

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FERNANDO DA CUNHA

**MEL DE *Apis mellifera* COMO BIOINDICADOR DE RESÍDUOS DE
PESTICIDAS.**

Marechal Cândido Rondon - PR

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FERNANDO DA CUNHA

MEL DE *Apis mellifera* COMO BIOINDICADOR DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição Animal, para obtenção do título de “Mestre em Zootecnia”.

Orientador: Prof^a. Dra. Regina Conceição Garcia
Co-orientador: Prof. Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira.

Marechal Cândido Rondon - PR

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE,
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

FERNANDO DA CUNHA

**MEL DE *Apis mellifera* COMO BIOINDICADOR DE RESÍDUOS DE
PESTICIDAS.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição Animal, para a obtenção do título de “Mestre em Zootecnia”.

Marechal Cândido Rondon, _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Regina Conceição Garcia

Professora Dra. Silvia Renata Machado Coelho

Professora Dra. Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto

Professor Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira

Aos meus pais

Milton Paulo da Cunha e Edla da Cunha,

*Pelo Amparo e motivação, indispensáveis à minha
vida;*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Sou grato a todos que fizeram parte dessa importante fase de minha vida, podem estar certos que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Agradeço a Professora Dra. Regina Conceição Garcia pela sua dedicação, amizade e pela orientação deste trabalho e, por meio dela, eu me reporto a toda a comunidade da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – (UNIOESTE) e Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelo apoio incondicional.

Agradeço em especial aos professores Dra. Silvia Renata Coelho, Dr. Newton Tavares Escocard de Oliveira e meu grande amigo Dr. Emerson Dechechi Chambó pelos momentos de aprendizado, orientações, sugestões e apoio em cada etapa deste trabalho.

Agradeço a CAPES, pelo apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, pela concessão da bolsa de mestrado que me possibilitou a realização do curso.

Agradeço ao Técnico de laboratório Alceu Hartleben pela ajuda incondicional nos momentos de coleta e ajuda de campo, em nome deste, externo à todos os professores e funcionários do Curso de Zootecnia e Centro de Ciências Agrárias da UNIOESTE meus agradecimentos.

Agradeço a parceria estabelecida entre a Universidade e a COOFAMEL, representada pelo Sr. Pedro da Silva, possibilitando com que este trabalho fosse realizado.

A todos os colegas de trabalho gostaria de externar minha satisfação de poder dividir o conhecimento e desenvolver diferentes estudos na área.

Agradeço a Simone Camargo, Larissa Malmann e Marcia Pauli pelo auxílio e dedicação ao trabalho. Aos colegas de laboratório, pela ajuda e parceria nas análises e tabulação de dados.

Agradeço aos professores da banca examinadora, pela atenção e contribuição dedicadas a este trabalho.

Gostaria de deixar registrado também, o meu reconhecimento à minha família, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio. E por último, e nem por isso menos importante, agradeço a minha querida companheira Rosana Martins Galvani, que esteve comigo desde o princípio desta etapa.

Sumário

RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivo específicos	10
3 Revisão de Literatura	11
3.1 Mel: Características e produção	11
3.2 Desordem do colapso da colônia (CCD).	12
3.3 Contaminação do mel por agrotóxicos	13
3.4 Pesticidas	17
3.5 Cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Informações geográficas e montagem do experimento	21
4.2 Coleta e extração do mel	25
4.3 Concentração e extração dos analitos	25
4.4 Preparo das soluções e análise cromatográficas	26
4.5 Seleção dos pesticidas	28
4.6 Análises estatísticas	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	44
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
8 REFERÊNCIAS	47

RESUMO

O efeito direto e indireto dos agrotóxicos utilizados na agricultura tem sido, cada vez mais, alvo de estudo nos diferentes ambientes e organismos vivos com os quais têm contato. As abelhas *Apis mellifera* são insetos que estão diretamente relacionadas aos ambientes naturais, produzindo o mel com características específicas dessa relação com os vegetais, nos quais buscam alimento. A legislação brasileira pouco se refere à concentração de pesticidas nos alimentos, e o mel apresenta especificações de limites máximos de resíduos de poucos princípios ativos utilizados na agricultura. Assim, buscou-se identificar os pesticidas presentes no mel de *Apis mellifera* e relacionar os agrotóxicos encontrados às possíveis fontes de contaminação, utilizando o mel como bioindicador ambiental. Foram utilizados padrões de pesticidas organoclorados e organofosforados, recuperados nas amostras e validados, a identificação dos pesticidas no mel foi realizada por meio das análises cromatográficas, em 86 amostras coletadas de 15 apiários e em duas épocas diferentes. Esses apiários foram georreferenciados e a partir das imagens foi estimado o uso e ocupação do solo, onde em média, o uso do solo por área agrícola correspondente a 58,92%, área de mata (22,08%), área de água (9,52%) e área com edificações (6,04%). No entanto, não houve efeito significativo de área sobre a porcentagem de contaminação das amostras. No período de setembro a novembro de 2013, 26,66% das amostras foram contaminadas, e no período de dezembro a janeiro de 2014, 8,88%. Houve efeito significativo de época ($p < 0,05$) sobre o Fenclorfós, Chlorpirifós, Mitotane e Bicyclo, tendo maior ocorrência e concentração de setembro a novembro de 2013. Com relação aos pesticidas com limites de resíduos fora da legislação, não houve efeito significativo de época ($p > 0,05$) sobre a ocorrência de amostras contaminadas com Paration Metílico, Chlorpirifós e DDE. Paration Metílico e Chlorpirifós foram encontrados acima do preconizado pela legislação em ambas as épocas de estudo, revelando o uso indevido destes compostos para as culturas e possivelmente o número excessivo de aplicações para o controle de pragas agrícolas. Contudo, o mel de *Apis mellifera* se mostrou um bioindicador eficiente de resíduos empregados nas culturas agrônômicas de entorno dos apiários da pesquisa entre setembro de 2013 e janeiro de 2014, reforçando a importância destes insetos polinizadores para a avaliação da qualidade ambiental.

Palavras chave: abelhas, rastreabilidade ambiental, cromatografia.

ABSTRACT

CUNHA, F. Pesticides residues in honey of *Apis mellifera* as quality bioindicator. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE.

The direct and indirect effects of agricultural pesticides has been the focus of increasing numbers of studies by different entities and in different locations. The *Apis mellifera* bee is an insect that are part of the natural environment, producing honey from its interaction with vegetation. Brazilian legislation seldom refers to the concentration of pesticides in food, and honey, a product produced by bees, has had few cases of contamination by pesticides used for the control of pests in agriculture. The maximum pesticide residue limit (MRLs) established in legislation principally relate to those products used in large-scale crop production. Organophosphate and organochloride standards were used on samples and validated. In this way the identification of pesticide residues in honey generated by bees acquired in native trees and planted cultures in a 1,500m radius of the hives, by way of chromatography (CGMS), was estimated over two seasons in fifteen apiaries in the city of Santa Helena-PR. On average, the areas utilised for the study corresponded to 58.92% under agricultural production, 22.08% in native forest, 9.52% in water, and 6.04% in buildings and dwellings. There was however no significant effect in the study area on the percentage of contamination in the samples. In september to november of 2013, 26.66% of the samples were contaminated. In december to january of 2014 the figure was 8.88%. There was significant effect in the period ($p < 0.05$) on the Fenclorfós, Chloropyrifos, Mitotane and Bicylo, with a greater occurrence and concentration in september to november of 2013. Those pesticides with residue limits outside of the legislation, did not have significant effect in the period ($p > 0.05$) on the occurrence of contaminated samples with Parathion Methyl, Chloropyrifos, and DDE. Parathion Methyl and Chloropyrifos were found at levels above those specified in the legislation in both periods of the study. This would suggest the overuse of these pesticides at above recommended levels by agricultural producers to control pests. In conclusion, the *Apis mellifera* bees were efficient in the detection of pesticide residues in honey, that were used in agricultural production near the apiaries between September 2013 and December 2014. This reinforces the potential of these insects as bioindicators of environmental quality.

Keywords: honey bees, environmental traceability, chromatography.

1 INTRODUÇÃO

O mel é um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, formado a partir da modificação do néctar recolhido das flores, secreções de partes vivas das plantas ou excreções de insetos sugadores, processado por enzimas digestivas e armazenado nos favos para servir de alimento em épocas de escassez (BRASIL, 2000). De acordo Kujawski e Namiesnik (2008), é uma solução aquosa de açúcares concentrados e higroscópica, constituída também por proteína, compostos fenólicos, aminoácidos livres, vitaminas e minerais em menores proporções (SILVA et al., 2009). As características organolépticas deste produto, como aroma, paladar, viscosidade e propriedades medicinais estão diretamente relacionadas à fonte floral, época de produção e à espécie que a originou. (MARCHINNI, 2001; HERRERA et al., 2005; RISSATO et al., 2006; SEBRAE, 2009; SOUZA et al. 2013).

As abelhas estão diretamente relacionadas aos ambientes naturais, dependendo da colheita de pólen, néctar, água e resinas para sustento e sobrevivência da colônia. Estes recursos e suas respectivas fontes devem ser puros e livres de contaminantes servindo de alimento para as abelhas, e como fonte de alimento seguro aos que consomem o mel e os demais produtos apícolas. Por outro lado, a produção de mel em ambientes susceptíveis a quaisquer agentes de contaminação, tal como pesticidas, que muitas podem permanecer nas plantas, no solo e água a qual foram aplicadas direta ou indiretamente, podem gerar sérios riscos de contaminação para as abelhas, e conseqüentemente para quem consome o mel (MULLIN et al., 2010; HENRY et al., 2012; WHITEHORN et al., 2012; TIRADO, 2013; EASTON, 2013).

Assim, o consumo de mel se torna uma rota importante para exposição humana aos resíduos de pesticidas, os quais podem acarretar problemas de saúde ao consumidor. Diante do risco potencial de resíduos de pesticidas em mel, há necessidade de monitoramento constante dos níveis de concentração dessas substâncias nos alimentos e no ambiente, e uma forma importante e confiável, é analisar o produto das abelhas ou mesmo através do comportamento e resíduos aderidos ao corpo destes animais.

O uso de diversos agrotóxicos organoclorados e organofosforados na agricultura tem sido alvo direto de estudos sobre seu grau de contaminação no mel (RISSATO, 2006; RISSATO, 2007; PITELLA, 2009; BEZERRA, 2009; ALMEIDA, 2010; ORSO, 2011; KRUPKE, 2012; SOUZA, 2013), rastreado devido sua ação tóxica ao ambiente e aos demais seres vivos. Os agrotóxicos têm seu uso controlado devido à possibilidade de suas fórmulas favorecerem a

formação de tumores cancerígenos, assim como vários outros problemas à saúde humana (SOARES e PORTO, 2012). Com isto, o desenvolvimento de técnicas precisas de quantificação de resíduos de diferentes pesticidas em alimentos tornou-se de fundamental importância.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar os agrotóxicos presentes no mel de *Apis mellifera* proveniente de colmeias georreferenciadas.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar o grau de contaminação do mel em duas épocas distintas (setembro a novembro de 2013) e (novembro a janeiro de 2014); e relacionar aos limites preconizados pela legislação.

- Classificar as áreas de coleta do mel em termos de uso e ocupação do solo;
- Correlacionar as concentrações de pesticidas nas amostras de mel às porcentagens de uso e ocupação das áreas.

3 Revisão de Literatura

3.1 Mel: Características e produção.

Os parâmetros físico-químicos para méis brasileiros estão bem definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa nº11, de 20 de outubro de 2000, que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. O regulamento estabelece a definição, classificação, designação, composição e os requisitos quanto às características físico-químicas, sensoriais, condições de acondicionamento, aditivos, contaminantes, condições higiênicas, rotulagem, amostragem e definição de métodos de análises que deverão ser seguidos (BRASIL, 2000).

As características de cada tipo de mel estão relacionadas diretamente à qualidade das plantas, solo, água e polinizadores no ambiente de produção do mesmo (MARCHINI et al., 2004; ZIELIŃSKI, 2014) e a rastreabilidade pode auxiliar a identificação deste produto, aumentando a quantidade de informações sobre cada tipo de mel e intensificando a responsabilidade quanto a origem, processamento, níveis de contaminação, até sua comercialização (BENDINI, 2009).

Nesta região, Moraes et al. (2012) e Camargo et al. (2014), caracterizaram o mel como predominantemente polifloral, com a presença marcante de pólen de *Hovenia dulcis*, *Eucalyptus sp.*, *Parapitadenia rígida* e *Leucena leucocephala*, identificando os apiários e buscando identificar os níveis de produção e a relação de uso e ocupação do solo por meio de registros de sistemas de informação geográfica (SIG), caracterizando de forma mais específica as condições de manejo e volume de produção de cada apiário.

A apicultura na região Oeste do Paraná é uma atividade produtiva que tem somado cada vez mais à subsistência de diversas famílias, como fonte de renda em pequenas propriedades. Também tem sido considerado um agronegócio de alta rentabilidade. O Brasil se destaca neste setor de produção, com investimentos em apiários padronizados, buscando maior qualidade nos produtos das abelhas, com expressivos volumes de mel produzido e melhoria do processo de certificação por meio da rastreabilidade desde a produção até a comercialização (SINDAG, 2011; ANVISA, 2014).

A produção brasileira de mel foi estimada no ano de 2010 em 50 mil toneladas e o país classificado como o 11º maior produtor mundial de mel, quinto maior exportador (ANVISA, 2014). Estes volumes têm aumentado, atingindo aproximadamente 22.000 toneladas exportadas no ano de 2015 (ABEMEL, 2015), devido ao incentivo e capacitação dos apicultores, coloca a região Sul como responsável por 49% da produção nacional e o Paraná foi considerado o segundo estado maior produtor de mel do país (IBGE, 2012). Neste sentido, a região Oeste do Paraná, com incentivo direto da Itaipu Binacional, tem alcançado volumes de produção expressivos para o mercado nacional, com incremento de aproximadamente 20% na produção do Estado (IBGE, 2012).

A Portaria nº 50 do MAPA, de 20 de fevereiro de 2006, aprovou os programas de controle de resíduos químicos e antibióticos em vários produtos, inclusive o mel (BRASIL, 2006). A Instrução Normativa nº 9 do MAPA, de 30 de março de 2007, prevê a execução de análises e, além dos antibióticos, determinam o limite máximo de resíduos (LMR) para vários tipos de agrotóxicos, entre eles os compostos halogenados, organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados (BRASIL, 2007).

3.2 Desordem do colapso da colônia (CCD).

Nos Estados Unidos, em 2007, foi adotada a expressão CCD (distúrbio de colapso das colônias), referindo-se ao desaparecimento repentino e sem causa aparente de um grande número de abelhas. Algumas possíveis explicações foram apontadas, como o surgimento de vírus, problemas de variabilidade genética, falta de alimentos adequados, intensidade no manejo das colmeias e uso intensivo dos inseticidas. Assim, abelhas e outros insetos polinizadores, parecem estar em declínio em todo o mundo (POTTS et al., 2010). Nos EUA houve perda de aproximadamente 40% das abelhas desde 2006, e este fenômeno está relacionado a "Desordem do colapso da colônia", uma síndrome caracterizada por desaparecendo abelhas operárias (LEBUHN et al., 2013). Na Europa, estima-se que desde 1985 houve uma perda de 25% das colônias de abelhas, com uma perda de 54% no Reino Unido (POTTS et al., 2010). E este fenômeno tem causado a morte de abelhas principalmente no final do inverno e início da primavera (KLUSER et al., 2010).

No Brasil, o problema também foi diagnosticado na Região Sul. Os dados não são conclusivos, porém, como não foi evidenciada a presença de vírus, nem tão pouco a escassez de alimento nestas regiões, e o manejo das colônias tem melhorado, este declínio pode ser atribuído a ação dos pesticidas, uma vez que sua utilização tem aumentado de forma exponencial ao plantio e desenvolvimento das monoculturas culturas agrícolas da região.

3.3 Contaminação do mel por agrotóxicos

De acordo com o decreto nº 4.074, da Lei 7.802 do MAPA, de 11 julho de 1989, os agrotóxicos são agentes destinados ao uso nos setores de produção para garantir qualidade no beneficiamento, armazenamento de produtos agrícolas, manutenção de culturas, pastagens e florestas, para que não sofram danos por outros seres vivos considerados nocivos à produção.

O Codex Alimentarius conceitua agrotóxico como “qualquer substância usada para prevenir, atacar, destruir ou preservar espécies vegetais ou animais de outros seres vivos considerados pragas no processo de produção, estocagem, transporte distribuição ou processamento de alimentos e rações animais para o controle de ectoparasitas”. Estes podem ser reguladores de crescimento, desfolhantes, dessecantes, agentes promotores ou inibidores de germinação e amadurecimento de frutos, bem como produtos aplicados à manutenção destes na estocagem, excluindo os fertilizantes vegetais e medicamentos de uso veterinário (CODEX ALIMENTARIUS, 2007).

Os agrotóxicos são classificados quimicamente em orgânicos e inorgânicos. Compostos orgânicos apresentam átomos de carbono em sua estrutura e podem ser divididos em sintéticos e naturais. Compostos orgânicos sintéticos são aqueles desenvolvidos em maior escala para sua utilização na agricultura, como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (PRESTES, 2013).

O termo “pesticida” também é utilizado principalmente pelas indústrias de agrotóxicos, remetendo o significado positivista de se tratar de um agente capaz de combater as pragas que interferem no ritmo e quantidade de produção (BRAUNER, 2015).

O resíduo de agrotóxico é definido como qualquer substância química específica presente em determinado alimento, cujas características sejam danosas à alimentação dos seres vivos e ao ambiente (FAO, 2005).

A ANVISA é o órgão responsável, no âmbito do Ministério da Saúde, pela avaliação da toxicidade dos agrotóxicos e seus impactos à saúde humana, emitindo um parecer toxicológico favorável ou desfavorável à concessão do registro pelo Ministério da Agricultura. Os estudos exigidos para efetuar a avaliação toxicológica dos agrotóxicos seguem parâmetros e metodologias adotadas internacionalmente, em particular pela ONU/OMS – Organização Mundial de Saúde, OECD – Organization for Economic Cooperation and Development, USA/EPA – Environmental Protection Agency e ONU/FAO – Food and Agriculture Organization. A avaliação toxicológica leva também em conta as condições brasileiras de uso e consumo de culturas tratadas com agrotóxicos e o impacto desses produtos na saúde humana de trabalhadores e consumidores.

A natureza de cada agente contaminante do mel e outros alimentos, bem como a identificação de forma específica no ambiente, contribui significativamente nas medidas de controle e prevenção da contaminação, sensibilizando os apicultores em relação às fontes e conseqüentemente minimizando as chances de contatos com os diversos produtos químicos utilizados na agricultura e pecuária. Ainda, a identificação de possíveis fontes de contaminação como ferramenta para garantir a qualidade do mel, seja por meio de se evitar o contato com o produto ou do fortalecimento da classe de apicultores, se estabelece recursos para reivindicação dos direitos legais para produção de alimento seguro.

No Brasil, a chamada Lei dos Agrotóxicos (Lei 7.802) publicada em 1989, já referenciava algumas restrições aos registros e utilização de agrotóxicos (BRASIL, 1989) Alterada pela **Lei** nº 9974 de 06 de Junho de 2000 (BRASIL, 2000b) sob anuência de três órgãos federais, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA; o Ministério da Saúde (MS), por meio da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); e o Ministério do Meio Ambiente, por meio do Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), estes produtos podem ser registrados à medida que se comprove a existência de métodos de desativação de seus componentes em caso de resíduos remanescentes que causem danos ao ambiente, se tenham antídotos ou tratamento eficaz, não causem efeitos carcinogênicos, teratogênicos, mutagênicos e/ou revelem perigo ao ambiente. (LONDRES, 2011).

O setor que mais consome os agrotóxicos é a agricultura, mais especificamente os grandes sistemas de monoculturas, sendo responsável por caracterizar o Brasil como o segundo maior importador de agrotóxicos e com um consumo de 300 mil toneladas anuais de produtos formulados (MALASPINA et al., 2010). Em 2009, o Brasil atingiu o consumo de mais de 1 milhão de toneladas (LONDRES, 2011) e segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório das Indústrias dos Agrotóxicos da Universidade Estadual do Paraná (UFPR), de 2000 à 2010, o mercado brasileiro cresceu mais de 190% enquanto o mercado mundial cresceu 93% (CARNEIRO et al., 2012).

O consumo de inseticidas, acaricidas, fungicidas e outros compostos químicos de função letal para as “pragas agrícolas”, têm aumentado de forma proporcional às áreas agricultáveis, influenciado também pela monocultura, que nesta região está culturalmente enraizada na produção de milho, trigo, mandioca e, em aproximadamente 90% das áreas agricultáveis, cobertas por soja (PERES et al., 2007). De acordo com o IBGE (2009), no Brasil, as culturas de soja e milho são as que mais se aplicam agrotóxicos.

O sistema de produção em larga escala e de uma mesma cultura, que por sua vez limita o número de espécies de insetos nesta região, oportunizando a reprodução de poucas espécies de insetos, devido a disponibilidade de alimento e falta de inimigos naturais. Assim, o uso de inseticidas, é utilizado para controle de invasores da produção agrícola em questão. Segundo Nocelli et al. (2012), a maior parte dos produtos aplicados em lavouras de soja, milho, cana-de-açúcar ou laranja, são altamente tóxicas às abelhas, e além do princípio ativo utilizados, a dosagem, forma de aplicação e época de aplicação deve ser controlada para se evitar danos ao ambiente e nas outras espécies vegetais e animais que tem contato com estes produtos.

Os diferentes pesticidas utilizados são preparados com princípios-ativo capazes de exterminar os insetos e outros invasores da lavoura. No entanto, o uso racional destes produtos fica a cargo dos agricultores, adquirindo produtos registrados na ANVISA, cuja procedência é garantida, sob orientação técnica e legal. Assim, alguns problemas como o baixo nível de escolaridade, a falta de uma política de acompanhamento técnico mais eficiente, desconhecimento de técnicas específicas, descarte adequado de rejeitos e embalagens, uso e exposição continuada dos químicos e as dificuldades de comunicação entre técnicos e agricultores sobre cada princípio ativo, bem como o conhecimento da realidade regional, é um agravante à contaminação do ambiente e das populações (PERES et al., 2007).

Na região do estudo, fronteira direta com o Paraguai, a utilização de produtos contrabandeados na agricultura tem dificultado o sistema de fiscalização de uso destes defensivos agrícolas. De acordo com o SINDAG (2013), o Paraná está no topo do ranking de apreensões por parte da polícia federal, de agrotóxicos e insumos agrícolas contrabandeados, assim, sem controle sanitário e muito menos as concentrações ideais dos agentes químicos para cada produto agrícola, estes interferem diretamente na manutenção de qualidade na agricultura, bem como, controle dos químicos residuais no ambiente e dos produtos consumidos pelo homem e pelos animais.

A legislação brasileira pouco se refere à concentração de pesticidas nos alimentos, quando se leva em conta o setor de apicultura, estes esforços são concentrados na determinação dos resíduos de acaricidas que são usados para controlar o *Varroa jacobsoni*, um ácaro parasítico que afeta as colônias da abelha doméstica (RUFFINENGO, 2005). Focalizados nos pesticidas usados para a proteção de plantações e introduzidos em colmeias pelas abelhas e por cera contaminada (BROWN et al., 2005; ABRASCO, 2015).

Desde 2001, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, criado pela ANVISA, tem a finalidade de avaliar de forma contínua os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos *in natura*, identificando os que excedem os limites máximos de resíduos (LMR) autorizados pela legislação (ANVISA, 2014).

No processo de determinação de uma substância contaminante de uma matriz, se faz necessário observar o Limite Máximo de Resíduo (LMR), que está relacionada à Ingestão Diária Aceitável (IDA), expresso em miligramas de resíduo por quilograma de alimento, obtida através de teste e experimentos específicos quanto à influência de seus agentes químicos nos seres vivos e no ambiente. Porém, para o mel e demais produtos apícolas, estes limites não são claros e não existe uma legislação oficial que garanta este padrão de qualidade destes produtos, haja visto que, a autorização desses inseticidas requer apenas que os fabricantes demonstrem que o princípio ativo não causa morte das abelhas nas doses habituais, ignorando a consequência de doses que não matam, mas podem desorientar os insetos.

A instrução Normativa 11, de 20 de Outubro de 2000, garante padrões físico-químicos do mel para fins comerciais, pautada na legislação europeia, mas não especifica nenhum nível de restrição para resíduos de contaminantes. Alguns pesticidas Organofosforados como Bromofós, Diclorvós, Etoprofós, Fenamifós, Forato, Fosmete, Terbufós e Paration Metílico não são avaliados no programa PNCRC/L,18 apesar de possuírem alta toxicidade (classe I ou II) e de

serem substâncias de uso permitido em alimentos, cereais e produtos domissanitários (BASTOS et al., 2015).

Os Limites Máximos de Resíduos (LMRs), são determinados pela ANVISA, vinculada ao Ministério da Agricultura e Agropecuária (MAPA). No entanto, a carência de informações específicas, dificulta a fiscalização e pouco desenvolve a criação de programas de contenção de uso de cada agente agressivo ao ambiente. Assim, o limite de resíduo de cada princípio ativo, estipula a concentração máxima que pode restar no ambiente.

A ANVISA deve estabelecer o Limite Máximo de Resíduo (LMR) e o intervalo de segurança de cada ingrediente ativo de agrotóxico para cada cultura. Porém, a maioria dos compostos estudados não está incluída no Codex Alimentarius, sendo pouco específico e direcionado a alguns poucos princípios ativos, principalmente de uso veterinário (MAPA 2013). Sendo assim, utiliza-se os dados adotados pelo MERCOSUL, os recomendados pelo Codex Alimentarius, os constantes nas Diretivas da União Europeia e os utilizados pelo FDA/USA, segundo a Instrução Normativa N° 42, de 16/12/2010 (BRASIL, 2010). Ainda, quando se refere a substâncias proibidas no país, certamente não existem LMR. Segundo a Comunidade Europeia, que por meio da Diretiva 2002/657/EC, indica o estabelecimento de um limite mínimo de performance requerida (LMPR), condicionando a mínima concentração de determinada substância no alimento (UE, 2002).

3.4 Pesticidas

O uso de pesticidas na agricultura é uma realidade intrínseca aos níveis de produtividade obtidos na atualidade para as monoculturas, o uso de agentes químicos para controle de insetos invasores está diretamente associado ao sucesso das plantações e a busca por maior rendimento, para muitos esta atrelada a quantidade de defensivos que são utilizados nas culturas (POTTS, 2010).

Atualmente, os pesticidas modernos estão sendo manipulados para garantir sua eficiência sob novas condições de resistência por parte dos insetos.

Os padrões selecionados no presente trabalho, que fazem parte de compostos organoclorados e organofosforados (figura 2), são utilizados na agricultura e tem influencia direta na sobrevivência e qualidade dos produtos produzidos pelos insetos (CBA, 2013).

O deslocamento dos pesticidas no meio ambiente depende da maneira como são aplicados, da natureza química de seus compostos, da sua formulação e de fatores climáticos como chuva, vento e sol (PINTO, 2015). Para tanto, o uso dos compostos estudados na agricultura está diretamente relacionado às cultivares e ao manejo das áreas.

Nesta pesquisa foram utilizados os seguintes pesticidas: Etoprofos, um composto orgânico da classe dos organofosforados, quimicamente conhecido como o-ethyl s,s-dipropyl phosphorodithioate, encontrado em diversos compostos, como Mocap 10G, Rhocap, Movento O-Teq, Movento Gold, utilizado como nematicida e inseticida, aplicado diretamente no solo. Seu uso é permitido no cultivo de banana a 2,5 gramas/isca, atua sobre o sistema nervoso de nematódeos e insetos, seu tempo de carência no ambiente de 3 dias, com classe toxicológica I, Classe ambiental II (LONDRES, 2011). No cultivo de batata o LMR é de 0,05 ppb e intervalo de segurança de 61 dias (ANVISA, 2001).

Ronnel Fenclorfós, princípio ativo utilizado como praguicida em controle de vetores e pragas urbanas, classe Inseticida, classificação toxicológica classe III, com venda permitida em lojas especializadas a 5% e emprego doméstico sob venda livre a 2% p/p. (BRASIL, 2016). No entanto, de acordo com a IN nº 26, de 8 de outubro de 2010, foi proibido para as culturas de abacaxi, alface, alho, arroz, banana, batata, café, citrus, feijão, maçã, mamão, manga, melão, milho, morango, pimentão, soja, tomate, trigo, uva (BRASIL, 2010).

O Paration Metílico, produto químico organofosforado utilizado como inseticida e acaricida, quimicamente conhecido como tiofosfato de dimetil – paranitrofenila e é encontrado no mercado com nome de Bravik, Declare, Folidol, Folisuper 600 BR, Mentox, Paracap, Paration Metílico Pikapau, Paration Pikapau. A sua fórmula molecular é $C_8H_{10}NO_5OS$, classificação toxicológica II (extremamente tóxico). No Brasil, em 2009 foi proibido para uso agrícola e quaisquer atividades que podiam oferecer possibilidade de exposição para humanos (BRASIL, 2009). Na China, foi proibido em 2007, por causarem problemas significativos ao sistema nervoso dos humanos (BRASIL, 2008).

Contudo, em 2014, após a reavaliação do Programa de Análises de Resíduos em Alimentos - PARA, este princípio ativo não foi identificado em amostras analisadas na reavaliação e tem seu uso autorizado para as culturas de cereais e leguminosas secas com tempo de carência de quinze dias entre aplicações com limite máximo de resíduo em cebola (*Allium cepa*), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris*), trigo (*Triticum vulgare*

Vill.), milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max L.*), de 50 ug. Kg⁻¹, 70 ug. Kg⁻¹, 95 ug. Kg⁻¹, 20 ug. Kg⁻¹, 50 ug. Kg⁻¹ e 10 ug. Kg⁻¹, respectivamente (BRASIL, 2014).

O produto comercialmente conhecido como Folisuper 600, com registro do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 027087 tem como princípio ativo o Paration Metílico e pode legalmente ser aplicado no milho com um intervalo de 14 dias, com um máximo de 04 aplicações e na soja é liberada uma única aplicação (ADAPAR, 2015).

Clorpirifós é um composto organofosforado, utilizado como inseticida, formicida e acaricida, comercialmente encontrado como Piritilen, sendo classificado pelo MAPA na classe toxicológica II (muito perigoso ao humano), na classe ambiental IV (pouco perigoso ao ambiente), (BRASIL, 2006).

De acordo com a Resolução-RDC nº 206 de 23/08/04, DOU de 24/08/04, os registros de produtos à base de Clorpirifós foram suspensos, excluindo-se desta determinação somente aqueles registros destinados ao uso em iscas para combate de baratas, em embalagens portáteis dotadas de dispositivo de segurança para evitar a exposição de crianças. No entanto, revogado após Consulta Pública nº 45, de 7 de junho de 2005, D.O.U de 09/06/2005. (BRASIL, 2005).

Os produtos à base de Clorpirifós registrados na ANVISA, como o Clorpirifós Fersol 480 EC, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 07097 e Lorsban 480 BR sob nº 02298596 (ADAPAR, 2015) e de acordo com Cosmann (2012), o Clorpirifós foi o inseticida mais vendido para as culturas do milho e soja na região de Cascavel. Atualmente, aplica-se este produto diretamente nas folhas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagem, soja, sorgo, tomate e trigo (ANVISA, 2016). A concentração máxima de resíduos permitida em ppb (parte por bilhão), com tempo de carência de 21 dias entre aplicações para o milho - *Zea mays* é de 10 ppb; soja - *Glycine max* (1 ppb); Trigo - *Triticum spp* (20 ppb), (ADAMA, 2013). De acordo com a confederação brasileira de apicultura, este inseticida tem sido um dos grandes responsáveis pela mortandade das abelhas no Brasil (CBA, 2013).

O p,p'- DDE - Dichlorodipenyldichloroethylene (DDE) é um composto químico proveniente da perda de cloreto de hidrogênio de DDT, solúvel em gordura, portanto tende a acumular-se na gordura de animais e raramente excretado. Pode ser encontrado no leite materno e conseqüentemente absorvido pelo animal jovem ou criança (EPA, 2000). O DDT foi

amplamente utilizado para o controle de mosquito *Anopheles*, causador da malária e outros insetos transmissores. Foi proibido nos Estados Unidos desde 1972, assim como o DDE, que é considerado um poluente de alta toxicidade, com poder de bioacumulação nos seres humanos e ao meio ambiente (ATSDR, 2002).

Diversos resultados do PARA (2008) revelaram que a utilização de agrotóxicos não autorizados e agrotóxicos com restrições de uso, continuam sendo utilizados no campo, apresentando resíduos acima do limite máximo (LMR) permitido, ainda é uma realidade frequente (BRASIL, 2009), e atualmente existe o consumo registrado de 3,7 Kg/ha de pesticidas no Brasil (SINDIVEG, 2015).

3.5 Cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa

A Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa é comumente utilizada na identificação de componentes presentes em sistemas naturais e biológicos, permitindo a caracterização e identificação de diferentes substâncias na mesma amostra. O espectrômetro de massas funciona como detector de caráter universal de alta sensibilidade aos íons de referência, mesmo em amostras complexas, fornecendo informações por meio da interpretação dos espectros de massa dos íons, tornando o método analítico mais preciso e confiável na identificação de compostos orgânicos (NORLI, 2011; KOLBERG, 2011; TORTELLA et al., 2012). Assim, a análise cromatográfica por CG-MS na identificação de vários agentes em uma mesma análise dos pesticidas, promove resultados com maior grau de precisão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Informações Geográficas e montagem do experimento.

O trabalho foi conduzido no município de Santa Helena, localizado no Oeste do estado do Paraná, às margens do Reservatório de Itaipu, pertencente à bacia hidrográfica do Paraná – 3 (altitude de 271 m, latitude 24°55'37"S, longitude 54°18'58" W) (SIMEPAR).

O clima é classificado como Cfa segundo Köppen (1948), Subtropical Úmido Mesotérmico, verões quentes com tendência de concentração de chuvas (temperatura média superior a 22°C), inverno com geadas pouco frequentes (temperatura média inferior a 18°C), sem estação seca definida.

Santa Helena apresenta tipologia do terreno com 70% suave ondula, 20% ondulado e 10% forte ondulado (MAACK, 2002), a vegetação do município é caracterizada por áreas de reserva legal, áreas de mata ciliar as margens do reservatório de Itaipu, com 200 metros de largura e aproximadamente 80 Km de extensão e áreas de mata ciliar aos rios que compõem a bacia do Paraná 3.

Foram selecionados 15 apiários no município de Santa Helena - Paraná, georreferenciados pelo ponto médio entre três colônias de *A. mellifera* com auxílio do sistema de posicionamento global (GPS - Garmin-etrex), estipulado 1500m de raio a partir do ponto médio entre as três colmeias de cada apiário, correspondente ao alcance máximo para busca de alimento por parte das abelhas (WOLF, 2008).

Os pontos registrados no GPS, foram descarregados no programa Mapsourse, para conversão em arquivos DXT, as informações incorporadas ao SIG (Sistema de Informação Geográfica), criado para a região por Camargo et al. 2014, com o programa SPRING 5.0.6.

Por meio do uso do sistema de informações geográficas (SIG), que permite armazenamento de informações e localização geográfica dos apiários, individualmente foi possível estudar o uso e ocupação das terras, em um raio de 1500m ao redor de cada apiário, utilizando-se uma composição colorida nas imagens, Red, Green e Blue (RGB), definindo-se quatro classes: área de mata, áreas agrícolas e pastagens, área de água e área com edificações a

1500 metros de raio do entorno de cada apiário, determinando a porcentagem de cada área em um total de 506 hectares (figura 1).

Para cada uma das três colônias de *A. mellifera* selecionada de cada apiário, foi introduzido um caixilhos para coleta de amostras. Os caixilhos foram preparados previamente com cera alveolada livre de contaminação e resquícios de mel de outras épocas. O intervalo de coleta foi dimensionado em função do período de produção médio declarado pelos apicultores da região.

Na Figura 1 pode-se observar a distribuição dos 15 apiários selecionados no município de Santa Helena.

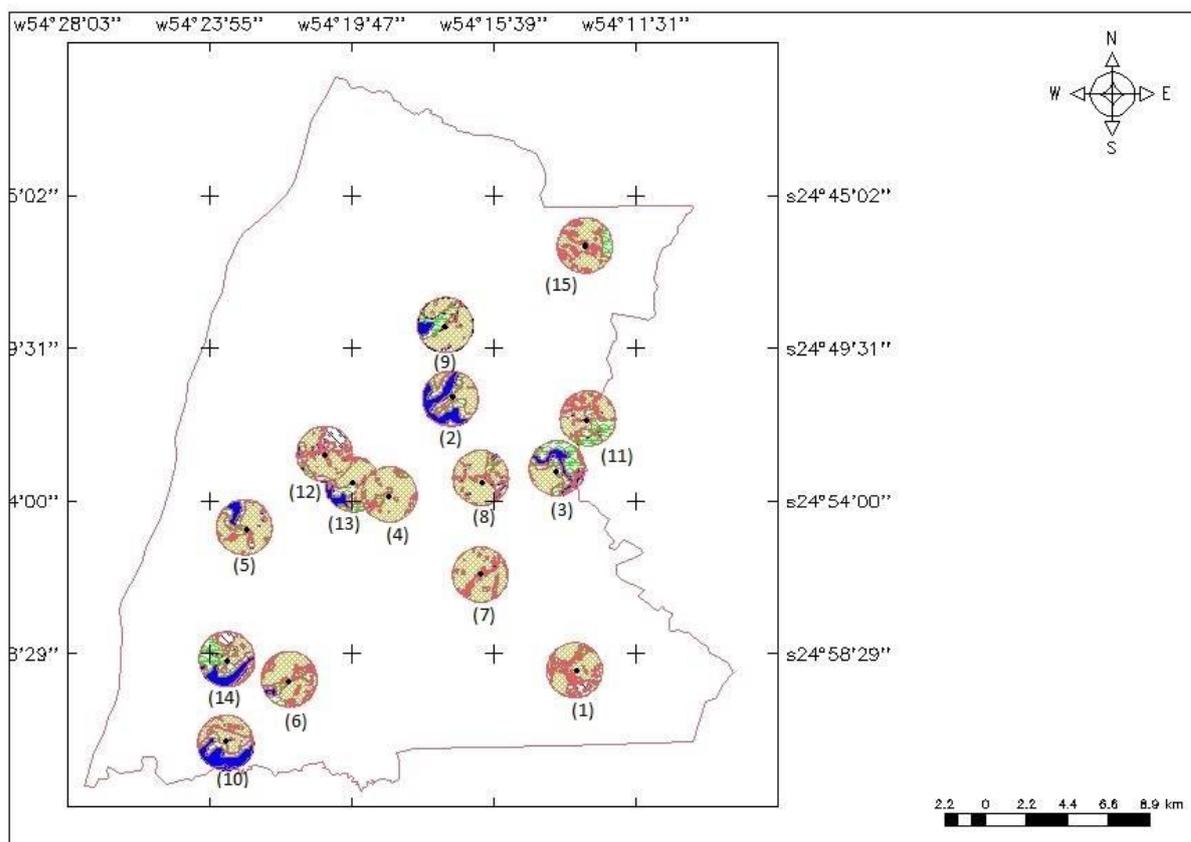
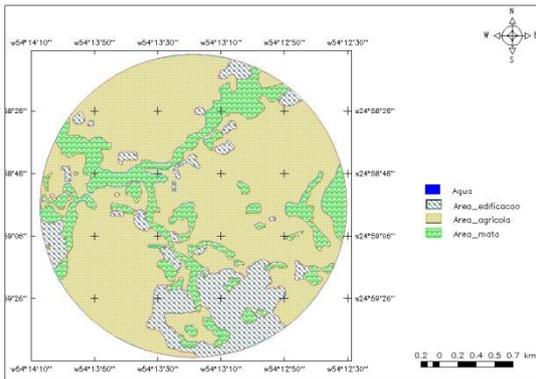
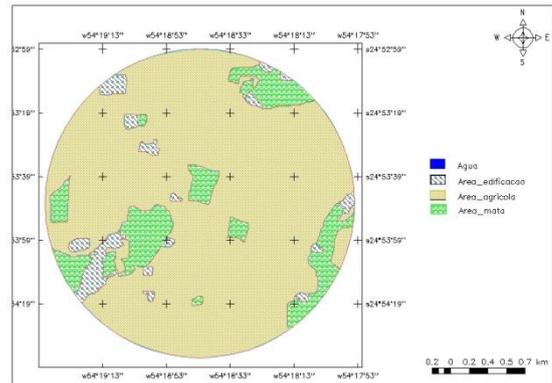


Figura 1. Distribuição dos apiários no município de Santa Helena, delineados na área correspondente ao raio de ação das abelhas *Apis mellifera*.

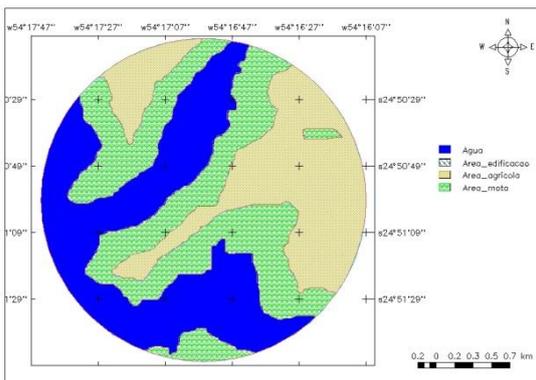
Na Figura 2, para cada apiário georreferenciado, pode-se observar o uso do solo com área agrícola e pastagens, área de mata (nativa ou reflorestada), área de água, bem como áreas com edificações. Nestas áreas predominam áreas agrícolas, distribuídas em toda a extensão do município, caracterizando o uso e ocupação de toda região de estudo.



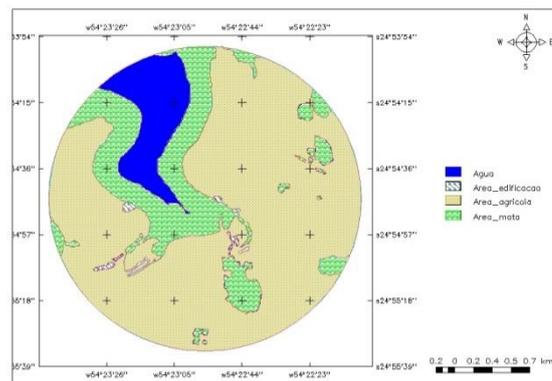
(1)



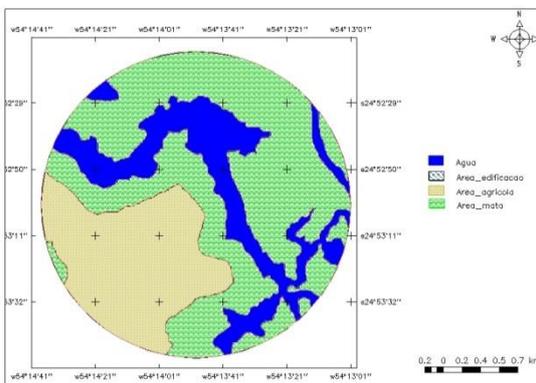
(4)



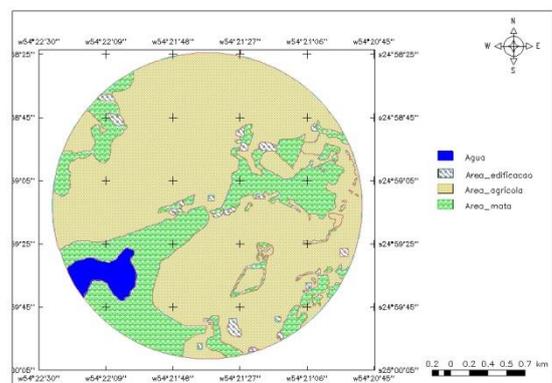
(2)



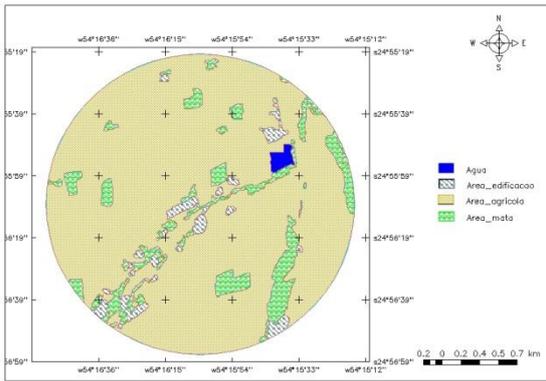
(5)



(3)

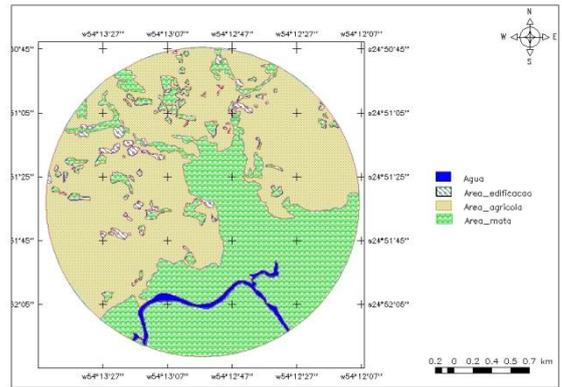


(6)

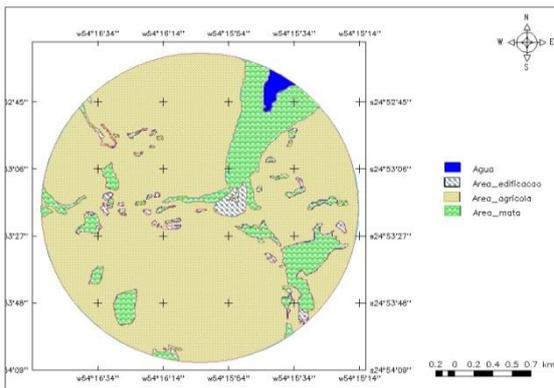


(7)

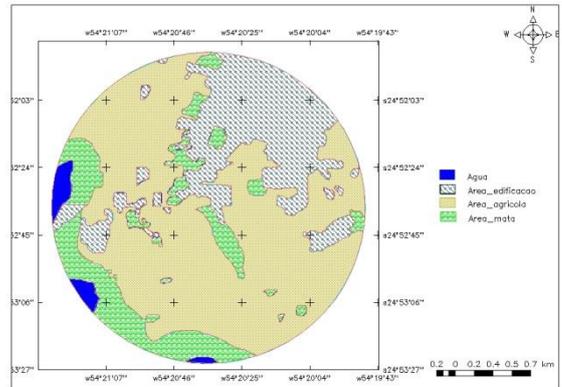
(10)



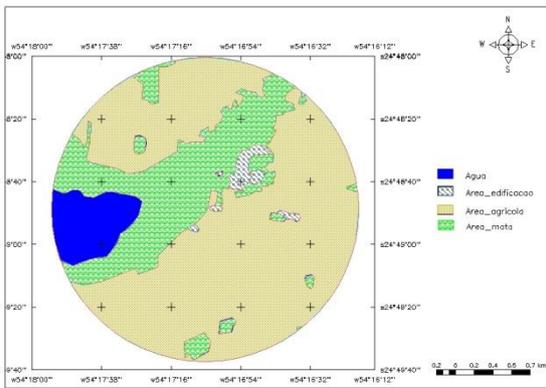
(11)



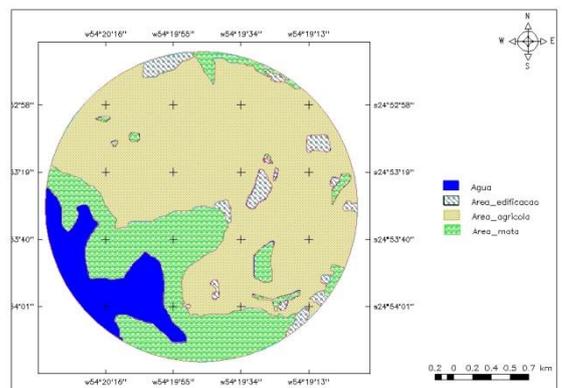
(8)



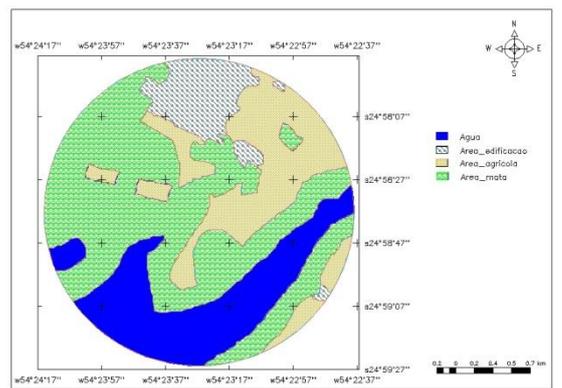
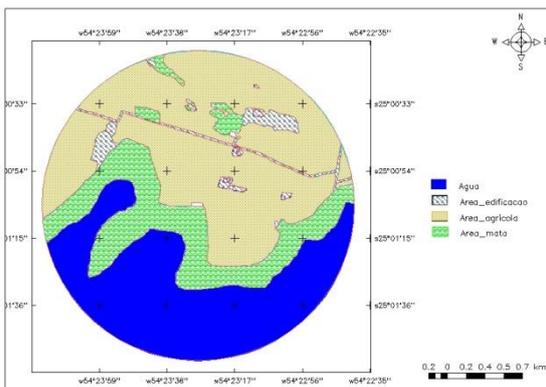
(12)



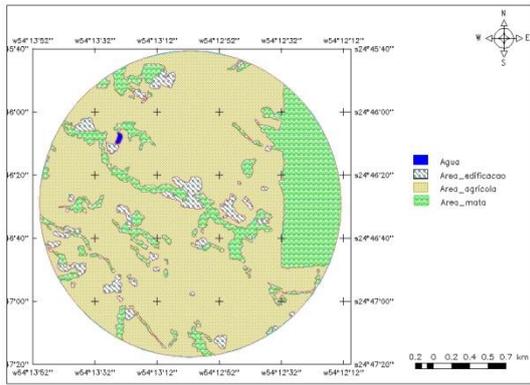
(9)



(13)



(14)



(15)

Figura 2. Uso e ocupação do solo de cada apiário selecionado, com 1500m de raio e área de 506 ha. no município de Santa Helena, Paraná, Brasil.

1 = apiário 1; 2 = apiário 2; 3 = apiário 3; 4 = apiário 4; 5 = apiário 5; 6 = apiário 6; 7 = apiário 7; 8 = apiário 8; 9 = apiário 9; 10 = apiário 10; 11 = apiário 11; 12 = apiário 12; 13 = apiário 13; 14 = apiário 14; 15 = apiário 15.

Assim, os apicultores de cada apiário selecionados, foram visitados e elucidado os objetivos da pesquisa, sob anuência destes, que cederam três caixilhos de tamanho padrão às suas caixas, os quais foram montados na Casa do mel, na fazenda experimental da Universidade estadual do Oeste do Paraná e implantados nas caixas no dia 01 de setembro de 2013. Em cada uma das três colmeias selecionadas de tamanho padrão, foram colocados um caixilho previamente montado com cera alveolada nova, evitando a contaminação com cera e mel remanescentes de outras épocas.

4.2 Coleta e extração de mel.

Em campo, foram coletadas 41 amostras na época 1 (setembro a novembro de 2013) e 45 amostras na época 2 (novembro de 2013 a janeiro 2014).

Para cada época de coleta foram visitados os apiários selecionados e retirado o caixilho implantado nas caixas, substituindo-o por outro previamente montado com nova placa de cera alveolada. Os caixilhos retirados, devidamente catalogados e armazenados em sacos plásticos próprios para alimentos, foram levados ao laboratório de análise de alimentos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Marechal Cândido Rondon, para o processo de extração do mel.

No laboratório, cada caixilho coletado individualmente passou por extração manual do mel, com o uso de luvas descartáveis, deixando-o escorrer. O mel foi armazenado em recipiente de 250g, de primeiro uso, próprio para alimentos e colocados sob temperatura reduzida (-5°C) com o intuito de manter suas propriedades físico-químicas.

4.3 Concentração e extração dos analitos

Foram utilizados padrões Restek® de pesticidas organoclorados (Etoprophos; Dissulfoton; Metil Paration; Fenchlorphos; Chlorpyrifos; Dichlorvos; Azinphos) e organofosforados (alpha – Lindano; Lindano; delta-Lindano; Heptachlor; 1,4:5,8-Dimet; Isodrin; p.p'-DDE; Mitotane; Endrin Keton; Endossulfan; 1,2,4 –Methen; Bicyclo[2.2.1]; p.p'-DDT e Methoxychlor) em concentrações conhecidas de 100 e 50 ppb respectivamente. Selecionados a partir do grau de receptividade dos equipamentos e do número de pesticidas a serem recuperados.

Para seleção e extração dos analitos de interesse foram pesados 10g de cada amostra de mel diretamente nos Falcons de 50 mL, em triplicata, diluídas inicialmente em 5 mL de água destilada e 25 mL de acetato de etila PA, agitadas constantemente por 1 min em agitador magnético e centrifugadas a 2500 rpm, por 10 min, o sobrenadante foi reservado e a amostra submetida à reextração com 25 mL de acetato de etila na centrífuga por 10 minutos, o sobrenadante foi guardado e o sedimento foi descartado. Os extratos guardados foram unidos e concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida a 60 °C e 80 rpm. O resíduo obtido foi solubilizado em 5 mL de acetato de etila para posterior limpeza (adaptado de RISSATO, 2006).

Para o processo de limpeza, foram utilizados cartuchos de Florisil, compostos por uma seringa de 10 mL com 2 membranas de lã de vidro (inferior e superior) e 1g de Florisil (entre as membranas). Cada cartucho foi ativado com 5 mL de acetona, descartando o solvente. As amostras solubilizadas em 5 mL de acetato de etila foram filtradas em filtro com membrana do tipo PTFE com 0,45 µm de porosidade e os analitos filtrados permaneciam na membrana de vidro quando passados no cartucho de florisil ativado, sendo o solvente descartado.

Para captura dos analitos de interesse através da eluição (fase móvel de separação dos pesticidas, através de solventes) foram adicionados 10 mL de hexano/acetato de etila (1:1, v/v) diretamente nos cartuchos de Florisil com o filtrado, e guardado o solvente com pesticidas. O extrato obtido foi submetido à concentração sob evaporação forçada na capela por 12 horas. O resíduo foi solubilizado em 1 mL de acetato de etila, armazenado

em eppendorf e mantido sob temperatura de -5°C para posterior análise cromatográfica por GC/MS (Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massa).

4.4 Preparo das soluções e análise cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de cromatografia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Engenharia Agrícola (Laboratório de Análises Agroambientais Avançadas –LAAA), executadas em equipamento GC/-MS Shimadzu QP2010 – Plus, equipado com amostrador automático e controle eletrônico de fluxo, coluna RTX5 MS – (5 % fenil metil polidimetilsiloxano) com 30 metros de comprimento, diâmetro interno: 0,25mm; temperatura da coluna: 150°C , fluxo de 1,08 mL/min., espessura do filme de : 0,25 μm , gás de arraste: Hélio com velocidade linear do gás de arraste de 39,5 cm/seg, Injeção 1 μL , modo splitless por 0,50 min e 50/1 split; purga do septo a 10 mL/min., temperatura do injetor 250°C e sobre pressão 250 kpa, temperatura da interface 250°C e 200°C de temperatura da fonte, voltagem do detector 750 V – Obtidos pelo autotune. Energia de ionização 70 eV 80°C por 2 min; 80 a 280°C a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$; estabilizando a 280°C por 15 minutos e tempo total de 41,5 minutos (RISSATO, 2006).

A partir das soluções estoques foram preparadas as soluções de trabalho na concentração 500 ug.kg^{-1} para organoclorados e 1000 ug.kg^{-1} para organofosforado diluídas em acetato de etila, contendo todos os agrotóxicos estudados (multirresíduo). Para isso, volumes apropriados de cada solução estoque foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, já contendo um pequeno volume de acetato de etila, e completado com este mesmo solvente. A mistura das soluções de trabalho ($1\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi armazenada em frascos âmbar, evitando-se contaminação e evaporação (RISSATO, 2006).

Para o ajuste da curva analítica no cromatógrafo foram injetadas soluções padrão dos agrotóxicos em diferentes concentrações: Organoclorado ($5\mu\text{g.mL}^{-1}$; $10\mu\text{g.mL}^{-1}$; $15\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $20\mu\text{g.mL}^{-1}$) em duplicata e Organofosforado ($0,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; $1,0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; $2,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), verificando o grau nível de intensidade dos picos nos cromatogramas na curva padrão. Foram relacionadas as variáveis tamanho da coluna cromatográfica, volume de

injeção, temperatura do injetor, temperatura da interface, temperatura da fonte de ionização do espectrômetro de massa, modo de injeção (splitless e split), velocidade linear do gás de arraste, rampa de temperatura. Os tempos de retenção dos compostos foram obtidos a partir da confirmação dos espectros dos vários agrotóxicos na concentração de 1000 ug.kg⁻¹ usando o modo de varredura (40 a 550 m/z) e comparação com bibliotecas de espectros do National Institute of Standards and Technology (NIST) e SHIMADZU. A confirmação dos compostos também foi realizada pelos seus respectivos valores dos índices de retenção obtidos das bibliotecas da Shimadzu e do NIST, utilizando o software SHIMADZU.

Para o estabelecimento das curvas analíticas e análises das amostras, os cromatogramas foram obtidos em vários segmentos, para no mínimo três íons no modo de aquisição por monitoramento de íons específicos (“single ion monitoring” - SIM) usando ionização por elétrons (EI) a 70 eV, realizando uma única corrida cromatográfica para os padrões de pesticidas organoclorado e organofosforado.

Após os ajustes analíticos, foram realizados cinco testes de recuperação dos analitos de interesse em amostras guardadas em 1mL com acetato de etila, em triplicata, garantindo a eficiência do método de extração em níveis de recuperação de 65 a 115%.

4.5 Seleção dos pesticidas

Após análises de recuperação, foram selecionados os pesticidas que por meio do método de extração escolhido foi possível satisfizeram os valores mínimos para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, verificados entre 70,3 e 97,6%.

Foi recuperado em porcentagem média de concentração após 5 injeções da solução de 500 ug.kg⁻¹ de agrotóxicos preparada em extrato da matriz analisados por CG-MS no modo SIM de pesticidas organofosforado Etoprophos (71,5%); Paration Metílico (70,3%); Fenclorpos (79,1%); Chlorpyrifos (97,6%); Dissulfoton (2,1%); Dichlorvos (227,89%) e Azinphos (149,4%), organoclorado p.p`-DDE (75,95%); Mitotane (82,15%); p.p`-DDE (75,95%); Bicyclo[2.2.1] (73,74%); alpha – Lindano (0%); Lindano (0%); delta-Lindano (29,89%); Heptachlor (24,73%); 1,4:5,8-Dimet (14,26%); Isodrin

(0%); Heptachlor (38,58%); Endrin Keton (0%); Endossulfan (0%); 1,2,4 –Methen (0%); p.p'-DDT (130,56%); e Methoxychlor (192,48%).

Por conseguinte, neste trabalho foram utilizados em análises os pesticidas validados organofosforados, Etoprophos (71,5%); Paration Metílico (97,6%); Chlorpyrifos (79,1%) e Fenchlorphos a 70,3%. Para os analitos organoclorados, os resíduos recuperados foram: p.p`-DDE (75.95%); Mitotane (82.15) e Bicyclo[2.2.1] a 73.74%.

Os dados obtidos das análises cromatográficas em arquivos .qgd, foram tabulados e analisados em médias para as análises estatísticas.

4.6 Análises estatísticas

Foram estimadas estatísticas descritivas das concentrações de pesticidas individuais em cada época de coleta. De acordo com a época de coleta, foram avaliadas a incidência (%) e a concentração em parte por bilhão (ppb) dos pesticidas Etoprophos (ETOP), Paration Metil (METPAR), Fenchlorphos (FENC), Chlorpyrifos (CHLORP), p.p`-DDE (DDE), Mitotane (MITOT) e Bicyclo[2.2.1] (BICYC) no mel de *A. mellifera*, e a ocorrência de amostras de mel com valores de METPAR, CHLORP e DDE fora da legislação vigente.

A análise estatística foi realizada com base na teoria dos modelos lineares generalizados (MLG), em que os dados observados de variáveis expressas por valores binários foram ajustados às distribuições binomial e normal, e os dados de variáveis quantitativas da concentração de pesticidas no mel de *Apis mellifera* foram ajustados à distribuição normal, poisson e negativa binomial.

A estimação dos parâmetros dos modelos foi realizada utilizando-se do método da máxima verossimilhança, por maximização da função de log-verossimilhança. As funções de ligação utilizadas foram: binomial: $g(\mu) = \ln(\mu/1-\mu)$, normal: $g(\mu) = \mu$, poisson: $g(\mu) = \ln(\mu)$ e negativa binomial: $g(\mu) = \ln(\mu)$.

O ajuste da teoria dos MLG aos dados das características foi realizado por meio de análise de *deviance* (ANODE), a partir de ajuste de modelo maximal, representado por porção sistemática $\eta = g(\mu) = \mu + E_i + A_j + E^*A_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, em que μ é o efeito da média geral, E_i é o efeito da i -ésima época ($i = 1$ e 2), A_j é o efeito do j -ésimo apicultor ($j = 1, \dots, 15$), E^*A_{ij} é o efeito de interação entre a i -ésima época e o j -ésimo apicultor e ε_{ijk} é o erro aleatório associado à cada observação Y_{ijk} .

A qualidade de ajuste dos modelos aos dados observados, e consequente seleção do melhor modelo, se baseou no maior valor do logaritmo da função de máxima verossimilhança (SCAPIM et al., 2002) e na aplicação do teste da razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*).

Para os modelos *poisson* e binomial, a comparação do valor da razão entre *deviance* residual e graus de liberdade residual com os percentis da distribuição $\chi^2_{n-p(\alpha)}$ (MCCULLAGH e NELDER, 1989) deve estar próximo de um. Assim, quando constatadas a superdispersão ou a subdispersão para os modelos *poisson* e binomial, foi realizado o ajuste do parâmetro de dispersão, em que os erros padrões foram corrigidos utilizando um modelo quasipoisson ou quasibinomial, respectivamente. No caso de ajuste do modelo *poisson*, a superdispersão também foi tratada por meio de ajuste da distribuição binomial negativa, para posterior comparação entre valores de logaritmo da função de máxima verossimilhança (*logLik*) ajustados por distribuições distintas.

Após definição da distribuição mais adequada, os efeitos de época (E), apicultor (A) e de interação entre E e A foram verificados na ANODE, por meio do teste da diferença de *deviances* entre dois modelos, que segue aproximadamente a distribuição de $\chi^2_{n-p(\alpha)}$ (LINDSEY, 1997) e que corresponde à análise do tipo I (R *Development Core Team*, 2013).

Constatada a significância do fator ‘época’ na análise do tipo I, o contraste associado às diferenças entre médias de mínimos quadrados (*lsmeans*) referentes ao efeito de época foi comparado por meio do teste da diferença de *lsmeans*, utilizando a estatística de qui-quadrado. Respeitados tais resultados, a apresentação das médias foi baseada nos valores observados.

De acordo com a época do ano, a incidência (%) de amostras com pesticidas no mel de *Apis mellifera* e a ocorrência (%) de amostras de mel com concentração de pesticidas além dos limites permitidos pela legislação vigente, foram avaliadas por meio de estimativas de intervalos de confiança da proporção populacional (P), utilizando-se do método exato, a 95% de índice de confiança.

As distribuições estatísticas que proporcionaram melhor ajuste para as características de incidência (%) de pesticidas no mel de *A. mellifera* foram: binomial com correção dos erros padrão por um modelo quasibinomial (ETOP, METPAR e FENC) e normal (CHLORP, DDE, MITOT e BICYC). Os valores encontrados para o logaritmo da função de verossimilhança (*logLik*) foram de -24,5 (ETOP), -41,0 (METPAR), -29,6 (FENC), 26,4 (CHLORP), 6,99 (DDE), -2,58 (MITOT) e -22,5 (BICYC).

Em relação as análises estatísticas, a distribuição que proporcionou melhor ajuste para as características expressas por concentração de pesticidas no mel de *A. mellifera* foi a negativa binomial. Para tais características, os valores encontrados para o logaritmo da função de verossimilhança (*logLik*) foram de: 30.815,8 (ETOP), 157.561,0 (METPAR), 4.339,1(FENC), 24.912,2 (CHLORP), 2.028,5 (DDE), 14.438,8 (MITOT) e 3.811,8 (BICYC). Os valores da estatística de *Pearson* χ^2 ou *Deviance*, as quais foram utilizadas para correção da subdispersão encontrada após ajuste da distribuição negativa binomial foram: *Pearson* $\chi^2_{(ETOP)}=0,3058$, *Pearson* $\chi^2_{(METPAR)}=0,1960$, *Pearson* $\chi^2_{(FENC)}=0,6009$, *Deviance*_{(CHLORP)=0,0837}, *Deviance*_{(DDE)=0,1710}, *Deviance*_{(MITOT)=0,1632} e *Deviance*_{(BICYC)=0,2862}, todas com 82 graus de liberdade.

Para as características de ocorrência de amostras fora do preconizado pela legislação vigente, as distribuições estatísticas mais ajustadas foram a binomial com correção dos erros padrão por um modelo quasibinomial (METPAR) e normal (CHLORP e DDE). Os valores de *logLik* foram de -41,0 (METPAR), 26,4 (CHLORP) e 25,7 (DDE).

Ainda, levando em conta os efeitos de época (E), apicultor (A) e concentração de pesticidas, foi realizada análise multivariada de agrupamento considerando a distância euclidiana como medida de dissimilaridade a partir dos dados normalizados. Os agrupamentos hierárquicos a partir da matriz de distância foram obtidos pelo método UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (SNEATH; SOKAL, 1973). A validação dos agrupamentos foi determinada por meio do coeficiente de

correlação cofenético (SOKAL; ROHLF, 1962). O critério para definição do número de grupos foi baseado na largura média da silhueta.

O escalonamento não métrico multidimensional (NMDS) foi empregado para os dados da época 1 (setembro a novembro de 2013) e da época 2 (novembro a janeiro de 2014), empregando a distância euclidiana após normalização dos dados. Após a construção da matriz de dissimilaridade com os dados normalizados, utilizou-se o comando “metaMDS” para gerar processos aleatórios e interativos para encontrar a melhor solução possível. A qualidade do ajuste mensurado do NMDS foi avaliada pelo “stress” e diagrama de Shepard.

O nível de 5% de significância foi adotado em todos os testes de hipóteses. As análises estatísticas foram efetuadas usando-se o *R Development Core Team* (2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em média, 58,92% da área de ocupação do solo deste estudo é ocupada por área agrícola, 22,08% por área de mata, 9,52% por área de água e 6,04% de área com edificações, distribuído em 506 ha em torno de cada apiário (tabela 1).

Apiário	Área mata (%)	Área agrícola (%)	Área edificações (%)	Área água (%)	Área total (%)
1	18,03	49,22	32,75	00	100
2	35,03	29,55	00	35,57	100
3	52,91	26,41	00	20,68	100
4	12,84	82,94	4,22	00	100
5	20,27	70,13	0,61	8,99	100
6	24,42	71,29	1,59	2,70	100
7	9,85	86,56	3,00	0,59	100
8	14,67	82,95	1,59	0,79	100
9	25,55	66,16	1,63	6,66	100
10	19,41	45,13	3,43	32,03	100
11	40,96	56,26	1,29	1,49	100
12	15,43	59,13	23,61	1,83	100
13	23,90	62,35	3,69	10,06	100
14	47,22	22,04	9,08	21,66	100
15	21,25	74,39	4,29	0,07	100
Média	25,44	58,96	6,06	9,54	100

Tabela 1. Porcentagem de uso e ocupação do solo em relação à área de forrageamento das abelhas de cada apiário, 506 ha.

Dose apiários, correspondente a 80% das áreas de estudo tem como predominância a ocupação do solo por área agrícola. Esta área de cultivo tem como predominância a soja e o milho como culturas agrícolas relacionadas a produção e venda dos produtos (IPARDES, 2008). Este cenário está atrelado diretamente aos possíveis usos de pesticidas para controle de insetos e pragas.

As áreas de mata desta região foram predominantemente reflorestadas após a construção da Hidrelétrica de Itaipu e alagamento das propriedades no ano de 1981. Assim, após a criação do reservatório de Itaipu, foram plantadas espécies nativas e exóticas a 200 m das margens (MULLER, 1989). As espécies que compõem a flora da região são principalmente das famílias fabaceae, Lauracea, Malvaceae e Boraginaceae, espécies de interesse apícola e atrativas às abelhas (CAMARGO, 2011). Assim, a mata dessa região é visitada pelas abelhas e contribui para disponibilidade de alimento para as abelhas produzirem o mel.

Relacionando a porcentagem de amostras contaminadas por época, em cada apiário, mesmo em espaços com maior ocupação por área de mata (apiário 2, 3 e 14), tem-se um maior número de amostras contaminadas para a primeira época (setembro a novembro de 2013).

De acordo com a resolução nº 120/2007 da SEAB, no período de 15 de junho a 15 de setembro de cada ano não se pode cultivar soja, buscando retardar o desenvolvimento da ferrugem asiática na região (PARANÁ, 2007). Após este período, está liberado o plantio desta cultura e se intensifica a aplicação de pesticidas na fase inicial de desenvolvimento da planta para controle de lagartas, prática decorrente do manejo da cultura. O plantio de soja se inicia em meados de setembro, florescendo durante 60 dias e em diferentes fases de desenvolvimento (EMBRAPA, 2014) e cada produtor determina o período de plantio e consequente aplicação de defensivo. Dessa forma, os apiários que tiveram uma maior porcentagem de amostras contaminadas na época de setembro a novembro de 2013, tiveram uma fonte de contaminantes comum que atingiu o mel das colmeias, seja por meio do néctar transportado pelas abelhas ou pelo vento, por deriva, uma vez que o mel é altamente higroscópico. Assim, mesmo que a mata pudesse funcionar como uma barreira, esse bloqueio pode funcionar como um ponto de acúmulo

destas partículas, que pode estar ligado ou não ao vapor d'água, contaminando as colmeias localizadas nas bordas dessas matas.

Assim, com maior disponibilidade de alimento e o maior contato com os diferentes agentes contaminantes utilizados em cada cultura agrícola, as abelhas podem ser consideradas excelentes bioindicadoras da qualidade do mel produzido (TOTTI, 2006). Ainda, o fato de existir disponibilidade de alimento para as abelhas nas espécies cultivadas como a soja nesta região, faz com que as abelhas não necessitam visitar outras plantas (CHIARI et al., 2013), e de acordo com Cosmann (2012), as culturas para as quais mais foram comercializados agrotóxicos no Paraná, foram a soja e o milho respectivamente. Portanto, mesmo se houver disponibilidade de outras culturas agrícolas e de mata como pasto apícola nas diferentes épocas, as espécies cultivadas e não nativas nas lavouras que receberam grandes cargas de pesticidas, contribuem como fonte de contaminantes para as abelhas, conseqüentemente alterando a qualidade do mel desta região.

Em relação ao percentual de amostras contaminadas para cada pesticida, observa-se pela Tabela 2 que no período de setembro a novembro de 2013, Etoprophos (ETOP) estava presente em 26,86% das amostras, Paration Metílico (METPAR) em 43,90%; Ronnel Fenchlorphos (FENC) em 58,53%; Chlorpyrifos (CHLORP) em 4,87%; p'p. DDE (DDE) em 9,75%; Mitotane (MITOT) em 12,19% e Bicyclo[2.2.1] (BICYC) em 24,39% das amostras. Para as amostras coletadas entre dezembro de 2013 e janeiro de 2014, o percentual de amostras contaminadas com Etoprophos (ETOP) foi de 8,88%; de Paration Metílico (METPAR) foi de 24,44%; de Ronnel Fenchlorphos (FENC) foi de 20,0%; de Chlorpyrifos (CHLORP), p'p. DDE (DDE), Mitotane (MITOT) e Bicyclo[2.2.1] (BICYC) foi de 2,22%; (Tabela 2).

Para os analitos Dissulfoton, Dichlorvos, Azinphos, delta-Lindano, Heptachlor, 1,4:5,8-Dimet, Heptachlor, p.p'-DDT e Methoxychlor, o simples fato de sua presença nas amostras de mel já indica sua contaminação e conseqüentemente do ambiente do entorno dos apiários de estudo. Assim, mesmo em níveis tão baixos que não puderam ser quantificados, suas concentrações podem ser indicativas de qualidade e bioacumulação de seus princípios ativos no mel.

A porcentagem de amostras contaminadas, valores máximos em concentração e a média para cada época comparadas ao preconizado na legislação, pode ser verificada na tabela 2.

Tabela 2. Pesticidas detectados em amostras de mel de *Apis mellifera* no Paraná, Br.

Pesticida	Classe	D ¹	N ²	%	Detecções (ppb) Época 1						
					Máx	Mín	5Perc	95Perc	Média	EPM ³	LP ⁴
Etop	Orgfos	11	41	26,83	262,09	0,00	0,0	146,48	41,17	11,47	NI
Met par	Orgfos	18	41	43,90	263,08	0,00	0,0	247,00	107,44	19,21	20
Ron fenc	Orgfos	24	41	58,54	38,25	0,00	0,0	0,36	19,06	2,65	NI
Chlorp	Orgfos	2	41	4,88	181,41	0,00	0,0	0,0	8,46	5,91	20
DDE	Orgclor	4	41	9,76	94,00	0,00	0,0	0,51	2,64	2,30	10
Mitot	Orgclor	5	41	12,20	317,40	0,00	0,0	43,72	13,77	8,67	NI
Bicyc	Orgclor	10	41	24,39	181,69	0,00	0,0	21,58	7,67	4,85	NI

Pesticida	Classe	D ¹	N ²	%	Detecções (ppb) Época 2						
					Máx	Mín	5Perc	95Perc	Média	EPM ³	LP ⁴
Etop	Orgfos	4	45	8,89	260,64	0,00	0,0	122,84	14,16	7,33	NI
Met par	Orgfos	11	45	24,44	266,20	0,00	0,0	250,70	55,65	15,46	20
Ron fenc	Orgfos	9	45	20,0	39,50	0,00	0,0	35,22	6,84	2,06	NI
Chlorp	Orgfos	1	45	2,22	162,20	0,00	0,0	0,00	3,60	3,60	20
DDE	Orgclor	2	45	4,44	12,01	0,00	0,0	0,00	0,39	0,29	10
Mitot	Orgclor	1	45	2,22	3,39	0,00	0,0	0,0	0,08	0,08	NI
Bicyc	Orgclor	1	45	2,22	14,80	0,00	0,0	0,0	0,33	0,33	NI

¹D – detecção; ²N – número de amostras analisadas; ³EPM – erro padrão da média; ⁴LP – limite máximo de concentração preconizado pela legislação brasileira.

Para Etoprofós, Ronnel Fenclorfós, Mitotane e Bicyclo [2.2.1], de acordo com a legislação atual, não existem limites específicos de resíduos para estes pesticidas em mel, tais concentrações podem estar em níveis críticos de contaminação, mas a fiscalização fica restringida sem base legal para monitoramento.

Para Etoprofós, encontrado em 26,86% e 8,88% das amostras para as épocas 1 e 2 respectivamente em concentrações de 41,17 e 14,14 ppb, revela a presença deste pesticida no ambiente, sabendo que o mesmo tem período de carência no ambiente de 3 dias e é aplicado diretamente no solo para controle de nematoides e insetos, e seu uso é liberado no cultivo de banana (LONDRES, 2011), a persistência no ambiente e acumulação nos vegetais visitados pelas abelhas é preocupante e pode causar danos às outras culturas e ao ser humano.

Ronnel Fenclorfós foi encontrado em 58,53% e 20% das amostras para as épocas 1 e 2 respectivamente. No entanto, foi proibido para agricultura desde 2010, nas culturas de soja, milho e outras (BRASIL, 2010), sendo permitido para o controle de insetos e pragas em áreas urbanas, seu uso indiscriminado e permanência nos diversos ambientes às quais as abelhas tem contato, revela o grau de contaminação das áreas de entorno do apiário, levando em conta que a região é formada por pequenas propriedades e que os apiários se encontram em áreas atualmente povoadas.

Ainda, para Mitotane e Bicyclo [2.2.1], compostos utilizados na produção de medicamentos de uso veterinário com fins bactericidas (PRIYANKA, 2015), não se tem dados de concentrações e limites de resíduos em alimentos e sua presença no mel podem estar relacionadas à visitas que as abelhas tenham feito em alimentos fornecidos aos animais criados na região, como silagem servidas no cocho para vacas leiteiras, bastante comum na região. Esse material é rico em açúcares e muitas vezes é utilizado como fonte de alimento pelas abelhas.

Assim, torna-se necessário estipular parâmetros de qualidade para estas substâncias como tempo de carência, potencial de acumulação em mel e outros alimentos, para que seja eficaz no controle de doenças, mas não gere passivos ambientais, tais como resíduos tóxicos em alimentos.

De acordo com Prates (2011) e Cosmann (2012) os maiores índices de contaminação e óbitos no Brasil por agrotóxicos estão relacionados aos inseticidas organofosforados, tais como Etoprofós, Paration Metílico, Ronnel Fenclorfós e Chlorpirifos utilizados na pesquisa.

Os resultados máximos em concentração de Paration Metílico encontrado em amostras de mel foram de 266 ug.kg, em ambas as épocas, a média independente de apiário foram encontrados 107,44 ug.kg na época 1 e 55,65 ug.kg na época 2 (Tabela 3). De acordo com o PNCRB (2008), o limite máximo de referência (LMR) no mel pode chegar a 20 ug.kg, valores bem acima do Limite Máximo Permitido, indicando a utilização excessiva desse agrotóxico nas culturas de soja e milho da região e, conseqüentemente contaminação do mel.

Tanto o Paration Metílico como o Etoprofós não são autorizados para as culturas de repolho, uva, mandioca, tomate, abobrinha, laranja, banana, maçã e pepino (BRASIL, 2009), porém, por serem utilizados na soja e milho, acabam contaminando outros alimentos de consumo direto como o mel, entre outros.

O resultado máximo em concentração de Clorpirifós encontrado em amostras de mel foi de 181 ug.kg em ambas as épocas e em média independente de apiário foi encontrado 8,46 ug.kg na época 1 e 3,60 ug.kg na época 2. Conforme o PNCRB (2008), o limite máximo de referência (LMR) no mel é igual a 20 ug.kg, sendo assim, existem valores bem acima do Limite Máximo Permitido, indicando que o mel desta região apresentou altos índices de contaminação ambiental.

Neste sentido, níveis acima do permitido para Clorpirifós no mel, provém das culturas agrícolas de entorno do apiário, que podem estar com níveis também acima do permitido para cada cultura. A fonte de contaminação do mel pode ser a flora de entorno dos apiários ou a aplicação direta nas caixas de abelha, uma vez que os procedimentos de extração e armazenamento foram controlados.

Em relação a concentração dos pesticidas por épocas, houve efeito significativo de época ($p < 0,05$) sobre o FENC, CHLORP, MITOT e BICYC (Tabela 3). Observou-se que a concentração média de FENC, CHLORP, MITOT e BICYC de méis de *A. mellifera* coletados de setembro a novembro de 2013 foi maior ($p < 0,05$) do que a incidência

observada em amostras de mel coletadas de dezembro de 2013 a janeiro de 2014 (Tabela 3).

Tabela 3. Médias observadas e desvios-padrão (entre parênteses) de Etoprophos (ETOP), Paration Metílico (METPAR), Fenchlorphos (FENC), Chlorpyrifos (CHLORP), DDE, Mitotane (MITOT) e Bicyclo[2.2.1] (BICYC) de acordo com as classes de época (E) de coleta de mel, independente de apiário⁽¹⁾.

Época	ETOP	METPAR	FENC	CHLORP	DDE	MITOT	BICYC
1	41,2 ^a (73,4)	107,4 ^a (123,0)	19,1 ^a (17,0)	8,46 ^a (37,9)	2,64 ^a (14,8)	13,8 ^a (55,5)	7,67 ^a (31,0)
2	14,2 ^a (49,1)	55,7 ^a (103,7)	6,84 ^b (13,9)	3,60 ^b (24,2)	0,39 ^a (1,96)	0,08 ^b (0,51)	0,33 ^b (2,20)

⁽¹⁾Época 1: setembro a novembro de 2013; ⁽²⁾Época 2: dezembro de 2013 a janeiro de 2014; Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste da diferença de *lsmeans*, em nível de 5% de probabilidade; $p \geq \chi^2_{(ETOP)} = 0,1156$; $p \geq \chi^2_{(METPAR)} = 0,0634$.

As concentrações obtidas de FENC foram de 19,1% (setembro a novembro de 2013) e de 6,84% (dezembro de 2013 a janeiro de 2014). As concentrações obtidas de CHLORP foram de 8,46% (setembro a novembro de 2013) e de 3,60% (dezembro de 2013 a janeiro de 2014). As concentrações obtidas de MITOT foram de 13,8% (setembro a novembro de 2013) e de 0,08% (dezembro de 2013 a janeiro de 2014). As concentrações obtidas de BICYC foram de 7,67% (setembro a novembro de 2013) e de 3,60% (dezembro de 2013 a janeiro de 2014).

Na época 1 (setembro a novembro de 2013) como já mencionado, foi o período de intenso plantio de soja nesta região até fim de setembro, passados o período de emergência, necessita-se aplicação de inseticidas para controle de pragas. No entanto, sabendo que FENC foi proibido para agricultura desde 2010 (BRASIL, 2010), permitido apenas no controle de insetos e pragas em áreas urbanas, que MITOT e BICYC são compostos utilizados na produção de bactericidas (PRIYANKA, 2015), e que Clorpirifós é permitido para cultura de soja e milho, sendo que foi o inseticida mais vendido nos anos de 2012, sua concentração tem referência direta de sua aplicação e presença no mel no período de setembro a novembro 2013.

Ainda, a concentração de ETOP, METPAR e DDE, constante nas duas épocas de estudo, revela sua permanência no ambiente de estudo, considerando que seu uso é destinado para o controle de nematoides e insetos nas culturas de soja, milho e pastagens (LONDRES, 2011; BRASIL, 2014 e ATDSR, 2002).

Em relação a porcentagem de incidência dos pesticidas nas amostras, não houve efeito significativo entre as épocas ($p>0,05$) de Etoprophos e Paration Metílico (Tabela 4); Chlorpirifos (Tabela 5); DDE e MITOT (Tabela 6).

Tabela 4. Comparação entre proporções e intervalos de confiança (IC) da incidência de pesticidas em amostras de mel de *Apis mellifera*, de acordo com a época de coleta⁽¹⁾

Época	Etoprophos (ETOP)			Paration Metílico (METPAR)		
	x/n	Proporção	IC (95%)	x/n	Proporção	IC (95%)
1	11/41	26,83 ^a	[14,22;42,94]	18/41	43,90 ^a	[28,47;60,25]
2	4/45	8,89 ^a	[2,48;21,22]	11/45	24,44 ^a	[12,88;39,54]

⁽¹⁾Época 1: setembro a novembro de 2013; Época 2: dezembro de 2013 a janeiro de 2014; x: número de fracassos; n: tamanho amostral; Proporções seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste da diferença de *lsmeans*, em nível de 5% de probabilidade; $p \geq \chi^2_{(METPAR)} = 0,0960$.

Tabela 5. Comparação entre proporções e intervalos de confiança (IC) da incidência de pesticidas em amostras de mel de *Apis mellifera*, de acordo com a época de coleta⁽¹⁾

Época	Clorpirifós (CLORP)		
	x/n	Proporção	IC (95%)
1	2/41	4,88 ^a	[0,60;16,53]
2	1/45	2,22 ^a	[0,056;11,77]

⁽¹⁾Época 1: setembro a novembro de 2013; Época 2: dezembro de 2013 a janeiro de 2014; x: número de fracassos; n: tamanho amostral; Proporções seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste da diferença de *lsmeans*, em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6. Comparação entre proporções e intervalos de confiança (IC) da incidência de pesticidas em amostras de mel de *Apis mellifera*, de acordo com a época de coleta⁽¹⁾

Época	DDE	Mitotane (MITOT)
-------	-----	------------------

	x/n	Proporção	IC (95%)	x/n	Proporção	IC (95%)
1	4/41	9,76 ^a	[2,72;23,13]	5/41	12,20 ^a	[4,08;26,20]
2	1/45	2,22 ^a	[0,056;11,77]	1/45	2,22 ^a	[0,056;11,77]

⁽¹⁾Época 1: setembro a novembro de 2013; Época 2: dezembro de 2013 a janeiro de 2014; x: número de fracassos; n: tamanho amostral; Proporções seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste da diferença de *lsmeans*, em nível de 5% de probabilidade; $p \geq \chi^2(\text{MITOT})=0,0626$.

A diferença entre as épocas para estes pesticidas não foi significativa a 5% de significância. No entanto, verifica-se que para ambos os analitos, existiu um maior número de amostras contaminadas na primeira época (setembro a novembro de 2013) e sua constância uso e permanência no ambiente é verificada pela indiferença entre as épocas.

Entretanto, para os pesticidas FENC e BICYC, observou-se efeito significativo de época a ($p < 0,05$), a proporção de FENC e BICYC em méis de *Apis mellifera* coletados de setembro a novembro de 2013 foi maior ($p < 0,05$) do que a incidência de FENC e BICYC observada em amostras de mel coletadas de dezembro de 2013 a janeiro de 2014 (Tabelas 7).

Tabela 7. Comparação entre proporções e intervalos de confiança (IC) da incidência de pesticidas em amostras de mel de *Apis mellifera*, de acordo com a época de coleta⁽¹⁾

Época	Fenchlorphos			BICYC		
	x/n	Proporção	IC (95%)	x/n	Proporção	IC (95%)
1	24/41	58,54 ^a	[42,11;73,68]	10/41	24,39 ^a	[12,36;40,30]
2	9/45	20,00 ^b	[9,58;34,60]	1/45	2,22 ^b	[0,056;11,77]

⁽¹⁾Época 1: setembro a novembro de 2013; Época 2: dezembro de 2013 a janeiro de 2014; x: número de fracassos; n: tamanho amostral; Proporções seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste da diferença de *lsmeans*, em nível de 5% de probabilidade

As proporções obtidas para FENC foram de 58,54% (setembro a novembro de 2013) e de 20,00% (dezembro de 2013 a janeiro de 2014) e para BICYC as proporções obtidas foram de 24,39% (setembro a novembro de 2013) e de 2,22% (dezembro de 2013

a janeiro de 2014), revelam o uso de produtos a base destes compostos prioritariamente na época 1.

Estes compostos são utilizados prioritariamente na formulação de produtos destinados ao controle de pragas urbanas, aplicados em porta iscas ou formulados em medicamentos de uso veterinário (BRASIL, 2010; PRIYANKA, 2015).

Em relação as amostras contaminadas com princípios ativo em limites acima do preconizado na legislação, não houve efeito significativo de época ($p>0,05$) sobre a ocorrência de amostras de mel de *A. mellifera* com concentração de METPAR, CHLORP e DDE fora da legislação vigente (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Comparação entre proporções e intervalos de confiança (IC) da ocorrência de amostras de mel de *Apis mellifera* com concentração de Paration metil e Chlorpyrifos fora da legislação vigente, de acordo com a época de coleta⁽¹⁾

Época	Paration Metílico (METPAR)			Chlorpyrifos (CHLORP)		
	x/n	Proporção	IC (95%)	x/n	Proporção	IC (95%)
1	18/41	43,90 ^a	[28,47;60,25]	2/41	4,88 ^a	[0,60;16,53]
2	11/45	24,44 ^a	[12,88;39,54]	1/45	2,22 ^a	[0,056;11,77]

⁽¹⁾Época 1: setembro a novembro de 2013; Época 2: dezembro de 2013 a janeiro de 2014; x: número de fracassos; n: tamanho amostral; Proporções seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste da diferença de *lsmeans*, em nível de 5% de probabilidade; $p \geq \chi^2_{(METPAR)} = 0,0960$.

Tabela 9. Comparação entre proporções e intervalos de confiança (IC) da ocorrência de amostras de mel de *Apis mellifera* com concentração de DDE fora da legislação vigente, de acordo com a época de coleta⁽¹⁾

Época	DDE		
	x/n	Proporção	IC (95%)
1	2/41	4,88 ^a	[0,60;16,53]
2	1/45	2,22 ^a	[0,056;11,77]

⁽¹⁾Época 1: setembro a novembro de 2013; Época 2: dezembro de 2013 a janeiro de 2014; x: número de fracassos; n: tamanho amostral; Proporções seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste da diferença de *lsmeans*, em nível de 5% de probabilidade.

Porém, observou-se um maior valor numérico para as proporções de METPAR, CHLORP e DDE nas amostras de méis de *Apis mellifera* coletadas de setembro a novembro de 2013 do que nas respectivas proporções de METPAR, CHLORP e DDE observadas em amostras de mel coletadas de dezembro de 2013 a janeiro de 2014 (Tabelas 8 e 9). Esses resultados mostraram que o teste aplicado não foi sensível o suficiente para detectar diferenças significativas, talvez pelo tamanho amostral utilizado neste estudo.

Pode-se observar que 43,90% das amostras de mel coletadas em setembro a novembro de 2013 e 24,44% das amostras coletadas de dezembro a janeiro de 2014 apresentaram ocorrência de METPAR acima do preconizado pela legislação, e 4,88% das amostras de mel coletadas em setembro a novembro de 2013 e 2,22% das amostras coletadas de dezembro a janeiro de 2014 apresentaram ocorrência de CHLORP acima do preconizado pela legislação. Com isso, sugere-se que estes ingredientes ativos formulados nos agroquímicos, são utilizados em concentrações mais elevadas, o número de aplicações sugeridas não é respeitado, bem o tempo de carência destes princípios ativos no ambiente não esteja em conformidade com seu registro.

Na análise de correlação de *Pearson* para amostras de mel coletadas entre setembro a novembro de 2013, constatou-se que os graus de associação de maior magnitude ocorreram entre MIT e BIC ($r = 0,997$), AM e AA ($r = -0,79$) e AA e AAG ($r = -0,76$). Todas as estimativas listadas apresentaram-se significativas ($p \leq 0,001$), indicando que foram válidas para estimar os respectivos coeficientes de correlação populacional. Para outros pares de características (AM e ETOP ($r=0,43$), AAG e MITOT ($r=0,31$), AAG e BIC ($r=0,31$), DDE e MITOT ($r=0,43$), e DDE e BIC ($r=0,40$)), também foi observada correlação significativa ($p \leq 0,01$) (Tabela 10).

Tabela 10. Estimativas dos coeficientes de correlação de *Pearson* entre pares de características, em amostras de mel coletadas de setembro a novembro de 2013⁽¹⁾

AM	***	p=0,08	**	*	NS	S	NS	NS	S	S
-0,79	AA	S	**	NS	S	S	NS	NS	S	S
0,28	-0,11	AED	p=0,051	NS	S	S	p=0,09	NS	S	S
0,49	-0,76	-0,31	AAG	NS	S	S	NS	NS	*	*

0,43	-0,26	-0,12	0,08	ETOP	S	S	NS	=0,07	S	S
0,01	-0,11	0,16	0,08	-0,04	MP	NS	NS	NS	S	S
0,12	0,05	0,04	-0,0002	-0,22	0,11	FENC	NS	NS	S	S
0,11	-0,001	0,27	-0,10	-0,13	0,25	0,25	CHL	NS	S	S
0,02	0,02	-0,05	-0,007	0,29	0,16	-0,16	-0,04	DDE	*	*
0,14	-0,21	-0,13	0,31	0,006	0,19	0,05	-0,06	0,43	MIT	**
0,11	-0,20	-0,12	0,31	-0,004	0,20	0,07	-0,06	0,40	0,997	BIC

⁽¹⁾ n = 41 pares de observações; AM: área de mata; AA: área agrícola; AED: área de edificações; AAG: área de água; ETOP: Etoprophos; MP: Paration Metil; FENC: Fenchlorphos; CHL: Chlorpyrifos; MIT: Mitotane; BIC: Bicyclo[2.2.1]; Códigos de significância: * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001; ^{NS} p>0,05.

A correlação significativa entre Mitotane (MIT) e Bicyc (BIC) a 0,997 para o período de setembro a novembro de 2013, sabendo que são princípios ativos de medicamentos de uso veterinário, revelam o uso destes compostos nas áreas de estudo e devido suas características hidrossolúveis, e tem referência às áreas AAG (0,31).

Na análise de correlação de *Pearson* para amostras de mel coletadas de dezembro de 2013 a janeiro de 2014, constatou-se que os graus de associação de maior magnitude ocorreram entre AM e AAG (r = 0,51), AM e AA (r = -0,80). Todas as estimativas listadas apresentaram-se significativas (p≤0,001), indicando que foram válidas para estimar os respectivos coeficientes de correlação populacional. Para outros pares de características (AM e AAG (r=0,51), AM e BIC (r=0,33), AED e MIT (r=0,29), AAG e CHL (r=0,33), AAG e DDE (r=0,27), ETOP e MIT (r=0,37), FENC e CHL (r=0,32)), também foi observada correlação significativa (p≤0,01) (Tabela 11).

Tabela 11. Estimativas dos coeficientes de correlação de *Pearson* entre pares de características, em amostras de mel coletadas de dezembro de 2013 a janeiro de 2014⁽¹⁾

AM	**	=0,09	**	S	S	S	NS	NS	NS	*
-0,80	AA	NS	**	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS
-0,25	0,13	AED	=0,06	NS	S	=0,08	NS	NS	*	NS
0,51	0,77	-0,28	AAG	S	NS	NS	*	p=0,08	NS	NS

0,04	0,07	0,02	-0,18	ETOP	NS	NS	NS	NS	*	NS
-0,08	0,16	-0,10	-0,10	0,16	MP	NS	NS	NS	p=0,06	NS
0,03	-0,22	0,26	0,14	0,15	-0,02	FENC	*	NS	NS	NS
0,12	-0,22	-0,10	0,33	-0,04	-0,08	0,32	CHL	NS	NS	NS
-0,07	-0,08	-0,06	0,27	-0,06	0,25	-0,10	-0,03	DDE	NS	NS
-0,12	0,001	0,29	-0,10	0,37	0,28	-0,08	-0,02	-0,03	MIT	NS
0,33	-0,24	-0,10	0,14	-0,04	-0,08	-0,08	-0,02	-0,03	-0,02	BIC

⁽¹⁾ n = 45 pares de observações; AM: área de mata; AA: área agrícola; AED: área de edificações; AAG: área de água; ETOP: Etoprophos; MP: Paration Metil; FENC: Fenchlorphos; CHL: Chlorpyrifos; MIT: Mitotane; BIC: Bicyclo[2.2.1]; Códigos de significância: * p≤0,05; ** p≤0,01; *** p≤0,001; ^{NS} p>0,05.

Para a época de dezembro de 2013 a janeiro de 2014, não houve fortes correlações entre as variáveis que justificam sua similaridade em função da semelhança entre o uso e ocupação do solo nas áreas e presença de pesticidas nas áreas de estudo.

Na análise multivariada de agrupamento, considerando a distância euclidiana com o medida de dissimilaridade a partir dos dados normalizados, relacionando a concentração de pesticidas e áreas em cada época, para ajuste e determinação do número ótimo de agrupamentos para a época de setembro a novembro de 2013, foi analisado a maior largura a média da silhueta entre as barras $k= 2/n$ com uma média da largura de silhueta de $0.59/n$.

Neste sentido formaram-se dois grupos para época de setembro a novembro de 2013 (figura 4 e 5). O grupo 1, formado por 13 apiários (1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15); e o grupo 2, formado por 2 apiários (2 e 6).

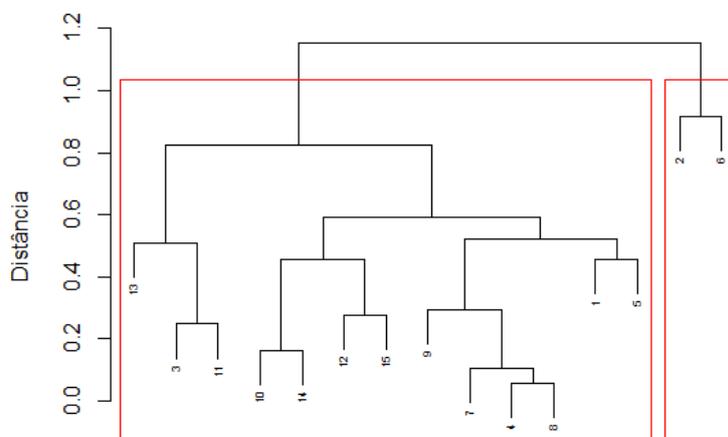


Figura 4. Dendrograma baseado na distância euclidiana e método de agrupamento por UPGMA para época 1 (Setembro a novembro de 2013). Correlação cofenética de 0,91.

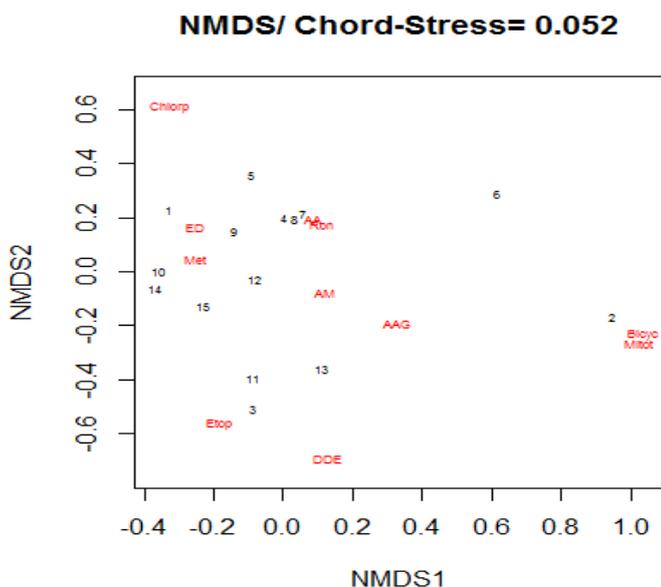


Figura 5. NMDS da matriz de distância de Chord transformada para os dados da Época 1 (Setembro a novembro de 2013).

A similaridade entre as variáveis para o grupo 1 na época de setembro a novembro de 2013, agrupa-os e não justificam-se valores que permitem caracterizar sua influência específica no estudo. No entanto a incidência dos princípios ativos BICYC e MITOT nestas áreas de estudo não é comum a todos os apiários.

Para o grupo 2, formado pelos apiário (2 e 6) e pesticidas BICYC e MITOT, a variável mais relevante para formação do grupo foi a presença dos pesticidas BICYC e MITOT, em concentrações médias de 60,56 ppb e 105,8 ppb respectivamente, no apiário 2 e 10,79 ppb e 21,86 ppb respectivamente, no apiário 6. Estes apiários estão localizados em diferentes regiões na área de estudo (Figura 1), com uso e ocupação do solo em proporções diferentes (Figura 2), mas a presença destes compostos em ambas as áreas, revelam a contaminação do mel mais acentuada e generalizada para a época de setembro a novembro de 2013. No entanto, para ambos os princípios ativos não existe um limite

máximo de resíduos no mel preconizados pela legislação, podendo estar em concentrações que tragam risco à saúde das abelhas e do ser humano.

Para a época 2 (novembro de 2013 a janeiro de 2014), para ajuste e determinação do número ótimo de agrupamentos para a época de dezembro de 2013 a janeiro 2014, foi analisado a maior largura média da silhueta entre as barras $k=2/n$ com uma média da largura de silhueta de $0.45/n$.

Assim, na análise multivariada de agrupamento, considerando a distância euclidiana como medida de dissimilaridade a partir dos dados normalizados, relacionando a concentração de pesticidas e áreas em cada época, formaram-se três grupos para época de dezembro de 2013 a janeiro 2014. O grupo 1, formado por 8 apiários (11, 12, 3, 10, 4, 6, 7, 5); grupo 2, formado por 5 apiários (1, 9, 13, 8, 15) e grupo 3, formado por 2 apiários (2, 14) (figura 6 e 7).

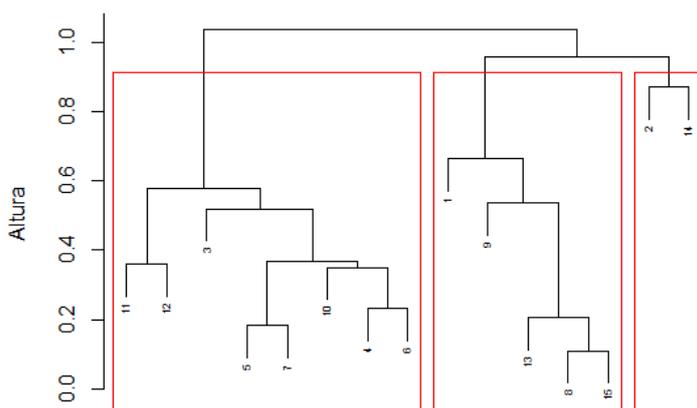


Figura 6. Dendrograma baseado na distância euclidiana e método de agrupamento por UPGMA para época 2 (Novembro de 2013 a Janeiro de 2014). Correlação cofenética de 0,93.

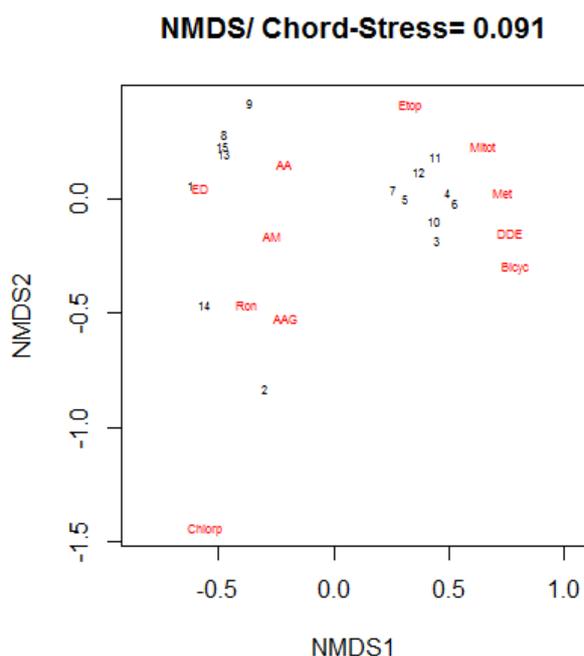


Figura 11. NMDS da matriz de distância de Chord transformada para os dados da Época 2 (Dezembro de 2013 a Janeiro de 2014).

A similaridade entre as avariáveis para formação dos grupos, de um modo geral foi direcionada pelo uso e ocupação do solo, uma vez que as concentrações de pesticidas para época de dezembro de 2013 a janeiro de 2014 foram menores que as concentrações de setembro a novembro de 2013.

Para o grupo 1, formado por 8 apiários (3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12), a presença do pesticida METPAR em todos os apiários e em concentrações acima de 80 ppb e porcentagem de área agrícola acima de 50% na maior parte da região de estudo, foram determinante para formação do grupo.

Para o grupo 2, formado por 5 apiários (1, 8, 9, 13, 15), a relação direta de uso e ocupação do solo com aproximadamente 20% das áreas cobertas com área de mata e mesmo que área agrícola em torno de 60% da área, não houve contaminação com METPAR, CLORP, DDE, MITOT E BICYC. Apenas o apiário 9 com amostras contaminadas com ETOP e o apiário 1 com FENC.

Para o grupo 3, formado por 2 apiários (2, 14), a similaridade entre as áreas de mata, acima de 30%, área agrícola menor que 30% e área de água acima de 20%, com ausência dos pesticidas ETOP, METPAR, DDE, MITOT e BICYC.

6 CONCLUSÃO

Foram detectados os pesticidas Etoprophos, Paration Metílico, Fenchlorphos, Chlorpyrifos, p.p`-DDE, Mitotane, Bicyclo[2.2.1] nas amostras de mel de *Apis mellifera* da área de estudo no município de Santa Helena, Paraná.

Significativamente, houve maior contaminação das amostras na época de setembro a novembro de 2013 em comparação com a época de novembro de 2013 a janeiro de 2014.

Em relação ao uso e ocupação do solo, foram classificadas as porcentagens de área agrícola, área de mata, área de água e área com edificações em torno de cada apiário. No entanto, não houve correlação significativa de amostras de mel contaminadas em função de área agrícola e área de mata, potenciais espaços para obtenção de alimento para as abelhas, pois existe uma grande similaridade entre os apiários.

Foram identificadas nas amostras de mel, concentrações acima do preconizado na legislação para Paration Metílico, Clorpirifós e DDE, fazendo referência ao uso abusivo de pesticidas nas áreas agrícolas e demais fontes de alimento para as abelhas. Ainda, a presença de Mitotane, Bicyclo[2.2.1] nas amostras, revela outras fontes de contaminação além dos agrotóxicos pulverizados na agricultura, pois estes princípios ativos estão presentes em medicamentos e produtos químicos utilizados na agropecuária

A identificação de Etoprophos, Paration Metílico, Fenchlorphos, Chlorpyrifos, p.p`-DDE, Mitotane, Bicyclo[2.2.1], nas amostras de mel, é um indicativo de contaminação não apenas do produto das abelhas como do ambiente de entorno dos apiários na região de estudo. Assim, as abelhas *A. mellifera* são consideradas insetos bioindicador de qualidade ambiental.

Por fim, a identificação de pesticidas nas amostras de mel, coletadas de setembro 2013 à janeiro de 2014, revelam que este produto foi contaminado nas diferentes épocas, principalmente por Paration Metílico e Clorpirifós, e que a qualidade do mel fica

comprometida pela presença destes agentes contaminantes, haja visto que houve a presença de todos os padrões estudados e sugere-se novos trabalhos na identificação de outros compostos que podem estar presente mas não foram alvo desta pesquisa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de Paration Metílico e Clorpirifós na agricultura de acordo com os agricultores tem sido substituído por novos compostos de menor impacto no ambiente. No entanto, sua presença no mel das diferentes áreas de estudo, em concentrações acima do preconizado pela legislação, alerta para que a monitoria destes compostos nesta região seja realizada de forma mais intensa, verificando seu tempo de carência não apenas nos vegetais, no solo e água, como nos alimentos, principalmente o mel desta região.

Novos trabalhos devem ser realizados, buscando relacionar de forma direta o uso de pesticidas formulados, a recuperação dos princípios ativos e a presença no mel. A escolha dos padrões de pesticidas deve ser estipulada de acordo com os produtos que são utilizados na região atualmente e aqueles legalmente proibidos, e assim buscar resultados mais conclusivos com a aplicação para cada cultura. Ainda, áreas reflorestadas com espécies de interesse apícola nesta região contribuem para a qualidade e disponibilidade de alimento abelhas. Porém, as árvores e plantas das Áreas de Preservação Permanente e mesmo de Reservas Legais, têm sido contaminadas com os mesmos pesticidas utilizados na agricultura, uma vez que acabam constituindo uma barreira física, que retém esses pesticidas, sendo fontes perenes de contaminação do mel.

8 REFERÊNCIAS

ABEMEL – Associação brasileira de exportadores de mel. Exportação brasileira de mel natural – 2011 A 2015. Disponível em: http://brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_dezembro_2015.pdf. Acesso em: 06/02/2016.

ABRASCO. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

ADAMA, Ficha de informação de segurança de produtos químicos, PIRITILEN. 2014. Disponível em: http://www.adama.com/brasil/pt/Images/Acert_Rev01_tcm14-44652.pdf. Acesso em: 25/10/2014.

ADAPAR–Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Parecer técnico.2015. Disponível em: http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/FOLISUPER_600_BR.pdf

ALMEIDA C.M.V.B. Detecção de contaminantes no mel. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar. **Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária**), Lisboa, 2010.

Anais da Academia Brasileira de Ciências v.2, n.86, 2014. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652014000200955

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for 4,4-DDT, 4,4-DDE, and 4,4-DDD. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 2002. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp35.pdf>. Acesso em: 20/07/2015.

BASTOS, L.H.P.; GOUVÊA, A.V.; ORTIZ, N.D. et al.. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos da classe dos organofosforados por cgdgc em amostras de leite fluído e em pó. **Quim. Nova**, v. 38, n.2, p.178-184, 2015.

BENDINI, A.; CERRETANI, L.; SALVADOR, M.D. et al.. Stability of the sensory quality of virgin oil during storage: an overview. **Italian Journal of Food Science**, v. 21, n. 12, p. 389-406, 2009.

BEZERRA, S. S. D. Desenvolvimento de método analítico para determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas *Apis Mellifera*. Dissertação (**Mestrado em Química. Universidade Federal de Sergipe**), São Cristóvão, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 26, de 8 de outubro de 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Produção Integrada de Banana, ciclo 2005/2006. 2006. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/grade.pdf, Acesso em 12/10/2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 62, de 19 de julho de 2001, D.O.U de 23/07/2001. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[2853-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[2853-1-0].PDF). Acesso em 25/10/2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 45, de 7 de junho de 2005. D.O.U de 09/06/2005. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B10618-1-0%5D.PDF>. Acesso em: 15 de outubro de 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9d08ac00474594869c18dc3fbc4c6735/f04.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 16 de fevereiro de 2016.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012. Brasília, outubro de 2014.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008. Brasília, 15 de abril de 2009.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório complementar relativo à segunda etapa das análises de amostras coletadas em 2012. Brasília, outubro de 2014.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 9.974, de 6 de junho de 2000. b

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 42, de 16 de dezembro de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial, Brasília, p. 16-17, 23 out. 2000. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de identidade e qualidade do mel.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA/MAPA 50/2006. PORTARIA Nº 50, DE 20 DE FEVEREIRO DE 2006. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/PORTARIA%2050-2006.pdf.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa nº 9, de 30 de março de 2007.

BRASIL. SISCOMEX. In: Perfil Nacional da Gestão de Substâncias Químicas. Comissão Nacional de Segurança Química – CONASQ. 2008. Disponível em: <http://www.opas.org.br/sausedotrabalhador/Arquivos/Sala248.pdf>.

BRAUNER, M.C.C.; GRAFF, L. Segurança alimentar e produção agrícola: reflexões sob a ótica da justiça ambiental. **Veredas do Direito**. v.12, n. 24, p.375-400, 2015.

BROWN, P. M.; TURNBULL, G.; CHARMAN, S. et al.. Analytical Methods Used in the United Kingdom Wildlife Incident Investigation Scheme for the Detection of Animal Poisoning by Pesticides. **Journal of AOAC International**. v.88, n.1, p.204-220, 2005.

CAMARGO, S. C.; GARCIA, R.C.; FEIDEN, A. et al. Implementation of a geographic information system (GIS) for the planning of beekeeping in the west region of Paraná.

CARNEIRO, F.F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R.M. et al.. Dossiê ABRASCO – **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

CBA – Confederação Brasileira de Apicultura. Mortandade disseminada das abelhas devido ao uso de agrotóxicos, 2013.

CHIARI, W.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; ARIAS, C.A. et al.. Floral Biology and Africanized Honeybee Behaviour in Transgenic (Roundup Ready™ var. BR-245 RR) and Conventional (var. BRS-133) Soybean (Glycine max L. Merrill) Flowers. **Agricultural and Biological Sciences**, DOI: 10.5772/55847, 2013

CODEX ALIMENTARIUS. Guide to Codex Maximum Residue Limits Pesticides and Extraneous Maximum Residue Limits Adopted by the Codex Alimentarius Commission 22nd Session. Food and Agriculture of United Nations, 2007.

COSMANN, N.J.; DRUNKLER, D.A. Agrotóxicos utilizados nas culturas de milho e soja em Cascavel-PR, **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**. v.2, n.6, p.15-32, 2012. Disponível em: <http://revista.md.utfpr.edu.br/ojs/index.php/IT/article/view/97>. Acesso em: 15/10/2015.

DESNEUX, N., DECOURTYE, A., DELPUECH, J. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Entomology**. v.52, p.81–106, 2007.

EASTON, A.H.; GOULSON, D. The Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid Repels Pollinating Flies and Beetles at Field-Realistic Concentrations. **PLoS ONE**, v.8, n.1, p. e54819.

EMBRAPA, Tecnologias de produção de soja; Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja: 2014. 268p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 16).

EPA – United States Hazard Summary-Created in April 1992; Revised in January 2000. Disponível em: <http://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/dde.html>. Acesso em: 13 agosto de 2014.

HENRY ML, BEGUIN M, REQUIER F. et al. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**. v.336, Issue 6079, p.348-350, 2012.

HERRERA, A.; PÉREZ-ARQUILLUÉ, C.; CONCHELLO, P. et al.. Determination of pesticides and PCBs in honey by solidphase extraction cleanup followed by gas chromatography electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.3, n.381, p.695 – 701, 2005

IBGE. Produção de mel no período de 01.01 a 31.12, segundo as Grandes Regiões e as Unidades da Federação – 2012. Disponível em: http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/tabelas_pdf/tab08.pdf. Acesso em: 02/01/2016.

KLUSER, S., NEUMANN, P., CHAUZAT, M.P. et al.. **Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators**. 2010.

KOLBERG, D.I.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B. et al.. Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC–MS. **Food Chemistry**, v.125, n.4, p.1436–1442, 2011.

KÖPPEN, W. Climatologia. **Com um estúdio de los climas de la tierra**. México. FCE. 1948.

KRUPKE, C H. HUNT, G.J.; EITZER, B.D. et al.. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS one**, v.7, n.1, p.229-268, 2012.

KUJAWSKI, M. W.; NAMIESNIK, J. Challenges in preparing haney samples for chromatographic determination and trace residues. **Trens in Analytical Chemistry**, v.27, p.785-793, 2008.

LEBUHN, G.; DROEGE, S.; CONNOR, E.F., et al.. Detecting insect pollinator declines on regional and global scales. **Conservation Biology**, v. 27, n. 1, p. 113-120, 2013.

LINDSEY, L.L.L. **Gender rolesa sociological perspective**. 1997.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p. : 1ª edição. Acesso em: <http://www4.planalto.gov.br/consea/biblioteca/documentos/agrotoxicos-no-brasil.-um-guia-para-acao-em-defesa-da-vida>. acesso em: 12/09/2015.

MAACK R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 3a ed., Curitiba: Imprensa Oficial do Paraná, 2012, 440 p.

MALASPINA, O.; NOVELLI, R.C.F.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; et al.. Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, n.18, 2010. Cuiabá. Anais. Mato Grosso, 2010. 5 p.

MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; TEIXEIRA, E.W et al.. Plantas visitadas por abelhas africanizadas em duas localidades do estado de São Paulo. **Scientia Agrícola**, v.58, p.413-420, 2001.

- MARCHINI, L.C.; SODRÉ, S.G.; MORETI, A.C.C.C. **Mel brasileiro: composição e normas**. AS Pinto, 2004. p.
- MCCULLAGH, P.; NELDER, J.A. **Generalized linear models**. CRC press, 1989.
- MORAES F.J.; GARCIA R.C.; VASCONCELOS E.D. et al.l. **Caracterização palinológica de amostras mel de abelha africanizada dos municípios de santa helena e terra roxa (pr)**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia. **Universidade Estadual do oeste do Paraná**, Marechal Cândido Rondon, 2009.
- MÜLLER, A.C.; ZELAZOWSKI, V.H. Reflorestamento ecológico da faixa de proteção do reservatório de Itaipu-ME. **Anais do Simpósio sobre Mata Ciliar**, p. 213-232, 1989.
- MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS ONE**, v.5, n.3, p. e9754, 2010.
- NOCELLI, R. C. F., MALASPINA, O., CARVALHO, S. M., et al.l. **As abelhas e os defensivos agrícolas. Polinizadores no Brasil—contribuições e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. EDUSP, São Paulo. 2012.
- NORLI, H.R.; CHRISTIANSEN, A.; DERIBE, E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v.1218, n.41, p.7234-7241, 2011.
- ORSO, D. Determinação de resíduos de agrotóxicos em mel empregando método QueChERS modificado e GC-ECD. Dissertação (Mestrado em Química. **Universidade Federal de Santa Maria**), Santa Maria, 2011.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C.; CLAUDIO, L. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n.1, editorial, 2007.
- PINTO, G.M.F. Os Pesticidas, Seus Riscos e Movimento no Meio Ambiente. **Revista Eletrônica FACP**. n.8 ,2015.
- PIRO, R.; MUTINELLI, F. The EU legislation for honey residue control. **Apiacta**, v.38, p.15 – 20, 2003.
- PITTELLA, C.M. Determinação de resíduos de agrotóxicos em mel de abelhas (*Apis* sp) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal. **Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2009.
- POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C. et al.. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v.25, n.6, 2010.
- PRATES, C.B.; GEBARA, S.S.; RÉ-POPPI, N. Análise de pesticidas organoclorados em água usando a microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v.34, n.7, p.1260-1264, 2011.
- PRESTES, O.; MARTINS, M.L.; FRIGGI, C.A. et al.. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v.36, n.5, p.697-710, 2013.

PRIYANKA, C.; KUMAR, P.; BANKAR, S.P. et al.. In vitro antibacterial activity and gas chromatography–mass spectroscopy analysis of *Acacia karoo* and *Ziziphus mauritiana*. **Journal of Taibah University for Science**, n.9, p.13–19, 2015.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2014. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

RISSATO, S, GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N. et al.. Método multirresíduo para conitoramento de contaminação ambiental de agrotóxicos na região de Bauru (SP) usando mel como bioindicador. **Quim. Nova**, v.29, n.5, p.950-955, 2006.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M.S.; ALMEIDA, M.V.; GERENUTTI, M. et al.. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination. **Food Chemistry**, v.101, p.1719–1726, 2007.

RUFFINENGO, S.; EGUARAS, M.; FLORIS, I. et al.. LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. **Journal of Economic Entomology**. v.98, p.651, 2005.

SCAPIM, C.A.; PACHECO, C.A.P.; TONET, A. et al.. Análise dialéctica e heterose de populações de milho-pipoca. **Bragantia**, v.61, n.3, p.219- 230, 2002.

SEBRAE, Campanha nacional estimula o consumo de mel no Brasil. 2010. Disponível em: http://www.mnpropolisloja.com.br/noticias_detalhes.asp?id=20&gclid=CMTc7pruwsoCFdAXHwodIdoHzg. Acesso em: 03/01/2016.

SEBRAE. **Apicultura: uma oportunidade de negócio sustentável**. Publigráf. Salvador: Sebrae Bahia, 2009. p. 52.

SILVA, L. R.; Videira, R.; Monteiro, A.P. et al.. Haney from luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. **Micrichemical Journal**, v.93, p.73-77, 2009.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de produtos para defesa agrícola. Disponível em: Conexão SINDAG São Paulo, 2011. Acesso em: 04/06/2013.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de produtos para defesa agrícola. Disponível em: Conexão SINDAG São Paulo, 2013. Acesso em: 06/02/2016.

SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Defesa Vegetal, Disponível em: <http://www.sindiveg.org.br/sindiveg.php>. Acesso em 05 jan 2015.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOARES, W.R.; PORTO, M.F.S. Uso de agrotóxicos e impactos econômicos sobre a saúde. **Rev. Saúde Pública**, v.46, n.2, 2012.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, v.11 p.33-40. 1962.

SOUSA, J. R. L., JUNIOR. O.P.A.; BRITO, N.M. et al.. Ação de pesticidas sobre abelhas: avaliação do risco de contaminação de méis. **Acta Tecnológica**, v.8, n.1 p.28 – 36, 2013.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHIN, L.C.; et al.. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p. (Embrapa Meio Ambiente Documentos, 42).

TIRADO, R.; SIMON, G.; JOHNSTON, P. Bees in Decline: A review of factors that put pollinators and agriculture in Europe at risk. Greenpeace Research Laboratories Technical Report (Review). **Greenpeace International**, v.5, p.1066, AZ Amsterdam, the Netherlands, 2013.

TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; CASTILLO, M.P. et al.. Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages. **Chemosphere**, v. 88, n. 2, p. 224-228, 2012.

TOTTI, S.; FERNÁNDEZ, M.; GHINI, S. et al.. Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography – mass spectrometry detection. **Talanta**, v.69, n.3, p.724-729, 2006.

UE - EUROPEAN UNION. Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. 2002. Diretiva. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32002D0657>. Acesso em: 25/10/2015.

UE, European Communities. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities L**, v.221, 2002.

WHITEHORN, P.R.; O'CONNOR, S.; WACKERS F.L. et al. Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. **Science**, v.336, n.6079, p. 351-352, 2012.

WOLFF, L. F. **Abelhas melíferas: bioindicadores e qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 38p. (Documento 244).

ZIELIŃSKI, L.; DEJA, S.; JASICKA-MISIAK, I. et al.. Chemometrics as a Tool of Origin Determination of Polish Monofloral and Multifloral Honeys. **J. Agric. Food Chem.**, v.62, n.13, p.2973–2981, 2014.