengths were evaluated, such as 532 nm, 785 nm and 1064 nm, resulting in the description of 411 relevant peaks. The technique showed divergences in the description of peaks between studies. For the 532 nm laser, the biggest discrepancy was in the "same molecules and different vibrational modes" category, while at 785 nm and 1064, most of the divergence was related to the "same molecules and vibrational modes" description. This difference indicates challenges such as spectral overlap and ambiguity in peak assignment. It can be concluded that Raman

spectroscopy can contribute to the identification and authentication of honey, strengthening its applicability in environmental studies and product quality assurance. **Key words:** *Melipona mandacaia*; Biomarkers; Raman spectroscopy; Anthropisation

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase			
ChE	Colinesterase			
EROS	Espécies reativas de oxigênio			
GST	Glutationa S-transferase			
GBR-NMF	Generalized Bilinear Non-negative Matrix			
	Factorization			
HS	High-stress area			
LPO	Lipoperoxidação			
LS	Low-stress area			
MS	Middle-stress area			
NS	No-stress area			
PCA	Preferred Reporting Items for Systematic			
PRISMA	Reviews and Meta-Analyses			
	Soft Independent Modeling of Class			
SIMCA	Analogy			

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espécime de Melipona mandacaia Smith, 1863.	22
Figura 2 - Reações simplificadas da formação dos radicais oxigenados	26
Figura 3 - Reação de Fenton e Haber-Weiss	27
Figura 4 - Dismutação do superóxido	29
Figura 5 - Reação de redução do peróxido de hidrogênio pela catalase.	29
Figura 6 - Redução do peróxido de hidrogênio pelas enzimas glutationas	30
Figura 7 - Fases da Lipoperoxidação	31

Capítulo 1

Figure 1 - Environmental stress gradient as a result of anthropogenic activity to which *Melipona mandacaia* were exposed. (1) Caatinga biome – No stress; (2) Meliponiculture boxes in the Caatinga – Low stress; (3) Caatinga close to anthropogenic disturbance – Moderate stress; (4) Meliponiculture in an urban area – High stress 41

Figure 2 - Comparison of biomarker activity in *Melipona mandacaia* from different study areas. NS- denotes no-stress area (dark blue), LS- denotes low-stress area (light blue), MS – denotes moderate-stress area (grey), HS - denotes high-stress area (orange).

Figure 3 - A) Principal Component Analysis (PCA) and projections of the main dimensions based on the activity of biomarkers in *Melipona mandacaia* from different study areas. Mean projections and standard deviations of the areas studied in Dimension 1 – Oxidative stress (B), in Dimension 2 – Neurotransmission(C), and in Dimension 3 – Cellular damage.

Figure 4 - Integrated Biomarkers Response (IBR) index for *Melipona mandacaia* under different stress areas. NS - no-stress area (dark blue), LS – low-stress area (light blue), MS - moderate-stress area (grey), HS – high-stress area (orange), ChE: cholinesterases, GST: glutathione *S*-transferase, LPO: lipid peroxidation, CAT: catalase.

Capítulo 2

Figura 1 – Diagrama PRISMA para revisões sistemáticas resultante.

Figura 2 - Diagrama de análise das diferenças encontradas na comparação de descrição de picos. 65

Figura 3 – Gráfico de barras agrupadas mostrando o número de picos em cada categoria (mesma molécula e modo vibracional; mesma molécula, mas modos vibracionais diferentes; moléculas diferentes, mas modos vibracionais iguais; e moléculas e modos vibracionais diferentes) após a comparação das descrições. 66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1- Descrição dos picos no comprimento de onda de 532nm	69
Tabela 2 - Descrição dos picos no comprimento de onda de 782 nm	73
Tabela 3 - Descrição dos picos no comprimento de onda de 785 nm	75
Tabela 4 - Descrição dos picos no comprimento de onda de 830 nm	83
Tabela 5 - Descrição dos picos no comprimento de onda de 1064 nm	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO GERAL	18
2.1 O bioma caatinga	18
2.2 O serviço ecossistêmico promovido pela polinização	20
2.3 Abelhas polinizadoras	21
2.3.1 Biomarcadores de avaliação de saúde	24
2.3.2 Espécies Reativas de Oxigênio radicalares e não radicalares	24
2.3.3 Sistema antioxidante	28
2.3.3.1 Sistema enzimático antioxidante	28
3.3.4 Estresse oxidativo	30
2.4 Biomarcadores em abelhas	32
2.5 Composição do mel	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4. ARTIGOS	36
Artigo I - Effects of anthropogenic stress on stingless bees <i>Melipona mandacaia</i> inhabiting urban and natural environments	37
Artigo II - Espectroscopia Raman no Mel: Uma Revisão Sistemática dos Picos e.	59
Compostos Químicos Associados	59
REFERÊNCIAS GERAIS	96

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das principais atividades econômicas desenvolvidas no Brasil, e apresenta um diversificado conjunto de produtos tanto ao consumo interno, quanto para exportação. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, o comércio de culturas dependentes de polinizadores é de grande relevância econômica (Silva et al., 2021; Murphy et al., 2022).

A troca de pólen entre plantas é mediada por polinizadores, que desempenham um papel essencial na produção de frutos e sementes, sendo fundamentais para a biodiversidade e a economia global (Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011; Potts et al., 2016; Roubik; David, 2018; Murphy et al., 2022; Gekière et al., 2023). As abelhas são especialmente importantes na polinização de plantas nativas e espécies agrícolas, participando desse processo em mais de 90% das principais culturas brasileiras (BPBES/REBIPP, 2019).

No Brasil, existem mais de 244 espécies de abelhas sem ferrão da tribo Meliponini (Ascher; and Pickering, 2024), enquanto mundialmente esse número chega a mais de 600 espécies, sendo a maioria distribuída na região neotropical (Roubik, 2023; Ascher; Pickering, 2024). A criação de abelhas sem ferrão para fins comerciais, conhecida como meliponicultura, também desempenha um papel econômico importante, servindo como fonte de renda para comunidades rurais e indígenas, especialmente por meio da venda de mel (Jaffé et al., 2015).

Entre as abelhas sem ferrão de importância ecológica e comercial está a *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Silveira; Melo; Almeida, 2002; Grüter, 2020). Esta espécie apresentava ampla distribuição no Vale do Rio São Francisco, na Caatinga, um bioma exclusivo do Brasil, com um número significativo de outras espécies endêmicas. Este bioma tem sido amplamente degradado, com uma redução de 45% de sua cobertura original (Alves; Carvalho; Souza, 2006; Sá; Silva, 2010; Alvares, 2013; Carneiro-Neto et al., 2017).

Na última década tem se observado um drástico declínio das populações de insetos, consequência direta da perda, degradação e fragmentação de habitat devido à expansão urbana e agrícola convencional (Potts et al., 2016; Cham et al., 2019; Sponsler et al., 2019; Cardoso et al., 2020; Silva F. et al., 2021; Teixeira; Huber, 2021). Entre esses insetos destaca-se as abelhas, como *M. mandacaia*, que segundo

meliponicultores de Petrolina passou a ser dificilmente encontrada na região (Ribeiro et al., 2019).

As abelhas sem ferrão, ao forragearem, ficam expostas a vários poluentes, tornando-se indicadores confiáveis da qualidade ambiental (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013; La Porta et al., 2023) e esses problemas ambientais podem desencadear a elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como hidroxilas (OH-) e peróxido de hidrogênio (H2O2), promovendo toxicidade e estresse oxidativo (Su et al., 2019) às células animais.

Assim, um dos métodos utilizados para avaliar os efeitos subletais das alterações antrópicas em organismos não-alvo como as espécies de abelhas é a análise de biomarcadores. Entre os biomarcadores mais utilizados, lista-se as colinesterases (ChE), as quais são indicadores sensível de neurotoxicidade (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Li et al., 2017). Por sua vez, as enzimas catalase (CAT) e glutationa s-transferase (GST), podem ser associadas à defesa antioxidante e detoxificação, respectivamente (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Han, 2019; Caliani et al., 2021), estando presentes no sistema antioxidante enzimático celular. É possível também quantificar a peroxidação de fosfolipídeos, reação conhecida como lipoperoxidação (LPO), quantificando os peróxidos capazes de promover danos à membrana celular (Lupi et al., 2021; Li et al., 2021). É crucial adotar uma abordagem integrada que combine múltiplos biomarcadores para um diagnóstico preciso da exposição a estressores ambientais (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Lupi et al., 2021). Esses biomarcadores oferecem uma visão abrangente dos efeitos tóxicos e da complexidade da exposição a xenobióticos.

Além da análise dos organismos, também é possível averiguar a contaminação ambiental nos produtos apícolas. O mel contém mais de 200 componentes de importância à saúde humana, como carboidratos (glicose e frutose), enzimas, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, lipídeos, carotenoides, vitaminas, minerais, substâncias aromáticas, flavonoides e ácidos fenólicos (Rao et al., 2016; Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Valverde et al., 2022). Sua composição pode variar conforme a espécie de abelha, condições climáticas, geográficas, tipos de plantas forrageadas e métodos de armazenamento utilizados pelos meliponicultores (Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Ribeiro et al., 2019; Batison et al., 2023; Silva et al., 2021). Uma das técnicas atualmente utilizada para análise molecular dos compostos presentes em diferentes materiais biológicos é a espectroscopia Raman. Essa técnica permite a identificação e quantificação da composição química, e oferecer detalhes sobre a autenticidade desses materiais, demonstrando uma digital química do produto analisado. Entretanto ainda necessita de uma maior sistematização dos dados das análises desses compostos (Anjos et al., 2018; Robert; Birech; Kaniu, 2023).

Diante deste contexto, o presente estudo tem por objetivo verificar os impactos de diferentes níveis de antropização em abelhas da espécie *Melipona mandacaia*, por meio da análise de biomarcadores de neurotoxicidade, estresse oxidativo e detoxificação. Pretende-se também sumarizar as caracterizações espectroscópicas de méis usando a técnica de Raman, apresentando os picos dessa técnica, bem como as divergências relativas às descrições já relatadas na literatura sobre picos em diferentes comprimentos de onda.

2. REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

2.1 O bioma caatinga

O Brasil abrange uma grande diversidade de ecossistemas, sendo o país mais megabiodiverso do mundo. Um desses ecossistemas é a Caatinga, que ocupa 54% da Região Nordeste, e 11% do território nacional, englobando grande parte da região semiárida do país. O ecossistema da Caatinga é caracterizado por sua flora e fauna únicas, que desenvolveram adaptações especializadas para o clima quente e seco da região (Sá; Silva, 2010; Alvares, 2013; Melo, 2023).

Esse ecossistema é considerado extremamente importante do ponto de vista biológico e ecológico, pois além de ter sua distribuição restrita ao território brasileiro, possui um número considerável de espécies endêmicas, como a *M. mandacaia* que contribui para a polinização de muitas espécies vegetais nativas do bioma (Alves; Carvalho; Souza, 2006; Carneiro-Neto et al., 2017; Melo, 2023).

Esse bioma no Nordeste brasileiro originalmente apresentava uma área de 826.000 km². No entanto, 45% dessa cobertura foi perdida, e as áreas remanescentes estão amplamente fragmentadas e sujeitas a perturbações antropogênicas. Esses distúrbios incluem a criação extensiva de gado e ovelhas, extração de madeira, fogo, caça e outras atividades humanas, afetando diretamente as abelhas nativas (Antongiovanni et al. 2020, Antongiovanni et al., 2022).

Verifica-se a continuidade nesse processo de degradação do Bioma, pois no ano de 2020 a perda de cobertura vegetal na Caatinga foi de 61.373ha, e no ano seguinte, em 2021, de 116.260ha, um aumento de 88,9%. Esses números destacam a taxa alarmante de degradação da Caatinga, com perdas significativas na cobertura vegetal ocorrendo nos últimos anos (Mapbiomas, 2021; Mapbiomas, 2022).

O presente estudo foi realizado nos munícios de Casa Nova (9°20'42.24"S, 41°23'5.81"O – Bahia) e Petrolina (9°22'16.95"S, 40°28'59.13"O – Pernambuco), ambas cidades localizando-se no Vale do Rio São Francisco. Fazem parte do bioma Caatinga, e apresentam climas similares, sendo do tipo BSwh' que, segundo a classificação de Köeppen para climas áridos e semiáridos, correspondente a uma região climaticamente semiárida. Em comparação a outras regiões do planeta, o semiárido brasileiro é mais chuvoso, com precipitação de até 800 mm por ano,

concentradas num período de 3 a 4 meses. Entretanto, apresenta uma insolação média elevada, alta taxa de evaporação, temperaturas médias anuais de 23 °C a 27 °C, e umidade relativa do ar média em torno de 50% (Sá; Silva, 2010; Alvares, 2013; Sudene, 2021). Segundo dados de estações meteorológicas da EMBRAPA (2023) localizadas no município de Casa Nova (BA) e Petrolina (PE), na série histórica de 2003-2022, as temperaturas médias foram de 26,2°C e 26,6°C, o índice pluviométrico de 381,0mm e 391,7mm, respectivamente.

Em meio a Caatinga, no município de Casa Nova – BA, situada no território do médio São Francisco, as margens do Lago de Sobradinho, está localizada a Fazenda Santarém, onde os moradores se organizam na Associação dos Pequenos Produtores e Apicultores da Fazenda Santarém há mais de 30 anos, e segundo a Presidente Simone De Brito Barreto (2023):

"A área de extensão da fazenda é de aproximadamente 6000 hectares, entre áreas de propriedade privada e terras devolutas (terras pertencentes ao Estado utilizadas de forma coletiva). Nela estão abrigadas cerca de 250 famílias, muitas remanescentes das terras inundadas com o represamento do Rio São Francisco que deu origem ao Lago. A população realiza a criação solta de ovinos e caprinos, cultivam espécies que dependem essencialmente de polinizadores, como o melão e melancia, além de mandioca e feijão. A principal fonte econômica dos produtores é a apicultura (criação de *Apis mellifera*), mas também se dedicam a meliponicultura, cultivando espécies de abelhas sem ferrão nativas da Caatinga, como *Melipona mandacaia.* A comunidade atua na organização e formação de agricultores e agricultoras familiares, buscando melhorar suas formas produtivas, assim como o beneficiamento e a comercialização da produção, sempre buscando incluir mulheres, jovens e idosos nas atividades econômicas."

Dessa maneira a comunidade atua fortalecendo o desenvolvimento econômico regional. Os méis lá produzidos apresentam características únicas, o que pode agregar valor comercial ao produto, além de proteger os serviços ecossistêmicos ambientais locais. Assim, a preservação do bioma não só garante a sobrevivência de espécies endêmicas, mas também apoia diretamente as atividades econômicas e sociais das populações locais, contribuindo para o desenvolvimento sustentável da região.

2.2 O serviço ecossistêmico promovido pela polinização

Os polinizadores são animais que intermediam a troca de pólen entre as plantas, facilitando a produção de frutos e sementes (Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011; Potts et al., 2016; Roubik; David, 2018; Murphy et al., 2022; Gekière et al., 2023). A interação polinizador-planta pode ser uma das relações ecológicas animal-planta mais importantes, sendo considerado um importante serviço ecossistêmico, por promover benefícios à vida humana, como de acordo com o Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima (2023):

"Todas as atividades humanas dependem dos recursos que estão no meio ambiente. Os serviços ecossistêmicos são benefícios fundamentais para a sociedade gerados pelos ecossistemas, em termos de manutenção, recuperação ou melhoria das condições ambientais, refletindo diretamente na qualidade de vida das pessoas".

A proteção da polinização é um processo chave para a conservação da biodiversidade e para a economia global. Esse processo está associado à manutenção do fluxo genético de espécies vegetais, à diversidade floral, à especiação e à evolução de plantas nativas e cultivadas nos ecossistemas de todo o mundo, além de serem ecologicamente relevantes na dispersão de esporos de fungos e outros organismos unicelulares (Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011; Potts et al., 2016; Roubik; David, 2018; Ollerton, 2017; Roubik; 2020).

Uma ampla gama de animais pode atuar como polinizadores, tais como aves, mamíferos, répteis e insetos, sendo este último táxon especialmente representado pelas abelhas que são especializadas nessa função (Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011; Potts et al., 2016; Roubik, 2020). Além de espécies de plantas nativas, as abelhas são os polinizadores mais comuns na agricultura, visitando mais de 90% dos 107 principais cultivares do Brasil (Bpbes/Rebipp, 2019). Dos 1330 cultivos realizados em regiões tropicais, 70% produzem mais frutos e sementes, ou de melhor qualidade, quando polinizadas adequadamente (Potts et al., 2016; Roubik; David, 2018; Bpbes/Rebipp, 2019).

No Brasil, entre as plantas destinadas à alimentação que apresentam informações sobre polinização, 35% têm a polinização como serviço ecossistêmico essencial, como por exemplo o caju (*Anacardium occidentale*), a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), o maracujá (*Passiflora edulis*), a melancia (*Citrullus lanatus*), o

melão (*Cucumis melo*), a mangaba (*Hancornia speciosa*), o umbu (*Copernicia prunifera*); outros, 24% dos cultivos apresentam alta dependência, como exemplo a berinjela (*Solanum melongena*), a cebola (*Allium cepa*), a goiaba (*Psidium guajava*), o guaraná (*Paullinia cupana*), o jambo (*Syzygium malaccense*); 10% tem dependência moderada, como o café (*Coffea arabica*), a soja (*Glycine max*), a laranja (*Citrus sinensis*), o pimentão (*Capsicum annuum*), o urucum (*Bixa orellana*); 7% das espécies apresentam baixa dependência da polinização, como o feijão (*Phaseolus vulgaris*), o tomate (*Solanum lycopersicum*) e a uva (*Vitis labrusca*) (Bpbes/Rebipp, 2019).

Como exemplo da relevância econômica dos polinizadores, o comércio de culturas dependentes de polinização é uma importante fonte de renda para países em desenvolvimento (Silva F. et al., 2021; Murphy et al., 2022). Em 2021, mais de 800 milhões de euros em produtos (frutas tropicais e cítricas, cacau, nozes e especiarias) foram exportados do Brasil para a União Europeia (União Europeia, 2022). Entendese que os choques nos sistemas alimentares globais, que podem ser gerados pelo declínio de polinizadores, portanto, podem ter efeitos desproporcionais entre os países, sendo mais severos em países em desenvolvimento (Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011; Bekkers et al., 2017; Murphy et al., 2022).

A compreensão das funções dos polinizadores e a promoção de práticas que favoreçam a sua conservação são fundamentais para garantir a continuidade dos serviços ecossistêmicos que sustentam a biodiversidade e o bem-estar humano (Potts et al., 2016; Sponsler et al., 2019; Silva et al. 2021; Murphy et al., 2022).

2.3 Abelhas polinizadoras

Dentre os diversos tipos de abelhas que abrigam as regiões tropicais e subtropicais, há destaque para as abelhas sem ferrão, da tribo Meliponini, cuja maioria das espécies podem ser encontradas na região neotropical (77%) (Grüter, 2020). As abelhas corbiculadas apresentam o hábito de carregar o pólen em uma "cesta de pólen", sendo esta chamada de corbícula, presente nas patas traseiras. Essa tribo de abelhas se distingue pela falta de um ferrão funcional, pela venação reduzida das asas, o um tufo tibial de cerdas fortes e curvas na base da tíbia posterior, denominado "penicillum", ausência de uma aurícula (prensa de pólen), e expansão da base do basitarsus posterior (Figura 1) (Grüter, 2020).

No mundo foram descritos cerca de 58 gêneros com mais de 600espécies, com 244 espécies estão presentes no Brasil, e divididas em 27 gêneros (Ascher; Pickering, 2024).

Esses dados fazem da tribo Meliponini o maior táxon da família Apidae e mais diversificado grupo de abelhas corbiculadas, em comparação com aproximadamente 11 espécies de abelhas melíferas, 250 espécies de mamangava e entre 200 e 250 espécies de abelhas-das-orquídeas (Grüter, 2020). Essas espécies de meliponíneos contribuem para a polinização de mais de 60 espécies agrícolas, tendo relevância econômica, contribuindo para a segurança alimentar e o equilíbrio ecológico dos ecossistemas (Cham et al., 2019; Meléndez Ramírez; Ayala; González, 2018). Uma das espécies desta tribo é M. mandacaia, uma abelha sem ferrão nativa e endêmica da Caatinga (Figura 1) (Silveira; Melo; Almeida, 2002; Grüter, 2020; Ascher; Pickering, 2024).



Figura 1- Espécime de Melipona mandacaia Smith, 1863.

<u>1 mm</u>

Fonte: Figura adaptada de (FRPSP - Coleção Entomológica "Prof. J.M.F. Camargo", FFCLRP/USP. Legenda: Melipona mandacaia com aspectos da morfologia das abelhas sem ferrão em destaque. a) Corbículas; b) Venação reduzida das asas; c) Presença de "penicillum"; d) ausência de aurícula no bisatarsus.

O declínio das populações de insetos, em especial das abelhas, deve-se principalmente a perda, degradação e fragmentação do habitat, expansão de áreas urbanas e de áreas agrícolas convencionais, e concomitantemente ao aumento do consumo de agrotóxicos e produtos químicos, a propagação de espécies invasoras, às alterações climáticas globais, e à co-extinção de espécies dependentes (Potts et al., 2016; Roubik, 2018; Cham et al., 2019; Sponsler et al., 2019; Cardoso et al., 2020; Silva F. et al., 2021). De acordo com relatos de meliponicultores da região de Petrolina, a *M. mandacaia* era frequentemente encontrada, mas deixou de ser uma espécie comum (Ribeiro et al., 2019).

A prática agrícola convencional, baseada em um alto consumo de agrotóxicos, é incentivada por razões econômicas, pois o preço internacional dos produtos é definido independentemente dos custos ambientais nos países exportadores (Silva et al., 2021). Contudo, essas substâncias poluentes utilizadas na agricultura convencional podem exercer efeitos letais e subletais sobre os organismos, variando conforme o nível de exposição, duração e via (ingestão, contato, inalação) (Potts et al., 2016; Roubik; David, 2018; Cham et al., 2019; Sponsler et al., 2019; Cardoso et al., 2020; Murphy et al., 2022).

A exposição crônica a esses fatores adversos enfraquece gradualmente as colônias, diminui seu desempenho, reduz a fecundidade da rainha e altera a capacidade das operárias de aprender e forragear. Além disso, ocorrem alterações subletais nos níveis molecular, bioquímico, celular, fisiológico ou comportamental. Como exemplo disso, pode ocorrer o desencadeamento da produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (EROs), como hidroxilas (OH-) e peróxido de hidrogênio (H2O2) aumentando assim a toxicidade para células animais (Cattani et al., 2014;Sies et al., 2022) e promovendo estresse oxidativo celular devido a peroxidação lipídica (Su et al., 2019).

Esses fatores podem servir como biomarcadores, indicando a exposição passada ou presente de um organismo a xenobióticos, e fornecendo informações sobre os impactos ecotoxicológicos dessas substâncias sobre as populações de insetos (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Lupi et al., 2021).

2.3.1 Biomarcadores de avaliação de saúde

Os xenobióticos são compostos que não são produzidos naturalmente pelos organismos e não possuem similaridades com os compostos químicos naturais (Fay; Silva; De Melo, 2008; Klaassen, 2013).

O processo de absorção dos xenobióticos não segue vias ou sistemas específicos. Eles são absorvidos da mesma forma que substâncias essenciais ao organismo, e uma vez absorvidos e na corrente sanguínea, são rapidamente distribuídos para as células dos órgãos e tecidos por transporte passivo, dependendo da afinidade do composto. Em geral, os compostos lipossolúveis atravessam as membranas celulares, enquanto os hidrofílicos podem atravessar pelas aquaporinas. Antes de serem eliminados, os xenobióticos passam pela biotransformação. Esse processo é altamente específico para cada composto, não havendo uma regra geral que determine como será transformado antes da eliminação (Klaassen, 2013; Halliwell; Gutteridge, 2015).

No entanto, na maioria dos casos, essas moléculas são convertidas de lipofílicas para hidrofílicas, por meio de reações catalisadas por diversas enzimas, incluindo hidrólise, redução, oxidação e conjugação (Klaassen, 2013; Halliwell; Gutteridge, 2015).

Os mecanismos pelos quais essas reações acontecem podem envolver a formação de moléculas denominadas de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que podem ser radicais livres, ou não. A interação entre EROs e xenobióticos pode ocorrer de diversas formas: o xenobiótico pode ser uma ERO, ser metabolizado em uma, participar de ciclos redox que geram EROs, interferir na defesa antioxidante ou afetar processos celulares que estimulam a produção endógena de EROs, entre outros efeitos (Halliwell; Gutteridge, 2015)

2.3.2 Espécies Reativas de Oxigênio radicalares e não radicalares

O conceito tradicional dos átomos indica que eles possuem um núcleo, onde partículas carregadas positivamente estão concentradas, e elétrons que orbitam ao redor, com carga negativa. Teoricamente, o número de cargas positivas é igual ao de cargas negativas, mantendo o átomo neutro. Para que um elemento químico esteja em equilíbrio, os orbitais da camada mais externa devem conter um número par de elétrons, garantindo sua estabilidade (Olszewer, 1995).

A formação de uma espécie radical ocorre, ainda que por um breve período, quando um elemento químico ou molécula possui um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, um elétron sem par em um orbital (Peres, 1994). Esses radicais, por serem altamente instáveis, têm uma vida média muito curta, pois tendem a captar elétrons de outros compostos para se estabilizarem. Assim, essas moléculas reagem frequentemente por meio de reações de oxirredução (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991). Durante essas reações, a espécie radical pode perder um elétron desemparelhado para outra molécula, resultando em uma reação de oxidação, sendo denominada um radical redutor. Alternativamente, pode ganhar um elétron, sofrendo redução e sendo denominada radical oxidante (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991; Peres, 1994; Olszewer, 1995). Esse processo gera um efeito cascata, pois as reações com espécies radicalares continuam até que dois radicais se encontrem, resultando na troca de elétrons (Peres, 1994; Olszewer, 1995; Halliwell; Gutteridge, 2015).

As espécies moleculares radicalares que contêm oxigênio como átomo central são conhecidas como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Barreiros; David; David, 2006). Contudo, algumas EROs, como o peróxido de hidrogênio, são classificadas como não radicalares, pois, embora reativas, não possuem elétron desemparelhado (Ferreira; Matsubara, 1997).

A maior parte do oxigênio nos organismos é metabolizada na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, onde a citocromo oxidase promove a redução tetravalente do O2, resultando na formação de água. No entanto, uma pequena parte do oxigênio pode seguir uma via metabólica alternativa e sofrer redução parcial, gerando EROs radicalares e não radicalares (Barbosa et al., 2010).

A redução parcial do O2 leva à formação de intermediários reativos, incluindo superóxido (O2-), hidroperoxila (HO2), peróxido de hidrogênio (H2O2) e hidroxila (-OH). A redução univalente resulta na formação dos radicais superóxido (O2-) e hidroperoxila (HO2, formado pela protonação do O2- em solução aquosa); a redução bivalente gera o peróxido de hidrogênio (H2O2, uma ERO não radicalar); e a redução trivalente produz o radical hidroxila (-OH), com as reações simplificadas apresentadas na Figura 3 (Halliwell; Gutteridge, 2015).



Figura 2 - Reações simplificadas da formação dos radicais oxigenados.

Fonte: Ferreira; Matsubara (1997, p. 62).

Conforme ilustrado na Figura 3, o superóxido (O2-) é gerado pela primeira redução do O2, um processo comum durante a atividade de neutrófilos e macrófagos (Ferreira; Matsubara, 1997), que envolve a adição de um elétron à molécula de oxigênio (Halliwell; Gutteridge, 2015). Embora o superóxido seja considerado um oxidante fraco devido à sua baixa reatividade, estudos indicam que ele pode causar danos tóxicos aos sistemas enzimáticos (Olszewer, 1995; Ferreira; Matsubara, 1997). Já a hidroperoxila (HO2), uma ERO radicalar mais reativa que o superóxido, é a forma protonada deste último, possuindo maior potencial de destruição de membranas biológicas (Ferreira; Matsubara, 1997).

O peróxido de hidrogênio (H2O2), uma ERO não radicalar, é formado pela segunda redução do O2 e pode ser produzido por diversas enzimas oxidases, incluindo a Superóxido Dismutase (SOD) (Halliwell; Gutteridge, 2015). Embora o H2O2 não possua um número ímpar de elétrons, ele é um metabólito de oxigênio altamente deletério. Com uma meia-vida relativamente longa e a capacidade de atravessar membranas, o H2O2 pode causar alterações cromossômicas, sendo formado principalmente pela protonação do superóxido ou pela reação de dois elétrons com oxigênio molecular (Olszewer, 1995; Ferreira; Matsubara, 1997; Andrade Junior et al., 2005).

Por fim, o radical hidroxila, considerado o mais reativo de todos (Peres, 1994), é formado a partir do peróxido de hidrogênio na reação de Fenton e Haber-Weiss (Figura 4), catalisada pelo ferro. Nesta reação, o superóxido doa um elétron para reduzir o ferro férrico (Fe+3) a ferroso (Fe2+), que, por sua vez, reduz o peróxido de hidrogênio à hidroxila. O ferro catalisador dessa reação pode ser proveniente de componentes biológicos como as proteínas transferrinas, hemoglobinas e lactoferrinas (Olszewer, 1995). A reação do radical hidroxila com moléculas vizinhas pode gerar elementos radicalares secundários (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991).



Fonte: Ferreira; Matsubara (1997, p. 63).

Nesta reação, o superóxido doa um elétron para reduzir o ferro férrico (Fe+3) a ferroso (Fe2+), que, por sua vez, reduz o peróxido de hidrogênio à hidroxila. O ferro catalisador dessa reação pode ser proveniente de componentes biológicos como as proteínas transferrinas, hemoglobinas e lactoferrinas (Olszewer, 1995). A reação do radical hidroxila com moléculas vizinhas pode gerar elementos radicalares secundários (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991).

Os principais processos fisiológicos que promovem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, a fagocitose, as reações de desintoxicação nos peroxissomos, a síntese de prostaglandinas e as irradiações ionizantes. Dada a gama de processos que resultam na produção de EROs, muitos problemas podem surgir devido às alterações metabólicas nos organismos. No entanto, ao longo da evolução dos metazoários, sistemas que impedem a formação ou neutralizam as EROs se desenvolveram, garantindo maior eficiência na sobrevivência e reprodução dos organismos. Esses sistemas são conhecidos como o sistema antioxidante (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991; Andrade Junior et al., 2005).

2.3.3 Sistema antioxidante

A função primordial do sistema antioxidante é prevenir, inibir ou mitigar os danos causados pela formação de EROs. Esse sistema pode atuar de três maneiras: na prevenção, reduzindo a formação de EROs; na varredura, minimizando a ação dessas espécies reativas; ou no reparo, reconstituindo estruturas danificadas pelas EROs (Clarkson; Thompson, 2000; Halliwell; Gutteridge, 2015).

Essas ações formam duas linhas de defesa. A primeira linha, chamada detoxificadora, mantém as concentrações de EROs baixas antes que possam causar danos ao organismo. Ela é composta por glutationa reduzida (GSH), superóxidodismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-peroxidase (GPx), e vitamina E. A segunda linha de defesa envolve captadores de EROs, que entram em ação quando a primeira linha é superada. Esta linha inclui o ácido ascórbico, glutationa-redutase (GR), e a glutationa-peroxidase (GPx), que atua em ambas as linhas de defesa (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991; Olszewer, 1995; Ferreira; Matsubara, 1997).

Antioxidantes são definidos, conforme Peres (1994) e Barbosa et al. (2010), como substâncias que, mesmo em concentrações menores que as do substrato oxidável, são eficazes em impedir a oxidação, doando ou recebendo um elétron do radical para estabilizá-lo, como sugerem Rodrigo, Guichard e Charles (2007). De modo geral, os antioxidantes são divididos em dois sistemas: enzimático e nãoenzimático.

O sistema não-enzimático é composto por substâncias, não enzimas, de origem endógena ou obtidas através da alimentação, que atuam como antioxidantes no organismo (Ferreira; Matsubara, 1997). O sistema enzimático, inclui enzimas como Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutationa Peroxidase (GPx), Glutationa Redutase (GR), e Glutationas S-Transferase (GST), que atuam na prevenção, evitando o início da cascata de reações desencadeada pelas EROs (Barbosa et al., 2010).

2.3.3.1 Sistema enzimático antioxidante

A SOD é uma enzima presente tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias. A diferença entre as duas formas está nos cofatores: a SOD citoplasmática utiliza cobre e zinco, enquanto a mitocondrial usa manganês (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991). Ambas catalisam a dismutação do radical superóxido em O2 e H2O2, conforme mostrado na Figura 5 (Peres, 1994). Devido à formação de H2O2, que é uma ERO, a atividade da SOD deve estar sempre associada a outras enzimas, como a catalase ou a glutationa peroxidase, para evitar o acúmulo de H2O2, que pode gerar o radical hidroxila (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991). O radical hidroxila é altamente reativo e não há enzimas que possam catalisar sua remoção (Peres, 1994).

Figura 4 - Dismutação do superóxido.

$$2O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

Fonte: Rover Junior (2001, p. 113).

Outra enzima fundamental do sistema enzimático antioxidante é a Catalase (CAT), que consiste em uma hemeproteína, ou seja, possui um grupo heme na sua estrutura, utilizando o ferro como cofator, catalisando a redução do H₂O₂ a O₂ e água (Figura 6; Peres, 1994; Ferreira; Matsubara, 1997). Esta enzima está principalmente localizada nos peroxissomos, organelas responsáveis pela desintoxicação de diversos produtos, o que restringe muito sua ação (Olszewer, 1995; Ferreira; Matsubara, 1997).

Figura 5 - Reação de redução do peróxido de hidrogênio pela catalase.

$2H_2O_2 \stackrel{\text{\tiny CAT}}{\rightarrow} 2H_2O \ + \ O_2$

Fonte: Halliwell; Gutteridge (2015, p.115), com modificações.

Semelhante à CAT, a enzima Glutationa Peroxidase (GPx) também promove a redução do peróxido de hidrogênio, que atua em ciclos com Glutationa Redutase (GR) (Barreiros; David; David, 2006). Utilizando o selênio como cofator, a GPx reduz o H₂O₂ à água utilizando a molécula glutationa (GSH) como doadora de elétrons, transformando-a em glutationa oxidada (GSSH). A GGSG, por sua vez, retorna ao seu estado reduzido (GSH) pela ação da GR que utiliza de NADPH para executar essa reação, retornando ao início do ciclo (Figura 7) (Kinnula, 2005). A GPx está presente no citosol e na mitocôndria, sendo responsável pela degradação da maior parte do

H₂O₂. Além disso, a GPx, por ser um composto facilmente oxidável, participa da segunda linha de defesa, junto com as vitaminas, captando radicais livres diante do acúmulo de H₂O₂ no citosol, reduzindo consideravelmente a cascata de reações de oxidação (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991).

Figura 6 - Redução do peróxido de hidrogênio pelas enzimas glutationas.

 $2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GSH \text{ peroxidase}} GSSG + 2H_2O$ $GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSH \text{ redutase}} 2GSH + NADP^+$ $H_2O_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow{GSH} 2H_2O + NADP^+$

Fonte: Barreiros; David; David (2006, p.117).

Em condições normais a barreira antioxidante constituída pelas enzimas e pelos compostos não enzimáticos é suficiente para combater a formação das EROs e manter o bom funcionamento celular, dos órgãos e sistemas. Porém, um desequilíbrio pode afetar moléculas biológicas, sendo caracterizado por um aumento nas EROs, ou uma diminuição da atividade do sistema antioxidante, o que é denominado como estresse oxidativo (Silva; Gonçalves, 2010).

3.3.4 Estresse oxidativo

Quando os sistemas antioxidantes fisiológicos são superados, ou quando ocorre uma produção excessiva de EROs, essas moléculas podem atacar membranas celulares, ácidos nucleicos e proteínas. Isso resulta em alterações profundas tanto nas membranas quanto no metabolismo da célula podendo levar à morte celular (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991).

A unidade básica da membrana celular é o fosfolipídio, composto por um grupamento fosfato hidrofílico e duas cadeias de ácidos graxos insaturados hidrofóbicos. As cadeias de ácidos graxos, especialmente aquelas com muitas ligações duplas (poliinsaturadas), são alvos das EROs por constituírem um substrato fornecedor de elétrons (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991). Quando ocorre o ataque às membranas, reações de oxirredução em cascata têm início, um processo conhecido como Peroxidação Lipídica ou Lipoperoxidação (LPO). Essa reação se

desenvolve em três etapas: início, propagação e término (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991; Olszewer, 1995; Ferreira; Matsubara, 1997).

Segundo Olszewer (1995), a LPO começa quando um radical livre é formado e, por alguma razão, escapa da ação enzimática antioxidante. Esse radical, frequentemente um radical hidroxila, ataca uma ligação dupla de uma cadeia de ácido graxo poliinsaturado na membrana, sequestrando um átomo de hidrogênio, formando água e transformando a cadeia lipídica em um novo radical (L*). Na fase de propagação, esse radical lipídico reage rapidamente com o O2, formando um radical peroxila (LOO*). Esse radical ataca outra cadeia insaturada de ácido graxo, sequestrando um átomo de hidrogênio e formando um novo radical lipídico (L*), que continua o ciclo de ataques às insaturações das cadeias. Esses ataques só cessam quando dois radicais interagem entre si, pareando seus elétrons na órbita externa e formando duas pontes entre eles, o que caracteriza o término da LPO (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991; Peres, 1994; Olszewer, 1995; Ferreira; Matsubara, 1997). A Figura 8 ilustra as reações de início, propagação e término da LPO.

Figura 7 - Fases da Lipoperoxidação.

LH	+ OH [•] (ou LO [•])) ——>	L^{\bullet} + $H_{2}O$ (ou LOH)	Iniciação
ľ.	+ O ₂	>	LOO'	Propagação
LH	+ LOO	>	L + LOOH	Propagação
loo'	+ L•	>	LOOL	Terminação
LOO'	+ LOO*	>	LOOL + O ₂	Terminação

Fonte: Ferreira; Matsubara (1997, p. 63).

Com a LPO, as membranas celulares podem ser muito prejudicadas, pois acabam perdendo sua flexibilidade e solidez com consequente perda de suas funções de barreira e informação, ocasionando falhas nos transportes iônicos, e alterações na sua permeabilidade, o que prejudica as relações entre os receptores das células e seus ligantes (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991, p. 19).

Com alterações na permeabilidade da célula poderá haver a entrada de radicais livres, e estes poderão afetar os ácidos nucleicos do DNA, que são particularmente sensíveis, provocando a desnaturação da molécula de DNA, que por

sua vez pode causar problemas na transcrição, na replicação, e na síntese das proteínas. As proteínas também são alvos da ação dos radicais livres, sendo oxidadas e inativadas. Muitas proteínas estão solubilizadas na membrana da célula e executam funções importantes de transporte e de reconhecimento celular, outras ainda constituem enzimas celulares, proteínas de transporte intracelular, ou proteínas estruturais. Desta forma, a ação dos radicais sobre as proteínas é muito prejudicial e promove uma consequente alteração no metabolismo celular (Droy-Lefaix; Ferradini; Gardes-Albert, 1991; Rover Junior; Höer.; Vellasco, 2001).

2.4 Biomarcadores em abelhas

As abelhas têm sido modelos para a análise de biomarcadores relacionados com a contaminação ambiental (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Caliani et al., 2021b; Lupi et al., 2021; La Porta et al., 2023), seja ela a poluição urbana e industrial (Nikolić et al., 2016; Al Naggar et al., 2020; Li et al., 2024) ou a exposição a pesticidas (Gauthier et al., 2018, Tan et al., 2022; Benito-Murcia et al., 2024; Ayoub et al 2024; Hisamoto et al., 2024; Mackei et al., 2024).

Entre os biomarcadores mais utilizados estão as colinesterases (ChE). Esses compostos ligados a neurotransmissão já se mostraram sensíveis e sendo inibidos à inseticidas (Carvalho et al., 2013; Zhu et al., 2017; Lv et al., 2023; Ayoub et al, 2024; Benito-Murcia 2024), fungicidas (Caliani et al., 2021a; Lv et al., 2023; Martins et al, 2023), e outros xenobióticos provenientes da urbanização e de processos industriais, como o cádmio e o chumbo (Al Naggar et al., 2020; Li et al, 2024).

Uma modulação variável também foi vista nos níveis de CAT em abelhas em estudos laboratoriais utilizando pesticidas, como tiamethoxam (Badiou-Bénéteau et al., 2012), fipronil e o espinosade (Carvalho et al., 2013), acetamiprida e propiconazol, e o sulfoxaflor (Han et al., 2019; Li et al., 2021). Mas também houve efeitos sob essa enzima em estudos que utilizaram abelhas do ambiente natural (Chakrabarti et al., 2015; El Saad et al., 2015).

Há também estudos mostrando a ação desses compostos nos níveis de GST, sendo seu aumento associado à indução de estresse oxidativo, como observado em abelhas expostas a tiametoxam (Badiou-Bénéteau et al., 2012), espinosade (Carvalho et al., 2013), acetamiprido e propiconazol (Han et al., 2019), imidacloprido isolado e

em associação com outros agrotóxicos (Zhu et al., 2017), azoxistrobina em coformulação com ciproconazol (Caliani et al., 2021a) e sulfaxor (Li, 2021), e em áreas de alto stress antropogênico (Caliani et al., 2021; Lupi et al., 2021).

Ademais, existem estudos que indicam que a peroxidação lipídica aumenta nas abelhas expostas a pesticidas. Por exemplo, a *Apis mellifera* e a *Tetragonisca angustula* mostraram sinais claros de stress oxidativo (Mena et al., 2023).

Embora os biomarcadores possam refletir eficazmente o estado real do ambiente, isolar e determinar as causas das condições fisiológicas é um desafio (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Lupi et al., 2021; La Porta et al., 2023). Ainda mais porque a investigação sobre os efeitos de estressores concentra-se em mellifera (por exemplo, Gauthier et al., 2018, Tan et al., 2022; Benito-Murcia et al., 2024; Ayoub et al., 2024; Hisamoto et al., 2024; Mackei et al., 2024). No entanto, esta espécie é nativa da Ásia, África, Médio Oriente e Europa (Carr, 2023), e não representa com precisão a diversidade de outras 20 000 espécies (Gekière et al., 2023), como a tribo Meliponine.

2.5 Composição do mel

Assim como as abelhas, seus produtos meliponíneos sofrem alteração aos fatores antrópicos adversos. O mel é uma substância natural produzida por abelhas a partir do néctar de plantas ou de secreções de partes das plantas, contendo mais de 200 componentes, sendo os principais constituintes os carboidratos, especialmente glicose e frutose. Mas também contém enzimas, aminoácidos e proteínas, ácidos orgânicos, lipídeos carotenoides, vitaminas, minerais, substâncias aromáticas, flavonoides e ácidos fenólicos (Rao et al., 2016; Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Valverde et al., 2022).

Os méis apresentam diferentes efeitos terapêuticos, apresentando evidências clínicas das suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, anti-hiperlipidêmicas, anti-hipolipidêmicas, cardioprotetoras, hepatoprotetora, tratamento de distúrbios oculares, doenças do trato gastrointestinal, distúrbios neurológicos e de fertilidade, atividade de cicatrização de feridas e problemas da tireoide (Rao et al., 2016; Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Silva A. et al., 2021; Valverde et al., 2022).

Um dos fatores que alteram a composição dos méis é a espécie de abelha e a dinâmica de produção do mel, considerando plantas de forrageamento e condições

climáticas. O clima, solo, umidade, altitude e mudanças sazonais, à área geográfica, às plantas forrageadas pela espécie e às condições de armazenamento realizadas por um meliponicultor afetam as características do produto (Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Ribeiro et al., 2019; Batison et al. 2020; Silva A. et al., 2021).

As abelhas sem ferrão após produzirem o mel o desidratam e armazenam; microrganismos presentes na colmeia consomem parte do açúcar do mel e transformam em álcool e, posteriormente, em ácido acético ou outros ácidos e subprodutos; tais mudanças químicas alteram as características do mel, diferindo devido ao microbioma ali presente (Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Batison et al. 2020; Ribeiro et al., 2019; Souza; Menezes; Flach 2020; Silva A. et al.; 2021).

Vários estudos demonstraram que, comparado aos méis de *Apis mellifera*, os méis das abelhas sem ferrão são ricos em compostos bioativos, possuindo alta capacidade antioxidante e propriedades biológicas, além de se diferenciar por apresentar perfil ácido, alto teor de açúcar redutor e alta higroscopicidade, fatores relacionados ao potencial antimicrobiano (Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Souza; Menezes; Flach, 2021; Silva A. et al., 2021). A variabilidade na composição química dos méis altera seus potenciais medicinais e capacidade antimicrobiana, sendo essa ação atribuída ao seu alto teor de açúcar, acidez, peróxido de hidrogênio e presença do peptídeo defensina-1 (Rao et al., 2016; Avila et al., 2018; Avila et al., 2019), havendo ainda carência de mais estudos.

Neste contexto, a espectroscopia Raman surge como uma das técnicas para a análise molecular deste composto, permitindo a identificação e quantificação dos compostos presentes no mel, sendo um meio de compreender as relações entre fatores ambientais, a composição química dos méis e suas propriedades bioativas (Anjos et al. 2018; Robert; Birech; Kaniu, 2023). O presente estudo irá contextualizar o uso desta técnica para avaliação de digitais químicas do mel, sendo apresentado uma revisão sistemática como parte dos achados deste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o impacto de um gradiente de ação antropogênica em abelhas da espécie *Melipona mandacaia* por meio da análise de biomarcadores de avaliação de neurotoxicidade, estresse oxidativo e detoxificação, além de sumarizar as caracterizações espectroscópicas do mel usando a técnica de Raman, apresentando os picos dessa técnica, bem como as divergências relativas às descrições já relatadas na literatura sobre picos em diferentes comprimentos de onda.

3.2 Objetivos Específicos

Artigo 1

 Avaliar a atividade dos biomarcadores colinesterase (ChE), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST), e peroxidação lipídica (LPO) em *Melipona mandacaia* coletadas em uma região da Caatinga.

 Analisar o efeito de um gradiente de estresse antropogênico promovido sobre os biomarcadores de Melipona mandacaia.

 Realizar uma interpretação integrativa do efeito de um gradiente de estresse antropogênico sobre o sistema antioxidante, estresse oxidativo e neurotoxicidade em Melipona mandacaia coletadas na Caatinga.

Artigo 2

 Realizar uma revisão sistemática da literatura para identificar estudos sobre a técnica de Espetroscopia de Raman aplicada a análise de mel, desenvolvendo um guia correlacional entre os picos de Raman e os compostos químicos associados.

 Verificar as principais divergências descritas sobre compostos químicos de análises de méis entre os diferentes artigos científicos sobre os picos de Raman em diferentes comprimentos de onda.

4. ARTIGOS

O presente estudo faz parte do projeto de pesquisa denominado "BEESNESS - Diversidade e dinâmica de recursos apícolas atlânticos em relação ao clima e contaminação por pesticidas: dados para a gestão da polinização e agricultura sustentável". A pesquisa é fruto de uma cooperação internacional estabelecida a partir do intercâmbio de experiências, competências e infraestruturas entre três países do eixo Atlântico Norte-Sul: Portugal, Brasil e Reino Unido. A parceira é liderada pelo Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR, Portugal), em conjunto com a Universidade Positivo (UP, Brasil), o Centro de Pesquisa da Universidade Positivo (CPUP, Brasil), Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE, Brasil), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF, Brasil) e a Cardiff University (CU, País de Gales). O projeto foi aprovado em edital da Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT) do governo de Portugal na categoria de "Projetos de Investigação Científica e Desenvolvimento Tecnológico no âmbito das Comemorações do V Centenário da Viagem de Circum-navegação", sob a coordenação da Prof.ª. Drª. Laura Guimarães (CIIMAR) e Dr. Nuno Gonçalo de Carvalho Ferreira (CIIMAR).

Na presente dissertação serão apresentados 2 artigos:

Effects of anthropogenic stress on stingless bees *Melipona mandacaia* inhabiting urban and natural environments. Enviado para Environmental Toxicology and Pharmacology

Espectroscopia Raman no Mel: Uma Revisão Sistemática dos Picos e Compostos Químicos Associados. Em fase de preparação.
Artigo I - Effects of anthropogenic stress on stingless bees *Melipona mandacaia* inhabiting urban and natural environments

Effects of anthropogenic stress on stingless bees Melipona mandacaia inhabiting urban and natural environments

Isabelle Letícia Bender de Souza^{1,2}, Leanna Camila Macarini^{1,2}, Cíntia Mara Ribas de Oliveira³, Nuno G. C. Ferreira^{4,5 *}, Ana Tereza Bittencourt Guimarães^{1,2}

¹ Ecotoxicology and Landscape Research Group, Rua Universitária n. 2069, Cascavel-PR, Brazil

² Biosciences and Health Postgraduate Programme- Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Rua Universitária n. 2069, Cascavel-PR, Brazil

³ Environmental Managemen Postgraduate Programme (PPGAmb), Universidade Positivo (UP) and Centro de Pesquisa da Universidade Positivo (CPUP), Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, n. 5300, 81280-330, Curitiba, Brazil.

⁴ CIIMAR - Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental. Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões. Av. General Norton de Matos S/N, 4450-208 Matosinhos, Portugal

⁵ School of Biosciences - Cardiff University. Museum Avenue, Cardiff CF10 3AX, Wales-UK

*Corresponding authors: Nuno G. C. Ferreira (ngoncf@gmail.com)

ABSTRACT

Bees play a crucial role as pollinators, significantly contributing to ecosystem health. However, they face growing threats from human activities. This study uses biomarkers to evaluate the health status of *Melipona mandacaia*, a stingless bee native to the Caatinga biome, as indicators of anthropogenic stress. The biomarkers include cholinesterases (ChE) to assess neurotoxicity, catalase (CAT) to measure antioxidant responses, glutathione *S*-transferase (GST) for detoxification pathways, and lipid peroxidation (LPO) as an indicator of oxidative stress. The results reveal that ChE inhibition may be associated with higher stress levels due to human activities, while the remaining biomarkers showed mixed responses across the different stress-level areas. This could be partly explained by the beekeeping practices in some locations, which may have mitigated the effects of pesticides and fuel combustion to a certain degree. These findings underscore the importance of monitoring wild bee health in the Caatinga and demonstrate the value of a multifaceted biomarker approach for understanding the impacts of anthropogenic stressors on bee populations in varied environments. **Keywords:** Anthropogenic stressors, Caatinga, Biomarkers, Pollinators, Integrated Analysis

INTRODUCTION

Bees are essential pollinators for maintaining the health and functioning of ecosystems, the reproduction of native plants, agricultural production and food security (Potts et al., 2016; Murphy et al., 2022; Gekière et al., 2023). Their extensive foraging behaviour, which involves collecting nectar, pollen, resin, and water, also exposes them to diverse pollutants and environmental stressors (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Gekière et al., 2023; La Porta et al., 2023). Consequently, bees serve as reliable bioindicators of environmental quality, detecting spatial and temporal variations in terrestrial ecosystems (Carvalho et al., 2013; La Porta et al., 2023).

Research on the effects of various stressors such as pesticides, heavy metals, or climate changes, primarily focuses on the species *Apis mellifera* (e.g., Gauthier et al., 2018, Tan et al., 2022; Benito-Murcia et al., 2024; Ayoub et al 2024; Hisamoto et al., 2024; Mackei et al., 2024; Schuhmann and Scheiner, 2025). However, this species is native to Asia, Africa, the Middle East and Europe (Carr, 2023), and it does not accurately represent the diversity of other 20,000 species (Gekière et al., 2023), like the Meliponine tribe. This tribe includes more than 600 described species of eusocial bees (Ascher;Pickering, 2024; Roubik, 2023), with 244 species found in Brazil (Ascher;Pickering, 2024).

Melipona mandacaia, a stingless bee endemic to the Caatinga, is an important representative of native Brazilian Meliponine species (Silveira, Melo & Almeida, 2002; Grüter, 2020; Ascher; Pickering, 202). This unique biome covers approximately 54% of northeastern Brazil and is characterised by a high number of endemic flora and fauna adapted to the warm and dry weather of the region (Alves; Carvalho; Souza, 2006; Carneiro-Neto et al., 2017; Melo, 2023). However, significant portions of its original habitat have been lost due to fragmentation and human disturbances, directly impacting native bee populations (Antongiovanni et al., 2020; Antongiovanni et al., 2022). *M. mandacaia* is an ecologically and economically important species, serving as a primary pollinator for numerous native and cultivated plant species within the Caatinga biome. Its role makes it a valuable bioindicator for assessing the environmental health of this biome (Silveira; Melo; Almeida, 2002; Grüter, 2020; Ascher; Pickering, 2024).

Biomarkers are an effective tool for assessing the health status of bioindicators, as they provide insights into environmental health by reflecting the impacts of anthropogenic stressors across various biological levels observed in different bee species (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Caliani et al., 2021b; Lupi et al., 2021; La Porta et al., 2023). Commonly used biomarkers include the activity assessment of enzymes, such as cholinesterase (ChE) for neurotoxicity analysis, catalase (CAT) for antioxidant response evaluation, glutathione S-transferase (GST) for detoxification, and lipid peroxidation (LPO) rates for oxidative stress evaluation (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Lupi et al., 2021). Biomarkers have enabled the assessment of various environmental stressors on bee populations, such as urban and industry pollution (Nikolić et al., 2016; Al Naggar et al., 2020; Li et al., 2024) or pesticide exposure (Gauthier et al., 2018; Tan et al., 2022; Benito-Murcia et al., 2024; Ayoub et al 2024; Hisamoto et al., 2024; Mackei et al., 2024). This evidence supports the use of bees as models for analysing biomarkers related to environmental contamination (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013; La Porta et al., 2023). To enhance assessments of anthropogenic impacts on bee populations, an integrated approach that combines multiple biomarkers is essential for achieving a more accurate diagnosis of exposure to environmental stressors (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Lupi et al., 2021).

Considering the ongoing degradation of the Caatinga biome over recent decades, coupled with significant anthropogenic pressures, and the crucial ecological role of the species *M. mandacaia* within this biome and for the local communities biome, this study aims to assess the impact of different levels of anthropogenic stress on key biological biomarkers.

METHODOLOGY

Sampling

During the period of highest precipitation in the region, in March 2023, researchers collected stingless bees of the species *Melipona mandacaia* from two distinct groups of nests in *Commiphora leptophloeos* (umburana) trees within Casa Nova (BA), a natural Caatinga area (centroid geographical coordinates -9.400428, -41.386407). The first group (NS) was located far from anthropogenic disturbances such as residences, plantations, and animal husbandry in the middle of the Caatinga biome with no observed stress level. The second group (LS) was situated on the

borderline between a farm and the Caatinga biome with bees being collected from meliponiculture boxes with occasional interactions with humans, resulting in low stress levels. A third group of bees (MS) were collected in a moderate-stress area close to Caatinga, which is part of a rural area in the middle of a farm with agricultural practices and cattle breeding. In a second study area, the fourth group of bees (HS) were sampled from meliponiculture boxes in the urban area of Petrolina (PE: -9.3713750, -40.4839200; Figure 1). This area is located within a city area with different levels of anthropological impact, such as car traffic, wastewater treatment stations and even a fragment of the native Caatinga biome, thus resulting in high stress levels. Within these different stress areas, 30 individual bees were collected using a 50 ml Falcon tube positioned at the nest exit, both for the tree-nesting and box-nesting colonies. All collected bees were immediately euthanised by freezing.



Figure 1. Environmental stress gradient as a result of anthropogenic activity to which *Melipona mandacaia* were exposed. (1) Caatinga biome – No stress; (2) Meliponiculture boxes in the Caatinga – Low stress; (3) Caatinga close to anthropogenic disturbance – Moderate stress; (4) Meliponiculture in an urban area – High stress.

Laboratory Analyses

The sample processing protocol has been previously described in detail by Ferreira et al. (2010) with the following modifications. The samples were homogenised in a Tris-HCl buffer (pH 7.4, 50 mM), and centrifuged at 200g/s (4°C) for 10 minutes. The supernatants were then stored at -80°C. At the time of analysis, the frozen samples were thawed and maintained at a cool temperature throughout all subsequent procedures. The lipid peroxidation (LPO) assay was adapted to a microplate format based on the methods described by Bird and Draper (1984) and Ohkawa et al. (1979). The activity of glutathione S-transferase (GST) was determined as described by Habig et al. (1974). Catalase (CAT) activity was measured based on the method described by Clairborne (1985), also adapted to a microplate format. The cholinesterase (ChE) activity was determined according to the Ellman method (Ellman et al., 1961). Protein concentration for all biomarkers was determined using the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as the standard.

Statistical Analyses

Biomarker's data was checked for normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene test). When data did not show a normal distribution or homoscedasticity, the Kruskal-Wallis test was compared between the groups. In the event of statistical significance (p < 0.05), the medians of the groups were compared using Dunn's post-hoc test. Afterwards, the variable matrices were standardised (zscore) and analysed using principal component analysis (PCA). In the PCA, factor loadings were defined, representing the linear correlations of each variable with the composition of the factor. Here, the factor is a new latent variable defined by the set of factor loadings. The factor loadings resulting from the first two principal components were assessed for significance using Single Factor Analysis of Variance (ANOVA), given that these variables met the assumptions of normality and homoscedasticity. In the event of statistical significance, the Tukey's Non-Honest Significant Difference (Tukey-NHSD) post-hoc test was carried out. All statistical tests were performed at an α = 0.05 using the R software (R Core Team, 2022). Based on the biomarker variables, the Integrated Biomarker Response Index - IBR was applied according to Beliaeff and Burgeot (2002).

RESULTS

The average weight of bees decreased across the different treatment groups, as follows: NS (54.4 ± 5.78 mg) > HS (52.7 ± 5.31 mg) > MS (51.2 ± 6.11 mg) > LS (49.4 ± 4.31 mg). Statistical analysis revealed significant differences among the groups (χ^2 = 37.2618, df = 3, *p* < 0.001). Particularly, the NS group was significantly different from all other groups, the LS group was also significantly different from all other groups, while the MS and HS groups were statistically identical.

The analysis of cholinesterase activity (Fig. 2A) showed significant differences among groups ($\chi^2 = 37.3175$, df = 3, p < 0.0001). Bees from the Caatinga's meliponary (LS) exhibited similar cholinesterase (ChE) activity levels to bees from the urban meliponary (HS), but significantly differed from the MS and NS areas. The highest ChE activity occurred in bees collected from the no-observed stress area (NS), while the lowest activity was observed in the moderate-stress area (MS). Catalase activity (Fig. 2B) showed significant differences among groups ($\chi^2 = 12.1679$, df = 3, p = 0.01). The LS area showed lower enzyme activity than the other groups, which were statistically similar. The GST activity showed a significant difference among groups ($\chi^2 = 55.6791$, df = 3, p < 0.0001). The activity was higher in the HS area with strong anthropogenic stress than in the other statistically identical areas (Figure 2C). As for LPO rates, the analysis revealed significant differences among groups ($\chi^2 = 8.6492$, df = 3, p = 0.03– Fig. 2D). The LS area showed LPO rates similar to the NS area but statistically different from the MS and HS areas. Meanwhile, the NS, MS, and HS areas all exhibited comparable LPO rates.



Figure 2 - Boxplot comparing the biomarker's activity/rates in *Melipona mandacaia* from different study areas. NS - denotes no observed stress area (dark blue), LS - denotes low-stress area (light blue), MS - denotes moderate-stress area (orange), HS - denotes high-stress area (red).

The principal component analysis of the biomarkers revealed that the first principal component (Dimension 1) was primarily driven by the positively correlated CAT variable, which can be interpreted as representing "Antioxidant System" (Eigenvalue = 1.31; Variance = 32.20%). The second principal component (Dimension 2) showed a greater contribution from the ChE variable, with positive scores indicating higher enzymatic activity. This dimension was labelled "Neurotransmission" (Eigenvalue = 1.10; Variance = 27.30%). The third principal component (Dimension 3) showed a greater contribution from the GST and LPO variables, with negative scores indicating higher stress. This dimension was labelled "Detoxification and Cellular damage" (Eigenvalue = 0.87; Variance = 21.72%; Figure 3A).

The analysis of the latent variables "Dim.1 – Antioxidant System", "Dim. 2 – Neurotransmission" and "Dim. 3 – Detoxification and Cellular damage" revealed statistically significant differences among the study areas ($F_{3,114} = 15.04$, p < 0.0001; $F_{3,114} = 16.05$, p < 0.0001; $F_{3,114} = 11.76$, p < 0.0001, respectively). Dim 1 (Antioxidant System) was primarily influenced by CAT, with the HS group showing the highest factor loadings compared to the other groups (p < 0.05). Dim 2 (Neurotransmission was

predominantly influenced by ChE, with the NS and LS groups displaying higher factor loadings, indicating greater ChE activity and being statistically distinct from the MS and HS groups (p < 0.05). Dim 3 (Detoxification and Cellular damage) was mainly influenced by GST and LPO, with the HS group showing the highest factor loadings compared to the other groups (p < 0.05).



Figure 3 - A) Principal Component Analysis (PCA) and projections of the main dimensions based on the activity of biomarkers in *Melipona mandacaia* from different study areas. Mean projections and standard deviations of the areas studied in B) Dimension 1 – Antioxidant System; C) Dimension 2 – Neurotoxicity; and D) Dimension 3 – Detoxification and Cellular damage.

As shown in Figure 4, the Integrated Biomarkers Responses (IBR) index varied across the four stress areas (NS, LS, MS, and HS). The MS area exhibited the highest IBR value (5.06), followed by HS (2.80), LS (1.36), and NS (0.00).



Figure 4. Integrated Biomarkers Response (IBR) index for *Melipona mandacaia* under different stress areas. NS – no observed-stress area (dark blue), LS – low-stress area (light blue), MS - moderate-stress area (orange), HS – high-stress area (red), ChE: cholinesterases, GST: glutathione S-transferase, LPO: lipid peroxidation, CAT: catalase.

DISCUSSION

The potential impacts of human-driven activities on wildlife have been a central focus within environmental toxicology (Refati et al., 2023). While human pressures do not always result in negative outcomes, they may instead lead to adaptations and the establishment of new homeostatic states among affected organisms (Hammond et al., 2020). To investigate the impacts of anthropogenic activity on native bee populations, this study evaluated four areas within the unique Caatinga biome that exhibited varying levels of environmental stress and human-induced pressures, assessing key biomarkers as indicators. The gradient of stress (NS < LS < MS < HS) was not entirely validated by the assessed biomarkers, PCA and IBR analyses as expected, but still distinguishing environmental conditions and bees' physiological responses. Although biomarkers can effectively reflect the state of the environment, isolating and determining the causes of the physiological conditions is challenging (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Lupi et al., 2021; La Porta et al., 2023), especially in situations where organisms are under the care of keepers who aim to promote their welfare.

Cholinesterases (ChE) are widely used biomarkers of neurotransmission. They were employed in this study as numerous stressors can inhibit their activity, including insecticides (Carvalho et al., 2013; Zhu et al., 2017; Lv et al., 2023; Ayoub et al., 2024; Benito-Murcia 2024), fungicides (Caliani et al., 2021a; Lv et al., 2023; Martins et al, 2023), and other xenobiotics from urbanisation and industrial processes, such as cadmium and lead (Al Naggar et al., 2020; Li et al, 2024). This ChE inhibition found in this studyin other field studies with other species. For example, Caliani et al. (2021b) evaluated honeybee health under different anthropogenic pressures (a wood reference site, an orchard, an agricultural, and an urban area), finding more pronounced ChE inhibition in agricultural areas than urban areas (both lower than the woodland), likely due to higher pesticide levels in agricultural areas versus the higher levels of hydrocarbons and metals emitted from fuel combustion in urban areas. The LS area exhibits considerable variation. While a single cause cannot be identified, this variation may stem from environmental factors (e.g., temperature, sunlight, humidity) or differing levels of human impact across the individual colonies (Belkey; Joshi, 2019; Meikle et al, 2020; Alves et al., 2023). The inhibition of cholinesterase (ChE) has significant neurological repercussions, including impaired motor function, reduced foraging, cognitive deficits, altered behaviours, and overall diminished fitness in affected organisms (Gashout et al., 2020; Caliani et al., 2021b; Tan et al., 2022; Ayoub et al., 2024).

As for the detoxification enzymes GST, a slight induction pattern was observed with increased stress levels, although only significant for the HS area. Previous studies that exposed bees in the laboratory to chemical compounds (Cd and Pb) associated with urbanisation had reported an induction in GST activity levels (Li et al., 2024). Similarly, field studies have also shown the induction of GST activities in bees exposed to several pesticides (e.g., Caliani et al., 2018; Lupi et al., 2021). This enzyme plays a key role in the phase two catalysis of numerous xenobiotics (Caliani et al., 2021a; Benito-Murcia, 2024). This process results in more polar compounds' excretion, thereby helping protect cells against oxidative damage (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Han et al., 2019; Benito-Murcia, 2024). As with the previous biomarker, there is no single identifiable cause for the similar levels of GST activity observed no-obsersed stress, low-stress and moderate-stress levels. This is especially true when pesticides and combustion-derived metals are a major driver of GST induction. Nonetheless, the involvement of other antioxidant enzymes like glutathione peroxidase (GPx),

glutathione reductase (GR), and catalase, as well as altered glutathione (reduced and oxidised) levels, are important factors to consider when analysing GST responses (Ferreira et al., 2015a; Ferreira et al., 2015b; Nikolić et al., 2016; Lupi et al., 2021).

The antioxidant enzyme catalase (CAT) plays a crucial role in the antioxidant system by converting hydrogen peroxide (H₂O₂) into harmless substances, thereby eliminating reactive oxygen species (Su et al., 2019). However, exposure to environmental contaminants can alter CAT function (Carvalho et al., 2013; Su et al., 2019). In the present study, CAT activities were significantly lower in the low-stress (LS) area, followed by an increasing pattern as stress levels increased. This inhibition may result from the high quantity of superoxide radicals (O2--) already present (Geret et al., 2008; Grilo et al., 2020). A U-shaped activity curve was also observed, where increased stress levels initially inhibited and then induced CAT activity. Similar trends in CAT activity have been reported in other studies. Lupi et al. (2021) showed significantly elevated CAT levels in chemically stressed bee pupae compared to those with no stress or multi-stress conditions. Conversely, El Saad et al. (2015) detected the lowest CAT levels in heavily urbanised sites with prolonged pesticide exposure, suggesting anthropogenic impacts can reduce this antioxidant enzyme. Moreover, species-specific adaptive CAT responses to environmental stressors have been documented. For example, the bee species Apis dorsata exhibited significantly increased CAT in high-intensity cropping areas, while Apis cerana showed the opposite, an inhibition of CAT activity (Chakrabarti et al., 2015). These findings indicate that bee antioxidant defences, as reflected by CAT activity, are highly contextdependent and influenced by local ecological dynamics and stress exposure levels.

Despite the efforts of GST and CAT to detoxify and handle oxidative stress, anthropogenic activity may still induce elevated lipid peroxidation (LPO) rates, negatively affecting organismal health (Morgado et al., 2013). In this study, the "protective" effects of GST and CAT were mainly observed within the HS area, leading to similar LPO rates as those seen in almost all the other areas. As expected, the previous enzyme activity results would indicate that increased stress levels, whether from oxidative stress due to human handling, pesticide exposure, or other xenobiotics from fuel combustion, would result in increased LPO rates. For example, *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* showed clear signs of oxidative stress when exposed to similar doses of fipronil, with a more marked increase in LPO rates observed in *T. angustula* (Mena et al., 2023).

When multiple biomarkers are used or subtle differences are observed, an integrative analysis like Principal Component Analysis (PCA) can help explain and visualise patterns and interactions among variables. This multivariate statistical approach is useful for natural studies involving dynamic, heterogeneous environments, as it allows simultaneous assessment of multiple factors, going beyond univariate analyses. Integrating biomarker data helps understand how bees respond to environmental pressures, identify areas of major ecological vulnerability, and prioritise management and conservation interventions. PCA analysis contributes to a more comprehensive understanding of environmental impacts, supporting the development of effective conservation strategies. The PCA revealed three key variation patterns in the *M. mandacaia* biomarkers: Dimension 1 related to antioxidant responses (CAT), Dimension 2 associated with neurotransmission (ChE), and Dimension 3 linked to detoxification and cellular damage (GST and LPO). These results suggest that bees in areas with greater human impact (HS) exhibited elevated antioxidant and detoxification responses and increased cellular damage, likely due to an insufficient capacity of these systems. Additionally, the neurotransmission system in these bees showed a negative response. In contrast, bees from the less impacted (NS) area demonstrated a robust neurotransmission response. The PCA analysis findings were confirmed by the IBR index. Here, the NS area had a zero score, which increased slightly in the LS area and nearly quadrupled in the MS area before dropping to about half that in the HS area. The lower HS area index may stem from the beekeeper's positive influence on the colonies rather than the actual impact of the previously mentioned stressors within the different stress zones. Still, it is important to highlight that these animals live in an urban meliponiculture and are directly fed glucose syrup. The HS group has higher weight and protein levels than the other groups, but this does not necessarily mean they are healthier.

Overall, the results obtained from this study show that the positive impact of beekeeping may contradict the increase in stress levels. With the clear exception of the ChE, biomarkers responded in an even manner, with slight inductions or inhibitions and very similar rates of cellular damage. The integrated analysis corroborated these findings, grouping PCA dimensions by biological traits, and IBR showed that beekeeping activity can reduce stress levels. Other collected variables, such as the average weight of bees, support these results. Here, the NS group presents the highest average weight, which is then followed by a decrease in beekeeping activity. The HS

colonies had the most active beekeeping practices, regularly feeding bees sugar solutions and commercial bee food as needed. The HS colonies showed similar weights to MS colonies, which had moderate beekeeping activity, with farmers providing the same supplemental food but not so frequently. In contrast, the LS colonies had the lowest level of beekeeping activity, with only occasional contact with beekeepers, as described in the methodology. The results of this study, conducted during the wet season when bees had greater access to floral resources, may differ from findings that could emerge in the dry season. In fact, the expected results may trend in the opposite direction of stress levels, with healthier colonies with high beekeeping activity exhibiting better status compared to those in the Caatinga biome (NS).

This study represents a crucial first step for developing new research that correlates these and additional biomarkers with ecological variables across different habitats or seasons. Additionally, this work aims to explore how subindividual changes impact higher organisational levels, such as behaviour and lifespan, and the ecosystem services these organisms provide, including pollination rates, honey or pollen quality and production rates. Furthermore, understanding the species-specific responses to environmental stressors will be vital for designing targeted conservation measures to protect not only *M. mandacaia*, but also other native bee species that are essential to the health and resilience of the caatinga ecosystem and crucial to the ecosystem services provided in the San Francisco Valley region.

CONCLUSION

In conclusion, this study showed that *M. mandacaia* can be used as a bioindicator species to evaluate environmental quality in the Caatinga biome. Integrating biomarker analysis provides valuable information on the physiological impacts of anthropogenic stressors on bee populations, which individually only showed a clear impact on ChE activity, which can be important early warning signs to avoid major effects at the ecological level. Even as urbanisation and agricultural practices continue to expand, understanding these dynamics is essential for developing effective conservation strategies to protect both bee health and biodiversity. By prioritising the conservation of key pollinators such as *M. mandacaia*, we can better protect the

ecological health of vital ecosystems and ensure sustainable agricultural practices that benefit both humans and wildlife.

DECLARATIONS AND STATEMENTS DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

ETHICS APPROVAL

This study used invertebrate species that do not require previous ethical approval. The animal experiments comply with the EU Directive 2010/63 for the protection of animals used for scientific purposes.

DATA AVAILABILITY

Data will be made available at Zenodo - https://doi.org/ 10.5281/zenodo.14605065.

CRediT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

I.L.B.S.: Validation, formal analysis, investigation, writing - original draft, visualisation; **L.C.M.:** Investigation and formal analysis; **C.M.R.O.:** Conceptualisation, methodology; **N.G.C.F.:** Conceptualisation, methodology, validation, formal analysis, resources, data curation, writing - original draft, project administration, funding acquisition; **A.T.B.G.:** Conceptualisation, methodology, validation, formal analysis, resources, data curation, writing - original draft, visualisation, supervision, project administration, funding acquisition. All authors contributed to the review and editing of the original manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) within the scope of UIDB/04423/2020, UIDP/04423/2020, Project BEESNESS (DOI:10.54499/CIRCNA/BRB/0293/201). Nuno G. C. Ferreira was supported by FCT through 2021.02111.CEECIND (DOI:

10.54499/2021.02111.CEECIND/CP1665/CT0003). Ana T. B. Guimarães was supported by CNPQ productivity researcher scholarship n. 304169/2020.

Thanks to the Association of Beekeepers and Meliponiculturists of Fazenda Santarem and meliponiculture Sanctorum.

REFERENCES

Al Naggar, Y., Dabour, K., Masry, S., Sadek, A., Naiem, E., & Giesy, J. P. (2020). Sublethal effects of chronic exposure to CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture on the honey bee (Apis millefera L.). Environmental Science and Pollution Research, 27, 19004-19015. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3314-Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. D. M., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische zeitschrift, 22(6), 711-728. https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507 Alves, D. A., George, E. A., Kaur, R., Brockmann, A., Hrncir, M., & Grüter, C. (2023). Diverse communication strategies in bees as a window into adaptations to an unpredictable world. Proceedings of the National Academy of Sciences, 120(24), e2219031120. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.07.002 Antongiovanni, M., Venticingue, E. M., Matsumoto, M., & Fonseca, C. R. (2020). Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. Journal of Applied Ecology, 57(10), 2064-2074. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13686 Antongiovanni, M., Venticinque, E. M., Tambosi, L. R., Matsumoto, M., Metzger, J. P., & Fonseca, C. R. (2022). Restoration priorities for Caatinga dry forests: Landscape resilience, connectivity and biodiversity value. Journal of Applied Ecology, 59(9), 2287-2298. https://doi.org/10.1111/1365-2664.14131 Ascher, J & J Pickering, 2024. Discover Life bee species guide and world checklist. Available in: https://www.discoverlife.org/. Ayoub, L., Yaqoob, M., Kanth, R. H., Wani, F. J., Shah, Z. A., Dar, E. A., ... & Alwahibi, M. S. (2024). Exposure to organophosphate insecticides induces behavioral changes and acetylcholinesterase inhibition in Apis mellifera. Ecotoxicology and Environmental Safety, 287, 117279. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117279 Badiou-Bénéteau, A., Carvalho, S. M., Brunet, J. L., Carvalho, G. A., Buleté, A., Giroud, B., & Belzunces, L. P. (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee Apis mellifera: application to the systemic insecticide thiamethoxam. Ecotoxicology and environmental safety, 82, 22-31. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.005

Beliaeff, B., & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 21(6), 1316-1322. https://doi.org/10.1002/etc.5620210629 Belsky, J., & Joshi, N. K. (2019). Impact of biotic and abiotic stressors on managed and feral bees. Insects, 10(8), 233. https://doi.org/10.3390/insects10080233 Benito-Murcia, M., Botías, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., Soler, F., Pérez-López, M., ... & Martínez-Morcillo, S. (2024). Biomarker responses and lethal dietary doses of tau-fluvalinate and coumaphos in honey bees: Implications for chronic acaricide toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *105*, 104330. https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104330

Bird, R. P., & Draper, H. H. (1984). Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 299-305). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05038-2

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3 Caliani, I., Campani, T., Conti, B., Cosci, F., Bedini, S., D'Agostino, A., ... & Casini, S. (2021). Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of different contaminants on the ecotoxicological status of *Apis mellifera*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *208*, 111486. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111486 Caliani, I., Campani, T., Conti, B., Cosci, F., Bedini, S., D'Agostino, A., ... & Casini, S. (2021). First application of an Integrated Biological Response index to assess the ecotoxicological status of honeybees from rural and urban areas. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*, 47418-47428. https://doi.org/10.1007/s11356-021-14037-8

Chakrabarti, P., Rana, S., Sarkar, S., Smith, B., & Basu, P. (2015). Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. *Apidologie*, *46*, 107-129. https://doi.org/10.1007/s13592-014-0308-z

Clairborne, A. (1985). Assay of catalase. *Hand book of methods of oxygen free radical research*, 283-284.

Carneiro-neto, T. F. D. S., Oliveira-Rebouças, P. L., Pereira, J. E., Duarte, P. M., Santos, M. H. L. C., da Silva, G. C., & de Siqueira, K. M. M. (2017). Spectrum of pollen stored by *Melipona mandacaia* (Smith, 1863)(Hymenoptera: Apidae, Meliponini) in an urban arid landscape. *Sociobiology*, *64*(3), 284-291. https://doi.org/10.13102/sociobiology.v64i3.1257

Carr, S. M. (2023). Multiple mitogenomes indicate things fall apart with Out of Africa or Asia hypotheses for the phylogeographic evolution of honey bees (Apis mellifera). *Scientific Reports*, *13*(1), 9386. https://doi.org/10.1038/s41598-023-35937-4

Carvalho, S. M., Belzunces, L. P., Carvalho, G. A., Brunet, J. L., & Badiou-Beneteau, A. (2013). Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental toxicology and chemistry*, *32*(9), 2117-2124. https://doi.org/10.1002/etc.2288 Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, *7*(2), 88-95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9 El-Saad, A. M. A., Kheirallah, D. A., & El-Samad, L. M. (2017). Biochemical and histological biomarkers in the midgut of *Apis mellifera* from polluted environment at Beheira Governorate, Egypt. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*, 3181-3193. https://doi.org/10.1007/s11356-016-8059-1

Ferreira, N. G., Cardoso, D. N., Morgado, R., Soares, A. M., & Loureiro, S. (2015). Long-term exposure of the isopod *Porcellionides pruinosus* to nickel: costs in the energy budget and detoxification enzymes. Chemosphere, 135, 354-362. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.025

Ferreira, N. G., Morgado, R., Santos, M. J., Soares, A. M., & Loureiro, S. (2015). Biomarkers and energy reserves in the isopod *Porcellionides pruinosus*: the effects of long-term exposure to dimethoate. Science of the Total Environment, 502, 91-102. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.062

Ferreira, N. G., Morgado, R. G., Amaro, A., Machado, A. L., Soares, A. M., & Loureiro, S. (2016). The effects of temperature, soil moisture and UV radiation on biomarkers and energy reserves of the isopod *Porcellionides pruinosus*. *Applied soil ecology*, *107*, 224-236. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.06.007

Gashout, H. A., Guzman-Novoa, E., Goodwin, P. H., & Correa-Benítez, A. (2020). Impact of sublethal exposure to synthetic and natural acaricides on honey bee (*Apis mellifera*) memory and expression of genes related to memory. *Journal of insect physiology*, *121*, 104014. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104014 Gauthier, M., Aras, P., Paquin, J., & Boily, M. (2018). Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, *8*(1), 16274. ttps://doi.org/10.1038/s41598-018-34625-y

Gekière, A., Vanderplanck, M., & Michez, D. (2023). Trace metals with heavy consequences on bees: A comprehensive review. *Science of the Total Environment*, 165084. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165084

Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., & Bebianno, M. J. (2002). Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. Biomarkers, 7(3), 242-256. https://doi.org/10.1080/13547500210125040 Gotelli, N. J., & Ellison, A. M. (2016). *Princípios de estatística em ecologia*. ARTMED editora.

Grilo, L. F., Martins, J. D., Cavallaro, C. H., Nathanielsz, P. W., Oliveira, P. J., & Pereira, S. P. (2020). Development of a 96-well based assay for kinetic determination of catalase enzymatic-activity in biological samples. Toxicology in Vitro, 69, 104996. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104996

Grüter, C. (2020). *Stingless bees: their behaviour, ecology and evolution*. Springer Nature.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, *249*(22), 7130-7139. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8
Han, W., Yang, Y., Gao, J., Zhao, D., Ren, C., Wang, S., Zhao, S., & Zhong, Y. (2019). Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or

combined. Ecotoxicology (London, England), 28(4), 399-411.

https://doi.org/10.1007/s10646-019-02030-4

Hammond, T. T., Ortiz-Jimenez, C. A., & Smith, J. E. (2020). Anthropogenic change alters ecological relationships via interactive changes in stress physiology and behavior within and among organisms. Integrative and comparative biology, 60(1), 57-69. https://doi.org/10.1093/icb/icaa001

Hisamoto, S., Ikegami, M., Goka, K., & Sakamoto, Y. (2024). The impact of landscape structure on pesticide exposure to honey bees. *Nature communications*, *15*(1), 8999. https://doi.org/10.1038/s41467-024-52421-3

La Porta, G., Magara, G., Goretti, E., Caldaroni, B., Dörr, A. J. M., Selvaggi, R., ... & Elia, A. C. (2023). Applying Artificial Neural Networks to Oxidative Stress Biomarkers in Forager Honey Bees (*Apis mellifera*) for Ecological Assessment. *Toxics*, *11*(8), 661. https://doi.org/10.3390/toxics11080661

Li, Z., Guo, D., Wang, C., Chi, X., Liu, Z., Wang, Y., ... & Gao, Z. (2024). Toxic effects of the heavy metal Cd on *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae): Oxidative stress, immune disorders and disturbance of gut microbiota. *Science of The Total Environment*, *912*, 169318. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169318

Lupi, D., Palamara Mesiano, M., Adani, A., Benocci, R., Giacchini, R., Parenti, P., ... & Tremolada, P. (2021). Combined effects of pesticides and electromagnetic-fields on honeybees: multi-stress exposure. *Insects*, *12*(8), 716.

https://doi.org/10.3390/insects12080716

Lv, Li, Wi, Li, X., Wang, D., Weng, H., Zhu, Y. C., & Wang, Y. (2023). Mixture toxic effects of thiacloprid and cyproconazole on honey bees (*Apis mellifera*

L.). Science of the Total Environment, 870, 161700.

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161700

Mackei, M., Huber, F., Sebők, C., Vöröházi, J., Tráj, P., Márton, R. A., ... & Mátis, G. (2024). Unraveling the acute sublethal effects of acetamiprid on honey bee neurological redox equilibrium. *Scientific Reports*, *14*(1), 27514.

https://doi.org/10.1038/s41598-024-79274-6

Martins, C. A. H., Caliani, I., D'Agostino, A., Di Noi, A., Casini, S., Parrilli, M., ... & Sgolastra, F. (2023). Biochemical responses, feeding and survival in the solitary bee *Osmia bicornis* following exposure to an insecticide and a fungicide alone and in combination. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(10), 27636-27649. https://doi.org/10.1007/s11356-022-24061-x

Mahé, C., Jumarie, C., & Boily, M. (2021). The countryside or the city: Which environment is better for the honeybee?. *Environmental Research*, *195*, 110784. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110784

Meikle, W. G., Weiss, M., & Beren, E. (2020). Landscape factors influencing honey bee colony behavior in Southern California commercial apiaries. Scientific reports, 10(1), 5013. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61716-6

Melo, J. D. O., Dantas-Medeiros, R., Moreira, L. G. L., Giordani, R. B., & Zucolotto,
S. M. (2023). A Caatinga: Um bioma exclusivamente brasileiro. *Ciência e Cultura*, *75*(4), 01-09.

Mena, F., Berrocal, S., Solano, K., Herrera, E., Gallardo, M., Jiménez, K., ... & Pinnock-Branford, M. (2023). Comparison of the Sensitivity of *Tetragonisca* angustula (Apidae-Meliponini) and Apis mellifera (Apidae-Apini) to Three Insecticides (Malathion, Imidacloprid, and Fipronil) Used in Costa Rica. *Environmental Toxicology* and Chemistry, 42(5), 1022-1031. https://doi.org/10.1002/etc.5587 Murphy, J. T., Breeze, T. D., Willcox, B., Kavanagh, S., & Stout, J. C. (2022). Globalisation and pollinators: Pollinator declines are an economic threat to global food systems. People and Nature, 4(3), 773-785. https://doi.org/10.1002/pan3.10314 Nikolić, T. V., Kojić, D., Orčić, S., Batinić, D., Vukašinović, E., Blagojević, D. P., & Purać, J. (2016). The impact of sublethal concentrations of Cu, Pb and Cd on honey bee redox status, superoxide dismutase and catalase in laboratory conditions. Chemosphere, 164, 98-105. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.077 Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry, 95(2), 351-358. https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3 Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., ... & Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. Nature, 540(7632), 220-229. https://doi.org/10.1038/nature20588 Refati, D. C., da Silva, J. L. B., Macedo, R. S., Lima, R. D. C. C., da Silva, M. V., Pandorfi, H., ... & de Oliveira-Júnior, J. F. (2023). Influence of drought and anthropogenic pressures on land use and land cover change in the brazilian semiarid region. Journal of South American Earth Sciences, 126, 104362. https://doi.org/10.1016/j.jsames.2023.104362 Roubik, D. W. (2023). Stingless bee (Apidae: Apinae: Meliponini) ecology. Annual Review of Entomology, 68(1), 231-256. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120120-103938

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <u>https://www.R-project.org/</u>.

Silveira, F. A., Melo, G. A., & Almeida, E. A. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Guilherme Carnevale Carmona.

Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., ... & Peng, Z. Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2019*(1), 5080843. https://doi.org/10.1155/2019/5080843

Tan, S., Li, G., Liu, Z., Wang, H., Guo, X., & Xu, B. (2022). Effects of glyphosate exposure on honeybees. *Environmental toxicology and pharmacology*, *90*, 103792. https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103792

Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017). Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS One*, *12*(6), e0178421. https://doi.org/10.1371/journal.pone.017842

Artigo II - Espectroscopia Raman no Mel: Uma Revisão Sistemática dos Picos e Compostos Químicos Associados

Espectroscopia Raman no Mel: Uma Revisão Sistemática dos Picos e Compostos Químicos Associados

Isabelle Letícia Bender de Souza¹, Isabel Oliveira Abreu^{2,3}, Ana Tereza Bittencourt Guimarães¹, Nuno Gonçalo de Carvalho Ferreira^{3,4}

¹ R. Universitária, 1619 - Universitário, Cascavel - PR, 85819-110. Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua do Campo Alegre S/N 4169-007 Porto (Portugal). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto,³ Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões, Avenida General Norton de Matos S/N 4450-208 Matosinhos (Portugal). CIIMAR- Universidade do Porto; ³ Museum Avenue, CF10 3 AX Cardiff (UK). School of Biosciences - Cardiff University

RESUMO

Os méis são produtos naturais de composição complexa, influenciada por fatores como a espécie de abelha produtora, a origem botânica e as condições ambientais. Dado o crescente interesse na caracterização química e na autenticação do mel, a espectroscopia Raman se destaca como uma técnica eficiente para análise não destrutiva, rápida e precisa de compostos bioquímicos. Este estudo realizou uma revisão sistemática utilizando o modelo PRISMA para identificar e organizar picos Raman associados ao mel, analisando 34 artigos publicados entre 2000 e 2024. Foram avaliados comprimentos de onda variados, como 532 nm, 785 nm e 1064 nm, resultando na descrição de 411 picos relevantes. Observou-se elevada divergência na categorização dos picos entre estudos, atribuída à sobreposição espectral e ambiguidades de interpretação. Na comparação dos picos e descrições cujas "moléculas eram iguais, mas com modos vibracionais diferentes", observou-se tal discrepância em 60% dos picos com laser de 532 nm, 20,8% em 785 nm e 14,3% em 1064 nm. Na avaliação de "moléculas e modos vibracionais diferentes", houve essa diferença em e 17,1% do laser de 532 nm, 52,1% em 785 nm e 58,9% em 1064 nm. E por fim, para a avaliação de "moléculas diferentes e modos vibracionais iguais", 4,1% em 785 nm e 3,6% em 1084 nm. Essas diferenças de interpretação indicam desafios, sendo necessário utilizar técnicas adicionais para minimizar os viéses de análise. Conclui-se que a espectroscopia Raman pode contribuir para identificação e autenticação do mel, desde que associada a técnicas complementares e bases de dados espectrais robustos, fortalecendo sua aplicabilidade em estudos ambientais e na garantia da qualidade do produto.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman; Mel; Revisão sistemática

1. INTRODUÇÃO

Os méis são produzidos naturalmente por abelhas e possuem uma composição química complexa. São ricos em carboidratos, como glicose e frutose, além de conter enzimas, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, lipídeos, carotenoides, vitaminas, minerais, substâncias aromáticas, flavonoides e ácidos fenólicos (Rao et al., 2016; Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Valverde et al., 2022). Essas características químicas conferem aos méis diversas propriedades terapêuticas (Rao et al., 2016; Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Silva A. et al., 2021; Valverde et al., 2022).

A composição de cada mel é influenciada por vários fatores que alteram suas propriedades. Entre eles, a espécie de abelha produtora, as plantas forrageadas e as condições ambientais, como clima, solo e práticas de manejo (Avila et al., 2018; Avila et al., 2019; Ribeiro et al., 2019; Batison et al., 2020; Silva A. et al., 2021). Essas variações tornam essencial o estudo da autenticidade e da qualidade do mel, bem como sua caracterização botânica e geográfica, sendo aspectos de interesse para produtores e consumidores (Anjos, 2018; Ballabio et al., 2018; Oroian et al., 2018; Sotiropoulou et al., 2021; Huzortey et al., 2022).

Assim, há um crescente interesse em técnicas para a análise do mel, refletindo sua relevância econômica, integridade química, ecológica e terapêutica, além de sua importância como marcador da interação entre abelhas e o ambiente.

Entre as análises empregadas para esses estudos, destaca-se a espectroscopia Raman. É uma técnica físico-química que estuda modos de vibração, rotação e baixa frequência em um sistema. Através de um feixe de luz monocromática, na faixa do infravermelho, visível ou ultravioleta, explora os fenômenos de espalhamento inelástico, ou efeito Raman, que descreve a excitação de fótons para estados de energia virtuais e a consequente perda (*Stokes*), ou ganho (*anti-Stokes*), de energia devido à interação da luz com modos vibracionais associados às ligações químicas da amostra. Essa mudança de energia é indicativa de modos vibracionais discretos de moléculas polarizáveis e, assim, uma medição qualitativa da composição bioquímica pode ser obtida (Butler, 2016; Oroian et al. 2017; Sotiropoulou et al. 2021; Robert; Birech; Kaniu, 2023). Essa técnica é capaz de analisar uma ampla gama de amostras, tanto sólidos quanto líquidos, tecidos e células fixados ou vivos, incluindo produtos apícolas (Butler, 2016; Robert; Birech; Kaniu, 2023).

Com base na relevância da espectroscopia Raman para a análise de produtos de abelhas, torna-se evidente a necessidade de organizar de forma sistemática os dados obtidos por essa técnica, especialmente em relação aos picos associados à composição química do mel. Essa organização auxilia a identificação mais clara e objetiva dos compostos presentes. Além disso, a sistematização dos picos Raman é fundamental para diferenciar amostras de méis com maior eficiência, refletindo diretamente na garantia de autenticidade, qualidade e rastreabilidade no mercado global. Assim, o objetivo do presente estudo foi sumarizar as caracterizações espectroscópicas do mel usando a técnica de Raman, apresentando os picos dessa técnica, bem como as divergências relativas às descrições já relatadas na literatura sobre picos em diferentes comprimentos de onda.

2. MÉTODOS

Neste estudo, utilizou-se o modelo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*). As bases de dados utilizadas foram Scopus e Periódicos CAPES, abrangendo publicações entre 2000 e 2024. Os termos de pesquisa utilizados foram "Honey AND Raman", sem nenhum filtro para fator de impacto ou qualis, sendo a última busca foi conduzida em 03/07/2024.

Após a remoção dos títulos duplicados, os resumos de todos os artigos foram revisados para identificar estudos que utilizaram espectroscopia Raman para análise de mel e foram selecionados para leitura completa. Foram incluídos os em inglês ou português que abordaram a identificação de picos específicos observados na análise Raman de mel e o respectivo comprimento de onda utilizado para geração dos espectros. Foram excluídos os artigos que utilizaram amostras de mel contaminadas, que não abordaram ou explicaram os picos de mel objetivamente, além de revisões de literatura não estruturadas de forma sistemática.

Dos artigos que foram incluídos, foram extraídas as informações relativas aos comprimentos de onda do laser, a áreas dos picos, bem como a descrição relativas às características dos compostos analisados. Para verificar diferenças nas descrições dos picos, foram excluídos aqueles reportados exclusivamente em um artigo científico. Os picos descritos em mais de um estudo foram categorizados em quatro tipos: (1) mesma molécula e modo vibracional; (2) mesma molécula, mas modos vibracionais diferentes; (3) moléculas diferentes, mas modos vibracionais iguais; e (4) moléculas e

modos vibracionais diferentes. É importante ressaltar que foram consideradas equivalentes nomenclaturas sinônimas (e.g., "*bending*", traduzida como "flexão", e "*angular deformation*", traduzida como "deformação angular").

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foram identificados 335 artigos potencialmente relevantes, sendo 148 na base de dados Scopus e 187 na plataforma de periódicos da CAPES. Após a remoção de duplicatas, restaram 234 artigos. Destes, 52 foram selecionados para leitura completa, enquanto 182 foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão. Dos 52 artigos selecionados, 17 foram posteriormente excluídos: 14 por não abordarem picos de mel, 2 por não especificarem o comprimento de onda utilizado na leitura e 1 por ser uma revisão não sistemática. Foram então incluídos 34 artigos na análise final, conforme ilustrado no diagrama do PRISMA (Figura 1).



Figura 1 – Diagrama PRISMA para revisões sistemáticas resultante.

Quatro dos artigos analisados relatavam especificamente sobre o mel da abelha *Apis melífera* (11.8%). Um artigo avaliou o mel de *A. mellifera* e *Melipona beecheii*, uma espécie de abelha sem ferrão (2.9%). Outro artigo abordou o mel de

diferentes espécies, incluindo *A. mellifera*, *A. cerana* e *A. dorsata*, além de abelhas sem ferrão (sem especificar a espécie) (2.9%). Os demais artigos não especificaram a espécie de abelha responsável pelo mel analisado (82.4%).

Quanto à origem floral do mel, dezesseis artigos avaliaram exclusivamente méis de origem unifloral (47.1%), ou seja, provenientes de uma única espécie vegetal. Outros quatorze artigos combinaram a análise de méis uniflorais com méis multiflorais (41.2%), que são compostos por néctar de diversas espécies vegetais. Entretanto, seis artigos não especificaram a origem botânica dos méis analisados (17.6%).

Dos 34 artigos incluídos nesta revisão, os picos resultantes dos diferentes comprimentos de onda foram analisados separadamente. Sete estudos empregaram lasers com frequência de 532 nm (Tabela 1), um utilizou 782 nm (Tabela 2), catorze utilizaram 785 nm (Tabela 3), um empregou 830 nm (Tabela 4) e onze utilizaram 1064 nm (Tabela 5).

Removendo 40 descrições que realizam descrições de regiões acima de 50cm⁻¹, que juntas explicavam 6870 picos, a análise resultou em 550 descrições de picos. Destes, 154 foram observados em estudos com leitura a 532 nm, 12 a 782 nm, 221 a 785 nm, 7 a 830 nm e 156 a 1064 nm.

Para verificar diferenças nas descrições dos picos, foram excluídos aqueles reportados exclusivamente em um artigo científico, resultando em 411 picos. Nos picos descritos em dois ou mais artigos científicos, comparações identificaram 8 picos com descrições idênticas e 27 picos com descrições divergentes em estudos com comprimento de onda de 532 nm. Em comprimento de onda de 735 nm, 11 picos apresentaram descrições iguais e 37 divergentes. Em comprimento de onda de 1064 nm, foram encontrados 13 picos com descrições idênticas e 43 divergentes (Figura 2).



Figura 2 - Diagrama de análise das diferenças encontradas na comparação de descrição de picos.

Nos estudos com laser cujo comprimento de onda era 532 nm, 60% dos picos apresentaram descrições divergentes em relação a "moléculas iguais e modos vibracionais diferentes", 17,1% corresponderam a "moléculas e modos vibracionais diferentes", e 22,9% das comparações indicaram descrições idênticas, ou seja, "moléculas e modos vibracionais iguais".

Para os estudos com laser cujo comprimento de onda era 785 nm, 20,8% dos picos divergentes apresentaram "moléculas iguais e modos vibracionais diferentes", 4,1% "moléculas diferentes e modos vibracionais iguais", 52,1% "moléculas e modos vibracionais diferentes", e 23% tiveram descrições idênticas.

Nos trabalhos com laser cujo comprimento de onda era 1064 nm, 14,3% das descrições divergentes corresponderam a "moléculas iguais e modos vibracionais diferentes", 3,6% a "moléculas diferentes e modos vibracionais iguais", 58,9% a

"moléculas e modos vibracionais diferentes", e 23,2% apresentaram descrições idênticas (Figura 3).



Figura 3 – Gráfico de barras agrupadas mostrando o número de picos em cada categoria (mesma molécula e modo vibracional; mesma molécula, mas modos vibracionais diferentes; moléculas diferentes, mas modos vibracionais iguais; e moléculas e modos vibracionais diferentes) após a comparação das descrições.

Essa metodologia de Espectroscopia de Raman tem sido amplamente utilizada nas últimas décadas para amostras biológicas, que são misturas complexas (Butler et al., 2016). Esta técnica oferece vantagens, como a eliminação da necessidade de uma preparação extensiva da amostra, a resistência à interferência do teor de água durante as medições, uma natureza não destrutiva e uma elevada especificidade para as impressões digitais químicas dos materiais. Além disso, a espetroscopia Raman é uma técnica rápida e econômica capaz de recolher espectros de volumes de amostra muito pequenos (menos de 1 µm de diâmetro) (Oroian et al., 2018; Robert; Birech; Kaniu, 2023).

No entanto, a complexidade das amostras biológicas apresenta desafios na diferenciação entre amostras com estruturas moleculares e modos vibracionais semelhantes. A sobreposição de caraterísticas espectrais pode dificultar uma diferenciação precisa e pode levar a interpretações ambíguas de determinados picos (Butler et al., 2016; Robert; Birech; Kaniu, 2023), conforme foi observado na revisão dos presentes estudos.

Para enfrentar estes desafios, alguns autores sugerem que haja integração de técnicas analíticas para minimizar o ruído e a sobreposição espectral (Aykas et al., 2020; Magdas et al., 2021; Hu et al., 2020). Aykas et al., (2020) e Magdas et al., (2021) sugerem uma abordagem promissora que envolve a aplicação de algoritmos de aprendizagem supervisionada, os quais aproveitam o conhecimento prévio das caraterísticas das amostras para as classificar com maior eficácia. Estes algoritmos podem ser combinados com técnicas de aprendizagem automática, como a *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA), aumentando a exatidão da classificação (Aykas et al., 2020; Magdas et al., 2021)), assim como estes algoritmos demonstraram uma sensibilidade alta na deteção de adulterações mínimas em misturas de méis (Hu et al., 2022).

Recentemente, novos métodos matemáticos foram desenvolvidos, como o GBR-NMF (*Generalized Bilinear Non-negative Matrix Factorization*), para melhorar a interpretação dos dados de espectroscopia Raman. Essas técnicas permitem a fatorização dos dados espectrais em grupos que representam diferentes componentes bioquímicos, proporcionando identificações e quantificações mais precisas de compostos em misturas biológicas complexas (Milligan et al., 2023).

Embora ainda não exista uma base de dados de espectros Raman para todos os compostos biológicos, revisões como a do presente estudo permitem compilar listas de picos biologicamente relevante. A criação destas bases de dados reforçará a atribuição de picos espectrais a espécies moleculares específicas, melhorando assim a confiabilidade da espetroscopia Raman na investigação ambiental.

Apesar dessas limitações, a espectroscopia Raman continua sendo uma ferramenta poderosa na análise química. Com os avanços na tecnologia de detecção e processamento de dados, espera-se que as aplicações dessa técnica se tornem cada vez mais detalhadas na identificação e autenticação de diversos materiais, incluindo os méis e outros produtos apícolas (Sotiropoulou et al., 2021; Robert; Birech; Kaniu, 2023).

4. CONCLUSÃO

A técnica de Espectroscopia Raman é um método de deteção não destrutivo, rápido, eficiente e preciso para identificar compostos em mel. Contudo, o presente

estudo relata algumas fragilidades, apresentando divergências sobre a sobreposição espectral e a atribuição ambígua de picos.

Sugere-se que os avanços de metodologias complementares, como algoritmos de aprendizagem automática e modelos matemáticos melhorarão substancialmente a capacidade analítica da Espectroscopia Raman para análises de mel. Além disso, o desenvolvimento de bases de dados espectrais desempenhará um papel fundamental na melhoria da acurácia e da aplicabilidade desta técnica, na caraterização e autenticação de méis e produtos de abelhas.

Picos (cm1)	Descrição	Referência
95	С-Н е С-О-Н	Tahir et al., 2017
200–400	OH em torção	Šugar; Bouř, 2016
200-500	C-C-C-, C-C-O, C-O e C-C	Tahir et al., 2017
200-500	C-C-C-, C-C-O, C-O e C-C	Ballabio et al., 2018
328	C-C-C, C-C-O, C-O e C-C	Wu et al., 2022
329		
336.18	Vibração Esqueletica	Huzortey et al.,2022
410.30		
420-424		Colvucci et al., 2015
422	C-C-C, C-C-O, C-O e C-C	Wu et al., 2023
424	C-C-C, C-C-O, C-O e C-C	Wu et al., 2022
449-450	Estiramento esquelético	Corvucci et al., 2015
452	C-C-C, C-C-O, C-O e C-C	Wu et al., 2022
514.58	Deformação C–C-C e C-C-O	Huzortey et al.,2022
518	Forte deformação de C-C-C e C-C-O	Tahir et al., 2017
519	C-C-C, C-C-O, C-O e C-C	Wu et al., 2022
519-522	Flexão de C-C-O, C-C-C	Corvucci et al., 2015
520	C-C-C, C-C-O, C-O e C-C	Wu et al., 2023
524	deformação de C-C-O e C-C-C	Ballabio et al., 2018
590-592	Estiramento esquelético	Corvucci et al., 2015
616.74	Deformação do anel	Huzortey et al.,2022
629	Deformações do anel devido à frutose, Flexão de C-O-H dos carboidratos	Wu et al., 2022
629-630	Flexão do anel	Corvucci et al., 2015
630	Flexão do anel	Tahir et al., 2017
630	Deformação do anel da frutose	Wu et al., 2023

Tabela 1- Descrição dos picos no comprimento de onda de 532nm

697.24	Estiramento C-O e C – C-O e flexão O-C-O	Huzortey et al.,2022
705	Estiramento C-O, C-C-O e O-C-O e flexão das bandas na região	Tahir et al., 2017
706	Estiramento C-O e C-C-O, flexão O-C-O da glicose	Wu et al., 2023
707-706	Estiramento C-O, C-C-O, O-C-O	Corvucci et al., 2015
777	Flexão C-H	Corvucci et al., 2015
816.04	Flexão C – OH	Huzortey et al.,2022
821	Estiramento CH	Corvucci et al., 2015
821	СН	Wu et al., 2022
822–866	Flexão C-H, C-O-H e CH2	Tahir et al., 2017
855.2	C – O – C Éteres alquílicos cíclicos	Huzortey et al.,2022
866	Deformação CH2	Wu et al., 2022
900–1000	Estiramento C-C/C-O e deformações do anel	Šugar; Bouř, 2016
904	flexão de CH	Corvucci et al., 2015
908.63	CH, flexão COH	Huzortey et al.,2022
971.16	Anel aromático	Huzortey et al.,2022
940–1175	C – O-H, C-C e C-O e C-O no fenol	Tahir et al., 2017
1063	C-C, C-O e C-O-H	Wu et al., 2022
1065.53	Estiramento C – O – C, vibração CN de proteínas	Huzortey et al.,2022
1067	Flexão C-H, C-O-H em carboidratos	Wu et al., 2023
1069-1064	Estriamento CO.	Corvucci et al., 2015
1070-1077	Flexão CH, COH, CN, proteínas	Corvucci et al., 2015
1076	C–O–H	Tahir et al., 2017
1077	Estriamento de CO	Corvucci et al., 2015
1111.74	Deformação C – OH	Huzortey et al.,2022
1125	Modos de vibração de CO e COH em açúcares e vibração de CN em proteínas e aminoácidos	Wu et al., 2022
1126	Carboidrato desconhecido C-N (proteína ou aminoácidos)	Corvucci et al., 2015
1126	Combinação de estriamento CO e modos vibracionais CN em proteínas e aminoácidos	Wu et al., 2023

1127	Estiramento da ligação C – O (maior) e vibração da ligação C – N de proteínas e aminoácidos (menor)	Tahir et al., 2017
1200–1500	Flexão CH	Tahir et al., 2017
1238	C (6) -OH e C (1) -OH)	Šugar; Bouř, 2016
1252.91	C – O – C Éteres alquílicos cíclicos	Huzortey et al.,2022
1265	Deformação de C-O-H, C-C-H e O-C-H	Wu et al., 2022
1266	С – О – Н, С-С-Н е С-О-Н	Tahir et al., 2017
1266-1271	Estiramento Proteína C OH – amida (III)	Corvucci et al., 2015
1267	Deformação de C-C-H, O-C-H e C-O-H	Wu et al., 2023
1300–1460	Vibrações oscilantes dos grupos funcionais CH e –OH	Šugar; Bouř, 2016
1349	Balanço CH2	Corvucci et al., 2015
1351.64	Flexão CH e OH	Huzortey et al.,2022
1364-1369	Flexão CH2	Tahir et al., 2017
1366	Glicose	Corvucci et al., 2015
1368	Deformação simétrica de CH2	Wu et al., 2022
1372	Glicose, maltose	Corvucci et al., 2015
1444.4	Flexão CH2	Huzortey et al.,2022
1457-1459	Frutose	Corvucci et al., 2015
1460	COO-, flexão CH2, atribuída à presença de flavonóis e ácidos orgânicos	Tahir et al., 2017
1462	COO- e CH2 em flavonóis e ácidos orgânicos	Wu et al., 2023
1560	CH2 e COO-	Wu et al., 2022
1576	Discriminação de amostras Linden das outras classes	Ballabio et al., 2018
1636-1642	Flexão de OH	Corvucci et al., 2015
1636-1642	Flexão de OH	Ballabio et al., 2018
1666	Discriminação de amostras Linden das outras classes	Ballabio et al., 2018
2800-3000	Estriamento CH	Corvucci et al., 2015
2900-2907	Estriamento CH	Tahir et al., 2017
2938-2944	Estriamento assimétrico CH2	Corvucci et al., 2015

2941-2903	Estriamento CH	Tahir et al., 2017	
2945	Estriamento CH	Corvucci et al., 2015	
2945	Estriamento CH	Tahir et al., 2017	
3384	Estriamento OH	Corvucci et al., 2015	
Tabela 2 – Descrição dos picos	no comprimento	de onda	de 782 nm
--------------------------------	----------------	---------	-----------
--------------------------------	----------------	---------	-----------

Picos (cm1)	Descrição	Referência
· · ·	Movimentos vibracionais esqueléticos com grandes contribuições dos modos de	
200 e 600	deformação dos grupos de sacarídeos C – C – C, C – C – O, C – C e C – O	
340	Modo de anel endocíclico d (C-C-C) da glicose	
354	d (C-C-C) forma furanóide de frutose	
420	Deformação C–C–O e C–C–C	
626	Deformação do anel de frutose	
777	Deformação m (C–H) na frutopiranose da frutose	Issaad et al., 2021
820	Deformação m (C–H) na frutofuranose da frutose	
915	d (COH) e m (C–H) deformações fora do anel da frutose	
1076	Estriamento de C–O	
1264	Deformação da vibração C–C–H, O–C–H e C–O–H da amida (ligação peptídica)	
1458	Vibração de deformação simétrica CH2	
2906	Estriamento C – H	
2941	Estriamento C – H	

Picos (cm1)	Descrição	Referência
	Vibrações de estiramento e flexão do C-O, C-C-O e C-C-C que formam a	Anguebes-Franseschi, F. et al.,
230–510	estrutura molecular dos açúcares	2019
	Deformação C-H e C-O-H, do anel, deformação plana e deformação C-C-O e C-	
300-950	C-C	Sahlan et al., 2022
312	δ (C–C–C) anelar de formas piranóides de frutose	Cherigui et al., 2023
314	δ (C– C–C) no piranóide, se sobrepôs à banda de glicose em 317	Özbalci et al., 2013
314	δ (C– C–C) no piranóide, se sobrepôs à banda de glicose em 317	Oroian; Ropciuc, 2018
317	Glicose	Özbalci et al., 2013
325–328	C-C-C estriamento de Glicose e Frutose	Xagoraris, et al., 2021
332	δ (C-C-C) endocíclico de glicose	Cherigui et al., 2023
	δ(C–C–O) de glicose que é coberto pela banda em 353 cm-1, que está	Molnar; Berghian-Grosan;
335	associada à vibração do anel δ (C – C – C) dos carboidratos	Magdas, 2020
	Anel endocíclico δ (C–C–C) da glicose cobriu a banda em 353 cm-1, que se	
341	originou da forma furanóide δ ($C - C - C$) da frutose	Özbalci et al., 2013
	Anel endocíclico δ (C–C–C) da glicose cobriu a banda em 353 cm-1, que se	
341	originou da forma furanóide δ (C – C – C) da frutose	Oroian; Ropciuc, 2018
345	δ (C–C–C) anular de formas furanóides de frutose	Cherigui et al., 2023
	Anel endocíclico δ (C-C-C) da glicose cobriu a banda em 353 cm-1, que se	-
346	originou da forma furanóide δ (C-C-C) da frutose	Oroian; Ropciuc; Paduret, 2018
353	vibração do anel d (C–C–C) na forma furanóide da frutose.	Özbalci et al., 2013
356	δ (C-C-O) endocíclico de glicose	Cherigui et al., 2023
408	Espectro de glicose	Oroian: Ropciuc: Paduret, 2018
415	Espectro de glicose	Oroian; Ropciuc, 2018
419	Espectro de frutose	Oroian: Ropciuc, 2018
419-453	δ (C–C–C) anel de carboidratos (glicose e frutose) 35.36	Cheriqui et al., 2023
		Magdas, D. A.: Berghian-
420	Glicose	Grosan, C., 2023

420-424	flexão C-C-O, C-C-C
423	$\delta(C-C-O) \in \delta(C-C-C)$ de carboidratos
423	C-C-O e C-C-C Flexão de glicose e frutose
437	Espectro de glicose
449-450	Estriamento esquelético
455-458	Estriamento de açúcares
498	Estriamento esquelético
515	r δ (C–C–O) e δ (C–C–C) de carboidratos
517-518	C-C-O e C-C-C Flexão de glicose e frutose
519	δ (C–C–O) e δ (C–C–C) de carboidratos
519	Frutose
519-522	Flexão C-C-O, C-C-C
521	δ (C–C–O) e δ (C–C–C) de carboidratos
530	Frutose
530	Espectro de frutose
530	Anel endocíclico de carboidratos
539-541	Estriamento de frutose em anel
571	Vibrações de deformação de NO2
588-590	Deformação do Anel Frutose
590-592	Estriamento esquelético
	Estriamento de anéis insaturados presentes em HMF, carotenos, flavonas,
595-691	navonoides e polifenois
596	Estiramento esquelético
606	Espectro de frutose
616	Frutose
617	Espectro de frutose

Oroian; Ropciuc, 2018 Magdas et al., 2021 Xagoraris, et al., 2021 Oroian; Ropciuc, 2018 Oroian; Ropciuc, 2018 Xagoraris, et al., 2021 Oroian; Ropciuc; Paduret, 2018 Cherigui et al., 2023 Xagoraris, et al., 2021 Magdas et al., 2021 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Oroian; Ropciuc, 2018 Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020 Özbalci et al., 2013 Oroian; Ropciuc, 2018 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Xagoraris, et al., 2021 Li et al., 2020 Xagoraris, et al., 2021 Oroian; Ropciuc, 2018 Anguebes-Franseschi, F. et al., 2019 Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020 Oroian; Ropciuc; Paduret, 2018 Özbalci et al., 2013 Oroian; Ropciuc, 2018

627	Estiramento de açúcares esqueléticos
627	Deformação do anel
627 629	Frutose Deformação do anel de carboidratos
629-630	Flexão do anel
630	Deformação do anel
663	Vibrações de balanço de NH2
681	Estiramento de C-O e C-C-O, flexão O-C-O
690	Estiramento C-O e C-C-O, juntamente com flexão de O-C-O
691–752	C-O e C-C-O e vibrações de flexão de O-C-O.
702	Deformação de NO2
704	v (C - C) em frutopiranose
705	Flexão C-O e C-C-O, O-C-O
705	Estiramento de C-O e C-C-O, flexão de O-C-O
705	Estiramento e flexão de açúcares C-O, C-C-O e O-C-O
705	Estiramento de $C = O$
707	Frutose
707-706	Estiramento C-O, C-C-O, O-C-O
709	v (C–O), v (C-C –O), δ (O–C–O)
732	glicose v (C-C)
743	Balanço de NH2
744	Frutopiranose
744	o v(C–C)

Xagoraris, et al., 2021 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Magdas et al., 2021 Oroian; Ropciuc, 2018 Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020 Li et al., 2020 Oroian; Ropciuc; Paduret, 2018 Robert; Birechi; Kaniu, 2023 Anguebes-Franseschi, F. et al., 2019 Li et al., 2020 Cherigui et al., 2023 Li et al., 2012 Oroian; Ropciuc, 2018 Xagoraris, et al., 2021 Hu et al., 2022 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Oroian; Ropciuc, 2018 Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020 Robert; Birechi; Kaniu, 2023 Li et al., 2020 Özbalci et al., 2013 Oroian; Ropciuc, 2018

	Região anomérica de carboidratos, flexão C-H (principalmente de carboidratos)	
750-950	Vibrações do anel (principalmente de carboidratos)	Sahlan et al., 2022
754	Ligação fracas (C = O)	Robert; Birechi; Kaniu, 2023
770–917	Estiramento C-C e C-H presentes na glicose	Anguebes-Franseschi, F. et al., 2019
776	Glicose	Oroian; Ropciuc, 2018
777	Flexão CH	Oroian; Ropciuc, 2018
779	δ (C–H) e v (C–C) em glicose	Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020
779	δ (C–H) e v (C–C) em glicose	Cheriqui et al., 2023
790	Espectro de glicose	Oroian; Ropciuc, 2018
793	Espectro de glicose	Oroian; Ropciuc; Paduret, 2018
793	Espectro de glicose	Robert; Birechi; Kaniu, 2023
796	Vibrações de balanço de NH2	Li et al., 2020
800	Frutosfuranos	Özbalci et al., 2013
800	Vibração v(C–C)	Oroian; Ropciuc, 2018
820	υ (C–C) em frutofuranose	Cherigui et al., 2023
819-821	Estiramento de açúcares C-H	Xagoraris, et al., 2021
820–1024	Deformação de C-H e metileno –CH2–, bem como as vibrações de flexão de C- O-H	Anguebes-Franseschi, F. et al., 2019
821	Estiramento CH	Oroian; Ropciuc, 2018
822	(C–O–H)	Magdas et al., 2021
823	δ(C–H) e δ(CH2), δ(C–O–H)	Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020
823	Estiramento C–C da frutose	Magdas, D. A.; Berghian- Grosan, C., 2023 Magdas, D. A.; Borghian-
823	Frutose	Grosan, C., 2023
824	C (1)H, CH2	Li et al., 2012
824	CH e C (1)H, CH2	Oroian; Ropciuc, 2018

838	Espectro de glicose
845	Espectro de glicose
845	Espectro de glicose
856	Espectro de glicose
860-864	Estiramento de açúcares C H, C O H e CH2
865	СН
865	CH e C (1)H, CH2
865	C – H
866	Estiramento C – C da frutose
866	Frutose
868	C-O-C
868	δ(C–Η), δ(CH2)
869	δ (C–H) e δ (CH2), δ (C–Ο–H)
880	Ligação de "abano" (NH - O)
896	Glicose
904	Flexão CH
911	Espectro de frutose - δ (COH) e v (C – O)
915	C (1)H e COH
915	C (1)H e COH
915	Flexão de C–H e C–OH
916-917	Flexão de açúcares C-H e C-O-H
922-916	Flexão de C-H, C-O-H
917	δ(C–H), δ(C–Ο–H)
917	Deformação do C–H e C-O–H
918	COCee,
918	δ (С–Н) е δ (С–ОН)

Oroian; Ropciuc, 2018 Oroian; Ropciuc; Paduret, 2018 Robert; Birechi; Kaniu, 2023 Oroian; Ropciuc, 2018 Xagoraris, et al., 2021 Li et al., 2012 Oroian; Ropciuc, 2018 Hu et al., 2022 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Li et al., 2020 Magdas et al., 2021 Cherigui et al., 2023 Robert; Birechi; Kaniu, 2023 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Oroian; Ropciuc, 2018 Oroian; Ropciuc, 2018 Li et al., 2012 Oroian; Ropciuc, 2018 Hu et al., 2022 Xagoraris, et al., 2021 Oroian; Ropciuc, 2018 Magdas et al., 2021 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Li et al., 2020 Cherigui et al., 2023

919	δ(C–H) e δ(C–OH)	Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020
933	Espectro de frutose - δ (COH) e v (C – O) Estiramento de CO e CC (carboidratos) Vibrações do anel (principalmente de	Oroian; Ropciuc, 2018
950-1175	carboidratos)	Sahlan et al., 2022
970	glicose v (C- O)	Robert; Birechi; Kaniu, 2023
978-980	Flexão da Frutose C C H	Xagoraris, et al., 2021
982	Frutose e glicose	Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020
1001	Estiramento de glicose v (C-C) e v (C-O)	Robert; Birechi; Kaniu, 2023
1024–1094	Flexão de CH e C-O-H dos açúcares e flexão de CN de aminoácidos e proteínas	Anguebes-Franseschi, F. et al., 2019
1028	(C – O) do anel de glicose	Oroian; Ropciuc, 2018
1040	CH, COH de carboidrato, proteína CN e aminoácido	Li et al., 2020
1048	(C-O) do anel de glicose	Oroian; Ropciuc; Paduret, 2018
4054	Flexão de C (1) -H e COH em carboidratos e uma contribuição menor pela	Oncient Densities Deskunst 0040
1054	Vibração da ligação CN em proteínas e aminoácidos	Urolan; Ropciuc; Paduret, 2018
1060-1064		Li el al., 2012 Magdas, D. A.: Berghian-
1063	Estiramento C – C e CO e deformação CO – H	Grosan, C., 2023
1063-1065	Estiramento de açúcares CO	Xagoraris, et al., 2021
1064	v (C – C), v (C – O) e δ (C – O – H) em carboidratos	Magdas et al., 2021
1066	υ (C – O)	Oroian; Ropciuc, 2018
1067	Flexão C–H e C–O–H de carboidratos	Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020
1070-1077	C (1)H e COH	Oroian; Ropciuc, 2018
1072	C (1)H e COH, C-N (proteína ou aminoácido)	Oroian; Ropciuc, 2018
1077	Estiramento CO.	Özbalci et al., 2013
1078	δ (C – H) e δ (C – O – H) em carboidratos e δ (C – N) em proteínas e aminoácidos	Oroian; Ropciuc, 2018

1078 1078 1080	Estiramento C – C e CO e modo de deformação CO – H υ (C – O) υ (C – C), υ (C – O) e δ (C – O – H) em carboidratos	Magdas, D. A.; Berghian- Grosan, C., 2023 Cherigui et al., 2023 Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020
1081	δ (C – H) e δ (C – O – H) de carboidratos e δ (C – N) de proteínas e aminoácidos Estiramento de CO, COC dos açúcares e das ligações CN das proteínas e	Cherigui et al., 2023
1094–1191 1106	aminoácidos C – O – C) modelo de flexão angular	Magdas et al., 2021 Anguebes-Franseschi, F. et al., 2019
1121-1125	Proteínas C N e estiramento de aminoácidos	Oroian; Ropciuc, 2018 Magdas, D. A.; Berghian-
1123	Estiramento C – C e CO e deformação CO – H	Grosan, C., 2023
1,123 1126 1126 1126-1127	Estiramento de C – O e C – O – C e vibração de C – N de proteínas e aminoácidos Carboidrato desconhecido e C-N (proteína ou aminoácido) Deformação C-OH da glicose e sacarose Estiramento de CN e proteínas	Xagoraris, et al., 2021 Magdas et al., 2021 Paradkar; Irudayaraj, 2002 Li et al., 2012
1127	Glicose, maltose	Li et al., 2012 Molnar: Berghian-Grosan:
1127	C – O E CN	Magdas, 2020
1127	Deformação C-OH	Oroian; Ropciuc, 2018.
1127	Estimamento de C – O U(C = O) = U(C = O) de carbeidrotes e $U(C = N)$ de proteínes e	Hu et al., 2022
1128	aminoácidos Estiramento e flexão O-H, estiramento de CH (carboidratos) e de C = O da	Cherigui et al., 2023
1175-1455	cetona	Sahlan et al., 2022
1262	C-O-C éteres alquílicos cíclicos da frutose	Anguebes-Franseschi, F. et al., 2019
1262–1300	CH e OCH	Oroian; Ropciuc; Paduret, 2018

1265 1265	d(CH), d(CH2) e d(COH) Éteres alquílicos cíclicos CO–C da frutose
1265	Deformação C – C – H, OCH – H e CO – H
1266	Deformação de C-C-H, O-C-H e C-O-H
1266	υ (C– O – H), υ (amida III)
1267-1268	C (6) OH e C (1) OH
1332	Frutose
1361	Dissacarídeos como 1-O-metil-a-D-glicosídeo, sacarose
1362	δ (O – H) e δ (C – H)
1364	Flexão H e OH da glicose e sacarose
1367	Glicose
1367	Sacarose
1372	CH e COH
1372-1374	Flexão OH, CH
1373	C – H e O – H
1373	Flexão de CH e OH da glicose e sacarose
1373	Flexão de ligação C – H e O – H
1471 ou 1455	Glicose
1457	Sacarose e flexao de CH2 da frutose
1457	Deformação de – H, CH2 e C-O – H
1460	Frutose e glicose
1461	Flexão CH2 e COO-

Oroian; Ropciuc, 2018. Oroian; Ropciuc, 2018. Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Xagoraris, et al., 2021 Cheriqui et al., 2023 Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020 Anguebes-Franseschi, F. et al., 2019 Oroian; Ropciuc, 2018. Cherigui et al., 2023 Xagoraris, et al., 2021 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020 Li et al., 2012 Oroian; Ropciuc, 2018 Oroian; Ropciuc, 2018 Hu et al., 2022 Li et al., 2012 Oroian; Ropciuc, 2018 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Magdas, D. A.; Berghian-Grosan, C., 2023 Xagoraris, et al., 2021

1461	δ(CH2) e δ (CCO- de flavonóis e ácidos orgânicos	Oroian; Ropciuc, 2018
1461	Deformação simétrica de CH2 em frutose	Molnar; Berghian-Grosan; Magdas, 2020
1461	Flexão de ligação H – C – H	Hu et al., 2022
1462	δ (CH2) e δ (CCO– de flavonóis e ácido orgânico	Cherigui et al., 2023
	Estiramento e flexão O-H (água), estiramento C = O (principalmente de	-
1640-1760	carboidratos), flexão NH da amida I (principalmente proteína	Sahlan et al., 2022
1645	Estiramento amidas $-C = O$	Robert; Birechi; Kaniu, 2023
	Estiramento dos grupos carbonila C-O e estiramento C-C, descobriu-se que	
1700–1600	esta região está relacionada a moléculas fenólicas	Oroian; Ropciuc, 2018
2400-2200	Estiramento CO2 (decomposição de carboidratos)	Sahlan et al., 2022
	Estiramento CH (carboidratos), Estiramento OH (ácidos carboxílicos),	
2800–3000	EstiramentoNH3 (aminoácidos livres	Sahlan et al., 2022
2885-2905	υ (CH)	Cherigui et al., 2023
2930-3000	kυ (CH2)	Cherigui et al., 2023

Tabela 4 - Descrição dos picos no comprimento de onda de 830 nm

Picos (cm1)	Descrição	Referência
200-600	Deformação de C-C-C, C-C-O, C-C e C-O	
350-650	Carboidratos	
407-541	Glicose	
423	Glicose e frutose	
427	Glicose e frutose	Frausto-Reyes, et al., 2017
540	Glicose e frutose	
626	Deformação do anel de frutose	
630	Glicose e frutose	
	Torção CH2 originada dos modos de carboidratos (também cíclicos) - hgh na	
1296	cera de abelha	
	Deformação de CH2 originada de modos de carboidratos (também cíclicos)	
1444	ricos em cera de abelha	

Picos (cm1)	Descrição	Referência
	Deformação de C – C – C, C – C – O, C – C e C – O das moléculas de	De Oliveira; Colombara;
200-600	açúcar.	Edwards, 2002
353	Carboidratos e proteínas desconhecidos	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002 De Oliveira; Colombara;
420	Glicose	Edwards, 2002
423	Carboidratos e proteínas desconhecidos	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
518	Carboidrato desconhecido	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
520	Frutose Flexão do fluido C2 – C1 – O1	De Oliveira; Colombara; Edwards, 2002 De Oliveira; Colombara;
540		Edwards, 2002 De Oliveira: Colombara:
625	Frutose	Edwards, 2002
627	Frutose cristalina centrada em frutose amorfa.	De Oliveira; Colombara; Edwards, 2002
630	Carboidrato desconhecido	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
638	Frutose cristalina centrada em frutose amorfa	De Oliveira; Colombara; Edwards, 2002
Abaixo de 700	Modos esqueléticos da estrutura em anel	Kizil; Irudayara, 2007 De Oliveira: Colombara:
703	Frutose	Edwards, 2002
704	Carboidrato desconhecido	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
706-707	Estiramento C-O, C-C-O, O-C-O	Batsouli et al., 2005
707	Frutose	Ciaccheri et al., 2015
707	Frutose	Mignani et al., 2015
707	Frutose	Grazia Mignani et al., 2016
775	Carboidrato desconhecido	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002

Tabela 5 - Descrição dos picos no comprimento de onda de 1064 nm

779	C-C	Kizil; Irudayara, 2007
04.0	Finite e e	De Oliveira; Colombara;
816	Frutose	Edwards, 2002
821	CH	Batsouli et al., 2005
821	Frutose	Ciaccheri et al., 2015
821	Frutose	Mignani et al., 2015
821	Frutose	Grazia Mignani et al., 2016
824	Desconhecido	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
840	C (1) –H, deformação CH2	Kizil; Irudayara, 2007
		De Oliveira; Colombara;
863	Frutose	Edwards, 2002
865	C (1)H e CH	Batsouli et al., 2005
866	C (1)H	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
867	Frutose, glicose	Ciaccheri et al., 2015
867	Frutose, glicose	Mignani et al., 2015
867	Frutose, glicose	Grazia Mignani et al., 2016
		De Oliveira; Colombara;
896	Glicose	Edwards, 2002
915	Flexão C (1)H e COH	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
o 1 -		De Oliveira; Colombara;
917	Glicose	Edwards, 2002
917	Glicose, maltose	Ciaccheri et al., 2015
917	Glicose, maltose	Mignani et al., 2015
917	Glicose, maltose	Grazia Mignani et al., 2016
0.4.0		De Oliveira; Colombara;
918	Sacarose	Edwards, 2002
922-918	C (1)H E COH	Batsouli et al., 2005
922-916	Flexão CH, COH	Ciaccheri et al., 2015

922-918	CH e COH Estiramento C-O, deformação C – C – H, estiramento C – C e deformação C	De Oliveira; Colombara; Edwards, 2002
924	-C-O.	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002 De Oliveira; Colombara;
981	Desconhecido	Edwards, 2002
1060-1080	Frutose, glicose	Ciaccheri et al., 2015
1060-1080	Frutose, glicose	Mignani et al., 2015
1060-1080	Frutose, glicose	Grazia Mignani et al., 2016
	Flexão de C (1) – H e COH em carboidratos e uma contribuição menor pela	
1065	vibração da ligação C–N em proteínas e aminoácidos.	Batsouli et al., 2005
1070-1077	Flexão CH, COH, CN, proteínas	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
4070	C (1)H e COH C-N (proteína ou aminoácidos)	De Oliveira; Colombara;
1072	Elevão do CAH o CAOAH em carboidratos o lovo contribuição polo vibração	Edwards, 2002
1075	da ligação C-N em proteínas e aminoácidos	Kizil: Irudavara, 2007
1106	Flexão angular δ (C – O – C) da glicose	Batsouli et al., 2005
1124	Estiramento C – O. flexão C – O – H	Kizil: Irudavara, 2007
	Estiramento de C – O e COC e vibração de C – N	
1124	proteínas e aminoácidos	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
	Vibração n (C – C) e n (C – O) da glicose, já que a frutose não possui	De Oliveira; Colombara;
1025-1027	bandas nesta região	Edwards, 2002
1127	Glicose, maltose	Ciaccheri et al., 2015
1127	Glicose, maltose	Mignani et al., 2015
	Estiramento C-O e vibração da ligação C-N de carboidratos e aminoácidos,	
1127	respectivamente	Grazia Mignani et al., 2016
1264	C (6) –OH e C (1) –OH	De Oliveira; Colombara; Edwards, 2002
1265	Estiramento COH, AMIDA III	Batsouli et al., 2005
1267	C (6) OH e C (1) OH, AMIDA III (ligação peptídica)	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
1267	Frutose, glicose	Kizil; Irudayara, 2007

1267 1267	Frutose, glicose Frutose, glicose
1267	C (6) OH e C (1) OH Amida III (ligação peptídica)
1273	Frutose
1300–1450	Torções de anel
1335	Glicose
1335	Flexão C – O – H, torção CH 2
1342	CH2
1346	Frutose
1349	"abano" de CH2
1363	Deformação de açúcares CH 2
1366	f Ligações C – H e O – H
1371	δ(Ο–Η), δ(Ϲ–Η)
1372	Glicose, maltose
1372	Glicose, maltose
1372-1374	Flexão de OH, CH
1373	Flexão de C – H e O – H
1374	CH e OH
1458-1461	Flexão de CH2
1460	Frutose e glicose
1460	Frutose e glicose
1460	Frutose e glicose

Ciaccheri et al., 2015
Mignani et al., 2015
Grazia Mignani et al., 2016
De Oliveira; Colombara;
Edwards, 2002
De Oliveira; Colombara;
Edwards, 2002
De Oliveira; Colombara;
Edwards, 2002
Kizil; Irudayara, 2007
Batsouli et al., 2005
De Oliveira; Colombara;
Edwards, 2002
De Oliveira; Colombara;
Edwards, 2002
De Oliveira; Colombara;
Edwards, 2002
Kizil; Irudayara, 2007
Batsouli et al., 2005
Ciaccheri et al., 2015
Mignani et al., 2015
Grazia Mignani et al., 2016
Paradkar; Irudayaraj, 2002
De Oliveira; Colombara;
Edwards, 2002
Batsouli et al., 2005
De Oliveira; Colombara;
Edwards, 2002
Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
Ciaccheri et al., 2015

Frutose e glicose	Mignani et al., 2015
Flexão do CH2 e vibração do grupo COO– Além disso, a mesma região espectral foi atribuída ao flavonol e aos ácidos orgânicos	Grazia Mignani et al., 2016
CH2 e coo-	Kizil; Irudayara, 2007
CH2 COO- Discriminação de amostras Linden das outras classes, vibração de flexão	De Oliveira; Colombara; Edwards, 2002
CH2 e vibrações do grupo COO	Kizil: Irudavara. 2007
H-C, OH e NH3, esses alongamentos são devidos principalmente a carboidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos livres e fenólicos	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
Estiramento O-H	Kizil; Irudayara, 2007
Estiramento OH	Paradkar; <u>Irud</u> ayaraj, 2002
Modos vibracionais esqueléticos C – C – O e C – C – C, C – O e C – C	Anjos et al., 2021.
Modos vibracionais esqueléticos, nomeadamente C-C-O e C-C, C-O e CC Modos vibracionais esqueléticos dominantes δ (C – C – C), δ (C – C – O), δ	Anjos, et al., 2018
$(C - O) e \tau (C - C)$	Salvador et al., 2019
δ (C2 – C1 – O1) vibração de flexão de α- glicose	Salvador et al., 2019
Glicose	Salvador et al., 2019
Anel δ (CCO) no anel piranóide	Salvador et al., 2019
Frutose	Salvador et al., 2019
Deformação C – C – O e C – C – C	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
δ(C2–C1–O1) vibração de flexão β- glicose	Salvador et al., 2019
Glicose	Salvador et al., 2019
forte vibração esquelética	Salvador et al., 2019
δ(C-2-C-1-O-1) flexão β da glicose	Salvador et al., 2019
Deformação C – C – O e C – C – C	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
Deformações do anel e Deformação C – C – O e C – C – C	Anjos et al., 2021.
	Frutose e glicose Flexão do CH2 e vibração do grupo COO- Além disso, a mesma região espectral foi atribuída ao flavonol e aos ácidos orgânicos CH2 e coo- CH2 COO- Discriminação de amostras Linden das outras classes, vibração de flexão CH2 e vibrações do grupo COO H-C, OH e NH3, esses alongamentos são devidos principalmente a carboidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos livres e fenólicos Estiramento O-H Estiramento OH Modos vibracionais esqueléticos C - C - O e C - C - C, C - O e C - C Modos vibracionais esqueléticos, nomeadamente C-C-O e C-CC, C-O e CC Modos vibracionais esqueléticos dominantes δ (C - C - C), δ (C - C - O), δ (C - O) e τ (C - C) δ (C2 - C1 - O1) vibração de flexão de α- glicose Glicose Anel δ (CCO) no anel piranóide Frutose Deformação C - C - O e C - C - C δ(C2-C1-O1) vibração de flexão β- glicose Glicose forte vibração esquelética δ(C-2-C-1-O-1) flexão β da glicose Deformação C - C - O e C - C - C Deformações do anel e Deformação C - C - O e C - C - C

521	Deformação de C-C-O e C-C-C	Anjos, et al., 2018
523	vibração esquelética de glicose	Salvador et al., 2]019
544	v(C-C) vibração da frutofuranose	Salvador et al., 2019
625	Deformações do anel e deformação C – C – O e C – C – C	Anjos et al., 2021.
626	Deformações do anel	Anjos, et al., 2018
629	Deformação do anel de frutose	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
630	Deformação do anel da frutose	Salvador et al., 2019
631	Deformação do anel	Salvador et al., 2019
705	Estiramento de C-O e C-C-O, dobra OCO	Anios. et al., 2018
706	Estiramento C – O e vibrações de flexão C – C – O e O – C – O da glicose	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
707	estiramento de C – O e C – C – O, flexão O – C – O	Anjos et al., 2021.
744	v (C-C) da frutopiranose	Salvador et al., 2019
776	Estiramento C – C e vibrações C – H presentes na glicose	Anjos, et al., 2018
776	Estiramento C – C e vibrações C – H presentes na glicose	Anjos et al., 2021.
800	v(C-C) vibração da frutofuranose	Salvador et al., 2019
817	Estiramento CC de frutose.	Salvador et al., 2019
822	Sacarose	Salvador et al., 2019
820-950	(CO), δ (C-C-H), v (C-C) e δ (C-C-O) vibrações de glicose e frutose	Salvador et al., 2019
824	Vibrações C – H e CH2 e flexão C – O – H da frutose	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
825	Deformação CH e CH2 e flexão C-O-H	Anjos, et al., 2018
825	C – H e CH2	Anjos et al., 2021.
826	Estiramento de CC no anel piranóide	Salvador et al., 2019
834	Sacarose	Salvador et al., 2019
836	Estiramento v (C-C)	Salvador et al., 2019
862	Estiramento CC de frutose.	Salvador et al., 2019

867	Deformação CH e CH2 e flexão C-O-H	Anjos, et al., 2018
871	Vibrações C – H e CH2 e flexão C – O – H da frutose	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
874	Frutose, estiramento de CC nos anéis furanóides	Salvador et al., 2019
915	CH e C-O-H	Anjos, et al., 2018
016	C – H e C – O – H e devido à vibração nos dois anômeros de frutose e	Apies et al. 2021
910		Anjos et al., 2021.
979	Fiulose e gilcose	Anjos, et al., 2018
979	glicose	Anjos et al., 2021.
1069-1064	Estiramento de CO	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
	Carboidratos, flexão de C – H e C – O – H, bem como com uma pequena	
1,072	contribuição da vibração de proteínas e aminoácidos das ligações C – N	Anjos, et al., 2018
1074-1080	Estiramento de C – C e C – O	Anjos et al., 2021.
1124-1126	Estiramento CO	Anjos et al., 2021.
	Sobreposição de vibrações v (C – O) e δ (C – O – H) de carboidratos, v (C –	
1125	N) de proteínas e aminoácidos	Anjos, et al., 2018
	υ (C – O) e υ (C – O – C) em carboidratos e υ (C – N) de proteínas e	
1126	aminoácidos	Salvador et al., 2019
1127	Deformação C – OH da glicose e sacarose	Salvador et al., 2019
1540–1175	Deformações de O-H, C-O, C-H e C-C. Além disso, a mesma região espectral corresponde a flavonol e fenol	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
1264	C (6) –OH e C (1) –OH	Salvador et al., 2019
1,265	C – O – H, C – C – H e O – C – H, e flexão de C – H e O – H	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
1265-1267	Estiramento COH, AMIDA III	Anjos et al., 2021.
1266	υ (C – O – H), υ (amida III)	Anjos, et al., 2018
1365	Deformação simétrica de CH2	Salvador et al., 2019

1,367	Flexão do grupo CH2	Anjos, et al., 2018
1368	Flexão CH e OH da sacarose	Anjos et al., 2021.
1370-141	Tesouramento de CH 2, deformação C – H e C – O – H	Salvador et al., 2019
1374	Flexão H e OH	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
1460	Flexão CH2	Salvador et al., 2019
1460-1461	Flexão e alongamento de CH 2 e COO- Flavonóis e ácidos orgânicos	Anjos, et al., 2018
1,461	COO-	Aykas, D.P.; Shotts; Rodriguez- Saona, 2020
1462	Flexão CH 2	Anjos et al., 2021.

REFERÊNCIAS

ANGUEBES-FRANSESCHI, F.; ABATAL, M.; PAT, L.; FLORES, A.; CÓRDOVA QUIROZ, A. V.; RAMÍREZ-ELIAS, M. A.; SAN PEDRO, L.; MAY TZUC, O.; BASSAM, A. Raman spectroscopy and chemometric modeling to predict physical-chemical honey properties from Campeche, Mexico. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4091, 2019.

ANJOS, O.; SANTOS, A. J.; PAIXÃO, V.; ESTEVINHO, L. M. Physicochemical characterization of Lavandula spp. honey with FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 178, p. 43-48, 2018.

ANJOS, O.; GUINÉ R. P.; SANTOS, A. J.; PAULA, V. B.; PEREIRA, H.; ESTEVINHO, L. M. Evaluation of FT-Raman and FTIR-ATR spectroscopy for the quality evaluation of Lavandula spp. Honey. **Open Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 47-56, 2021.

AYKAS, D.P.; SHOTTS, M.L.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E., 2020. Authentication of commercial honeys based on Raman fingerprinting and pattern recognition analysis. **Food Control**, v. 117, p. 107346, 2020.

BALLABIO, D.; ROBOTTI, E.; GRISONI, F.; QUASSO, F.; BOBBA, M.; VERCELLI, S.; GOSETTI, F.; CALABRESE, G.; SANGIORGI, E.; ORLANDI, M.; MARENGO, E. Chemical profiling and multivariate data fusion methods for the identification of the botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 266, p. 79-89, 2018.

BATSOULIS, A. N.; SIATIS, N. G.; KIMBARIS, A. C.; ALISSANDRAKIS, E. K.; PAPPAS, C. S.; TARANTILIS, P. A.; HARIZANIS, P.C.; POLISSIOU, M.G. FT-Raman spectroscopic simultaneous determination of fructose and glucose in honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 207-210, 2005.

CHERIGUI, S.; DERGAL, F.; CHIKHI, I.; CHAKER, H.; CHABANE, N. Detection of Algerian Honey Adulteration by Raman Spectroscopy and Chemometrics Methods. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 88, n. 3, p. 231-242, 2023.

CIACCHERI, L.; MIGNANI, A. G.; MENCAGLIA, A. A.; DI SANZO, R.; CARABETTA, S.; RUSSO, M. T. Nondestructive and rapid authentication of honey using dispersive raman spectroscopy. In: **2015 XVIII AISEM Annual Conference**. IEEE, 2015. p. 1-4.

CORVUCCI, F.; NOBILI, L.; MELUCCI, D.; GRILLENZONI, F. V. The discrimination of honey origin using melissopalynology and Raman spectroscopy techniques coupled with multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 169, p. 297-304, 2015.

DE OLIVEIRA, L. F.C.; COLOMBARA, R.; EDWARDS, H. G.M. Fourier transform Raman spectroscopy of honey. **Applied Spectroscopy**, v. 56, n. 3, p. 306-311, 2002.

FRAUSTO-REYES, C.; CASILLAS-PEÑUELAS, R.; QUINTANAR-STEPHANO, J. L.; MACÍAS-LÓPEZ, E.; BUJDUD-PÉREZ, J. M.; MEDINA-RAMÍREZ, I. Spectroscopic study of honey from Apis mellifera from different regions in Mexico. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 178, p. 212-217, 2017.

GRAZIA MIGNANI, A.; CIACCHERI, L.; MENCAGLIA, A. A.; DI SANZO, R.; CARABETTA, S.; RUSSO, M. Dispersive raman spectroscopy for the nondestructive

and rapid assessment of the quality of southern Italian honey types. Journal of Lightwave Technology, v. 34, n. 19, p. 4479-4485, 2016.

HU, S.; LI, H. CHEN, C. CHEN, C.; ZHAO, D.; DONG, B.; LV, X.; ZHANG, K.; XIE, Y. Raman spectroscopy combined with machine learning algorithms to detect adulterated Suichang native honey. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 3456, 2022

HUZORTEY, A. A.; AREFI, A.; ANDERSON, B.; KHADEM, H.; SACKEY, S. S.; MAHMOODI-KHALEDI, E. TAVASSOLI, S. H. 532-nm Laser-Excited Raman Spectroscopic Evaluation of Iranian Honey. **Food Analytical Methods**, v. 15, n. 3, p. 772-782, 2022.

ISSAAD, F. Z.; BOUHEDJAR, K.; IKHLEF, A.; LACHLAH, H.; SMAIN, D. H.; BOUTAGHANE, K.; BENSOUICI, C. Multivariate analysis of physico-chemical, bioactive, microbial and spectral data characterisation of Algerian honey. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 4, p. 3634-3648, 2021.

KIZIL, R.; IRUDAYARAJ, J. Rapid evaluation and discrimination of γ-irradiated carbohydrates using FT-Raman spectroscopy and canonical discriminant analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 7, p. 1244-1251, 2007.

LI, S.; SHAN, Y.; ZHU, X.; ZHANG, X.; LING, G. Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 1, p. 69-74, 2012.

LI, Y.; HUANG, Y.; XIA, J.; XIONG, Y.; MIN, S. Quantitative analysis of honey adulteration by spectrum analysis combined with several high-level data fusion strategies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 108, p. 103060, 2020.

MAGDAS, D. A.; GUYON, F.; BERGHIAN-GROSAN, C.; MOLNAR, C. M. Challenges and a step forward in honey classification based on Raman spectroscopy. **Food Control**, v. 123, p. 107769, 2021.

MAGDAS, D. A.; BERGHIAN-GROSAN, C. Botanical honey recognition and quantitative mixture detection based on Raman spectroscopy and machine learning. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 293, p. 122433, 2023.

MIGNANI, A. G., CIACCHERI, L.; MENCAGLIA, A. A.; DI SANZO, R.; CARABETTA, S.; RUSSO, M. T. Dispersive Raman spectroscopy excited at 1064nm to classify the botanic origin of honeys from Calabria and quantify the sugar profile. In: **Advanced Environmental, Chemical, and Biological Sensing Technologies XII**. SPIE, 2015. p. 25-32.

MILLIGAN, Kirsty et al. Reconstruction of Raman Spectra of Biochemical Mixtures Using Group and Basis Restricted Non-Negative Matrix Factorization. **Applied Spectroscopy**, v. 77, n. 7, p. 698-709, 2023.

MOLNAR, C.; BERGHIAN-GROSAN, C.; MAGDAS, D. A. An optimized green preparation method for the successful application of Raman spectroscopy in honey studies. **Talanta**, v. 208, p. 120432, 2020.

OROIAN, M.; ROPCIUC, S. Botanical authentication of honeys based on Raman spectra. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, p. 545-554, 2018.

OROIAN, M.; ROPCIUC, S.; PADURET, S. Honey adulteration detection using Raman spectroscopy. **Food analytical methods**, v. 11, p. 959-968, 2018.

ÖZBALCI, B.; BOYACI, İ. H.; TOPCU, A.; KADILAR, C.; TAMER, U. Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks. **Food chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1444-1452, 2013.

PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. **Food chemistry**, v. 76, n. 2, p. 231-239, 2002.

ROBERT, I.O.; BIRECH, Z.; KANIU, M. I. Rapid Assessment of Molasses Adulterated Honey Using Laser Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis. **Food Analytical Methods**, v. 16, n. 11, p. 1702-1710, 2023.

SAHLAN, M.; AHLAM; N. A. L.; AGUS, A.; SABIR, A. R. D. O.; PRATAMI, D. K. IDENTIFICATION and Authentication of Honey Using Chemometric Analysis Based on ATR-FTIR and Raman Spectroscopy. **Int. J. Appl. Pharm**, v. 14, p. 36-44, 2022.

SALVADOR, L., GUIJARRO, M., RUBIO, D., AUCATOMA, B., GUILLÉN, T., VARGAS JENTZSCH, P., CIOBOTĂ, V.; STOLKER, L.; ULIC, S.; VÁSQUEZ, L.; GARRIDO, P.; BRAVO, J.; RAMOS GUERRERO, L. Exploratory monitoring of the quality and authenticity of commercial honey in Ecuador. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 105, 2019.

ŠUGAR, J.; BOUŘ, P. Quantitative analysis of sugar composition in honey using 532nm excitation Raman and Raman optical activity spectra. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 47, n. 11, p. 1298-1303, 2016.

TAHIR, H. E.; XIAOBO, Z.; ZHIHUA, L.; JIYONG, S.; ZHAI, X.; WANG, S.; MARIOD, A. A. Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 226, p. 202-211, 2017.

WU, X.; XU, B.; MA, R.; NIU, Y.; GAO, S.; LIU, H.; ZHANG, Y. Identification and quantification of adulterated honey by Raman spectroscopy combined with convolutional neural network and chemometrics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 274, p. 121133, 2022.

WU, X.; XU, B.; LUO, H.; MA; R.; DU, Z.; ZHANG, X.; LIU, H.; ZHANG, Y. Adulteration quantification of cheap honey in high-quality Manuka honey by two-dimensional correlation spectroscopy combined with deep learning. **Food Control**, v. 154, p. 110010, 2023.

XAGORARIS, M.; LAZAROU, E.; KAPARAKOU, E. H.; ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C. S. Botanical origin discrimination of Greek honeys:

Physicochemical parameters versus Raman spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 8, p. 3319-3327, 2021.

REFERÊNCIAS GERAIS

AL NAGGAR, Y. Sublethal effects of chronic exposure to CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture on the honey bee (*Apis millefera* L.). Environmental Science and Pollution Research, v. 27, p. 19004-19015, 2020.

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische zeitschrift,** v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013

ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. D. A. Espectro polínico de amostras de mel de *Melipona mandacaia Smith*, 1863 (Hymenoptera: Apidae). Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 28, n. 1, p. 65-70, 2006.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. D.; SOUZA, R. B. D.; SANTOS, S. A. D.; ANDRADE, D. R. D. OS radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, p. 60-68, 2005.

ANJOS, O.; SANTOS, A.J.A.; PAIXÃO, V.; ESTEVINHO, L.M. Physicochemical characterization of Lavandula spp. honey with FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, v. 178, p. 43-48, 2018.

ANTONGIOVANNI, M.; VENTICINQUE, E. M.; MATSUMOTO, M.; FONSECA, C.R. Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. **Journal of Applied Ecology**, v. 57, n. 10, p. 2064–2074, 2020.

ANTONGIOVANNI, M.; VENTICINQUE, E. M.; TAMBOSI, L. R.; MATSUMOTO, M.; METZGER, J. P.; FONSECA, C. R. Restoration priorities for Caatinga dry forests: Landscape resilience, connectivity and biodiversity value. **Journal of Applied Ecology**, v. 59, n. 9, p. 2287–2298, 2022.

Ascher, J & J Pickering, 2024. Discover Life bee species guide and world checklist. Disponível em: https://www.discoverlife.org/.

ÁVILA, S., BEUX, M. R., RIBANI, R. H., ZAMBIAZI, R. C. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, p. 37–50, 2018.

ÁVILA, S., HORNUNG, P. S., TEIXEIRA, G. L., MALUNGA, L. N., APEA-BAH, F. B., BEUX, M. R., BETA, T., RIBANI, R. H. Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International**, v. 123, p. 1– 10, 2019.

AYOUB, L. et al. Exposure to organophosphate insecticides induces behavioral changes and acetylcholinesterase inhibition in Apis mellifera. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 287, p. 117279, 2024.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; CARVALHO, G. A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L. P. Development of biomarkers of

exposure to xenobiotics in the honey bee Apis mellifera: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 22–31, 2012.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006

BATISTON, T. F. T. P.; FRIGO, A.; STEFANI, L. M.; SILVA, A. S. Da; ARAUJO, D. N. Physicochemical composition and antimicrobial potential of stingless honey: a food of differentiated quality. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e7099108223–e7099108223, 2020. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8223. Acesso em: 07 jul. 2023.

BEKKERS, E.; BROCKMEIER, M.; FRANCOIS, J.; YANG, F. Local food prices and international Price transmission. **World Development**, v. 96, p. 216–230, 2017.

BENITO-MURCIA, M. Biomarker responses and lethal dietary doses of taufluvalinate and coumaphos in honey bees: Implications for chronic acaricide toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 105, p. 104330, 2024.

BPBES/REBIPP. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. 1ª edição, São Carlos, SP: Editora Cubo, 2019. 184 páginas.

CALIANI, I.; CAMPANI, T.; CONTI, B.; COSCI, F.; BEDINI, S.; D'AGOSTINO, A.; AMMENDOLA, A.; DI NOI, A.; GORI, A.; CASINI, S. Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of different contaminants on the ecotoxicological status of Apis mellifera. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111486, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111486>

CALIANI, I. First application of an Integrated Biological Response index to assess the ecotoxicological status of honeybees from rural and urban areas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 47418-47428, 2021.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637S-646S, 2000.

CARDOSO, P.; BARTON, P. S.; BIRKHOFER, K.; CHICHORRO, F.; DEACON, C.; FARTMANN, T.; FUKUSHIMA, C. S.; GAIGHER, R.; HABEL, J. C.; HALLMANN, C. A.; HILL, M. J.; HOCHKIRCH, A.; KWAK, M. L.; MAMMOLA, S.; ARI NORIEGA, J.; ORFINGER, A. B.; PEDRAZA, F.; PRYKE, J. S.; ROQUE, F. O.; SETTELE, J.; SIMAIKA, J. P.; STORK, N. E.; SUHLING, F.; VORSTER, C.; SAMWAYS, M. J. Scientists' warning to humanity on insect extinctions. **Biological Conservation**, v. 242, 2020. CARDOSO, P.; BARTON, P. S.; BIRKHOFER, K.; CHICHORRO, F.; DEACON, C.; FARTMANN, T.; FUKUSHIMA, C. S.; GAIGHER, R.; HABEL, J. C.; HALLMANN, C. A.; HILL, M. J.; HOCHKIRCH, A.; KWAK, M. L.; MAMMOLA, S.; ARI NORIEGA, J.; CLAIRBORNE, A. Assay of catalase. **Handbook of Methods of Oxygen Free Radical Research**, p. 283-284, 1985.

CARNEIRO NETO, T. F. DE S.; OLIVEIRA-REBOUÇAS, P. L.; PEREIRA, J. E.; DUARTE, P. M.; SANTOS, M. H. L. C.; SILVA, G. C. DA.; SIQUEIRA, K. M. M. DE. Spectrum of pollen stored by *Melipona mandacaia* (Smith, 1863) (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) in an urban arid landscape. **Sociobiology**, v. 64, n. 3, p. 284– 291, 2017.

CARVALHO, S. M.; BELZUNCES, L. P.; CARVALHO, G. A.; BRUNET, J. L.; BADIOU-BENETEAU, A. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 2117–2124, 2013.

CARR, S. M. Multiple mitogenomes indicate things fall apart with Out of Africa or Asia hypotheses for the phylogeographic evolution of honey bees (Apis mellifera). **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 9386, 2023.

CATTANI, D.; CAVALLI, V. L. D. L. O.; RIEG, C. E. H.; DOMINGUES, J. T.; DAL-CIM, T.; TASCA, C. I.; SILVA, F.R.M.B.; ZAMONER, A.Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 34-45, 2014.

CHAKRABARTI, P. et al. Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. **Apidologie**, v. 46, p. 107-129, 2015.

CHAM, K. O.; NOCELLI, R. C. F.; ROBERTA C.F.; BORGES, L. O.; VIANA-SILVA, F. E. C.; TONELLI, C. A. M.; MALASPINA, O.; MENEZES, C.; ROSA-FONTANA, A. S.; BLOCHTEIN, B.; FREITAS, B. M. Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. **Environmental Entomology**. Entomological Society of America, 2019.

DROY-LEFAIX, M.T..; FERRADINI, C.; GARDÈS-ALBERT, M. Les Radicaux libres: en 10 questions. lpsen, 1991.

EMBRAPA. Dados Agrometerológicos do Vale do São Francisco. Disponível em: https://www.embrapa.br/dados-agrometeorologicos-do-vale-do-sao-francisco. Accesso em: 1 mai. 2023.

EUROPEAN COMMISSION. Agri-Food Trade Statistical Factsheet European Union – Brazil. 2022. Disponível em: https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2023-05/agrifood-brazil_en.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2023.

FAY, E. F.; SILVA, CMM de S.; DE MELO, I. S. Degradação abiótica de xenobióticos. 2008.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

GAUTHIER, M. et al. Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16274, 2018.

GEKIÈRE, A.; VANDERPLANCK, M.; MICHEZ, D. Trace metals with heavy consequences on bees: A comprehensive review. **Science of the Total Environment**, p. 165084, 2023.

GRÜTER, C. **Stingless Bees: Evolution and diversity of stingless bees**. 1 ed. [S.I.]: Springer Cham. 2020. 385 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, USA, 2015.

HAN, W.; YANG, Y.; GAO, J.; ZHAO, D.; REN, C.; WANG, S.; ZHAO, S.; ZHONG, Y. Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 4, p. 399–411, 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10646-019-02030-4

HILL, R.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G.; BUCHORI, D.; LEBUHN, G.; MAUÉS, M. M.; PERT, P. L.; KWAPONG, P. K.; SAEED, S.; BRESLOW, S. J.; CUNHA, M. C., DICKS, L. V.; GALETTO, L.; GIKUNGU, N.; HOWLETT, B. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; LYVER, P. O'B.; MARTÍN-LÓPEZ, B.; OTEROS-ROZA, E.; POTTS, S.G.; ROUÉ, M. Biocultural approaches to pollinator conservation. **Nature Sustainability**, v. 2, n. 3, p. 214–222, 2019.

HISAMOTO, S. et al. The impact of landscape structure on pesticide exposure to honey bees. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 8999, 2024.

JAFFÉ, R.; POPE, N.; TORRES CARVALHO, A.; MADUREIRA MAIA, U.; BLOCHTEIN, B.;0 DE CARVALHO, C.A.; CARVALHO-ZILSE G.A.; FREITAS, B.M.; MENEZES, C.; RIBEIRO, M. D. F.; VENTURIERI, G.C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

KINNULA, V.L. Production and degradation of oxygen metabolites during inflammatory states in the human lung. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 4, p. 465-470, 2005.

KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. O. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2013.

LA PORTA, G.; MAGARA, G.; GORETTI, E.; CALDARONI, B.; DÖRR, A.J.M.; SELVAGGI, R.; PALLOTTINI, M.; GARDI, T.; CENCI-GOGA, B.T.; CAPPELLETTI, D.; ELIA, A.C. Applying Artificial Neural Networks to Oxidative Stress Biomarkers in Forager Honeybees (*Apis mellifera*) for Ecological Assessment. *Toxics*, *11*, 661, 2023.

LI, J.; LI, M.; HE, M.; ZHAO, X.; CHAIMANEE, V.; HUANG, W.; NIE, H.; ZHAO, Y.; SU, S. Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honeybees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 1-8, 2017.

Li, J.; Zhao, L.; QI, S.; ZHAO, W.; XUE, X.; WU, L.; HUANG, S. Sublethal effects of Isoclast[™] Active (50% sulfoxaflor water dispersible granules) on larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 220, p. 112379, 2021.

LI, Zhongyu et al. Toxic effects of the heavy metal Cd on *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae): Oxidative stress, immune disorders and disturbance of gut microbiota. **Science of The Total Environment**, v. 912, p. 169318, 2024.

LUPI, D.; MESIANO, M. P.; ADANI, A.; BENOCCI, R.; GIACCHINI, R.; PARENTI, P.; ZAMBON, G.; LAVAZZA, A.; BONIOTTI, M. B.; BASSI, S.; COLOMBO, M.; TREMOLADA, P. Combined effects of pesticides and electromagnetic-fields on honeybees: Multi-stress exposure. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 1–32, 2021.

LV, Lu et al. Mixture toxic effects of thiacloprid and cyproconazole on honey bees (*Apis mellifera* L.). Science of the Total Environment, v. 870, p. 161700, 2023.

MACKEI, M. et al. Unraveling the acute sublethal effects of acetamiprid on honey bee neurological redox equilibrium. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 27514, 2024.

MAPBIOMAS. Relatório Anual do Desmatamento no Brasil 2020. São Paulo, Brasil: MapBiomas, 2021. 93 p. Disponível em: http://alerta.mapbiomas.org. Acesso em: 11 mai. 2023

MAPBIOMAS. Relatório anual do desmatamento no Brasil 2021. São Paulo, Brasil: MapBiomas, 2022. 1126 p. Disponível em: http://alerta.mapbiomas.org. Acesso em: 11 mai. 2023.

MELÉNDEZ RAMÍREZ, V.; AYALA, R.; DELFÍN GONZÁLEZ, H. Crop pollination by stingless bees. Em: Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology. [s.l.] Springer International Publishing, 2018.

MELO, J. D. O.; DANTAS-MEDEIROS; R., MOREIRA, L. G. L.; GIORDANI, R. B.; ZUCOLOTTO, S. M. A Caatinga: Um bioma exclusivamente brasileiro. **Ciência e Cultura**, v. 75, n. 4, p. 01-09, 2023.

MENA, F. et al. Comparison of the Sensitivity of *Tetragonisca angustula* (Apidae-Meliponini) and *Apis mellifera* (Apidae-Apini) to Three Insecticides (Malathion,

Imidacloprid, and Fipronil) Used in Costa Rica. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1022-1031, 2023.

MURPHY, J. T.; TOM D. BREEZE, T. D.; WILLCOX, B.; KAVANAGH, S.; STOUT, J.C. Globalisation and pollinators: Pollinator declines are an economic threat to global food systems. **People and Nature**, v. 4, n. 3, p. 773–785, 2022.

NIKOLIĆ, T. V. et al. The impact of sublethal concentrations of Cu, Pb and Cd on honey bee redox status, superoxide dismutase and catalase in laboratory conditions. **Chemosphere**, v. 164, p. 98-105, 2016.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321–326, 2011.

OLLERTON, J. Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 48, p. 353–76, 2017.

OLSZEWER, E. Radicais livres em medicina. In: **Radicais livres em medicina**. 1995. p. 204-204.

PERES, W. Radicais Livres em nïveis biológicos. **Pelotas: Ed. Universidade Católica de Pelotas**, p. 49-81, 1994.

POTTS, S. G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human wellbeing. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220-229, 2016.

RAO, P. V.; KRISHNAN, K. T.; SALLEH, N.; GAN, S. H. Biological and therapeutic effects of honey produced by honeybees and stingless bees: A comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 1–8, 2016.

RIBEIRO, M. F.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; MEIRELLES, R. N. Apicultura e meliponicultura. In: MELO; R. F.; VOLTOLINI, T. F. Agricultura familiar. Braslilia, 2019, p. 333-362.

ROBERT, I.O; BIRECH, Z.; KANIU, M. I. Rapid Assessment of Molasses Adulterated Honey Using Laser Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis. **Food Analytical Methods**, v. 16, n. 11, p. 1702-1710, 2023.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 111-127, 2007

ROUBIK, D. W.; DAVID W.; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners. 1 ed. Roma: FAO, 2018. 324 p.

ROUBIK, D. W. Bees, Ecological Roles Bees: Ecological Roles. In: Encyclopedia of social insects. [s.l.] Springer International Publishing, 2020. p. 1–6.

ROUBIK, D.W. Stingless bee (Apidae: Apinae: Meliponini) ecology. **Annual Review** of Entomology, v. 68, n. 1, p. 231-256, 2023.

ROVER-JÚNIOR, L. HÖEHR. N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova,** v. 24, n. 1. P. 112-119, 2001.

SA, I. B.; SILVA, P. C. G. da. **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010.

SILVA, A.A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, p. 994-1002, 2010.

SILVA, A. C.; BRITO, M. G. A.; ROCHA, G. M. M.; SILVA, M. A.; OLIVEIRA, G. A. L. Propriedade antimicrobiana e perfil de toxicidade de méis de abelhas sem ferrão do gênero Melipona Illiger, 1806: Uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e13510413903-e13510413903, 2021.Disponível em: < https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13903>. Acesso em: 07 jul. 2023.

SILVA, F. D. S.; CARVALHEIRO, L. G.; AGUIRRE-GUTIÉRREZ, J.; LUCOTTE, M.; GUIDONI-MARTINS, K.; MERTENS, F. Virtual pollination trade uncovers global dependence on biodiversity of developing countries. **Science Advances**, v. 7, n. 11, 2021.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte. Min. Meio Ambiente/Fund. Araraucária. 2002. p. 253.

SOUZA, E. C. A.; MENEZES, C.; FLACH, A. Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A review of quality control, chemical profile, and biological potential. **Apidologie**, v. 52, 2021.

SPONSLER, D. B.; GROZINGER, C. M.; HITAJ, C.; RUNDLÖF, M.; BOTÍAS, C.; CODE, A.; LONSDORF, E. V.; MELATHOPOULOS, A. P.; SMITH, D. J.; SURYANARAYANAN, S.; THOGMARTIN, W. E.; WILLIAMS, N. M.; ZHANG, M. DOUGLAS, M. R. Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis. **Science of The Total Environment**, v. 662, p.1012-1027, 2019.

SU, L.J.; ZHANG, J.H.; GOMEZ,H.; MURUGAN, R.; HONG,X.; XU, D.; JIANG, F.; PENG, Z.Y. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, n. 1, p. 5080843, 2019.

SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE. Resolução CONDEL/SUDENE Nº 150, de 13 De dezembro De 2021. Diário Oficial da União: Sessão 1, Brasília, DF, n. 256, p.52, 13 de dezembro de 2021.

TAN, S. et al. Effects of glyphosate exposure on honeybees. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 90, p. 103792, 2022.

TEIXEIRA, J. C.; HUBER, C; D. The inflated significance of neutral genetic diversity in conservation genetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 10, p. e2015096118, 2021.

VALVERDE, S., ARES, A. M.; ELMORE, J. S.; BERNAL, J. Recent trends in the analysis of honey constituents. **Food Chemistry**, v. 387, p. 132920, 2022.