

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ, CAMPUS DE CASCAVEL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**PRESENÇA DE IMIDACLOPRID E FIPRONIL NO MEL E O EFEITO EM OPERÁRIAS DE**  
***Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA**

**CRISTIANE LURDES PALOSCHI**

**CASCAVEL - PR**  
**SETEMBRO - 2021**

**CRISTIANE LURDES PALOSCHI**

**PRESENÇA DE IMIDACLOPRID E FIPRONIL NO MEL E O EFEITO EM OPERÁRIAS DE  
*Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora:  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Hermínia Ferreira Tavares

Coorientadores:  
Prof. Dr<sup>a</sup>. Michele Potrich  
Prof. Dr. Silvio César Sampaio

**CASCADEL - PR**

**SETEMBRO – 2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA<sup>1</sup>

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Paloschi, Cristiane Lurdes

PRESENÇA DE IMIDACLOPRID E FIPRONIL NO MEL E O EFEITO EM OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA / Cristiane Lurdes Paloschi; orientadora Maria Hermínia Ferreira Tavares ; coorientadora Michele Potrich. -- Cascavel, 2021.

138 p.

Tese (Doutorado Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, 2021.

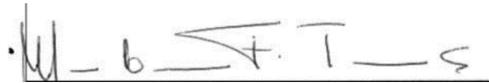
1. Abelha. 2. Agrotóxico. 3. Inseticida. 4. Seletividade. I. Ferreira Tavares, Maria Hermínia, orient. II. Potrich, Michele, coorient. III. Título.

<sup>1</sup>Revisor de português, inglês e normas: Prof. Dr. José Carlos da Costa, 18 de novembro de 2021.

**CRISTIANE LURDES PALOSCHI**

**PRESENÇA DE IMIDACLOPRID E FIPRONIL NO MEL E O EFEITO EM OPERÁRIAS DE  
Apis mellifera L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADA pela seguinte banca examinadora:



Orientadora - Maria Hermínia Ferreira Tavares

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



Michele Potrich

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)



Paula Fernandes Montanher

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)



Simone Damasceno Gomes

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



Ralrho Rinaldo dos Reis

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

Cascavel, 17 de setembro de 2021.

## BIOGRAFIA

Cristiane Lurdes Paloschi nasceu em 24/07/1985, no município de Capitão Leônidas Marques. Graduou-se em Engenharia Agrícola – Bacharelado, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, em 2011. Ingressou como mestranda no primeiro semestre de 2012 no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), sob orientação do Professor Dr. Divair Christ, com pesquisa voltada à qualidade tecnológica de grãos de milho infestados por *zabrotes subfasciatus*. No período de 2015 – 2017, atuou como técnica de cromatografia (Bolsista nível Superior) no Laboratório de Análises Agro-Ambientais da UNIOESTE. Realizou doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), sendo orientada pela Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Hermínia Ferreira Tavares e coorientada pelos Professores Dr<sup>a</sup>. Michele Potrich e Dr. Sílvio César Sampaio, com pesquisa voltada à presença de imidacloprid e fipronil no mel e o efeito em operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizada.

“Se as abelhas desaparecerem da face da terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana”.

Albert Einstein

Dedico primeiramente a Deus e à minha família, em especial à minha filha Helena.

## AGRADECIMENTOS

Ao Fagner e a Helena, pelo carinho, companheirismo, apoio e compreensão nos momentos de ausência;

Aos meus pais, Cacemiro e Ivanir, pelo apoio e o incentivo que em mim depositaram;

À minha orientadora, professora Dra. Maria Hermínia Ferreira Tavares, e aos coorientadores: professora Dra. Michele Potrich e professor Dr. Silvio Cesar Sampaio, exemplos de profissionalismo e dedicação, pela orientação e ensinamentos, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho, pela enorme contribuição com o meu aprendizado e pela amizade.

Ao pessoal do grupo de pesquisa dos laboratórios LAAA – UNIOESTE e LABCON – UTFPR-DV, fundamentais na realização dos estudos; em especial às minhas amigas Elizabete, Karine, Kathleen e Letícia que, além das contribuições científicas, fizeram que os dias de trabalho no laboratório fossem mais divertidos;

À Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE – UTFPR-DV) – Apicultura; em especial à professora Fabiana Martins Costa e à doutoranda Fernanda Raulino Domanski, as quais sempre estiveram dispostas a nos ajudar na programação dos quadros;

À central de análises LABCA-UTFPR-DV, por disponibilizar toda a estrutura e equipamentos para as análises.

Ao Rodrigo e a Amanda que ajudaram na coleta das amostras de mel e aos produtores por nos receber e disponibilizar as amostras;

A todos os meus amigos e familiares que, direta ou indiretamente, auxiliaram e não foram citados acima;

À CAPES, pela concessão da bolsa, e às universidades UNIOESTE e UTFPR-DV por disponibilizarem o acesso para realização dos estudos e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola - PGAGRI.

A todos, MUITO OBRIGADA!

# PRESENÇA DE IMIDACLOPRID E FIPRONIL NO MEL E O EFEITO EM OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA

## RESUMO GERAL

Os produtos fitossanitários sintéticos são apontados como um dos principais fatores que ocasionam o declínio populacional nas colônias de abelhas *Apis mellifera* africanizada, afetando sua sobrevivência e contaminando seus subprodutos, como o mel. O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de toxicidade que os inseticidas imidacloprid e fipronil, utilizados na cadeia produtiva da soja, provocam por via oral, tópica e por contato em operárias de abelhas *A. mellifera* africanizada, além de verificar se há presença destes princípios ativos em amostras de mel. Os níveis de toxicidade foram verificados através de bioensaios. Nos bioensaios 1 os níveis correspondem às porcentagens de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01% da concentração recomendada de aplicação dos produtos comerciais Nortox<sup>®</sup> (princípio ativo imidacloprid) e NortoxWG<sup>®</sup> (princípio ativo fipronil) no campo. Assim, foram obtidas as concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) em 48 horas para *A. mellifera*, por contato em superfície contaminada, sendo determinados os intervalos dos níveis de concentração a serem utilizados para os próximos bioensaios. Os bioensaios 2 e 3 seguiram as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, guias nº 213 e nº 214, de 1998), determinando a CL<sub>50</sub> (48 horas) dos inseticidas imidacloprid e fipronil, para *A. mellifera* por via tópica e oral. No bioensaio 4 foram determinadas a CL<sub>50</sub> (48 horas) e a taxa de sobrevivência das abelhas por um período de 120 horas, através do contato em superfície contaminada pelos inseticidas imidacloprid e fipronil e a sua interferência no comportamento das abelhas. Amostras de mel foram coletadas em apiários agroecológicos e convencionais georreferenciados. Os traços dos inseticidas imidacloprid e fipronil nas amostras foram detectados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV) e cromatografia gasosa (CG-ECD), com extração por SPE C18. Verificou-se que a sobrevivência das abelhas foi afetada diretamente, em relação à concentração utilizada e ao tempo de exposição, assim como sua capacidade comportamental, demonstrando o efeito residual negativo que o imidacloprid e o fipronil têm sobre as operárias dessa espécie. Amostras de mel provenientes de apiários convencionais apresentaram detecção dos inseticidas imidacloprid e fipronil acima dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos pela União Europeia (0,05 µg mL<sup>-1</sup>) e amostras provenientes dos apiários agroecológicos não apresentaram traços destes produtos. Os inseticidas imidacloprid e fipronil afetam a taxa de sobrevivência e a capacidade comportamental de *A. mellifera* africanizada, bem como a qualidade do mel.

**Palavras-Chave:** abelha; agrotóxicos; inseticida; neonicotinoides; fenilpirazol; seletividade.

## PRESENCE OF IMIDACLOPRID AND FIPRONIL IN HONEY AND THE EFFECT ON AFRICANIZED *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) WORKER BEES

### ABSTRACT

Synthetic phytosanitary products are indicated as one of the main factors that cause population decline in Africanized *Apis mellifera* honeybee colonies, affecting their survival and contaminating their sub products, such as honey. Therefore, the objective of this research was to evaluate the toxicity levels that the insecticides imidacloprid and fipronil, used in the soybean production chain, generate orally, topically and by contact in worker bees of Africanized *A. mellifera*, besides verifying whether these active ingredients could be found in honey samples. The toxicity levels were verified by bioassays. In bioassays 1 the levels correspond to the percentages of 100, 10, 1, 0.1 and 0.01% of the recommended concentration of application of the commercial products Nortox® (active ingredient imidacloprid) and NortoxWG® (active ingredient fipronil) in the field. Thus, the average lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) were obtained in 48 hours for *A. mellifera*, by contact on contaminated surface, which led to the determination of the ranges of concentration levels to be used for the next bioassays. Bioassays 2 and 3 followed the guidelines of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, guide no. 213 and no. 214 of 1998), determining the LC<sub>50</sub> (48 hours) of the insecticides imidacloprid and fipronil, for *A. mellifera* topically and orally. In bioassay 4, LC<sub>50</sub> (48 hours) and bee survival rate for a period of 120 hours were determined through surface contact contaminated by the insecticides imidacloprid and fipronil and their interference in honeybee behavior. Honey samples were collected in agroecological and conventional georeferenced apiaries. The traces of the insecticides imidacloprid and fipronil in the samples were detected by high-pressure liquid chromatography (HPLC-UV) and gas chromatograph-electron capture detector (GC-ECD) with extraction by SPE C18. It was verified that the survival of honeybees was directly affected in relation to the concentration used and exposure time, as well as their behavioral capacity, demonstrating the negative residual effect that imidacloprid and fipronil have on the workers of this species. Honey samples from conventional apiaries displayed detection of imidacloprid and fipronil insecticides above the maximum residue limits (MRL) allowed by the European Union (0.05 µg mL<sup>-1</sup>) and samples from agroecological apiaries did not show traces of these products. The insecticides imidacloprid and fipronil affect the survival rate and behavioral capacity of Africanized *A. mellifera*, as well as the quality of honey.

**Keywords:** honeybee; pesticides; insecticide; neonicotinoids; phenylpyrazole; selectivity.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xviii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo geral .....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1 Atividade apícola: abelhas ( <i>Apis mellifera</i> ) .....	4
3.2 Abelhas: polinização.....	7
3.3 Atividade apícola: mel .....	8
3.4 Desordem do colapso das colônias (DCC) e mortalidade das abelhas.....	11
3.5 Agrotóxicos/produtos fitossanitários sintéticos.....	13
3.6 Neonicotinoides: imidacloprid .....	17
3.7 Fenilpirazol: fipronil.....	20
REFERÊNCIAS .....	22
5 ARTIGO 1: IMPACTO DO IMIDACLOPRID EM OPERÁRIAS DE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA E A PRESENÇA NO MEL .....	36
5.1 INTRODUÇÃO .....	37
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
5.2.1 Toxicidade de imidacloprid a operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada .....	39
5.2.1.1 Local dos experimentos.....	39
5.2.1.2 Obtenção do padrão de imidacloprid e das operárias de <i>A. mellifera</i> .....	39
5.2.1.3 Bioensaio 1: determinação da concentração letal média (CL <sub>50</sub> ) por contato de operárias de <i>A. mellifera</i> em superfície vítrea tratada com imidacloprid .....	40
5.2.1.4 Bioensaio 2: concentração letal média oral (CL <sub>50</sub> ) - OECD.....	41
5.2.1.5 Bioensaio 3: concentração letal média por aplicação tópica (CL <sub>50</sub> ) - OECD .....	43
5.2.1.6 Bioensaio 4: concentração letal média por contato com superfície contaminada e a relação com o comportamento de <i>A. mellifera</i> .....	44
5.2.2 Análise de imidacloprid em amostras de mel.....	45
5.2.2.1 Área de estudo.....	46

5.2.2.2 Coleta e georreferenciamento das amostras .....	46
5.2.2.3 Armazenamento das amostras .....	47
5.2.2.4 Extração das amostras de mel .....	48
5.2.1.5 Determinação de imidacloprid em mel.....	49
5.2.1.6 Parâmetros de validação cromatográficos para análise de imidacloprid em mel .....	50
5.2.3 Análise estatística .....	51
5.3 RESULTADOS .....	52
5.3.1 Toxicidade de imidacloprid a operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada .....	52
5.3.1.1 Bioensaio 1: determinação da concentração letal média (CL <sub>50</sub> ) por contato de operárias de <i>A. mellifera</i> em superfície vítrea tratada com imidacloprid .....	52
5.3.1.2 Bioensaios 2 e 3: concentração letal média por via oral (CL <sub>50</sub> ) e por via tópica (CL <sub>50</sub> ) – OECD.....	53
5.3.1.3 Bioensaio 4: concentração letal média por contato com superfície contaminada e a relação com o comportamento de <i>A. mellifera</i> .....	54
5.3.2 Determinação de imidacloprid em mel.....	57
5.4 DISCUSSÃO .....	62
5.5 CONCLUSÕES .....	66
REFERÊNCIAS .....	66
6 ARTIGO 2: FIPRONIL: ESTÁ PRESENTE NO MEL? QUAL O IMPACTO EM OPERÁRIAS DE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA? ..	74
6.1 INTRODUÇÃO .....	75
6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	77
6.2.1 Análise de fipronil em amostras de mel .....	77
6.2.1.1 Área de estudo .....	77
6.2.1.2 Coleta e georreferenciamento das amostras .....	77
6.2.1.3 Armazenamento das amostras.....	79
6.2.1.4 Extração das amostras de mel .....	79
6.2.1.5 Determinação de fipronil em mel .....	80
6.2.1.6 Parâmetros de validação cromatográfico para análise de fipronil em mel.....	82
6.2.2 Toxicidade do inseticida fipronil a operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada .....	83
6.2.2.1 Local dos experimentos.....	83
6.2.2.2 Obtenção do padrão de fipronil e das operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada.....	84
6.2.2.3 Bioensaio 1: determinação da concentração letal média (CL <sub>50</sub> ) por contato de operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada em superfície vítrea tratada com fipronil .....	85
6.2.2.4 Bioensaio 2: concentração letal média oral (CL <sub>50</sub> ) - OECD.....	86
6.2.2.5 Bioensaio 3: concentração letal média por aplicação tópica (CL <sub>50</sub> ) - OECD .....	87

6.2.2.6 Bioensaio 4: comportamento de <i>A. mellifera</i> africanizada, após contato com superfície contaminada pelo inseticida fipronil .....	88
6.2.3 Análise estatística .....	90
6.3 RESULTADOS .....	90
6.3.1 Deteminação de fipronil em mel .....	90
6.3.2 Toxicidade de fipronil a operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada .....	95
6.3.2.1 Bioensaio 1: determinação da concentração letal média (CL <sub>50</sub> ) por contato de operárias de <i>A. mellifera</i> em superfície vítrea tratada com fipronil .....	95
6.3.2.2 Bioensaios 2 e 3: concentração letal média oral (CL <sub>50</sub> ) e por via tópica (CL <sub>50</sub> ) – OECD .....	96
6.4 DISCUSSÃO .....	100
6.5 CONCLUSÕES .....	104
REFERÊNCIAS .....	105
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
ANEXOS.....	113
ANEXO A: MAPA DO APIÁRIO 1 .....	114
ANEXO B: MAPA DO APIÁRIO 2 .....	115
ANEXO C: MAPA DO APIÁRIO 3 .....	116
ANEXO D: MAPA DO APIÁRIO 4.....	117
ANEXO E: MAPA DO APIÁRIO 5 .....	118
ANEXO F: MAPA DO APIÁRIO 6 .....	119
ANEXO G: MAPA DO APIÁRIO 7.....	120

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação dos produtos fitossanitários sintéticos, conforme sua finalidade no controle de organismos alvo .....	14
<b>Tabela 2</b>	Classificação dos produtos fitossanitários sintéticos, conforme sua toxicidade através da concentração da dose letal (DL50).....	14
<b>Tabela 3</b>	Concentração do inseticida imidacloprid em amostras de mel de sete apiários .	59
<b>Tabela 4</b>	Condições cromatográficas do GC-ECD para determinação de fipronil em amostras de mel .....	82
<b>Tabela 5</b>	Concentração do inseticida fipronil em amostras de mel de sete apiários .....	92

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estruturas da nicotina e dos inseticidas neonicotinoides sintéticos..... 17
- Figura 2** Colmeias instaladas em estruturas de madeira do tipo Langstroth, no apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) – Apicultura, localizado na fazenda experimental da UTFPR-DV. .... 40
- Figura 3** Recipientes de plásticos com tela antiafídica, para oferecimento da dieta alimentar de cada tratamento do inseticida imidacloprid para abelhas *A. mellifera*. .... 42
- Figura 4** Aplicação tópica de 1 µL de solução de cada tratamento do inseticida imidacloprid, aplicado com uma micropipeta no lado dorsal do tórax das abelhas *A. mellifera*. .... 43
- Figura 5** Ilustração da torre de voo e classificação dos estratos, de acordo com o comportamento das abelhas nos testes de queda e voo. .... 45
- Figura 6** Coleta de mel em apiário de estudo, no município de Capanema - PR. .... 46
- Figura 7** a) Condicionamento dos cartuchos SPE C18 1000 mg/6 mL conectados a um Minifold para a realização de extração de imidacloprid em mel; b) Coleta dos extratos eluídos das amostras de mel em tubos de ensaios; c) Secagem dos extratos eluídos das amostras. .... 49
- Figura 8** Shimadzu HPLC, localizado no Laboratório de Análises Agro-Ambientais, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (LAAA-UNIOESTE)..... 50
- Figura 9** Determinação da CL<sub>50</sub> (48 horas) do inseticida imidacloprid para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em contato com superfície vítrea. IC<sub>95%</sub>: 26,25 -38,71 µg mL<sup>-1</sup>..... 53
- Figura 10** a) Determinação da CL<sub>50</sub> (48 horas) do inseticida imidacloprid para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em contato via oral; IC<sub>95%</sub>: 12,45 - 24,09 µg mL<sup>-1</sup>; b) Determinação da CL<sub>50</sub> (48 horas) do inseticida imidacloprid para as abelhas por via tópica. .... 53
- Figura 11** Determinação da CL<sub>50</sub> do inseticida fipronil: a) 4 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre 38,10 e 50,80 µg mL<sup>-1</sup>; b) 12 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre 33,65 e 46,87 µg mL<sup>-1</sup>; c) 24 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre 24,61 e 36,52 µg mL<sup>-1</sup>; d) 48 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre 1,75 e 10,53 µg mL<sup>-1</sup>; e) 72 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre -8,17 e 3,26 µg mL<sup>-1</sup>; f) 96 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre -12,38 e 1,01 µg mL<sup>-1</sup>; g) 120 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre -1.01 e -0.23 µg mL<sup>-1</sup>. .... 55

<b>Figura 12</b>	Gráfico de sobrevivência de abelhas operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada, por Kaplan-Meier, após contato com superfície contaminada com inseticida imidacloprid: a) Ajustado ao período de 48 horas; b) Ajustado ao período de 72 horas; c) Ajustado ao período de 120 horas. ....	56
<b>Figura 13</b>	Análise de capacidade de voo de operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada, após 24 horas de contato com superfície contaminada com inseticida imidacloprid...	57
<b>Figura 14</b>	a) Cromatograma correspondente ao tempo de retenção do composto químico imidacloprid; b) Cromatograma correspondente ao solvente metanol utilizado para a diluição do composto químico imidacloprid. ....	58
<b>Figura 15</b>	Curva analítica do imidacloprid realizada no HPLC. ....	59
<b>Figura 16</b>	Classificação do uso e ocupação das terras. ....	61
<b>Figura 17</b>	Coleta de mel em apiário de estudo, no município de Capanema - PR. ....	78
<b>Figura 18</b>	a) Condicionamento dos cartuchos SPE C18 1000 mg/6 mL conectados a um Minifold para a realização de extração de fipronil em mel; b) Coleta dos extratos eluídos das amostras de mel em tubos de ensaios; c) Secagem dos extratos eluídos das amostras de mel em fluxo de nitrogênio; d) Equipamento TurboVap® LV com fluxo de nitrogênio. ....	80
<b>Figura 19</b>	GC-ECD, Shimadzu CG-2010, localizado no Laboratório de Análises Agro-Ambientais, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (LAAA-UNIOESTE).....	81
<b>Figura 20</b>	Colmeias instaladas em estruturas de madeira do tipo Langstroth, no apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) – Apicultura, localizado na fazenda experimental da UTFPR-DV. ....	84
<b>Figura 21</b>	Recipientes plásticos com tela antiafídica, para oferecimento da dieta alimentar de cada tratamento do inseticida fipronil para abelhas <i>A. mellifera</i> africanizada.....	86
<b>Figura 22</b>	Aplicação tópica de 1 µL de solução de cada tratamento do inseticida fipronil, aplicado com uma micropipeta no lado dorsal do tórax das abelhas <i>A. mellifera</i> africanizada. ....	88
<b>Figura 23</b>	Ilustração da torre de voo e classificação dos estratos, de acordo com o comportamento das abelhas nos testes de queda e voo. ....	89
<b>Figura 24</b>	a) Cromatograma correspondente ao tempo de retenção do composto químico fipronil; b) Cromatograma correspondente ao solvente metanol utilizado para a diluição do composto químico fipronil. ....	91
<b>Figura 25</b>	Curva analítica do fipronil realizada no GC-ECD. ....	92
<b>Figura 26</b>	Classificação do uso e ocupação das terras. ....	94

<b>Figura 27</b>	Determinação da CL <sub>50</sub> (48 horas) do inseticida fipronil em abelhas operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada, em contato com superfície vítrea. IC <sub>95%</sub> : 4,38 - 10,34 µg mL <sup>-1</sup> . .....	95
<b>Figura 28</b>	a) Determinação da CL <sub>50</sub> (48 horas) do inseticida fipronil para as abelhas operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada, por via oral. IC <sub>95%</sub> : 0,62 -0,86 µg mL <sup>-1</sup> ; b) Determinação da CL <sub>50</sub> (48 horas) do inseticida fipronil para as abelhas operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada, por via tópica. IC <sub>95%</sub> : 2,31 -3,83 µg mL <sup>-1</sup> . .....	96
<b>Figura 29</b>	Determinação da CL <sub>50</sub> do inseticida fipronil: a) 4 horas após o início do experimento. IC <sub>95%</sub> : entre 13,28 e 26,73 µg mL <sup>-1</sup> ; b) 12 horas após o início do experimento. IC <sub>95%</sub> : entre 12,52 e 30,52 µg mL <sup>-1</sup> ; c) 24 horas após o início do experimento. IC <sub>95%</sub> : entre 10,12 e 16,02 µg mL <sup>-1</sup> ; d) 48 horas após o início do experimento. IC <sub>95%</sub> : entre 4,18 e 6,12 µg mL <sup>-1</sup> ; e) 72 horas após o início do experimento. IC <sub>95%</sub> : entre 0,03 e 1,53 µg mL <sup>-1</sup> ; f) 96 horas após o início do experimento. IC <sub>95%</sub> : entre -1,20 e 0,09 µg mL <sup>-1</sup> ; g) 120 horas após o início do experimento. IC <sub>95%</sub> : entre -0,53 e 0,02 µg mL <sup>-1</sup> . .....	98
<b>Figura 30</b>	Gráfico de sobrevivência de abelhas operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada, por Kaplan-Meier, após contato com superfície contaminada com inseticida fipronil: a) Ajustado ao período de 48 horas; b) ajustado ao período de 72 horas; c) Ajustado ao período de 120 horas. ....	99
<b>Figura 31</b>	Análise de capacidade de voo de operárias de <i>A. mellifera</i> africanizada, após 24 horas de contato com superfície contaminada com inseticida fipronil. ....	100

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CL50	Concentração letal média da substância
DL50	Dose letal média da substância
GARP	Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LC	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LMR	Limites máximos de resíduos
LQ	Limite de quantificação
MS	Espectrometria de Massa
ng	Nanograma
PA	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
PPB	Partes por bilhão
PPM	Partes por milhão
rpm	Rotação por minuto
RSD	Estimativa do desvio padrão relativo
S	Estimativa do desvio padrão absoluto
SPE	Extração em fase sólida
µg	Micrograma
σ	Desvio padrão absoluto

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas (*Apis mellifera* L.) são fundamentais na cadeia produtiva agrícola, sendo responsáveis pelo processo de polinização de culturas agrícolas e de espécies nativas. 75% dos alimentos produzidos dependem de alguma maneira da polinização (WINSTON, 1987; PINHEIRO; FREITAS, 2010; ROUBIK, 2018; JACOB et al., 2019a; REILLY JR et al., 2020). O serviço ecossistêmico de polinização gera de 5 a 8% do valor total da produção de alimentos no mundo, equivalendo entre US\$ 235 e 577 bilhões por ano (IPBES, 2016).

Apesar da importância que as abelhas têm para a produção de alimentos através do serviço ecossistêmico de polinização, nas últimas décadas tem-se observado o desaparecimento de abelhas em áreas agrícolas, sendo o uso de produtos fitossanitários sintéticos uma das principais causas consideradas para o seu declínio populacional (HOLDER et al., 2018; SGOLASTRA et al., 2020; ABATI et al., 2021). Dentre esses produtos, destaca-se o grupo químico dos neonicotinoides e fenilpirazol, com ênfase nos inseticidas imidacloprid e fipronil (MITCHELL et al., 2017; HOLDER et al., 2018; CASTILHOS et al., 2019).

Esses inseticidas atuam diretamente no sistema nervoso central das abelhas, provocando elevadas taxas de mortalidade em suas colônias e efeitos subletais, como o comprometimento da memória, as alterações no comportamento de voo, dificuldades na comunicação entre elas e interferências em seu mecanismo de defesa (JACOB et al., 2019a; COLIN et al., 2020; NAIARA-GOMES et al., 2020; TESOVNIK et al., 2020; ABATI et al., 2021; SILVA et al., 2021).

Durante o forrageamento, as abelhas podem ser expostas aos inseticidas imidacloprid e fipronil de diversas formas: de maneira direta, por meio do contato com gotículas de uma pulverização; por via oral, através da ingestão de alimento contaminado e pelo contato com resíduos dos produtos nas plantas (PIMENTEL, 1995; BONMATIN et al., 2015; CHAM et al., 2019). Além de provocar efeitos subletais e mortalidade nas abelhas, os inseticidas podem ser transportados para dentro das colmeias, ocasionando contaminação dos produtos apícolas, como o mel, afetando a sua qualidade e colocando em risco a saúde humana, pelo consumo (RISSATO et al., 2006; BARGAÑSKA; NAMIEŚNIK, 2010; MITCHELL et al., 2017).

Em relação aos diversos atributos que o consumo do mel proporciona para a saúde humana, destacando o seu elevado valor nutricional e suas múltiplas propriedades medicinais, o ideal é que não haja nenhum contaminante presente em sua composição, garantido maior segurança para o consumo humano (BILANDZIC et al., 2011; MANDAL; MANDAL, 2011; AL-WAILI et al., 2012; TETTE et al., 2016). Porém, resíduos dos inseticidas fipronil e imidacloprid foram detectados em amostras de mel em vários países em níveis variados,

muitas vezes ultrapassando os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos (PAREJA et al., 2011; KASIOTIS et al., 2014; NOTARDONATO et al., 2014; MICHELL et al., 2017; SILVA; FARIA, 2020).

A detecção de resíduos dos inseticidas imidacloprid e fipronil em amostras de mel está relacionada também ao uso e ocupação das terras, pois áreas com maior percentual de agricultura estão mais propensas à aplicação de produtos fitossanitários sintéticos, conseqüentemente, aumentando a probabilidade de as abelhas entrarem em contato com esses produtos. Dessa forma, considerando a relevância das abelhas *A. mellifera* africanizada como polinizadoras e suas relações ecológicas que aumentam a reprodução de plantas, a qualidade de frutas, a produtividade de alimentos e a produção dos seus subprodutos (mel, cera, própolis, entre outros), este estudo foi conduzido com o propósito de verificar os níveis de toxicidade que os inseticidas imidacloprid e fipronil provocam em *A. mellifera* e se esses inseticidas, além de ocasionarem efeitos deletérios nas abelhas, estão presentes em seus subprodutos como o mel.

São apresentadas as seguintes hipóteses/perguntas a serem respondidas por esta pesquisa:

- 1) Quais são os impactos que os inseticidas imidacloprid e fipronil provocam na sobrevivência de operárias de *A. mellifera* africanizada?
- 2) Quais são os impactos que os inseticidas imidacloprid e fipronil provocam no comportamento e movimentação de operárias de *A. mellifera* africanizada?
- 3) Há ocorrência de contaminação de resíduos dos inseticidas imidacloprid e fipronil em amostras de mel?

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis de toxicidade que os inseticidas imidacloprid e fipronil ocasionam em operárias de *A. mellifera* africanizada através do contato em superfície, via oral e via tópica, assim como possíveis alterações comportamentais e a possível contaminação de resíduos dos inseticidas imidacloprid e fipronil em amostras de mel.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar os níveis de toxicidade que os inseticidas imidacloprid e fipronil provocam em abelhas *A. mellifera* africanizada através do contato em superfície, via oral e via tópica, determinando a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) e a sobrevivência das abelhas.
- Verificar se os inseticidas imidacloprid e fipronil provocam alterações no comportamento de voo das abelhas *A. mellifera* africanizada.
- Determinar a possível contaminação de resíduos dos inseticidas imidacloprid e fipronil em amostras de mel provenientes de apiários agroecológicos e convencionais.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Atividade apícola: abelhas (*Apis mellifera*)

As abelhas são insetos que surgiram há milhares de anos a partir de vespas que alteraram sua dieta alimentar, de insetos e ácaros para o néctar e o pólen como fontes de nutrientes (FONSECA; RAMALHO; KLEINERT-GIOVANNI, 1993). As abelhas, assim como as vespas e formigas, são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera. Provavelmente, têm origem na África tropical e se propagaram da África do Sul para o norte da Europa, leste da Índia e da China. Os primeiros registros de espécies foram detectados em fósseis encontrados há cerca de 40 milhões de anos (WINSTON, 1987).

Os principais grupos sociais das abelhas pertencem à família *Halictidae*, *Anthophoridae* e *Apidae*. Desta última, são encontradas as maiores colônias, que atingem populações com centenas e até milhares de indivíduos (PIRANI; LAURINDO, 1993). O gênero *Apis* pertence ao reino: Animalia, ao filo: Arthropoda, à classe: Insecta ou Hexapoda, subclasse: Pterygota, ordem: Hymenoptera, subordem: Apocrita, família: Apidae e à tribo: Apni, existindo uma variedade de espécies de *Apis* (MICHENER, 2000).

Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas, apresentando nove espécies: *Apis mellifera*, *Apis florea*, *Apis dorsata*, *Apis cerana*, *Apis korchevniskov*, *Apis andreniformis*, *Apis laboriosa*, *Apis nuluensis* e *Apis nigrocincta*. Dentre elas, a *Apis mellifera* sempre despertou interesse por sua importância econômica (DÁVILA; MARCHINI, 2005), destacando-se na elevada produção de mel (MORAIS et al., 2012).

No Brasil, a apicultura (criação de abelhas com ferrão) teve início em 1839, quando colônias de abelhas de *A. mellifera* europeia foram trazidas de Portugal para o Rio de Janeiro, pelo padre Antônio Carneiro (COUTO; COUTO, 2006). Porém, as abelhas europeias foram atacadas por doenças e pragas, gerando prejuízos aos apicultores e, em virtude disso, o Prof. Dr. Warwick Estevam Keer, renomado cientista brasileiro, iniciou estudos sobre abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier (RAMOS; CARVALHO, 2007).

Em 1950, o Dr. Keer passou um período na África e estudou a produção de mel do continente. Ao retornar mais tarde para o Brasil, com espécies de rainhas africanas, aplicou seus conhecimentos para estudar a genética da produção e da agressividade dessas abelhas (KERR, 1967; RAMOS; CARVALHO, 2007). Após, ocorreu o cruzamento entre outras subespécies de abelhas *melliferas* europeias (OLIVEIRA; CUNHA, 2005), proporcionando o surgimento de um novo híbrido (Abelha africanizada - *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:

Apidae), apresentando características predominantes das abelhas africanas, como rusticidade e maior capacidade de enxamear, o que lhes permitiu uma rápida adaptação e expansão por quase todo continente americano (OLIVEIRA; CUNHA, 2005; RAMOS; CARVALHO, 2007), contribuindo para o aumento da produção de mel no país (MORAIS et al., 2012).

As abelhas *A. mellifera* são conhecidas por serem insetos sociais devido à hierarquização nas colônias (COUTO; COUTO, 2006). Pequenas colônias típicas contêm em média uma população de 10 a 25 mil abelhas e para a realização de todas as atividades é necessária a presença das três castas que compõem a colônia: rainha, zangões e operárias (WINSTON, 1987; COUTO; COUTO, 2006; TAUTZ, 2010). A sobrevivência de toda a colônia depende da abelha rainha e das abelhas operárias, todas do sexo feminino, tendo os zangões, que são os machos, somente a função de reproduzir (COSTA; OLIVEIRA, 2018).

A rainha possui a função de manter a ordem social pela liberação de feromônios e realiza a postura dos ovos após o voo nupcial, que é o momento da cópula entre a rainha e os zangões (COUTO; COUTO, 2006). Os ovos fecundados depositados pela rainha darão origem às fêmeas e os não fecundados aos machos, no processo chamado de partenogênese arrenótoca (COSTA; OLIVEIRA, 2018).

A rainha nasce de um ovo fecundado, desenvolvido em uma célula especial chamada de realeira e é superalimentada com geleia real (ROCHA, 2008). Morfologicamente ela é o maior indivíduo da colônia (GALLO et al., 2002), porém essa regra nem sempre é observada, pois o tamanho da rainha está relacionado a alguns fatores ambientais e à idade das operárias que geram as suas larvas de origem (MAHBOBI et al., 2012; RANGEL; KELLER; TARPY, 2013).

Os zangões são os indivíduos machos da colônia e possuem aspectos característicos, como corpo coberto por pelos e um super olfato, localizando uma rainha virgem em um raio de até 10 km. Não possuem um órgão específico para um trabalho entre as castas, sendo sua única função a de fecundar a rainha durante o voo nupcial, morrendo logo após a cópula. Assim, apenas se alimentam na colmeia (ROCHA, 2008; TAUTZ, 2010; COSTA; OLIVEIRA, 2018). A quantidade de zangões em uma colônia é variável em função da quantidade de alimento disponível e da época de acasalamento (TAUTZ, 2010).

As operárias nascem de ovos fecundados e, após sua eclosão, são alimentadas nos primeiros três dias com geleia real (diferenciada) e, após, com uma mistura de mel e pólen, até o início do período de pupa, 5 a 6 dias após a eclosão, momento em que não se alimentam e sofrem metamorfose, tornando-se adultas (ROCHA, 2008). Esse comportamento é característico de uma espécie holometábolo, ou seja, de metamorfose completa, sendo o inseto imaturo completamente diferente do adulto (GALLO et al., 2002).

As operárias são os indivíduos em maior quantidade e são responsáveis pelos trabalhos na colmeia, como limpeza, reforma e construção dos favos, alimentação da rainha e das larvas, coleta de néctar, defesa, produção de mel, cera, geleia real e própolis. Apresentam funções diferentes conforme a idade, desenvolvimento glandular e as necessidades da colônia (COUTO; COUTO, 2006; ROCHA, 2008). Após 22 dias de idade, as operárias são denominadas abelhas campeiras ou forrageiras, pois realizam a coleta de pólen, néctar, água e própolis, substâncias fundamentais para o seu desenvolvimento, pois são fontes de nutrientes (COUTO; COUTO, 2006).

A busca e exploração de recursos alimentares são denominadas de forrageamento e esse comportamento generalista das operárias é essencial para o desenvolvimento populacional das colônias, sendo uma das atividades mais importantes realizadas pelas abelhas (WINSTON, 1987; HUNG et al. 2018). O forrageamento pode ser influenciado por fatores genéticos e ambientais (WINSTON, 1987), pois a temperatura e a luminosidade estimulam a atividade das abelhas no trabalho de coleta de alimentos (BRANDEBURGO; GONÇALVES, 1990). O *habitat* também é relevante, sendo favoráveis grandes áreas abertas, ricas em flores e culturas florestais (IDIAZ-FORERO et al., 2011).

As abelhas forrageiras percorrem uma distância superior a 4 km por dia, nas áreas próximas ao seu *habitat*, recolhendo o néctar, a água e o pólen das flores para suprir as necessidades de alimentação de sua colônia e, conseqüentemente, realizam a produção do mel, produto apícola de alto valor nutricional e comercial (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007; MITCHELL et al., 2017). Para a produção de produtos apícolas no Brasil, a espécie *A. mellifera* foi a que mais se adequou, produzindo: mel, geleia real, cera, apitoxina, produtos de valor medicinal e econômico. Essa eficiência na produção se dá em virtude de sua resistência a doenças e adaptabilidade (TAUTZ, 2010; MORAIS et al., 2012).

Além da produção de mel e de produtos apícolas, elas criaram afinidade com as plantas que produzem flores e frutos, desenvolvendo uma função principal na fecundação das flores, tarefa fundamental na polinização de culturas agrícolas e espécies nativas (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007; PANSERI et al., 2014). Porém, a atividade de forrageamento pode ser comprometida ou afetada pela presença de substâncias químicas no ambiente, causando enfraquecimento da colônia (CARVALHO et al., 2009; AMARO; GODINHO, 2012). Além desses produtos afetarem o forrageamento, as abelhas possuem um nível de organização muito avançado no trabalho por castas e qualquer perturbação que possa alterar de alguma forma a rotina desses insetos resulta em conseqüências negativas para a colônia (FREITAS; SILVA, 2015)

### 3.2 Abelhas: polinização

O processo de polinização é definido como a transferência de grãos de pólen entre órgãos masculinos e femininos das flores, sendo importante para a reprodução das plantas, resultando na formação de frutos e sementes. É considerado um fenômeno fundamental para manutenção da biodiversidade vegetal e produção agrícola (GARIBALDI et al., 2014; GIANNINI et al., 2015; ROUBIK, 2018). Quando ocorre adequadamente, o processo de polinização possibilita a garantia de um aumento na qualidade das sementes e dos frutos produzidos (RICHARDS, 2001; BARBOSA; SOUSA, 2016), porém, quando a polinização é deficiente pode haver deformação nos frutos, os quais perdem o seu valor e devem ser descartados, para comercialização na produção agrícola (NASCIMENTO et al., 2012).

Dentre todas as espécies de plantas conhecidas atualmente, aproximadamente, 87% necessitam da polinização realizada por seres vivos, denominados polinizadores e, em menor porcentagem, pode ocorrer por ação do vento ou água (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011; FREITAS; SILVA, 2015; ROUBIK, 2018). Os polinizadores visitam as flores em busca de pólen, néctar, resina, entre outros elementos. Durante a coleta desses recursos, acabam entrando em contato acidental ou propositalmente com o pólen, levando-o consigo, retido em seu corpo, transferindo-o, então, para outras flores, realizando o serviço conhecido como polinização (CALDERONE, 2012; RUCKER et al., 2012).

Os animais polinizadores são em sua maioria insetos, como abelhas, moscas, borboletas, mariposas, vespas, besouros e tripes, mas também há polinizadores vertebrados, como aves, morcegos, mamíferos não voadores e lagartos (KLEIN et al., 2007). A polinização realizada por seres vivos, além de aumentar o volume da produção, também influencia na qualidade dos frutos, melhora o formato, diminui a má-formação, proporciona maior valor nutritivo, melhora o sabor e a durabilidade, uniformizando o processo de amadurecimento e reduzindo as perdas nas colheitas, além de melhorar a qualidade da fisiologia das sementes produzidas e aumentar a variabilidade genética das plantas (FREITAS; SILVA, 2015; OLIVEIRA; NICODEMO; OLIVEIRA, 2015; JUNQUEIRA; AUGUSTO, 2017).

O potencial da polinização como serviço ecossistêmico pode ser ressaltado quando associado à produção de alimentos: a primeira valoração econômica global do serviço ecossistêmico da polinização apontou o montante de US\$ 70 bilhões/ano (COSTANZA et al. 1997). Atualmente, estima-se que o serviço ecossistêmico de polinização contribui com 35% do volume de produção de alimentos, o que corresponde de 5 a 8% do valor total da produção mundial, equivalendo entre US\$ 235 e 577 bilhões por ano (IPBES, 2016). No Brasil, a contribuição econômica proveniente dos polinizadores representa, aproximadamente, 30% da renda agrícola anual total das culturas dependentes, totalizando quase US\$ 45 bilhões (GIANNINI et al. 2015; WOLOWSKI et al., 2019).

Dentre os polinizadores, as abelhas têm um destaque especial: são os agentes mais importantes devido à sua ampla distribuição, pois estão presentes em todas as regiões do mundo e por possuírem comportamento generalista de forrageamento (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007; POTTS et al., 2010; HUNG et al., 2018). Esse processo representa um contato íntimo do animal com a planta, sendo, portanto, um momento importante para ambos, pois se baseia num sistema de dependência recíproca, em que as plantas fornecem o alimento para as abelhas, principalmente pólen e néctar e, em troca, recebem os benefícios da transferência de pólen (PROCTOR, YEO; LACK, 1996; SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007).

As abelhas oferecem um serviço essencial para a agricultura e o meio ambiente, pois, através da polinização de diversas espécies, garantem frutos e grãos em maior quantidade e/ou com melhor qualidade (COUTO; COUTO, 2006; RUCKER, et al. 2012; ROUBIK, 2018). São responsáveis por polinizar 50% das espécies de plantas das florestas tropicais e 80% das espécies vegetais do cerrado brasileiro (FREITAS; SILVA, 2015). Um terço da alimentação humana depende direta ou indiretamente da polinização feita por abelhas, sendo a espécie *A. mellifera* L. a mais utilizada para a polinização de cultivos comerciais (McGREGOR, 1976).

Na cultura da soja, por exemplo, 10% da polinização é realizada por insetos, sendo 50% realizados pelas abelhas (MORSE; CALDERONE, 2000). Quando a soja é polinizada por *A. mellifera*, há um aumento na produtividade de grãos comparativamente à soja não polinizada (cultivares transgênica e convencional) (CHIARI et al., 2008; GAZZONI, 2017; GARIBALDI et al., 2021). Dessa forma, são notórias a importância e a necessidade da preservação das abelhas, porém, sua densidade populacional vem sendo reduzida a níveis que podem comprometer os serviços de polinização nos ecossistemas naturais e agrícolas, afetando a reprodução das plantas.

### **3.3 Atividade apícola: mel**

O mel é um produto alimentar natural, constituído por uma substância viscosa e aromática produzida pelas abelhas melíferas a partir do néctar recolhido de flores e processado por suas enzimas digestivas. O mel é armazenado em favos nas suas colmeias para servir-lhes de alimento durante o inverno. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais estão diretamente relacionados com a fonte floral que o originou, com as condições climáticas e com a espécie que o produziu (PANSERI et al. 2014).

O mel é composto por mais de 300 substâncias químicas que pertencem a diferentes grupos, principalmente açúcares, como frutose, glicose e sacarose (65-75% do total de sólidos solúveis), além de carboidratos, água, vários ácidos orgânicos e inorgânicos, minerais, enzimas, hormônios, flavonoides, proteínas, aminoácidos, corantes, fragrâncias e vitaminas (BARGANSKA; NAMIESNIK, 2010; BILANDZIC et al., 2011; BARGANSKA; SLEBIODA; NAMIESNIK, 2013).

O mel é um produto muito valioso não apenas pelo seu sabor, mas também por suas múltiplas propriedades médicas (AL-WAILI et al., 2012; MANDAL; MANDAL, 2011), pois melhora o funcionamento do sistema imunológico, é levemente sedativo (combate a insônia), digestivo e laxativo, anti-inflamatório e antianêmico. Em aplicação tópica, minimiza a formação de cicatrizes em feridas e queimaduras, devidas às alterações na produção de colágeno e nas propriedades antimicrobianas, além de ser excelente hidratante para a pele. É utilizado também em afecções do trato respiratório como expectorante (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007; CINEGAGLIA et al., 2013; RATCLIFFE; AZAMBUJA; MELLO 2014).

Devido a essas propriedades, em alguns países, ele é tradicionalmente usado em crianças, idosos e doentes como complemento em tratamentos medicinais (BILANDZIC et al., 2011; MALHAT et al., 2015;). Além dos benefícios medicinais, o mel também pode impedir reações de oxidação deteriorantes nos alimentos, como o escurecimento das frutas e legumes e oxidação lipídica na carne, além de inibir o crescimento de patógenos e microrganismos de origem alimentar que causam deterioração dos alimentos (MUNDO; PADILLA-ZAKOUR; WOROBO, 2004).

Em relação aos diversos atributos que o consumo de mel proporciona, o ideal é que não haja nenhum contaminante presente em sua composição, exigindo-se alta qualidade do produto e garantindo-se maior segurança para o consumo humano (BILANDZIC et al., 2011; TETTE et al., 2016). No entanto, como qualquer outro alimento, o mel é propenso a vários tipos de contaminação, provocando reduções significativas na produção dos produtos apícolas, especialmente o mel (AL-WAILI et al., 2012; CHIESA et al., 2016).

O monitoramento constante de contaminantes no mel é de grande relevância, tanto para o controle na segurança alimentar como para obter informações sobre o uso de produtos fitossanitários sintéticos nas culturas circunvizinhas das colmeias (FERNÁNDEZ; PICÓ; MAÑES, 2002; RISSATO et al., 2006; TETTE et al., 2016). Assim, o mel pode ser considerado um bioindicador da contaminação ambiental (RISSATO et al., 2006; CHIESA et al., 2016).

Os produtos fitossanitários sintéticos, utilizados para a proteção de plantas contra organismos alvos, são considerados a principal fonte de contaminação no mel, reduzindo suas propriedades benéficas e tornando-o inadequado para o consumo humano (LEVER et al., 2014; ZHENG et al., 2018; GAWEL et al., 2019). Além da contaminação por forrageamento,

os produtos podem contaminar as colônias pela aplicação direta para combater parasitas e agentes patogênicos (NAKAJIMA et al., 2015; CHIESA et al., 2016; TETTE et al., 2016; KARISE et al., 2017). O vento também pode translocar os produtos fitossanitários sintéticos a grandes distâncias da origem de aplicação (LONG; KRUPKE, 2016), resultando em contaminação do pólen e do néctar em flores silvestres.

A ingestão de mel contaminado pode ocasionar sérios riscos para a saúde humana, como toxicidade subaguda e crônica no organismo (RAGHUNANDAN; BASAVARAJAPPA, 2013). Devido a esses riscos, a determinação de resíduos químicos nos alimentos é necessária (CHIESA et al., 2016). Em vários países, as agências governamentais realizam o controle da presença de contaminantes nos alimentos, garantindo a segurança da população quanto ao seu consumo estabelecendo, para tanto, os limites máximos de resíduos (*Maximum residue levels*) – LMR (FRENICH et al., 2004). Porém, para o consumo de mel em alguns países, esses limites são escassos para determinados grupos de produtos fitossanitários sintéticos, destacando-se o grupo dos inseticidas, os quais ocasionam elevada contaminação nos produtos apícolas.

Amostras de mel contaminadas que excederem os LMR estabelecidos pela legislação vigente devem ser descartadas (YUAN et al., 2014), porém, o descarte dessas amostras provoca perdas de muitas substâncias benéficas que poderiam ser utilizadas (CHENG et al., 2012; XU et al., 2012). Para garantir que os LMR sejam respeitados e que não ocorram desperdícios desnecessários das amostras, é ideal que sejam utilizados métodos analíticos altamente sensíveis e seletivos para a determinação de produtos fitossanitários sintéticos no mel (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; TETTE et al., 2016; LEHOTAY, 2018).

Diversos métodos foram relatados para a determinação de produtos fitossanitários sintéticos no mel, porém, alguns apresentaram problemas analíticos substanciais, devidos à alta porcentagem de açúcares ou à coloração intensiva por pigmentos (FERNÁNDEZ; PICÓ; MAÑES, 2002; BLASCO et al., 2004). Por isso, um método deve compreender etapas mínimas de extração e purificação, pois são essenciais para um programa de monitoramento eficiente (RISSATO et al., 2006). Para a determinação de produtos fitossanitários sintéticos em alimentos, os métodos exigem preparação, separação e quantificação das amostras (TETTE et al., 2016).

A primeira etapa é a diluição do mel, que consiste em adição de solventes orgânicos e soluções aquosas (BLASCO et al., 2004; TETTE et al., 2016). Além disso, são necessários procedimentos de limpeza após a extração, com a finalidade de eliminar interferências na matriz de interesse antes da análise (GARCIA-CHAO et al., 2010).

Após a extração das amostras de mel, ainda é necessário realizar o *clean-up*, que é um processo de limpeza em colunas de extração em fase sólida (SPE), utilizado para a pré-concentração da amostra, reduzindo o limite de quantificação do método e evitando

interferências da matriz. Nos extratos apícolas os interferentes mais comuns são pigmentos, lipídios e carboidratos (RISSATO et al., 2006).

As técnicas de *clean-up* mais convenientes para o processo incluem a utilização de métodos de extração em fase sólida denominados de QuEChERS (BLASCO et al., 2011), cartuchos C18 (FERNÁNDEZ; PICÓ; MAÑES, 2002; BLASCO, et al., 2004; CALATAYUD-VERNICH et al., 2018) ou florisil (RISSATO et al., 2006; SUN et al., 2012; PANSERI et al., 2014). Além dos procedimentos de extração e *clean-up*, a escolha da abordagem de separação/detecção é de fundamental importância (TETTE et al., 2016).

A cromatografia é a técnica de separação mais utilizada para a determinação de produtos fitossanitários sintéticos em mel (TETTE et al., 2016). Na cromatografia, o processo de separação dos analitos de interesse em uma matriz alimentar é realizado através da existência de uma fase móvel e de uma fase estacionária (FRIED; SHERMA, 1999). Pode ser combinada com diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A determinação dos resíduos de produtos fitossanitários sintéticos no mel se fundamenta, principalmente, em *Gas chromatography* - CG (Cromatografia gasosa) e *High performance liquid chromatography* - HPLC/ CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) (RIAL-OTERO et al., 2007; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; BLASCO et al., 2011). A escolha da técnica de separação depende principalmente das características dos produtos fitossanitários sintéticos de interesse. Os compostos voláteis, semivoláteis e termicamente estáveis podem ser determinados por cromatografia gasosa, enquanto os não voláteis e/ou termicamente instáveis devem ser determinados por cromatografia líquida (KUJAWSKI et al., 2014).

É indicado que métodos de análise de produtos fitossanitários sintéticos apresentem algumas especificações, como: linearidade, seletividade, limite de detecção e quantificação e recuperações de extração (BARR; NEEDHAM, 2002). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) são os órgãos responsáveis para disponibilizarem guias para o procedimento de validação de métodos analíticos (RIBANI et al., 2004).

### **3.4 Desordem do colapso das colônias (DCC) e mortalidade das abelhas**

A desordem do colapso das colônias tem sido observada mundialmente, ao longo das últimas décadas, gerando grande preocupação. Essa desordem é identificada quando as abelhas operárias forrageiras não conseguem retornar às suas colônias, durante o seu

forrageamento. O primeiro caso de DCC foi relatado nos Estados Unidos no ano de 2006, sendo observada a perda de milhares de colônias de abelhas *A. mellifera*, resultando em prejuízos para a agricultura, pela falta desses polinizadores (RUCKER et al., 2012). Estima-se que 13% (325 mil colônias) foram atribuídas à DCC, com perdas para os apicultores, aproximadamente, 80 a 100% de suas colônias (OLDROYD, 2007; PIRES et al., 2016).

Até o início dos anos 2000, não havia registros na literatura sobre a perda de colônias de *A. mellifera* no Brasil, com exceção de perdas ocorridas em virtude de indisponibilidade de recursos naturais e manejo inadequado. Em 2010, foram relatadas perdas de colônias no estado de São Paulo, com características semelhantes às descritas pelos americanos, todavia, sem causas estabelecidas. Em seguida, foram verificadas perdas com os mesmos sintomas nos estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina (PIRES et al., 2016).

Mundialmente, diversos pesquisadores buscam informações sobre as principais causas que ocasionam o abandono das colônias e a perda das abelhas. Essas causas são atribuídas a vários fatores, como: patógenos, parasitas, genética, desmatamento, mudança climática, perda de *habitat* de forrageamento e uso intensivo de produtos fitossanitários sintéticos nas culturas (TSVETKOV et al., 2017; RAYMANN et al., 2018).

Dentre os fatores citados acima, os produtos fitossanitários sintéticos se destacam como principais fatores do declínio populacional das abelhas. Além da intoxicação direta, esses produtos ocasionam uma contínua degradação da paisagem agronatural, comprometendo o processo de polinização natural e exigindo dos produtores a implantação de colmeias em meio aos cultivos como forma de manutenção dos insetos no sistema e fonte de renda, fato que tem enfraquecido as populações das colônias, provavelmente em função da contaminação por produtos fitossanitários sintéticos (ABATI et al., 2021).

O contato e a ingestão de alimentos contaminados por produtos fitossanitários sintéticos afetam a taxa de sobrevivência, desenvolvimento, sistema imunológico, reprodução, comportamento e manutenção de colônias de abelhas (GOULSON et al., 2015; PISA et al., 2015; BRANDT et al., 2016). Embora os efeitos subletais causados pelos produtos fitossanitários sintéticos não possam causar declínio imediato da população pelo aumento das taxas de mortalidade de abelhas, eles podem diminuir a sobrevivência e o crescimento a longo prazo das colônias e, assim, afetar o sucesso das populações de abelhas (LEVER et al., 2014).

Porém, quando os efeitos subletais afetam a taxa de sobrevivência das abelhas, aumentando os índices de mortalidade, o processo de polinização é diretamente prejudicado, reduzindo a eficiência de forrageamento da colônia, intensificando a escassez de pólen e desencadeando um declínio na produção de crias, que poderia até mesmo ser totalmente interrompida. Nos últimos anos, em vários países, registrou-se elevada mortalidade nas

colônias de abelhas, destacando-se os produtos fitossanitários sintéticos, como um dos principais fatores (PINHO et al., 2010; LEVER et al., 2014).

A grande expansão dos produtos fitossanitários organossintéticos, nos anos 1940, provocou rápidas consequências na elevada mortalidade de abelhas (AMARO; GODINHO, 2012). Nos anos 1990, na França, ocorreu a mortalidade em massa de abelhas, coincidindo com a introdução de dois inseticidas sistêmicos novos no mercado, o imidacloprid (lançado em 1994) e o fipronil (lançado em 1993), amplamente utilizados na cultura do girassol francês (*Helianthus annuus*) (HOLDER et al., 2018).

### 3.5 Agrotóxicos/produtos fitossanitários sintéticos

A Lei Federal nº 7.802/89 define o termo agrotóxico como:

[...] produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento (BRASIL, 1989, p, 11459).

De uma forma mais sucinta, podem ser denominados de pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários sintéticos e defensivos agrícolas (SAMPAIO; GUERRA, 1998).

Os agrotóxicos são produtos orgânicos sintéticos com baixo peso molecular, baixa solubilidade em água e intensa atividade biológica (SILVA; FAY, 2004). Esses produtos atuam sobre os organismos vivos por meio do bloqueio de algum processo fisiológico ou bioquímico, tendo como alvo principal o sistema nervoso (GALLO et al., 2002). São utilizados para impedir a ação ou destruir, direta ou indiretamente, vidas animais ou vegetais que sejam prejudiciais, como: ervas daninhas, roedores, fungos, ácaros e insetos (MELO; OLIVEIRA; LAGO, 2002).

Esses produtos são agrupados conforme a sua finalidade: controle de pragas, ou seja, de acordo com o organismo alvo (Tabela 1); grupo químico ao qual pertencem ou são derivados, por exemplo: neonicotinoides e fenilpirazol; toxicidade (Tabela 2), dentre outras (BAIRD; CANN, 2011). A classificação da toxicidade é baseada na dose letal da substância (DL50), que pode ser considerada como a massa necessária para provocar a morte da metade da população do organismo em estudo (BAIRD; CANN, 2011; DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011).

**Tabela 1** Classificação dos produtos fitossanitários sintéticos, conforme sua finalidade no controle de organismos alvo

<b>Produtos fitossanitários sintéticos</b>	<b>Organismo alvo</b>
Inseticida	Insetos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Acaricida	Ácaros
Larvicida	Larvas de insetos
Bactericida	Bactérias
Nematicida	Nematoides
Raticida	Roedores
Algicida	Algas
Moluscicida	Caracóis, lesmas
Nematicida	Nematoides

**Fonte:** Baird e Cann (2011).

**Tabela 2** Classificação dos produtos fitossanitários sintéticos, conforme sua toxicidade através da concentração da dose letal (DL50)

<b>Classe</b>	<b>Classificação</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg de pesticidas/kg de organismo)</b>
I	Extremamente tóxico	<50
II	Altamente tóxico	50-500
III	Medianamente tóxico	500-5000
IV	Pouco tóxico	>5000

**Fonte:** Baird e Cann (2011).

O ataque de insetos-pragas na agricultura é responsável por grandes perdas anuais de alimentos em todo o mundo, reduzindo a produção agrícola entre 20 e 30% (PANG et al., 2006). Assim, o uso de produtos fitossanitários sintéticos é de suma importância para a prevenção e redução dessas perdas, melhorando a produção, satisfazendo os consumidores e garantindo o seu comércio (KMELLÁR et al., 2008). Devido a esses fatores e à crescente demanda por produção de alimentos, o uso de produtos fitossanitários sintéticos tem aumentado significativamente nas últimas décadas (TETTE et al., 2016).

No Brasil, o uso de agrotóxicos começou a se difundir por volta de 1940, pelos incentivos fiscais e pela política de subsídios dados pelo governo ao longo desses anos. Embora o uso desses produtos traga benefícios para a produção agrícola em relação ao combate de espécies-alvo, o uso indiscriminado constitui uma prática agressiva ao meio ambiente e a seus componentes biológicos (BARR; NEEDHAM, 2002; GALLO et al., 2002).

Estudos demonstram que mais de 98% dos inseticidas e 95% dos herbicidas aplicados não atingem seu destino (espécie alvo). Eles possuem diversas rotas de degradação no ambiente e podem se dispersar das mais variadas formas, sendo, muitas vezes, encontrados em compartimentos distintos aos que foram aplicados e na forma de um produto de degradação. Esses produtos fitossanitários sintéticos podem entrar em contato com a água e o solo por meio da lixiviação e pelo escoamento da água, assim como podem ser transferidos

para a atmosfera pela volatilização, pela ressuspensão de partículas e, principalmente, pela dispersão no momento da aplicação, sobretudo se esta for de forma aérea. Ocorre, assim, um acúmulo ambiental de contaminantes que podem ser introduzidos na cadeia alimentar humana ou atingir outros insetos não alvos (CIESLIK et al., 2011).

O acúmulo ambiental de contaminantes, provenientes de produtos fitossanitários sintéticos, ocasiona danos imprevisíveis para os seres humanos e diversas espécies animais, tanto as de grande porte como os diminutos insetos, principalmente aqueles considerados benéficos, ocasionando morte e intoxicação de produtores rurais, contaminação de alimentos, poluição de rios e extinção de diversas espécies (GALLO et al., 2002; AL-WAILI et al., 2012; GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015). Conforme Hooper et al. (2005), a redução da biodiversidade prejudicará diversas interações nos ecossistemas, pois além dos organismos predadores e parasitoides, os polinizadores, em especial as abelhas, são também atingidos direta e indiretamente pelos produtos fitossanitários sintéticos.

As abelhas estão constantemente expostas a esses produtos, quando suas colônias estão localizadas próximas a áreas com produção agrícola. A contaminação pode ocorrer de diversas formas, dentre elas podem ser citadas a imprecisão na aplicação dos agrotóxicos, quando não atingem somente os alvos requeridos e falhas nas doses que são empregadas, elevando a contaminação por ação de resíduos (PIMENTEL, 1995).

A contaminação ocorre também através da alimentação pelas plantas, uma vez que os inseticidas sistêmicos e os seus metabolitos são transportados nos vasos (floema e xilema) e nas células das plantas (culturas e infestantes), acumulando resíduos, em partes da planta não pulverizadas, com doses tóxicas para os insetos que se alimentam (AMARO; GODINHO, 2012; BONMATIN et al., 2015). Em aplicações ao solo (como grânulos) ou com sementes tratadas com inseticidas sistêmicos (exemplo: à base de imidacloprid), podem ocorrer resíduos nas flores, no pólen e néctar de plantas, com efeitos nas abelhas por doses subletais de produtos fitossanitários sintéticos (AMARO; GODINHO, 2012).

Os produtos fitossanitários sintéticos impactam significativamente a saúde das abelhas, provocando toxicidade aguda com altas taxas de mortalidade das colônias e ocasionando efeitos deletérios, interferindo em sua capacidade cognitiva e no seu comportamento (TOSI; BURGIO; NIEH, 2017; JACOB et al., 2019a). Dentre esses efeitos, destacam-se problemas como déficits na aprendizagem, na orientação e na habilidade de coleta de alimentos (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; SCHNEIDER et al., 2012; TOSI; BURGIO; NIEH, 2017), expressão gênica alterada (WU et al., 2017) e imunocompetência afetada, aumentando a suscetibilidade à infecção por patógenos (BRANDT et al., 2016; RAYMANN et al., 2018).

Mussen et al. (2004) relataram que fungicidas contaminantes da alimentação de abelhas interferem no seu desenvolvimento larval e pupal, comprometendo a metamorfose do

inseto, levando-o a más formações morfológicas. Os inseticidas do grupo químico dos piretroides e organofosforados afetam negativamente o desenvolvimento e o comportamento das abelhas (LI et al., 2017). D'Amato, Torres e Malm (2002) observaram que os inseticidas organoclorados atuam em canais de sódio e potássio dos neurônios das abelhas, alterando o fluxo normal de entrada e saída desses íons, afetando a transmissão dos impulsos.

Carvalho et al. (2009) observaram que os compostos do grupo piretroides provocaram impactos negativos sobre as abelhas polinizadoras. O inseticida deltametrina promoveu elevadas taxas de mortalidade quando pulverizado sobre *A. mellifera*, provocando o efeito *knock down*, também se demonstrou bastante tóxico quando ingerido e/ou em contato com resíduos sobre superfícies (CARVALHO et al., 2009). Doses de permetrina e metomil (0,91 g p.c./ L de H<sub>2</sub>O e 0,90 g p.c./ L de H<sub>2</sub>O) também demonstraram causar efeitos subletais a abelhas silvestres, sendo estas altamente susceptíveis a esses inseticidas (VALDOVINOS-NÚÑEZ et al., 2009).

Além do grupo químico dos inseticidas que afeta as abelhas, os fungicidas e herbicidas impactam, principalmente, no que se refere à contaminação de produtos apícolas (CALATAYUD-VERNICH et al., 2017; TOSI et al., 2017). Um estudo na China continental, verificou resíduos do fungicida carbendazim em amostras de pólen em oito províncias, apresentando resíduos máximos que chegavam até 4,52 ng.g<sup>-1</sup> (TONG et al., 2016).

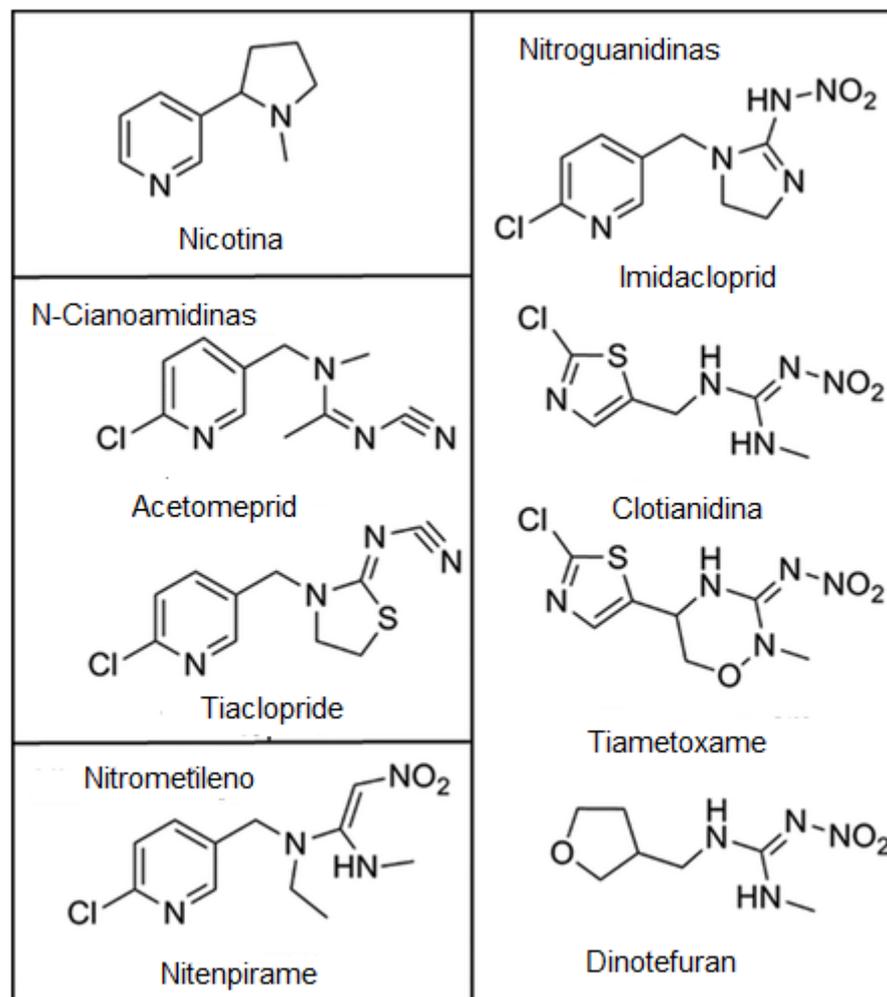
A toxicidade que os produtos fitossanitários sintéticos ocasionam nas abelhas é determinada por meio da DL<sub>50</sub>, definida como a dose letal capaz de ocasionar a mortalidade de 50% de uma população, por um determinado período (PEREIRA, 2010). Produtos fitossanitários sintéticos que apresentam DL<sub>50</sub> inferior a 2 µg abelhas<sup>-1</sup> são classificados como extremamente tóxicos para abelhas *A. mellifera* (JOHANSEN; MAYER, 1990).

Os efeitos dos produtos fitossanitários sintéticos são extremamente prejudiciais para a saúde humana, conforme a toxicidade do produto químico e o tempo de exposição (FELL; COBB, 2009). Os efeitos variam de leve irritação da pele a defeitos congênitos, tumores, alterações genéticas, disfunções nos sistemas nervoso e reprodutivo, distúrbios endócrinos e, até mesmo, resultar em óbito (VARSAMIS et al., 2008; AL-WAILI et al., 2012).

Atualmente, mais de 800 ingredientes ativos de produtos fitossanitários sintéticos em uma ampla gama comercial são registrados para atender às demandas de fornecimento de alimentos no mundo (BARR; NEEDHAM, 2002). Entre esses, destaca-se o grupo químico dos neonicotinoides e fenilpirazol. Porém, em 19/07/2012, foi publicado no Diário Oficial da União um Comunicado (BRASIL, 2013) que deu início formal ao processo de reavaliação de quatro ingredientes ativos de produtos fitossanitários sintéticos relacionados com efeitos nocivos às abelhas: imidacloprid, tiametoxam, clotianidina e fipronil. O primeiro a passar pelo processo de reavaliação foi o imidacloprid, produto com elevada comercialização, quando comparado aos outros princípios ativos (BRASIL, 2013).

### 3.6 Neonicotinoides: imidacloprid

O grupo químico neonicotinoide tem origem partir da molécula nicotina (Figura 1), extraída de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (NAUEN; EBBINGHAUS-KINTSCHER; SCHMUCK, 2001; HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018). Foi registrado na década de 1990 e, em 2010, já representava um terço do mercado global de inseticidas, tornando-se uma das classes mais amplamente utilizadas no mundo para o controle de organismos alvo em diferentes culturas (GOULSON et al., 2015; SIMON-DELSO et al., 2015; SGOLASTRA et al., 2020).



**Figura 1** Estruturas da nicotina e dos inseticidas neonicotinoides sintéticos.

Fonte: Hladik, Main e Goulson (2018).

A preferência por esses produtos se deve à sua alta eficácia em baixas concentrações, atividade residual longa, proporcionando proteção por longos períodos, ação sistêmica nas plantas, sendo prontamente absorvido e translocado para todos os tecidos vegetais, facilitando o controle de um amplo espectro de pragas, versatilidade de aplicação, aumentando, assim, o leque de potenciais rotas de exposição e baixa toxicidade para mamíferos (TOMIZAWA; CASIDA, 2003; JESCHKE et al., 2011). Sua aplicação pode ser realizada de diferentes formas: via pulverização foliar, via água de irrigação no solo e no tratamento de sementes (BLACQUIÈRE et al., 2012; SIMON-DELSO et al., 2015; HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018).

Eles atuam como agonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nACHRs), afetando diretamente o sistema nervoso central dos insetos (ELBERT et al. 2008; GAUTHIER, 2010; GOULSON, 2013; JOHNSON, 2015). Ao contrário da acetilcolina, que é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase nos receptores nicotínicos, as moléculas dos neonicotinoides não são degradadas imediatamente, assim, os impulsos nervosos são transmitidos continuamente, levando à hiperexcitação do sistema nervoso (GALLO et al., 2002). Em concentrações baixas/moderadas ocasionam a estimulação nervosa, mas em altas concentrações levam à paralisia e à morte (JOHNSON, 2015).

Há uma crescente preocupação sobre os impactos que esses inseticidas vêm causando, pois, através da sua ação neurotóxica, os neonicotinoides atuam na neurofisiologia dos insetos, incluindo aqueles não alvos, como por exemplo as abelhas (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; ELBERT et al. 2008; SÁNCHEZ-BAYO et al., 2016; HEIMBACH et al., 2017). Como inseticidas sistêmicos, os neonicotinoides são absorvidos pelos tecidos das plantas e transportados para todos os seus órgãos vegetativos, incluindo flores, contaminando o pólen e o néctar, bem como qualquer fluido produzido pela planta (GOULSON, 2013; FAIRBROTHER et al., 2014; BONMATIN et al., 2015).

A preocupação com os impactos ambientais dos neonicotinoides começou em 1996, quando os apicultores franceses associaram o uso do imidacloprid, na época um novo produto, à morte de colmeias de abelhas (*A. mellifera*) (BONMATIN et al., 2005). Deste então, as abelhas permaneceram no centro das preocupações com o uso de inseticidas provenientes desse grupo químico (HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018).

Estudos demonstram que os neonicotinoides são altamente tóxicos para abelhas da espécie *A. mellifera* e sem ferrão, causando distúrbios comportamentais, dificuldades de orientação, comprometimento das atividades sociais e mortalidade (SÁNCHEZ-BAYO; BELZUNCES; BONMATIN, 2017; JACOB et al., 2019a; TADEI et al., 2019). Colônias de *A. mellifera*, expostas a pólen contaminado por inseticidas neonicotinoides por um período de 46 dias, mostraram redução no crescimento da colônia em longo prazo (12 meses), o que interferiu na substituição de rainhas, consequentemente na enxameação (SANDROK et al.,

2014), sendo um dos principais causadores do declínio populacional das abelhas (SGOLASTRA et al., 2020).

Os neonicotinoides mais comumente detectados são clotianidina, imidacloprid e tiametoxam, classificados como altamente tóxicos para as abelhas, apresentando valores de toxicidade aguda ( $DL_{50}$ ) por ingestão oral entre 1 e 5 mg por abelha (HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018). O inseticida imidacloprid ( $C_9H_{10}ClN_5O_2$ ) foi o primeiro composto desse grupo químico a ser comercializado, sendo registrado para uso em 1991. Foi introduzido na Europa e no Japão pela Bayer CropScience® que, juntamente com o nitenpyram e o acetamipride, representam a classe das cloronicotinilas, também conhecidas como neonicotinoides de primeira geração (NAUEN; EBBINGHAUS-KINTSCHER; SCHMUCK, 2001; BASS et al., 2015).

O imidacloprid é considerado altamente prejudicial para as abelhas, tanto para as no presente estudo quanto para as sem ferrão, devendo então ser aplicado com cautela. Altas doses desse inseticida afetam o comportamento das abelhas, comprometendo o processo de polinização e a produção de alimentos nos agroecossistemas (JACOB et al., 2019b). Segundo Raymann et al. (2018) e Tsvetkov et al. (2017), a exposição das abelhas a esse inseticida vem ocasionando contaminação de produtos apícolas, mortalidade elevada e colapso na ordem das suas colônias.

Em estudos realizados a campo, as concentrações de imidacloprid encontradas no néctar e no pólen das plantas não são imediatamente letais para as abelhas, porém alteram os seus comportamentos (ELBERT et al. 2008). Além disso, os produtos de degradação do imidacloprid do metabolismo dos insetos e da decomposição ambiental também são tóxicos para as abelhas (GOULSON, 2013). O imidacloprid e seus subprodutos podem permanecer no solo e, posteriormente, serem incorporados em plantas não tratadas, iniciando um novo ciclo de exposição ao polinizador (GOULSON, 2013; SÁNCHEZ-BAYO, 2014).

Diversos estudos em abelhas demonstram que a exposição destas ao inseticida imidacloprid ocasiona uma ampla variedade de efeitos, como: morte de células cerebrais, prejuízo ao aprendizado das abelhas e suas características cognitivas da memória, afetando o seu retorno às colônias (HENRY et al. 2012; WU et al., 2014; ZHANG; NIEH, 2015), diminuição da captação de alimentos (RAMIREZ-ROMERO; CHAUFaux; PHAM-DELÈGUE, 2005), função motora reduzida (LAMBIN et al., 2001; WILLIAMSON; WILLIS, WRIGHT, 2014; JACOB et al., 2019b), forrageamento prejudicado (SCHNEIDER et al., 2012), aprendizagem visual prejudicada (HAN et al., 2010), diminuição da prevenção de predadores (TAN et al., 2014), redução na aprendizagem olfativa (YANG et al., 2012; WILLIAMSON; BAKER; WRIGHT, 2013; ZHANG; NIEH, 2015), imunocompetência (BRANDT et al. 2016) e suscetibilidade à infecção por patógenos (RAYMANN et al., 2018).

Whitehorn et al. (2012) relataram uma redução no crescimento das abelhas e na população das colônias, impactando significativamente os genes de desenvolvimento das abelhas rainhas e sua reprodução, pelo efeito tóxico do inseticida imidacloprid, associado à ausência e diminuição desses insetos no campo. Chauzat et al. (2006) relataram encontrar resíduos de imidacloprid em 11 amostras de mel de 125 colmeias avaliadas. Sua concentração variou entre os valores 1,1 a 5,7 ug kg<sup>-1</sup>.

O uso dos inseticidas do grupo químico dos neonicotinoides foi temporariamente proibido na União Europeia no ano de 2018 (ERICKSON, 2013; SGOLASTRA et al., 2020), porém, eles continuam sendo utilizados em vários outros países (MITCHELL et al., 2017). Seu uso não se restringe apenas a tratamentos em cultivos de áreas agrícolas, mas também está presente em ambientes urbanos e florestais, sendo muito utilizado em centros de jardinagem e viveiros e como medicamentos tópicos contra pulgas (JESCHKE et al., 2011; LENTOLA et al., 2017).

No Brasil, a aplicação de produtos fitossanitários sintéticos contendo o ingrediente ativo imidacloprid é autorizado para uso em mais de 40 culturas e está no *ranking* entre os sete inseticidas mais vendidos em 2018 (IBAMA, 2019a). Considerando os riscos para os insetos polinizadores, sua aplicação foi limitada. A normativa do IBAMA nº 17/2009 desautoriza em carácter cautelar, a aplicação por pulverização aérea, em todo o território nacional, durante o período de floração (IBAMA, 2019b).

### 3.7 Fenilpirazol: fipronil

Fipronil, conforme nomenclatura oficial da IUPAC, (RS)-5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile, é um inseticida de amplo espectro que pertence à família fenilpirazol. Faz parte de produtos de controle de insetos em áreas residenciais, aplicações fitossanitárias no manejo de pragas na agricultura e medicamentos veterinários (TINGLE et al., 2003).

O fipronil afeta o sistema nervoso central do inseto, atuando nos receptores do ácido gama aminobutírico (GABA) (LAW; LIGHTSTONE, 2008), provocando hiperexcitação e atividade descontrolada do sistema nervoso central, resultando na morte do inseto, mesmo quando aplicado em baixas concentrações (TINGLE et al., 2003; GUNASEKARA et al., 2007). Devido à sua alta ação neurotóxica e efeitos residuais de longa duração, o fipronil se tornou um dos agrotóxicos mais utilizados na agricultura, o que tem gerado diversos problemas de saúde no mundo (APARICIO-MURIANA et al., 2020).

No meio ambiente, o fipronil se degrada lentamente na vegetação, solo e na água com meia-vida variando entre 36 horas e 7,3 meses, dependendo do substrato e das condições (TINGLE et al., 2003). Ele se degrada em quatro produtos principais: fipronil-sulfona, fipronil-sulfeto, fipronil-amida e fipronil-desulfinil (BOBE et al., 1998). Outros estudos mostraram que alguns produtos de degradação do fipronil (por exemplo, fipronil-sulfona) têm maior significado toxicológico do que o composto original (ZHAO et al., 2005).

O fipronil é altamente tóxico para abelhas ( $DL_{50} = 0,004$  mg abelha<sup>-1</sup>), lagartos [ $DL_{50}$  para *Acanthodactylus dumerili* (Lacertidae) é 30 microgramas a.i/g bw] e aves galináceas ( $DL_{50} = 11,3$  mg kg<sup>-1</sup> para codornizes do norte), mas mostra baixa toxicidade para aves aquáticas ( $DL_{50} > 2150$  mg kg<sup>-1</sup> para pato-real). É moderadamente tóxico para mamíferos de laboratório por exposição oral ( $DL_{50} = 97$  mg kg<sup>-1</sup> para ratos;  $DL_{50} = 91$  mg kg<sup>-1</sup> para camundongos) (TINGLE et al., 2003).

O fipronil atua como bloqueador não competitivo do receptor de ácido gama-aminobutírico no sistema nervoso central dos insetos, afetando os canais de cloreto dependentes de glutamato, causando hiperexcitação, paralisia e morte (GUNASEKARA et al., 2007). Esses inseticidas são extremamente prejudiciais para as abelhas, provocando alterações nas enzimas responsáveis pela regulação de processos fisiológicos como transmissão neural, metabolismo de xenobióticos e estresse oxidativo (ROAT et al., 2017). Prejudicam habilidades cognitivas (gustativas e olfativas) e a capacidade locomotora das abelhas (comunicação/ orientação de voo) (ROAT et al., 2017), o sistema imunológico é afetado, com aumento da suscetibilidade a patógenos, redução no número de ovos nas colônias, progredindo para o abandono das colônias (ZALUSKI et al., 2015).

Estudos demonstram que o fipronil ocasiona mortalidade em massa de abelhas nas colônias, sendo mais agressivo quando comparado ao inseticida imidacloprid do grupo dos neonicotinoides (HOLDER et al., 2018). Uma simulação demográfica utilizando o fipronil demonstrou uma mortalidade de 4.000 a 9.000 abelhas durante uma semana de exposição ao inseticida, formando um tapete de abelhas mortas em frente as colônias (HOLDER et al., 2018).

Os metabólitos de fipronil têm a capacidade de se bioacumular nos organismos das abelhas. Análises utilizando o corpo inteiro de operárias, demonstraram que apenas uma única refeição à base de fipronil é altamente tóxica, permanecendo por pelo menos 6 dias inalterado no organismo das abelhas, tendo destaque o metabólito fipronil sulfona (HOLDER et al., 2018). Estudos anteriores demonstram que o fipronil sulfona é mais tóxico para insetos do que para mamíferos (HAINZL; CASIDA, 1996). O fipronil é classificado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos como um grupo C (Possível carcinógeno humano), com base no aumento observado em tumores de células foliculares da tireoide em ambos os sexos de rato sob seus efeitos (USEPA, 2018).

## REFERÊNCIAS

- ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; MACIEL, R. M. A.; COLOMBO, F. C.; LIBARDONI, G.; BATTISTI, L.; LOZANO, E. R.; GHISI, N. C.; COSTA-MAIA, F. M.; POTRICH, M. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 32282–32298, 2021.
- AL-WAILI, N.; SALOM, K.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M. J. E. N. SCOZZAFAVA, A.; TAN, D. X.; VIDELA, L. A. Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 9 p. 2012.
- AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e abelhas. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 2, p. 53-62, 2012.
- APARICIO-MURIANA, M. M.; LHOTSKA, I.; GARCIA-CAMPANA, A. M.; LARA, F. J. A first approach using micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of fipronil and fipronil-sulfone in eggs. **Electrophoresis**, v. 41, n. 3-4, p. 202-208, 2020.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.
- BARBOSA, M. V.; SOUSA, E. M. L. Biologia floral, ecologia da polinização e eficiência na produção de sementes de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em sistemas agrícolas. **Gaia Science**, v. 10, p. 272–283, 2016.
- BARGANSKA, Z.; NAMIESNIK, J. Pesticides analysis of bee and bee products samples. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 159-171, 2010.
- BARGANSKA, Z.; SLEBIODA, M.; NAMIESNIK, J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. **Food Control**, v. 31, p. 196–201, 2013.
- BARR, D. B.; NEEDHAM, L. L. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. **Journal of Chromatography B**, v. 778, p. 5-29, 2002.
- BASS, C.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 121, p. 78-87, 2015.
- BILANDZIC, N.; DOKIĆ, M.; SEDAK, M.; KOLANOVIĆ, B. S.; VARENINA, I.; KONČURAT, A.; RUDAN, N. Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. **Food Chemistry**, v. 128 p. 1160-1164, 2011.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; CORNELIS A. M.; GESTEL, V.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p.973–992, 2012.
- BLASCO, C.; LINO, C. M.; PICÓ, Y.; PENA, A.; FONT, G.; SILVEIRA, M. I. N.; J. Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, p. 155-160, 2004.
- BLASCO, C.; VAZQUEZ-ROIG, P.; ONGHENA, M.; MASIA, A.; PICO, Y. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry: comparison of

different extraction procedures. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 4892–4901, 2011.

BOBE, A.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M.; MULLER, M. A. Behavior of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. **Pesticide science**, v.52, p. 275-281, 1998.

BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A.; NOOME, D. A.; SIMON-DELISO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 35–67, 2015.

BONMATIN, J. M.; MOINEAU, I.; CHARVET, R.; COLIN, M. E.; FLECHE, C.; BENGSCHE, E. R. Behavior of imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees. **Environmental Chemistry. Green Chemistry and Pollutants in Ecosystem**, p 483– 494, 2005.

BRANDEBURGO M. A. M.; GONÇAVES, L. S. Environmental influence on the aggressive (defense) behaviour and colony development of africanized bees (*Apis mellifera*). **Ciência e Cultura**, v. 42, n. 10, p. 759-771, 1990.

BRANDT, A.; GORENFLO, A.; SIEDE, R.; MEIXNER, M.; BÜCHLER, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal Insect Physiol.**, v. 86, p. 40–47, 2016.

BRASIL. Lei Federal nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 11459 12 jul. 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Instrução Normativa Conjunta nº 01, de 28 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a aplicação dos ingredientes ativos imidacloprido, clotianidina, tiametoxam e fipronil. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, Seção 1, pág. 10, 4 de janeiro de 2013.

CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMO, E.; PICO, Y. Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. **Science Total Environ.** v. 605-606, p. 745-754, 2017.

CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMO, E.; PICÓ, Y. Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. **Environmental Pollution**, v. 241, p. 106-114, 2018.

CALDERONE, N. W. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992 – 2009. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. 24–28, 2012.

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, C. F.; BUENO FILHO, J. S. S.; BAPTISTA, A. P. M.; Toxicidade de acaricidas / inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis Mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 597–606, 2009.

CASTILHOS, D.; DOMBROSKI, J. L. D.; BERGAMO, G. C.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use in brazilian agricultural areas. **Apidologie**, v. 50, n. 5, p. 657– 668, 2019.

CHAM, K. O.; NOCELLI, R. C. F.; BORGES, L.; VIANA-SILVA, F. E. C.; TONELLI, C. A. M.; MALASPINA, O.; MENEZES, C.; ROSA-FONTANA, A. S.; BLOCHTEIN, B.; FREITAS, B. M.; PIRES, C. S. S.; OLIVEIRA, F. F.; CONTRERA, F. A. L.; TOREZANI, K. R. S.; RIBEIRO, M. F.; SIQUEIRA, M. A.; ROCHA M. C. L. S. A. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 36-48, 2019.

CHAUZAT, M. P.; FAUCON, J.P.; MARTEL, A.C.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M. A Survey of Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France. **Journal of Economic Entomology**, v.99, n.2, p.253-262, 2006.

CHENG, N.; GAO, H.; DENG, J.; WANG, B.; XU, R.; CAO, W. Removal of chloramphenicol by macroporous adsorption resins in honey: a novel approach on reutilization of antibiotics contaminated honey. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 9, p. 169-172, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623–636, 2008.

CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. A. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RÚVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; TOLEDO, T. C. S. O. A.; LOPES, T.S. Pollination by *Apis mellifera* in transgenic soy (Glycine max (L.) Merrill) Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR and conventional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 267–271, 2008.

CHIESA, L. M.; LABELLA, G. F.; GIORGI, A.; PANSERI, S.; PAVLOVIC, R.; BONACCI, S.; ARIOLI, F. The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution. **Chemosphere**, v. 154, p.482-490, 2016.

CIESLIK, E. SADOWSKA-ROCIK, A.; RUIZ, J.M.M.; SURMA-ZADORA, M. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. **Food Chem.** v.125, p. 773–778, 2011.

CINEGAGLIA, N. C.; BERSANO, C. R. O.; ARAÚJO, M. J. A. M.; BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells in vitro. **Evid Based Complement Alternat Med**, p.1-6, 2013.

COLIN, T.; PLATH, J. A.; KLEIN, S. VINE, P.; DEVAUD, J. M.; LIHOREAU, M.; MEIKLE, W. G.; BARRON, A. B. The miticide thymol in combination with trace levels of the neonicotinoid imidacloprid reduces visual learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 51, p. 499–509, 2020.

COSTA, P. S. C.; OLIVEIRA, J. S. **Manual prático de criação de abelhas**. Viçosa – MG: Aprenda Fácil, 2018. 424 p.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R. V.; PARUELO, J.; RASKIN, R. G.; SUTTON, P.; N BELT, M. C. D. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, p. 253–260, 1997.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 192 p.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, v. 5, p. 1402-1419, 2011.

D'AMATO, C.; TORRES, J.; MALM, O. DDT (Dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão. **Química Nova**, v. 25, p. 995-1002, 2002.

DÁVILA, M.; MARCHINI, L. C. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. **Boletim da Indústria animal**, v. 62, n. 1, p. 79-90, 2005.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.

ELBERT, A.; HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELERT, W. NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, v. 64, p.1099-1105, 2008.

ERICKSON, B. Regulation: Europe bans three neonicotinoids linked to honeybee population declines. **ACS Macro Letters**, v.2, n.5, p.361–365, 2013.

FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELL, R. Risks the neonicotinoid insecticides to honey bee. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, p. 719-731, 2014.

FELL, R. D.; COBB, J. M. Miticide residues in Virginia honeys. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, p. 822–827, 2009.

FERNÁNDEZ, M.; PICÓ, Y.; MAÑES, J. Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1502-1511, 2002.

FONSECA, V. L. I.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNI, A. Abelhas sociais e flores análise polínica como método de estudo. In: **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 1993. Cap. 1, p. 17-30.

FREITAS, B. M.; SILVA, C. I. O papel dos polinizadores na produção agrícola no Brasil. In: A.B.E.L.H.A (Org.). **Agricultura e polinizadores**. São Paulo: Associação Brasileira de Estudos das Abelhas, 2015, p. 9-18.

FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L.; LÓPEZ, T. L.; AGUADO, S. C.; SALVADOR, I. M. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1048, p.199-206, 2004.

FRIED, B.; SHERMA, J. **Thin-layer chromatography**. 4 ed. New York: Taylor & Francis Group, 1999.

GALLO, D. O.; NAKANO, O.; SILVERA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA-CHAO, M.; AGRUNA, M. J.; CALVETE, G. F.; SAKKAS, V.; LLOMPART, M.; DAGNAC, T. Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain. **Analytica Chimica Acta**, v. 672, p. 107-113, 2010.

GARIBALDI, L. A.; CARVALHEIRO, L. G.; LEONHARDT, S. D.; AIZEN, M. A.; BLAAUW, B. R.; ISAACS, R.; KUHLMANN, M.; KLEIJN, D.; KLEIN, A. M.; KREMEN, C.; MORANDIN, L.;

SCHEPER, J.; WINFREE, R. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. **Front. Ecol. Environ.**, v. 12, p. 439–447, 2014.

GARIBALDI, L. A.; SCHULTE, L. A.; NABAES JODAR, D. N.; GOMEZ CARELLA, A. S.; KREMEN, C. Time to integrate pollinator science into soybean production. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 36, n. 7, p. 573-575, 2021.

GAUTHIER, M. State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 683, p. 97-115, 2010.

GAWEL, M.; KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; SEMENIUK, S.; GOLISZEK, M.; BUREK, O.; POSYNIAK, A. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 282, p. 36-47, 2019.

GAZZONI, D. L. **Soja e abelhas**. Embrapa: Brasília, DF, 2017. 151 p.

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO JR., E. A.; VEIGA, A. K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, n. 2, p. 209–223, 2015.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 103-118. 2015.

GOULSON, D. Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, p. 997-987, 2013.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, 2015.

GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal Pesticids Science**, v.32, n.3, p. 189–199, 2007.

HAINZL, D.; CASIDA J.E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.12746-12767, 1996.

HAN, P.; NIU, C.-Y.; LEI, C.-L.; CUI, J. J.; DESNEUX, N. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1612-1619, 2010.

HEIMBACH, E.; SCHMUCK, R.; GRÜNEWALD, B.; CAMPBELL, P.; SAPPINGTON, K.; STEEGER, T.; DAVIES, LES P. The challenge: assessment of risks posed by systemic insecticides to hymenopteran pollinators. New perception when we move from laboratory via (semi-)field to landscape scale testing? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 1, p.17-24, 2017.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J. F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, p. 348–350, 2012.

HLADIK, M.; MAIN, A.; GOULSON, D. Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 6, p. 3329-3335, 2018.

HOLDER, P. J.; JONES, A.; TYLER, C. R.; CRESSWELL, J. E. Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 51, p. 13033-13038, 2018.

HOOPER, D. U.; CHAPIN, F. S.; EWEL, J. J.; HECTOR, A.; INCHAUSTI, P.; LAVOREL, S.; LAWTON J. H.; LODGE, D. M.; LOREAU, M.; NAEEM, S.; SCHMID, B.; SETAL. A. H.; SYMSTAD, A. J.; VANDERMEER, J.; WARDLE, D. A. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. **Ecological Monographs**, v. 75, p. 3-35, 2005.

HUNG, K. J.; KINGSTON, J. M.; ALBRECHT, M.; HOLWAI, D. A.; KOHN, J. R. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of The Royal Society B**, p. 1-8, 2018.

IDIAZ-FORERO, I.; KUUSEMETS, V.; MAEND, M.; LIIVAMAEGI, A.; KAART, T.; LUIG, J. Effects of forest habitats on the local abundance of bumblebee species: a landscape-scale study. **Baltic Forestry**, v.17, n. 2, p. 235-242, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Sistema Eletrônico de Informações – SEI. **Memorando 1019510**. Brasília – DF: 22 fev 2019a. 7 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Relatório de estudos da reavaliação, imidacloprid**. 2013. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/04-Primeira-entrega-estudos-REAVALIACAO-IMIDACLOPRIDO.pdf>>. Acesso em: jul. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Sistema Eletrônico de Informações – SEI. **Avaliação de risco ambiental do ingrediente ativo imidacloprido para insetos polinizadores** - Parecer Técnico Nº SEI IBAMA 6220406. Brasília – DF: 2019b. 298 p.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES - IPBES. POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T. et al. (eds.). **The Assessment report of the Intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services on pollinators, pollination and food production**. Bonn, Germany: IPBES, 2016. 552 p.

JACOB, C. R. O.; MALAQUIAS, J. B.; ZANARDI, O. Z.; SILVA, C. A. S.; JACOB, J. F. O.; YAMAMOTO, P. T. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 28, p. 744–753, 2019b.

JACOB, C. R. O.; ZANARDI, O. Z.; MALAQUIAS, J. B.; SILVA, C. A. S.; YAMAMOTO, P. T. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 224, p. 65–70, 2019a.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 2897–2908, 2011.

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F. **Pollinator protection**. A bee & pesticide handbook. Cheshire: Wicwas Press, 1990. 212 p.

JOHNSON, R. M. Honey bee toxicology. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p.415–434, 2015.

JUNQUEIRA, C. N.; AUGUSTO, S. C. Bigger and sweeter passion fruits: effect of pollinator enhancement on fruit production and quality. **Apidologie**, v. 48, p. 131–140, 2017.

KARISE, R.; RAIMETS, R. BARTKEVICS, V.; PUGAJEVA, I.; PIHLIK, P.; KERES, I.; WILLIAMS, I. H.; A VIINALASS, H.; MÄND, M. Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments? **Chemosphere**, v. 188, p. 389-396, 2017.

KASIOTIS, M. K.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; ANASTASIADOU, P.; MACHERA, K.; Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. **Science of the Total Environment**, v. 485, p. 633–642, 2014.

KERR, W. E. The history of the introduction of African bees in Brazil. **Apiculture in Western Australia**, v. 2, p. 53-55, 1967.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, p. 303-313, 2007.

KMELLÁR, B.; FODOR, P.; PAREJA, L.; FERRER, C.; MARTINEZ-UROZ, M. A.; VALVERDE, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatog. A**, v. 1215, n. 1, p. 37-50, 2008.

KUJAWSKI, M. W.; BARGAŃSKA, Ż.; MARCINIAK, K.; MIEDZIANOWSKA, E.; KUJAWSKI, J. K.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS – Comparison of pesticide recoveries of two liquid–liquid extraction based approaches. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 517-523, 2014.

LAMBIN, M.; ARMENGAUD, C.; RAYMOND, S.; GAUTHIER, M. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. **Arch. Insect. Biochem. Physiol**, v. 48, p. 129-134, 2001.

LAW, R. J.; LIGHTSTONE, F. C. Gaba receptor insecticide non-competitive antagonists may bind at allosteric modulator sites. **Int. J. Neurosci.**, v. 118, p. 705–734, 2008.

LEHOTAY, S. J. Food safety analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 5329–5330, 2018.

LENTOLA, A.; DAVID, A.; ABDUL-SADA, A.; TAPPARO, A.; GOULSON, D.; HILL, E. M. Ornamental plants on sale to the public are a significant source of pesticide residues with implications for the health of pollinating insects. **Environ. Pollut.**, v. 228, p. 297– 304, 2017.

LEVER, J. J.; VAN NES, E. H.; SCHEFFER, M.; BASCOMPTE, J. The sudden collapse of pollinator communities. **Ecology Letters**, v. 17, p. 350-359, 2014.

LI, Z. G.; LI, M.; HUANG, J. N.; MA, C. S.; XIAO, L. C.; HUANG, Q.; ZHAO, Y. Z.; NIE H. Y.; SU, S. K. Effects of sublethal concentrations of chlorpyrifos on olfactory learning and memory performances in two bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Sociobiology**, v. 64, p. 174-181, 2017.

LONG, E. Y.; KRUPKE, C. H. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

MAHBOBI, A.; FARSHINEH-ADL, M.; WOYKE, J.; ABBASI, S. Effects of the age of grafted larvae and the effects of supplemental feeding on some morphological characteristics of Iranian queen honey bees (*Apis mellifera meda* Skorikov, 1929). **Journal of Apicultural Science**, v. 56, n. 1, p. 93-98, 2012.

MALHAT, F. M.; HAGGAG, M. N.; LOUTFY, N. M. OSMAN, M. A.M.; AHMED, M.T. Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. **Chemosphere**, v. 120, p. 457-461, 2015.

MANDAL, M. D.; MANDAL, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154-160, 2011.

MCGREGOR, S. E. **Insect pollination of cultivated crop plants**. Washington (DC): United States Department of Agricultural Research Service, 1976, 496 p.

MELO, M. M.; OLIVEIRA, N. J. F.; LAGO, L. A. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e galos. Parte I. Organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides. **Revista de Educação Continuada**, CRMV-SP, v. 5, n. 2, p. 188-195, 2002.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2. ed. United States of America: The Johns Hopkins, 2000.

MITCHELL, E. A. D.; MULHAUSER, B.; MULOT, M.; MUTABAZI, A.; GLAUSER, G.; AEBI, A. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. **Science**, v. 358, n. 6359, p. 109–111, 2017.

MORAIS, M. M.; JONG, D.; MESSAGE, D.; GONÇALVES, L. S. Perspectivas e desafios para o uso das abelhas *Apis mellifera* como polinizadores no Brasil. In: **Polinizadores no Brasil**. São Paulo, SP: EdUSP, 2012. p. 203–236.

MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. **Bee Culture**, v. 128, p. 1-15, 2000.

MUNDO, M. A.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; WOROBO, R. W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 1–8, 2004.

NAIARA GOMES, I.; VIEIRA, K. I. C.; GONTIJO, L. M.; HELDER CANTO RESENDE, H. C. Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 97-107, 2020.

NAKAJIMA, T.; TSURUOKA, Y.; KANDA, M.; HAYASHI, H.; HASHIMOTO, T.; MATSUSHIMA, Y. YOSHIKAWA, S.; NAGANO, C.; OKUTOMI, Y.; TAKANO, I. Determination and surveillance of nine acaricides and one metabolite in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants**. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, v. 32, n. 7, p. 1099-1104, 2015.

NASCIMENTO, W. M.; GOMES, E. M. L.; BATISTA, E. A.; FREITAS, R. A. Utilização de Agentes Polinizadores na Produção de Sementes de Cenoura e Pimenta Doce em Cultivo Protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 494-498, 2012.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; SCHMUCK, R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Pest Management Science**, v. 57, p. 577-586, 2001.

NOTARDONATO, I.; PASQUALE A.; CINELLIA, G.; RUSSO, M. V.; Trace determination of acaricides in honey samples using XAD-2 adsorbent and gas chromatography coupled with an ion trap mass spectrometer detector. **Royal Society of Chemistry**; v. 4, p. 42424–4243, 2014.

OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **Plos Biology**, v. 5, n. 6, p.1195-1199, 2007.

OLIVEIRA, J. E. M.; NICODEMO, D.; OLIVEIRA, F. F. Contribuição da polinização entomófila para a produção de frutos de aceroleira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p. 56-65, 2015.

OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 389-394, 2005.

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

PANG, G.F.; FAN, C.L.; LIU, Y.M.; CAO, Y.Z.; ZHANG, J.J.; FU, B.L.; LI, X.M.; LI, Z.Y.; WU, Y.P. Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additive and Contaminants**. v. 23, p. 777-810, 2006.

PANSERI, S.; CATALANO, A.; GIORGI, A.; ARIOLI, F.; PROCOPIO, A.; BRITTI, D.; CHIESA, L.M. Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. **Food Control**, v. 38, p. 150–156, 2014.

PAREJA, L.; COLAZZO, M.; PARADA, A. P.; NIELL, S.; LETELIER, C.; BESIL, N.; CESIO, M. V; HEINZEN, H.; Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 3844-3858, 2011.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 125 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 8, p. 17–29,1995.

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

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, SILVERIO, M.; F. O. Optimization of the liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21. p. 1307–1311, 2010.

PIRANI J. R; LAURINDO M. C; **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP; FAPESP, 1993. Projeto Ciclo.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, F.R. C.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

PISA, L. W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; MCFIELD, M.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **EnvironSci Pollut Res. Int.**, v. 22, p. 68–102, 2015.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E.; Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. **The natural history of pollination**. Portland: Timber Press, 1996.

RAGHUNANDAN, K.; BASAVARAJAPPA, S. Analysis of multifloral honey of the giant honeybee, *Apis Dorsata* F., for pesticide residues in Southern Karnataka, India. **European Journal of Zoological Research**, v. 2, n. 3, p. 22–28, 2013.

RAMIREZ-ROMERO, R.; CHAUFAX, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. **Apidologie**, v. 36, p. 601-611, 2005.

RAMOS, J. M.; CARVALHO, N. C. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 6, n. 10, p. 1–21, 2007.

RANGEL, J.; KELLER, J. J.; TARPY, D. R. The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth. **Insectes Sociaux**, v. 60, n. 1, p. 65-73, 2013.

RATCLIFFE, N.; AZAMBUJA, P.; MELLO, C. B. Recent advances in developing insect natural products as potential modern-day medicines. **Hindawi** 2014, p.1–22, 2014.

RAYMANN, K.; MOTTA, E. V. S.; GIRARD, C.; RIDDINGTON, I. M.; DINSE, J. A.; MORAN, N. A. Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, p. 1-13, 2018.

REILLY, J. R.; ARTZ, D. R.; BIDDINGER, D.; BOBIWASH, K.; BOYLE, N. K.; BRITTAIN, C.; BROKAW, J.; CAMPBELL, J. W.; DANIELS, J.; ELLE, E.; ELLIS, J. D.; FLEISCHER, S. J.; GIBBS, J.; GILLESPIE, R. L. GUNDERSEN, K. B.; GUT, L.; HOFFMAN, G.; JOSHI, N.; LUNDIN, O.; MASON, K. MCGRADY, C. M.; PETERSON, S. S.; PITTS-SINGER, T. L.; RAO, S.; ROTHWELL, N.; ROWE, L.; WARD, K. L.; WILLIAMS, N. M.; WILSON, J. K.; ISAACS, R.; WINFREE, R. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. **Proc. R. Soc.**, n. 287, p. 1-9, 2020.

RIAL-OTERO, R.; GASPAR, E. M.; MOURA, I.; CAPELO, J. L. Chromatographic- based methods for pesticide determination in honey: an overview. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 503-514, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHARDS, A. J. Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield? **Annals of Botany**, v. 88, p. 165-172, 2001.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N.; ANDRADE, R. M. B.; ALMEIDA, M. V. Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. **Química nova**, v. 29, n. 5, p. 950-955, 2006.

ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Biochemical response of the africanized honeybee exposed to fipronil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1652–1660, 2017.

ROCHA, J. S. **Apicultura**. Niterói – RJ: Programa Rio Rural, 2008. 27 p. (Manual técnico, 5).

ROUBIK, D. W. **The pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners**. Roma: Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2018.

RUCKER, R. R.; THURMAN, W. N.; BURGETT, M. Honey bee pollination markets and the internalization of reciprocal benefits. **American Journal of Agricultural Economics**, v. 94, n. 4, p. 956–977, 2012.

SAMPAIO, P.; GUERRA, M. **Receituário agrônomo**. Guia prático para a nova lei dos agrotóxicos. 2. ed. São Paulo: Globo, 1998. p. 256-263.

SÁNCHEZ-BAYO, F. The trouble with neonicotinoids. **Science**, v. 346, p. 806-807, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BELZUNCES, L.; BONMATIN, J. M. Lethal and sublethal effects, and incomplete clearance of ingested imidacloprid in honey bees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, v.26, p.1199–1206, 2017.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOULSON, D.; PENNACCHIO, F.; NAZZI, F.; GOKA, K.; DESNEUX, N. Are bee diseases linked to pesticides? A brief review. **Environment International**, v. 89-90, p. 7-11, 2016.

SANDROK, C.; TANADINI, M.; TANADINI, L. G.; FAUSER-MISLIN, A.; POTTS, S. G.; NEUMANN, P. Impact of chronic neonicotinoid exposure on honey bee colony performance and queen supersedure. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, e103592, 2014.

SCHNEIDER, C. W.; TAUTZ, J. R.; GRÜNEWALD, B.; FUCHS, S.; RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PLOS ONE**, v. 7, e30023, 2012.

SGOLASTRA, F.; MEDRZYCKI, P.; BORTOLOTTI, L.; MAINI, S.; PORRINI, C.; SIMONDELSON, N.; BOSCH, J. Bees and pesticide regulation. Lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, v. 241, 108356, 2020.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Agrotóxicos: aspectos gerais. In: SILVA, C. M. M. S. (org.); FAY, E.F. (org.). **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa, 2004. p.17-73.

SILVA, R. A. G.; FARIA, A. M.; Determinação de multirresíduos de agrotóxicos em méis produzidos na região do triângulo mineiro por UHPLC-MS/MS; **Química nova**, v. 43, n. 3, p. 307-313, 2020.

SILVA, R. C. M.; TORRE, P. AP.; MATOS, J. C. O uso incorreto do inseticida fipronil e sua influência na morte das abelhas no sul do Brasil. **Processando o saber**, v. 13, p. 93-110, 2021.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 5–34, 2015.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 3, 1-7, 2007.

SUN, H.; GEA, X.; LVA, Y.; WANG, A. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v.1237, p.1-23, 2012.

TADEI, R.; DOMINGUES, C. E. C.; MALAQUIAS, J. B.; CAMILO, E. V.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 3277, p. 1-11, 2019.

TAN, K.; CHEN, W.; DONG, S.; LIU, X.; WANG, Y.; NIEH, J. C. Imidacloprid alters foraging and decreases bee avoidance of predators. **PLOS ONE**, v. 9, e102725, 2014.

TAUTZ, J. **O fenômeno das abelhas**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 288 p.

TESOVNIK, T.; ZORC, M.; RISTANIC, M.; GLAVINIĆ, U.; STEVANOVIĆ, J.; NARAT, M.; ZORAN STANIMIROVIĆ, Z. Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees. **Environmental pollution**, v.256, n.10, 2020.

TETTE, P. A. S.; ROCHA GUIDI, L.; ABREU GLÓRIA, M. B.; FERNANDES, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**, v. 149, p. 124-141, 2016.

TINGLE, C. C. D.; ROTHER, J. A.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. L. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology, and Human Health Concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1-66, 2003.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 339-364, 2003.

TONG, Z.; WU, Y. C.; LIU, Q. Q.; SHI, Y. H.; ZHOU, L. J.; LIU, Z. Y.; YU, L. S.; CAO, H. Q. Multi-residue analysis of pesticide residues in crude pollens by UPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 21, n.12. p.1-13, 2016.

TOSI, S.; BURGIO, G.; NIEH, J.C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific Reports**, v. 7, n.1201, 2017.

TSVETKOV, N.; SAMSON-ROBERT, O.; SOOD, K.; PATEL, H. S.; MALENA, D. A.; GAJIWALA, P. H.; MACIUKIEWICZ, P.; FOURNIER, V.; ZAYED, A. Chronic exposure to

neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science**, v.356, p.1395–1397, 2017.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food**, 2018. Disponível em: [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-dx?SID=e2cdd6c5583f6a8893f98e9d51c52d69&node=pt40.24.180&rgn=div5#se40.24.180\\_1222](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-dx?SID=e2cdd6c5583f6a8893f98e9d51c52d69&node=pt40.24.180&rgn=div5#se40.24.180_1222)). Acesso em: 18 fev. 18.

VALDOVINOS-NÚÑEZ, G. R.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G.; ANCONA-XIU, P.; MOO-VALLE, H.; CARMONA, A.; SÁNCHEZ, E. R. Comparative Toxicity of Pesticides to Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Journal of Economic Entomology**, v.102, n. 5, p. 1737–1742, 2009.

VARSAMIS, D. G.; TOULOUPAKIS, E.; MORLACCHI, P.; GHANOTAKIS, D.F.; GIARDI, M. T.; CULLEN, D. C. Development of a photosystem II-based optical microfluidic sensor for herbicide detection. **Talanta**, v. 77, p. 42-47, 2008.

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

WILLIAMSON, S. M.; BAKER, D. D.; WRIGHT, G. A. Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. **Invert. Neurosci.**, v.13, p.63-70, 2013.

WILLIAMSON, S. M.; WILLIS, S. J.; WRIGHT, G. A. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. **Ecotoxicology**, v. 23, p. 1409-1418, 2014.

WINSTON, M. L. **The biology of the honey bee**; Cambridge: Harvard University Press, 1987.

WOLOWSKI, M.; AGOSTINI, K.; RECH, A. R.; VARASSIN, I. G.; MAUÉS, M.; FREITAS, L.; CARNEIRO, L. T.; BUENO, R. O.; CONSOLARO, H.; CARVALHEIRO, L.; SARAIVA, A. M.; SILVA, C. I. **Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil**. São Carlos, SP : Cubo, 2019. Livro eletrônico.

WU, M.; CHANG, Y.; LU, K.; YANG, E. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 88, p. 12-20, 2017.

WU, Y. Y.; ZHOU, T.; WUBIE, A. J.; WANG, Q.; DAI, P. L.; JIA, H. R. Apoptosis in the nerve cells of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) brain induced by imidacloprid. **Acta Entomol. Sin.**, v. 57, p. 194-203, 2014.

XU, R.; CHENG, N.; HUANG, W.; GAO, H.; DENG, J.; CAO, W. Effects of the processing steps on parathion levels during honey production and parathion removal by macroporous adsorption resins. **Food Control**, v. 23, p. 234–237, 2012.

YANG, E. C.; CHANG, H. C.; WU, W. Y.; CHEN, Y. W. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **PLOS ONE**, v. 7, e49472, 2012.

YUAN, Z.; YAO, J.; LIU, H.; HAN, J.; TREBŠE, P. Photodegradation of organophosphorus pesticides in honey medium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 108, p. 84-88, 2014.

ZALUSKI, R.; KADRI, S. M.; ALONSO, D. P.; RIBOLLA, P. E. M.; ORSI, R. O. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology*, V.34, N.5, p. 1062-1069, 2015.

ZHANG, E.; NIEH, J. C. The neonicotinoid imidacloprid impairs honey bee aversive learning of simulated predation. ***Journal of Experimental Biology***, v.218, n.20, p. 3199–3205, 2015.

ZHAO, X.; YEH, J. Z.; SALGADO, V. L.; NARAHASHI, T. Sulfone Metabolite of Fipronil Blocks  $\gamma$ -Aminobutyric Acid- and Glutamate-Activated Chloride Channels in Mammalian and Insect Neurons. ***Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***, v. 314, n.1, p. 363-373, 2005.

ZHENG, W., PARKA, J. A.; ATYA, A. M. A. E.; KIMA, A.K.; CHOA, S. H.; CHOIA, J.M.; YIA, H.; CHOA, S. M.; RAMADANB, A.; JEONGC, J. H.; SHIMD, J. H.; SHIN, H. C.; Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC–MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly. ***Journal of Chromatography***, v. 1072, p. 60–69, 2018.

## 5 ARTIGO 1: IMPACTO DO IMIDACLOPRID EM OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA E A PRESENÇA NO MEL

### RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) são fundamentais na cadeia produtiva, garantindo a diversidade alimentar por meio do serviço ecossistêmico de polinização e da produção de produtos apícolas. Consequentemente, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de toxicidade que o inseticida imidacloprid, também utilizado na cadeia produtiva, provoca por via oral, tópica e por contato em operárias de abelhas *A. mellifera* africanizada, além de verificar se há a presença desse princípio ativo amostras de mel. Os níveis de toxicidade foram verificados através de bioensaios. No bioensaio 1 os níveis correspondem às porcentagens de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01% da concentração recomendada de aplicação do produto comercial Nortox<sup>®</sup> (princípio ativo imidacloprid) no campo, com isto, a obteve-se a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) em 48 horas para *A. mellifera* por contato em superfície contaminada, determinando-se os intervalos dos níveis de concentração a serem utilizados para os próximos bioensaios. Os bioensaios 2 e 3 seguiram as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, guias nº 213 e nº 214, de 1998), determinando a CL<sub>50</sub> (48 horas) do inseticida imidacloprid, para *A. mellifera* por via tópica e oral. No bioensaio 4 foi determinado a CL<sub>50</sub> (48 horas) e a taxa de sobrevivência das abelhas por um período de 120 horas através do contato em superfície contaminada pelo imidacloprid e a interferência no comportamento das abelhas. Amostras de mel foram coletadas em apiários agroecológicos e convencionais georreferenciados e os traços do inseticida imidacloprid foram detectados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV) com extração por SPE C18. A sobrevivência das abelhas foi afetada diretamente em relação à concentração utilizada e ao tempo de exposição, assim como sua capacidade comportamental, demonstrando o efeito residual negativo que o imidacloprid exerce sobre as operárias desta espécie. Amostras de mel provenientes de um apiário convencional apresentaram detecção acima dos limites máximos de resíduos (LMR) permitidos pela EU (0,05 µg mL<sup>-1</sup>), entretanto, amostras dos demais apiários não apresentaram traços deste inseticida. O imidacloprid afeta a taxa de sobrevivência e a capacidade comportamental de *A. mellifera* africanizada, bem como a qualidade do mel.

**Palavras-chave:** Abelha; Neonicotinoides; Segurança alimentar; Toxicidade.

## 5.1 INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) são essenciais ao processo de polinização das culturas e, conseqüentemente, na cadeia produtiva agrícola. A polinização é considerada como um serviço ecossistêmico necessário para a reprodução da maioria das culturas, sendo essencial para garantir a segurança alimentar (KLEIN et al., 2007; GALLAI et al., 2009; IPBES, 2016; JACOB et al., 2019). O serviço ecossistêmico de polinização gera, no mundo, um valor equivalente entre US\$ 235 e 577 bilhões por ano (IPBES, 2016). No Brasil, a contribuição econômica proveniente dos polinizadores representa quase US\$ 45 bilhões (GIANNINI et al. 2015; WOLOWSKI et al., 2019).

Porém, o declínio populacional das abelhas aumenta a preocupação com a segurança alimentar, pois acarreta efeitos negativos ao processo de polinização afetando diretamente a produção de alimentos (SANCHEZ-BAYO et al., 2016; MITCHELL et al., 2017; REILLY J. R. et al., 2020; ABATI et al., 2021). Os produtos fitossanitários sintéticos estão entre as causas mais significativas no declínio populacional das abelhas, destacando-se o grupo químico dos neonicotinoides, usados mundialmente em várias culturas (MITCHELL et al., 2017; DAI et al., 2019; LI et al., 2019; SGOLASTRA et al., 2020; ABATI et al., 2021). Esses inseticidas são neurotóxicos, afetando a sobrevivência, o desenvolvimento, o comportamento e a manutenção das colônias (LUNDIN et al., 2015; JACOB et al., 2019; COLIN et al., 2020). Embora seu uso tenha sido temporariamente restrito na União Europeia (ERICKSON, 2013), eles continuam sendo utilizados em vários outros países (MITCHELL et al., 2017).

No grupo dos neonicotinoides, destaca-se o inseticida imidacloprid, com ação bloqueadora dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) e ocasionando deterioração no sistema nervoso dos insetos (ELBERT et al., 2008; GALLAI et al., 2009; GOULSON, 2013; TAYLOR-WELLS et al., 2015). No Brasil, a aplicação de produtos fitossanitários sintéticos contendo o ingrediente ativo imidacloprid é autorizado para uso em mais de 40 culturas e está no *ranking* entre os sete inseticidas mais vendidos em 2018 (IBAMA, 2019b). Levando-se em consideração os riscos para insetos polinizadores, sua aplicação foi limitada. A normativa do IBAMA nº 17/2009 desautoriza, em carácter cautelar, a aplicação por pulverização aérea, em todo o território nacional, durante o período de floração (IBAMA, 2019a).

O imidacloprid é um inseticida sistêmico que apresenta a capacidade de translocação pelos tecidos das plantas através do sistema vascular (ELBERT et al., 2008; BONMATIN et al., 2015). Assim, pode ser transmitido para as colônias pelo pólen e néctar contaminados que são transportados pelas abelhas e, posteriormente, pelo contato social (inseto-inseto) (TSVETKOV et al., 2017). Outra forma de exposição das abelhas a esse inseticida pode ser por contato direto (pulverização) e oral (SAMSON-ROBERT et al., 2014).

Estudos demonstram que o imidacloprid provoca efeitos letais e subletais em abelhas, interferindo no aprendizado e nas características cognitivas da memória, afetando o forrageamento e o retorno às suas colônias (SCHNEIDER et al., 2012; WU et al., 2014; ZHANG; NIEH, 2015). Outros efeitos negativos também são observados, como aprendizagem visual afetada, olfato prejudicado, tremores e dificuldades na movimentação (HAN et al., 2010; ZHANG; NIEH, 2015; LI et al., 2019; ZHANG et al., 2020), imunocompetência afetada aumentando a suscetibilidade à infecção por patógenos (BRANDT et al., 2016; RAYMANN et al., 2018). Além da desordem de colapso das colônias, o imidacloprid ocasiona a contaminação nos produtos apícolas e a mortalidade em massa de abelhas (ALIFERIS et al., 2010; JACOB et al., 2019).

Dentre os produtos apícolas, destaca-se o mel que é muito utilizado tanto por seu sabor quanto por suas múltiplas propriedades medicinais (MANDAL; MANDAL, 2011; AL-WAILI et al., 2012). Em relação aos diversos atributos que o consumo de mel proporciona, o ideal é que não haja nenhum contaminante presente em sua composição, exigindo-se alta qualidade do produto e garantindo maior segurança para o consumo humano (BILANDŽIĆ et al., 2011; TETTE et al., 2016). No entanto, como qualquer outro alimento, o mel é propenso a vários tipos de contaminação, podendo ser considerado um bioindicador da contaminação ambiental (CHIESA et al., 2016; MITCHELL et al., 2017; GAWEŁ et al., 2019; QUIGLEY et al., 2019).

A ingestão de mel contaminado pode ocasionar sérios riscos para a saúde humana, como toxicidade subaguda e crônica no organismo (RAGHUNANDAN; BASAVARAJAPPA, 2013). Devido a esses riscos, os contaminantes no mel devem ser monitorados, garantindo-se o controle na segurança alimentar (RISSATO et al., 2006; CHIESA et al., 2016; TETTE et al., 2016). Em vários países, as agências governamentais realizam o controle da presença de contaminantes nos alimentos, garantindo a segurança da população quanto ao seu consumo, estabelecendo limites máximos de resíduos (*Maximum residue levels*) – LMR (GARRIDO FRENICH et al., 2004).

Dessa forma, considerando a importância das abelhas *A. mellifera* como polinizadoras e suas relações ecológicas que aumentam a reprodução de plantas, a qualidade de frutas e a produtividade de alimentos (qualidade do mel), este estudo teve por objetivo avaliar os níveis de toxicidade que o inseticida imidacloprid ocasiona em operárias de *A. mellifera* africanizada, pelo contato em superfície, via oral e via tópica, assim como possíveis alterações comportamentais e a possível contaminação do imidacloprid em amostras de mel.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Toxicidade de imidacloprid a operárias de *Apis mellifera* africanizada

#### 5.2.1.1 Local dos experimentos

Os experimentos (bioensaios) foram realizados na Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) – Apicultura e no Laboratório de Controle Biológico (LABCON), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - *campus* de Dois Vizinhos, PR (UTFPR-DV). Os experimentos foram conduzidos com adaptações nas metodologias recomendadas por Brighenti et al. (2007), Baptista et al. (2009), Carvalho et al. (2009) e Libardoni et al. (2021), seguindo as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), para o ensaios de produtos químicos nº 213 e nº 214, de 21 de setembro de 1998.

#### 5.2.1.2 Obtenção do padrão de imidacloprid e das operárias de *A. mellifera*

O padrão de imidacloprid ( $C_9H_{10}ClN_5O_2$  - pureza 99,9% grau HPLC) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich® e uma solução estoque foi preparada, pesando-se 6,0 mg de imidacloprid em uma balança analítica (Shimadzu®), com precisão de quatro casas decimais e dissolvendo esse sólido em 10 mL de metanol grau HPLC, obtendo-se uma concentração de  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  de imidacloprid.

Operárias de *A. mellifera* africanizada foram obtidas de colônias provenientes do apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) – Apicultura, localizado na fazenda experimental da UTFPR-DV. Nesse apiário, as colmeias estão instaladas em estruturas de madeira do tipo Langstroth (Figura 2). Para os bioensaios, foram selecionadas colmeias com quadros identificados, que foram retirados do apiário contendo crias operculadas de 19 dias, acondicionadas em sacos de papel Kraft (60 x70 cm com gramatura 50 mm), lacrados, perfurados e transportados ao Laboratório de Controle Biológico I e, então, alocados em câmara climatizada ( $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , U.R de  $60 \pm 10\%$ ), até sua emergência, obtendo-se operárias de genealogia e idade padronizada (Aproximadamente, 24 horas de fase adulta).



**Figura 2** Colmeias instaladas em estruturas de madeira do tipo Langstroth, no apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) – Apicultura, localizado na fazenda experimental da UTFPR-DV.

**Fonte:** o autor.

### **5.2.1.3 Bioensaio 1: determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) por contato de operárias de *A. mellifera* em superfície vítrea tratada com imidacloprid**

Para a determinação da concentração letal média CL<sub>50</sub> do imidacloprid sobre operárias de *A. mellifera* africanizada com, aproximadamente, 24 horas de fase adulta, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo sete tratamentos com cinco repetições cada, dois controles e cinco níveis de concentração do inseticida imidacloprid. Os níveis correspondem às porcentagens de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01% da concentração recomendada para aplicação do produto comercial Nortox® (1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine (IMIDACLOPRID) - 480,0 g/L) no campo, para a cultura da soja no combate ao percevejo verde (*Nezara viridula*). Os tratamentos foram classificados da seguinte forma: T1 - controle composto com água destilada esterilizada; T2 - controle com água destilada esterilizada e metanol grau HPLC; T3 - 600 µg mL<sup>-1</sup> (100%); T4 – 60 µg mL<sup>-1</sup> (10%); T5 – 6 µg mL<sup>-1</sup> (1%); T6 – 0,6 µg mL<sup>-1</sup> (0,1%); T7 – 0,06 µg mL<sup>-1</sup> (0,01%) de imidacloprid padrão Sigma-Aldrich.

Para o contato das operárias com os tratamentos em superfície vítrea, foram pulverizados 290  $\mu\text{L}$  dos tratamentos em placas de Petri (15 cm diâmetro x 1,5 cm de altura). Para a pulverização, utilizou-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma<sup>®</sup> acoplado a uma bomba Tecnal<sup>®</sup> (TE-058) de pressão constante (1,2  $\text{kgf.cm}^{-1}$ ). As placas foram montadas de forma que houvesse fluxo de ar e acondicionadas em câmara de fluxo laminar horizontal (Veco<sup>®</sup>) para a evaporação completa da água (Metodologia adaptada de Carvalho et al. (2009) e Libardoni et al. (2021)).

Em seguida, dez operárias de *A. mellifera*, anestesiadas com  $\text{CO}_2$  por até 120 segundos, foram inseridas no interior dessas placas, durante duas horas, simulando o contato em campo. Após as duas horas, as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro), identificadas, desinfetadas e cobertas com *voile*, sendo cada gaiola considerada uma repetição. Sobre o *voile* foi adicionado algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi (Açúcar de confeitaria e mel) (Metodologia adaptada de Brighenti et al. (2007)).

As gaiolas contendo as operárias foram mantidas em sala climatizada para criação de insetos ( $27 \pm 2$  °C, U.R. de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 10/14 horas C/E). A mortalidade das operárias foi avaliada 48 horas após o contato das abelhas com as placas pulverizadas com os tratamentos, realizando-se a contagem das abelhas mortas. As abelhas foram consideradas mortas quando não reagiram ao toque de uma pinça Bioquip<sup>®</sup>. A concentração letal média encontrada nesse bioensaio foi utilizada para determinar os intervalos dos níveis de concentração a serem usados nos bioensaios 2 e 3, conforme fator 2.2, preconizado pela OECD guia 213 e 214 (1998).

#### **5.2.1.4 Bioensaio 2: concentração letal média oral ( $\text{CL}_{50}$ ) - OECD**

A análise dos níveis de toxicidade aguda, por via oral, de abelhas operárias de *A. mellifera* para o inseticida imidacloprid foi realizada seguindo a metodologia proposta pela OECD (1998a), guia 2013. Operárias de *A. mellifera* com idade padronizada (Aproximadamente, 48 horas) ficaram sem alimento por um período de 2 horas para garantir que se alimentassem quando o bioensaio fosse iniciado. Em seguida, foram preparadas as dietas compostas por uma solução de água: açúcar (1:1).

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo sete tratamentos (T1; T2; T3; T4; T5; T6 e T7), com cinco repetições cada (composto por dez abelhas por repetição). Os tratamentos foram classificados da seguinte forma: T1 - controle (apenas a dieta); T2 - 7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; T3 - 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; T4 - 57  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; T5 - 82  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; T6 - 107  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; T7 - 132  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do inseticida imidacloprid, as respectivas concentrações

foram diluídas na solução da dieta e determinadas a partir da  $CL_{50}$  obtida no bioensaio 1 ( $32,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), com intervalos estipulados em relação ao fator 2.2, estabelecido pela OECD (1998a).

Para isso, dez operárias de *A. mellifera* africanizada, anestesiadas com  $\text{CO}_2$  por até 120 segundos, foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) identificadas, desinfetadas e cobertas com *voile*, sendo cada gaiola considerada uma repetição. A dieta foi oferecida em recipientes plásticos (1 cm de altura x 2.5 cm de diâmetro), com capacidade para 2 mL (Figura 3), cobertos com tela antiafídica e fixados na parte interna de cada gaiola.



**Figura 3** Recipientes de plásticos com tela antiafídica, para oferecimento da dieta alimentar de cada tratamento do inseticida imidacloprid para abelhas *A. mellifera*.

**Fonte:** o autor.

A quantidade de dieta contendo os tratamentos que receberam concentrações de imidacloprid foi monitorada, obtendo-se o peso dos recipientes com o volume da dieta no início e no final do experimento, a fim de fornecer informações sobre palatabilidade de cada tratamento. Depois de 4 horas, os recipientes com as dietas restantes foram removidos da gaiola e pesados em balança analítica, sendo substituídos por um recipiente contendo a dieta T1 (controle). Nos tratamentos em que não se observou o consumo da dieta durante as primeiras 4 horas (variação nos pesos dos recipientes), foram mantidos por mais 2 horas até ser realizada a troca, conforme recomendação da OECD (1998a).

As unidades experimentais foram mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ , no escuro, conforme recomendado pela OECD (1998a), guia 213. A mortalidade foi registrada 4 horas após o início do teste e, posteriormente, às 24 e 48 horas, porém, quando a mortalidade das abelhas no Tratamento 1 (Controle) era inferior a 10%, o

teste foi estendido até 72 e 98 horas de avaliação. As abelhas foram consideradas mortas quando não reagiram ao toque de uma pinça Bioquip®. Todos os efeitos comportamentais anormais observados durante o período do bioensaio foram registrados.

#### 5.2.1.5 Bioensaio 3: concentração letal média por aplicação tópica (CL<sub>50</sub>) - OECD

Os níveis de toxicidade aguda, por contato, das abelhas operárias de *A. mellifera* para o inseticida imidacloprid foi realizado seguindo a metodologia proposta pela OECD (OECD, 1998b), guia 214. Foram utilizados sete tratamentos e as concentrações do inseticida imidacloprid utilizadas para os tratamentos foram as mesmas do bioensaio 2, sendo que as respectivas soluções foram diluídas em água.

Operárias de *A. mellifera*, com idade aproximada de até 48 horas, foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> por até 120 segundos. Grupos de dez abelhas receberam, individualmente, os tratamentos por aplicação tópica. Um volume de 1 µL de solução de cada tratamento foi aplicado com uma micropipeta Kasvi® (Capacidade de 1-2 µL) no lado dorsal do tórax (Figura 4), após a aplicação as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura × 10 cm de diâmetro), identificadas, desinfectadas e cobertas com *voile*, totalizando cinco repetições por tratamento. A alimentação foi composta por uma solução de água e açúcar (1:1), oferecida em recipientes de plásticos, conforme seção 5.2.1.4.



**Figura 4** Aplicação tópica de 1 µL de solução de cada tratamento do inseticida imidacloprid, aplicado com uma micropipeta no lado dorsal do tórax das abelhas *A. mellifera*.

**Fonte:** o autor.

As unidades experimentais foram mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ , no escuro. A mortalidade foi registrada 4 horas após o início do teste e, posteriormente, às 24 e 48 h. Os demais parâmetros foram os mesmos descritos no bioensaio 2.

#### **5.2.1.6 Bioensaio 4: concentração letal média por contato com superfície contaminada e a relação com o comportamento de *A. mellifera***

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo seis tratamentos (T1; T2; T3; T4; T5 e T6), com quinze repetições cada e, cada repetição, contendo 10 abelhas. Os tratamentos foram classificados da seguinte forma: T1 - controle; T2 –  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; T3 -  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; T4 –  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; T5 –  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  e T6 –  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  do inseticida imidacloprid. As concentrações foram determinadas a partir da  $CL_{50}$  obtida no bioensaio 3 ( $16,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), com intervalos estipulados em relação ao fator 2.2, estabelecido pela OECD (1998a). Após a preparação desse bioensaio, cinco repetições de cada tratamento foram selecionadas, aleatoriamente, para a avaliação pertinente ao bioensaio 4, cinco repetições aleatórias foram utilizadas para análise de caminharmento e cinco para a análise de voo.

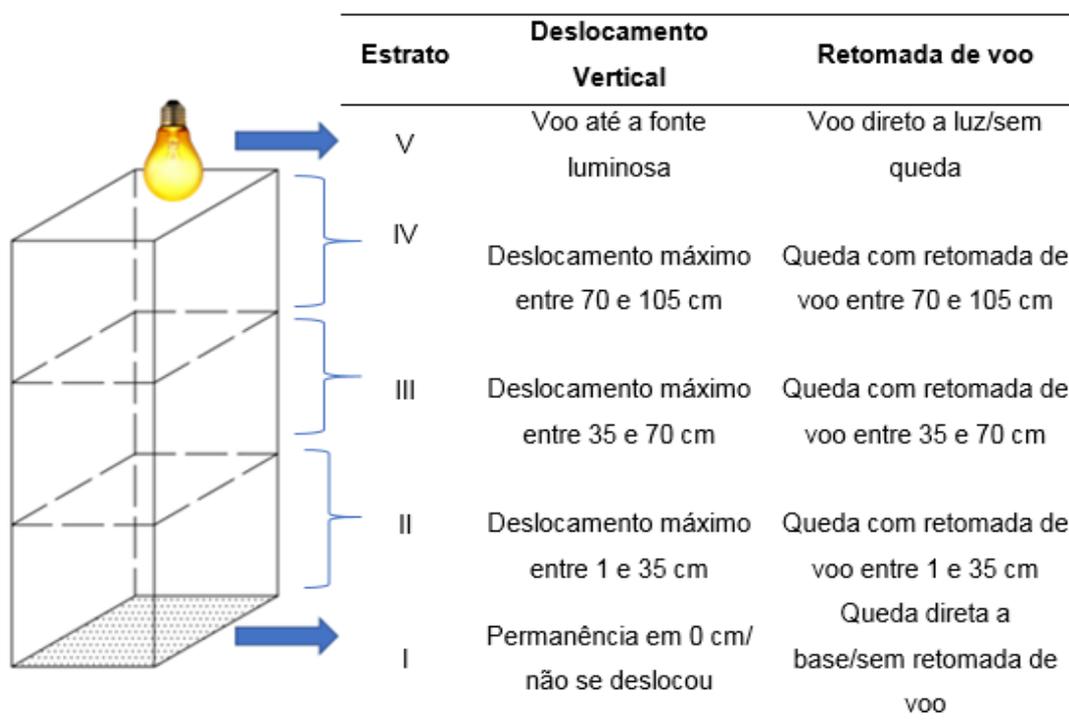
A pulverização e a secagem das placas de Petri com os tratamentos foram realizadas conforme o bioensaio 1. Posteriormente, dez operárias de *A. mellifera*, anestesiadas com  $\text{CO}_2$  por até 120 segundos, foram inseridas no interior dessas placas, durante duas horas. Na sequência, as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC, conforme executado no bioensaio 1, sendo cada gaiola considerada uma repetição.

As gaiolas contendo as operárias foram mantidas em sala climatizada ( $27 \pm 2$  °C, U.R. de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 10/14 horas C/E). A mortalidade das operárias foi avaliada a 1, 2, 4, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, após contato com os tratamentos (Metodologia adaptada de Baptista et al. (2009)). As abelhas foram consideradas mortas quando não reagiram ao toque de uma pinça Bioquip®.

Análise de voo (deslocamento vertical) e retomada de voo (queda livre) de *A. mellifera* africanizada

Após 24 horas do início da montagem do bioensaio 4, 10 abelhas oriundas do tratamento que apresentava a menor concentração de imidacloprid (T2 -  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram selecionadas, aleatoriamente, entre as cinco repetições e submetidas à análise de deslocamento vertical e outras 10 abelhas selecionadas para queda livre. Esse bioensaio foi

realizado em sala com ausência de iluminação natural, com uma torre de madeira (35 cm x 35 cm de largura e 105 cm de altura), a qual continha uma fonte luminosa na parte superior e uma fita métrica em seu interior, com cinco níveis (estratos), conforme Figura 5.



**Figura 5** Ilustração da torre de voo e classificação dos estratos, de acordo com o comportamento das abelhas nos testes de queda e voo.

**Fonte:** Adaptado de Tome et al. (2015).

Para o deslocamento vertical, as abelhas, individualmente, foram liberadas na base inferior da torre. Durante um minuto, observou-se o comportamento de cada abelhas e foi contabilizado o estrato máximo atingido, conforme Figura 5. Para a análise de retomada de voo (queda livre) as abelhas, uma a uma, foram liberadas da base superior aberta da torre. Verificou-se em qual dos estratos cada abelha conseguiu retomar o voo ou se houve queda até o estrato I.

### 5.2.2 Análise de imidacloprid em amostras de mel

Uma vez observado o alto impacto que o inseticida imidacloprid ocasiona em abelhas *A. mellifera*, realizou-se a detecção desse princípio ativo em amostras de mel, coletadas em apiários localizados em propriedades agroecológicas e convencionais.

### 5.2.2.1 Área de estudo

A área de estudo englobou sete apiários, sendo dois em propriedades agroecológicas localizadas no município de Verê – PR ( $25^{\circ} 52' 53''$  S  $52^{\circ} 54' 28''$  W). Outros cinco apiários estão localizados em propriedades convencionais: quatro no município de Capanema - PR ( $25^{\circ} 40' 19''$  S  $53^{\circ} 48' 32''$  W) e um no município de Capitão Leônidas Marques – PR ( $25^{\circ} 28' 44''$  S  $53^{\circ} 36' 50''$  W). Os apiários convencionais pertencem a regiões lindeiras ao Parque Nacional do Iguaçu, não ultrapassando uma distância de 7000 m da bordadura da reserva. Nesses cinco apiários as colônias de *A. mellifera* recebiam suplementação alimentar (Açúcar) constante.

### 5.2.2.2 Coleta e georreferenciamento das amostras

A coleta das amostras de mel ocorreu no período de novembro de 2018 a janeiro de 2019. Esse período é considerado a safra, segundo os apicultores da região em estudo. Para a coleta utilizou-se EPI de corpo inteiro (Figura 6) e, em cada apiário, foram coletadas oito amostras de mel com, aproximadamente, 250 g cada e armazenadas em caixas gerbox devidamente higienizadas, esterilizadas e catalogadas. As amostras foram coletadas em favos de diferentes colmeias de cada apiário, totalizando 56 amostras.



**Figura 6** Coleta de mel em apiário de estudo, no município de Capanema - PR.

**Fonte:** o autor.

Os apiários foram georreferenciados com o auxílio de um receptor de sinal de sistema de posicionamento global (GPS) Juno 4 Trimble®. Os dados foram descarregados em um ambiente de sistemas de informações geográficas (SIG) e a delimitação espacial denominada

como Buffer correspondeu a uma área com raio de 3 km do centro de cada apiário em estudo (SANTOS et al. 2011; BRITO; BRITO, 2014; CAMARGO et al., 2014). Essa distância foi estabelecida considerando-se a metade da distância percorrida pelas abelhas ao redor do seu *habitat*, de até 6 km (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007). Para que o trabalho de forrageamento seja eficiente, as fontes de alimento devem estar no máximo a 3 km de distância das colônias, pois o desgaste metabólico em longos percursos podem ser maior do que o benefício com a apreensão do alimento (CAMARGO; PEREIRA; LOPES, 2002).

#### Aquisição e classificação das imagens Sentinel 2

Foram adquiridas gratuitamente imagens Sentinel 2, diretamente do portal eletrônico do Programa Europeu de Observação da Terra Copernicus. As imagens utilizadas foram capturadas em 22 de outubro de 2020, sendo que, para o processo de escolha, levou-se em consideração a presença de nuvens e ruídos. Ressalta-se que as cenas foram disponibilizadas com as devidas correções geométricas e atmosféricas. Assim, foi realizada a reprojeção para o sistema de referência SIRGAS 2000 e feita uma composição colorida falsa cor com as bandas espectrais 8, 4 e 3, todas com 10 m de resolução espacial.

Em seguida, por meio de uma inspeção visual das áreas de interesse, como também das observações feitas em campo no momento das coletas, foram identificadas cinco classes de uso e ocupação da terra para o estudo, sendo elas: mata, corpos hídricos, agricultura, pastagem e área construída. Com as classes definidas, coletaram-se 50 amostras para cada classe de uso, distribuídas na imagem e, por meio do algoritmo de distância mínima euclidiana, realizou-se a classificação supervisionada para cada região de coleta. Todas as etapas supracitadas foram realizadas no *software* QGIS 3.16.9, com o auxílio do *plugin* *Semi-automatic classification* (SCP) 7.9.5.

#### 5.2.2.3 Armazenamento das amostras

As amostras de favos de mel coletadas foram maceradas e filtradas, extraíndo-se apenas o mel. Depois desse procedimento, foram armazenadas em recipientes de vidros com capacidade de 250 g, higienizados e esterilizados, próprios para alimentos e devidamente catalogados. As amostras foram levadas até o Laboratório de Análises Agro-Ambientais, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* de Cascavel – PR, e acondicionados sob temperatura reduzida (-5 °C) com o intuito de manter suas propriedades físico-químicas, até o processo de extração.

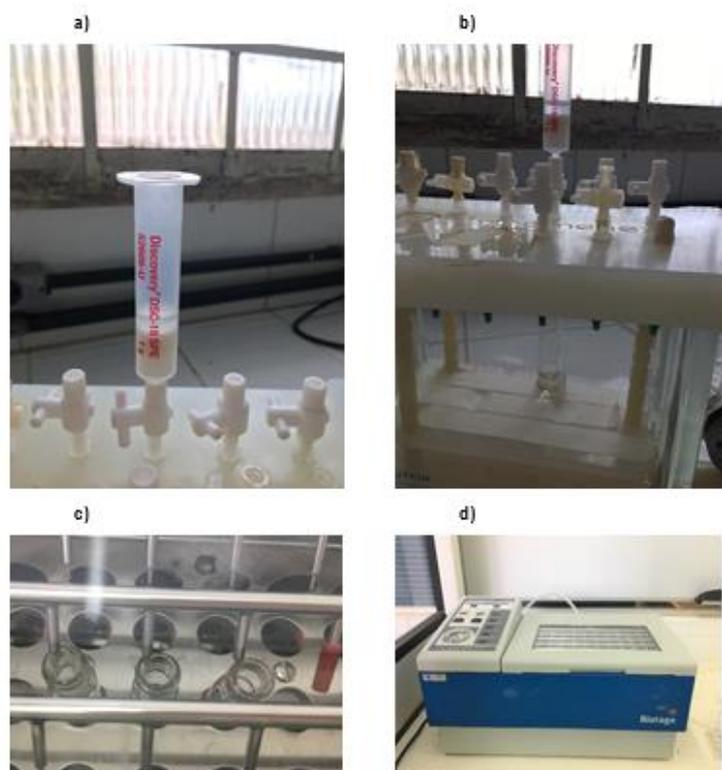
#### 5.2.2.4 Extração das amostras de mel

As vidrarias utilizadas para o processo de extração foram devidamente lavadas e, posteriormente, passadas em água destilada por osmose reversa e mantidas em uma mufla por um período de 4 horas a 350 °C. Tal procedimento de limpeza é imprescindível para minimizar a presença de interferentes.

Após o processo de limpeza das vidrarias, pesou-se, aproximadamente,  $1,0 \pm 0,1$  g de cada amostra de mel em tubos de ensaio, utilizando-se uma balança analítica (Shimadzu®). Em seguida, cada amostra foi diluída em água até o volume de 3,0 mL e a solução foi homogeneizada sob agitação em vortex por 1 min.

O condicionamento dos cartuchos SPE C18 1000 mg / 6 mL foi realizado conectando os cartuchos a um minifold (Figura 7a), após, adicionaram-se 5,0 mL de metanol, aplicou-se vácuo e descartou-se o solvente, sem permitir a secagem do adsorvente. Em seguida, o procedimento foi repetido com 5,0 mL de água ultrapura MilliQ. Em seguida, os cartuchos foram carregados com 1,0 mL da solução da amostra e lavados com 5,0 mL de água destilada. Essas etapas foram realizadas permitindo-se a completa secagem do adsorvente.

Os extratos foram eluídos com 3,0 mL de metanol e coletados em tubos de ensaio (Figura 7b). Os eluídos foram secos sob fluxo de nitrogênio (Figura 7c) no equipamento TurboVap® LV (Figura 7d), à temperatura de 40 °C, até a completa evaporação do solvente. Os analitos foram ressuspensos em metanol e transferidos quantitativamente para vials de cromatografia até se completar 1,0 mL de solução. Cada vial foi tampado, envolvido com papel alumínio e armazenado no congelador, até o momento da determinação cromatográfica.



**Figura 7** a) Condicionamento dos cartuchos SPE C18 1000 mg/6 mL conectados a um Minifold para a realização de extração de imidacloprid em mel; b) Coleta dos extratos eluídos das amostras de mel em tubos de ensaios; c) Secagem dos extratos eluídos das amostras.

**Fonte:** o autor.

#### 5.2.1.5 Determinação de imidacloprid em mel

As vidrarias utilizadas para o preparo da curva padrão foram devidamente lavadas e, em seguida, enxaguadas com etanol 99,5%, metanol grau HPLC e hexano grau HPLC, todos por duas vezes. Esse procedimento de limpeza é necessário para minimizar a presença de interferentes.

Após o processo de limpeza das vidrarias, foi preparada uma solução estoque pesando-se 8,0 mg de imidacloprid ( $C_9H_{10}ClN_5O_2$  - pureza 99,9% grau HPLC, Sigma-Aldrich®) em balança analítica (Shimadzu®) com precisão de quatro casas decimais e dissolvendo-se esse sólido em 10 mL de metanol grau HPLC, obtendo-se uma concentração de  $800,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de imidacloprid. A partir dessa solução, foi preparada uma solução mãe (Imidacloprid) de  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a partir da qual foram preparadas seis soluções de trabalho de imidacloprid, todas em metanol, com as seguintes concentrações: 0,05; 0,10; 0,15; 0,25, 0,50 e  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A detecção de imidacloprid nas amostras de mel e os parâmetros para a validação, foram analisados em sistema cromatográfico utilizando-se um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Shimadzu®; Figura 8), equipado com amostrador automático

(SIL-20A). A coluna cromatográfica utilizada foi a Kromasil C18, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm da marca AkzoNobel®. Os parâmetros cromatográficos do método de determinação foram detector UV (SPD-20A), comprimento de onda 270 nm, modo de eluição isocrático, fase móvel água-acetonitrila (70:30 v/v), fluxo 1 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção 30  $\mu\text{L}$ , temperatura de aquecimento da coluna 25 °C e tempo de corrida 8 min.



**Figura 8** Shimadzu HPLC, localizado no Laboratório de Análises Agro-Ambientais, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (LAAA-UNIOESTE).

Fonte: o autor.

#### 5.2.1.6 Parâmetros de validação cromatográficos para análise de imidacloprid em mel

A fim de se atestar a confiabilidade do método, foram testados alguns dos parâmetros de validação, seguindo as recomendações da *in-house validation* (RIBANI et al., 2004). A validação em laboratório consistiu em analisar os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção, limites de quantificação e recuperação.

A seletividade foi realizada em triplicatas, comparando-se uma matriz com adição do analito (Padrão de imidacloprid com concentração de 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e uma matriz sem a adição do analito. O resultado dessas medições foi avaliado considerando-se os tempos característicos de retenção do pico, sendo observado que não há sinal do analito na matriz sem adição do composto imidacloprid.

A linearidade foi obtida por padronização externa e formulada como expressão matemática, usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis, área do pico e a concentração da substância, a ser quantificada é expressa pela Equação 1 (INMETRO, 2007).

$$y = ax + b \quad (1)$$

em que:

y: resposta medida (absorbância, altura ou área do pico etc.);

x: concentração;

a: inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b: interseção com o eixo y, quando  $x = 0$ .

Através da equação da reta, a linearidade foi avaliada levando-se em consideração o coeficiente de determinação linear ( $R^2 \geq 0,99$ ) como indicador do modelo matemático. Para o ajuste da curva analítica, foram preparadas soluções estoques e de trabalho, conforme a seção 5.2.1.5, com três triplicatas injetadas em ordem crescente.

O limite de detecção (LD) foi determinado utilizando-se o método visual, que consiste em injetar soluções de concentração crescente até o aparecimento de um sinal analítico visível. O limite de quantificação (LQ) considerado foi a concentração do menor ponto da curva analítica, visto que amostras com concentrações inferiores a esse valor não poderiam ser quantificadas por fugirem da linearidade do método.

O ensaio de recuperação foi realizado comparando-se os resultados analíticos da solução padrão de imidacloprid de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , submetidos ao processo de extração em fase sólida, com os resultados que serão obtidos com a mesma solução padrão não extraída. O ensaio de recuperação será calculado conforme a Equação 2 (ANVISA, 2017).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos, geralmente, estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (GARP, 1999).

### 5.2.3 Análise estatística

Para os bioensaios 1, 2 e 3, foi realizada análise de concentração letal do inseticida imidacloprid em operárias de *A. mellifera* africanizada utilizando-se o pacote MASS (VENABLES, RIPLEY, 2002) do *software* R (R CORE TEAM, 2019).

Para o bioensaio 4 foi realizada análise de sobrevivência das operárias de *A. mellifera* africanizada usando Kaplan-Meier. Os tratamentos foram comparados usando o teste de *log-rank* e a análise completa foi realizada utilizando-se o pacote de sobrevivência (THERNEAU, 2015) do *software* R (R CORE TEAM, 2019).

Para a análise de caminhamento das abelhas foi utilizado o teste de comparação de médias (Tukey), com o *software* R, para verificar se houve ou não diferença entre os tratamentos para  $p$ -valor  $<0,05$ . Para a análise de voo (Deslocamento vertical) e retomada de voo foram utilizados modelos lineares generalizados, regressão ordinal, através do teste de Wald (Qui-quadrado), utilizando-se o *software* R, pacote ordinal.

Para as análises de contaminação no mel, foi verificada a homogeneidade e/ ou normalidade dos dados pelo teste de Shapiro Wilk. Os dados não apresentaram normalidade, sendo, então, aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de Nemenyi (NEMENYI, 1963), utilizando-se o pacote PMCMR (POHLERT, 2014) do *software* R (R CORE TEAM, 2019).

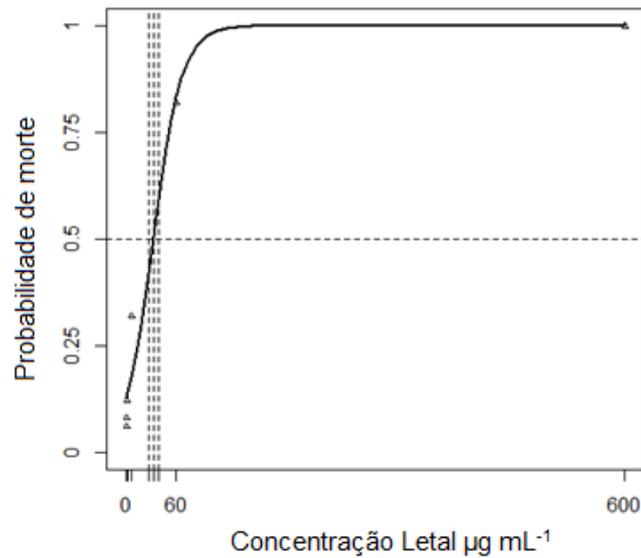
### 5.3 RESULTADOS

#### 5.3.1 Toxicidade de imidacloprid a operárias de *A. mellifera* africanizada

Em todos os bioensaios realizados, a mortalidade das abelhas provenientes do controle foi inferior a 10%, conforme recomendado pelas diretrizes da OECD guias 213 e 214 (1998).

##### 5.3.1.1 Bioensaio 1: determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) por contato de operárias de *A. mellifera* em superfície vítrea tratada com imidacloprid

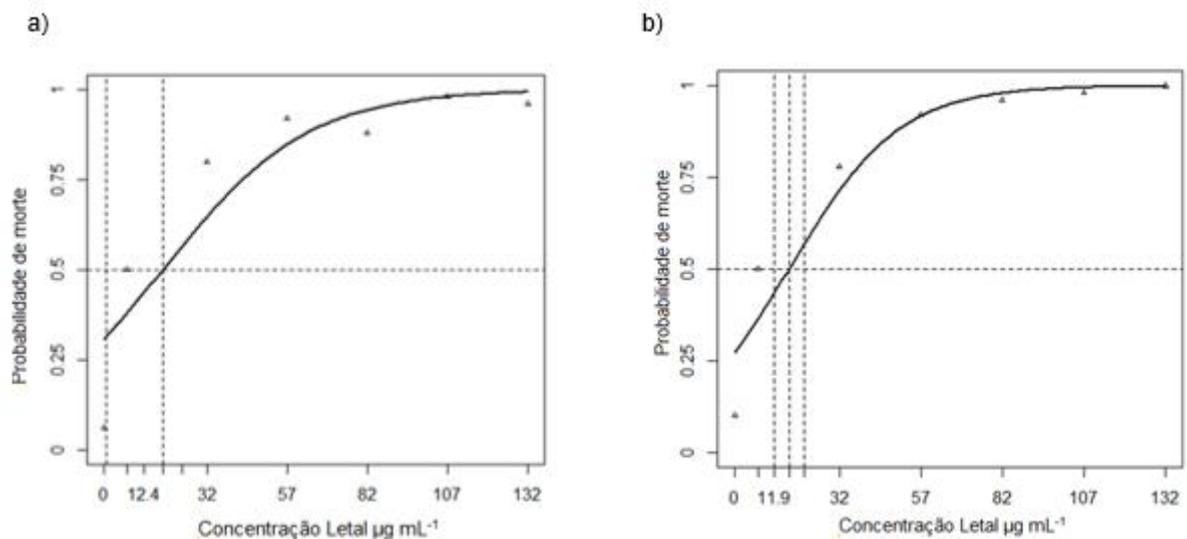
A CL<sub>50</sub> do inseticida imidacloprid, obtida 48 horas após o início do experimento, para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em contato com superfície vítrea foi de 32.49  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 9).



**Figura 9** Determinação da  $CL_{50}$  (48 horas) do inseticida imidacloprid para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em contato com superfície vítrea.  $IC_{95\%}$ : 26,25 - 38,71  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.3.1.2 Bioensaios 2 e 3: concentração letal média por via oral ( $CL_{50}$ ) e por via tópica ( $CL_{50}$ ) – OECD

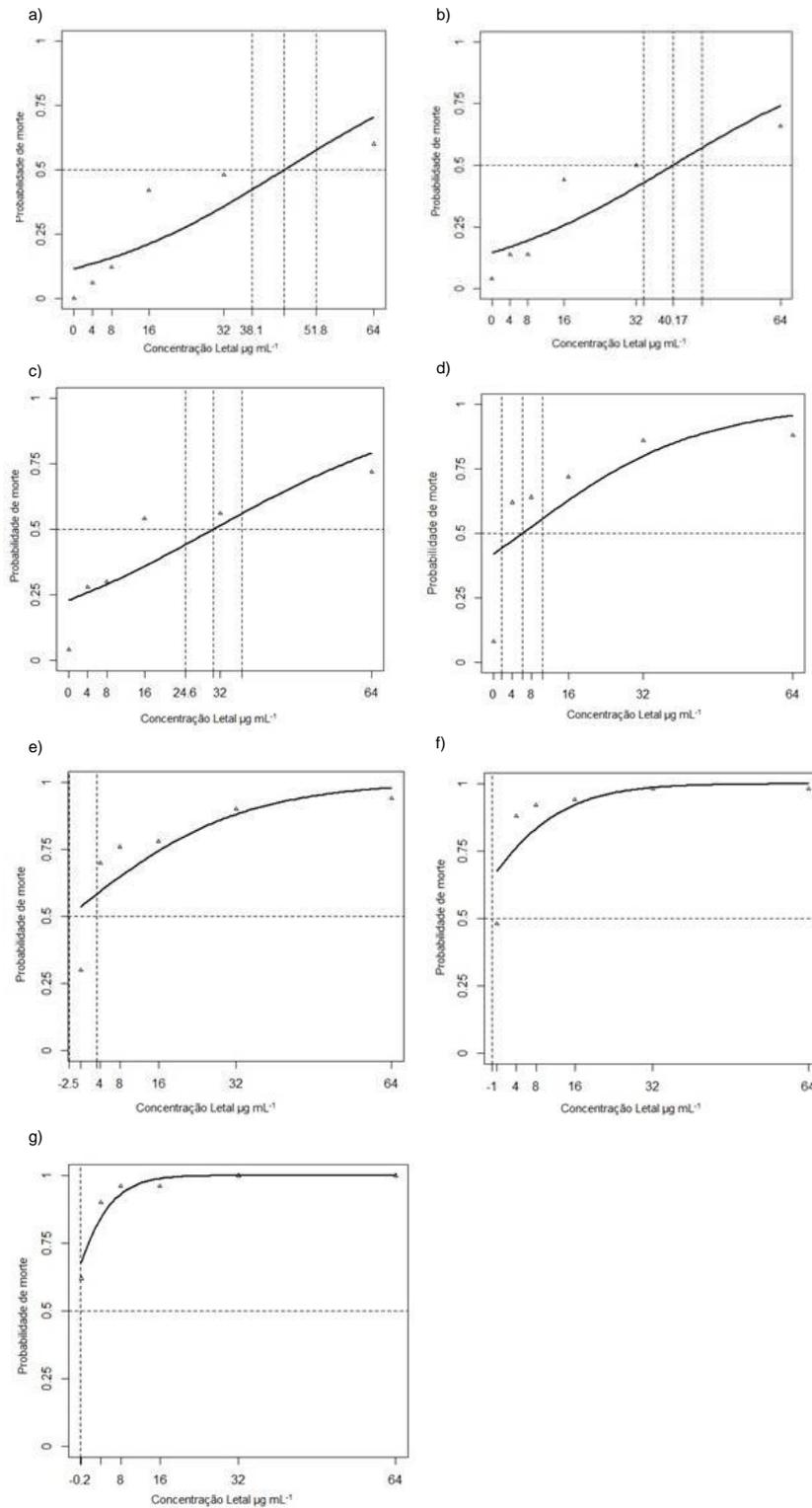
A  $CL_{50}$  do inseticida imidacloprid, obtida 48 horas após o início do experimento, para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em contato via oral foi de 18,27  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 10a) e por via tópica foi de 16,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 10b).



**Figura 10** a) Determinação da  $CL_{50}$  (48 horas) do inseticida imidacloprid para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em contato via oral;  $IC_{95\%}$ : 12,45 - 24,09  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; b) Determinação da  $CL_{50}$  (48 horas) do inseticida imidacloprid para as abelhas por via tópica.

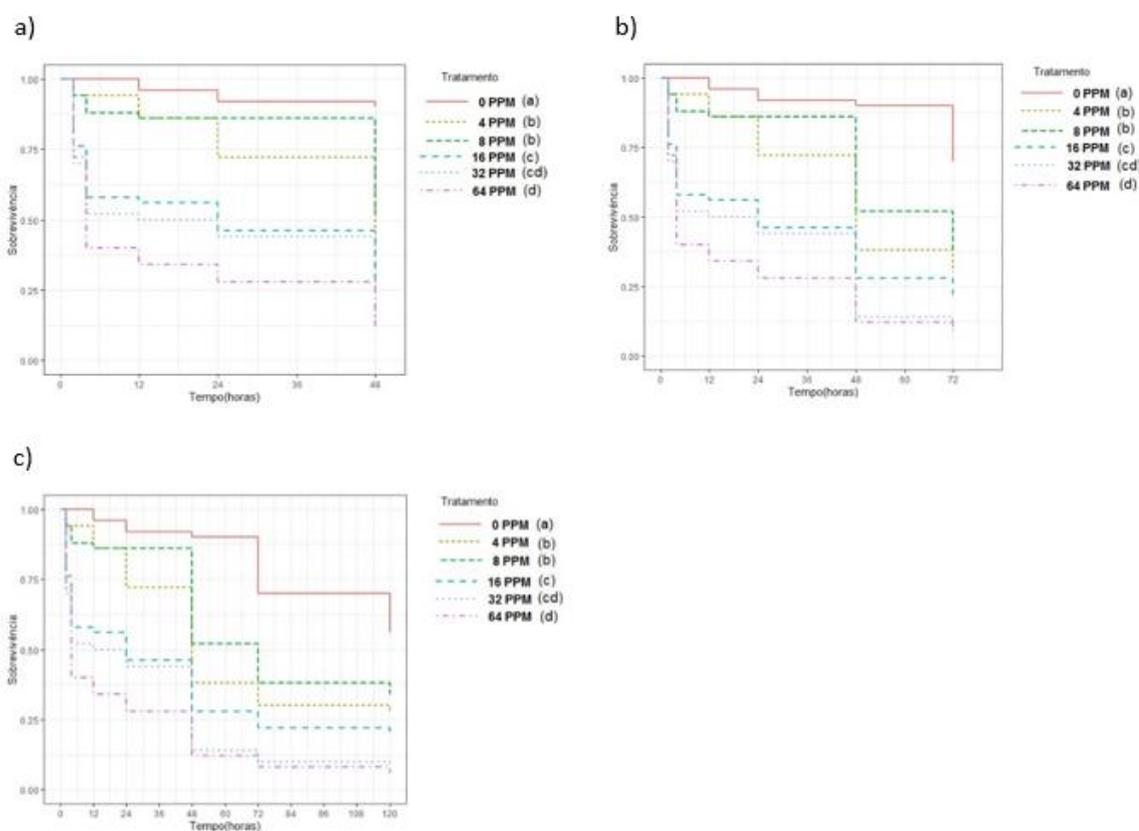
### **5.3.1.3 Bioensaio 4: concentração letal média por contato com superfície contaminada e a relação com o comportamento de *A. mellifera***

A  $CL_{50}$  do inseticida imidacloprid, obtida 4 horas após o início do experimento, para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada por contato em superfície contaminada foi de  $44,92 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 11a), depois de 12 horas foi de  $40,11 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 11b), depois de 24 horas foi  $30,57 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 11c), 48 horas após foi de  $6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 11d), em 72 horas foi  $-2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 11e), 96 horas foi de  $-6,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 11f) e  $-3,15 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 11g), após 120 horas.



**Figura 11** Determinação da CL<sub>50</sub> do inseticida fipronil: a) 4 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre 38,10 e 50,80 µg mL<sup>-1</sup>; b) 12 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre 33,65 e 46,87 µg mL<sup>-1</sup>; c) 24 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre 24,61 e 36,52 µg mL<sup>-1</sup>; d) 48 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre 1,75 e 10,53 µg mL<sup>-1</sup>; e) 72 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre -8,17 e 3,26 µg mL<sup>-1</sup>; f) 96 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre -12,38 e 1,01 µg mL<sup>-1</sup>; g) 120 horas após o início do experimento, IC<sub>95%</sub>: entre -1,01 e -0,23 µg mL<sup>-1</sup>.

Após a determinação da  $CL_{50}$ , foi analisada a sobrevivência das abelhas operárias *A. mellifera*, durante os períodos de 48, 72 e 120 horas. A presença do inseticida imidacloprid em todos os tratamentos causou redução nas taxas de sobrevivência em relação ao controle. Em 48 horas, as abelhas oriundas dos tratamentos com 16, 32 e 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  estavam com taxas de sobrevivência abaixo de 50% (Figura 12a). Após 72 horas (Figura 12b), todos os tratamentos com o princípio ativo imidacloprid provocaram queda na taxa de sobrevivência das abelhas, estando abaixo de 50%. No período de 120 horas (Figura 12c), a sobrevivência das abelhas expostas às concentrações de 16, 32 e 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (PPM) estava com taxas menores que 25%.

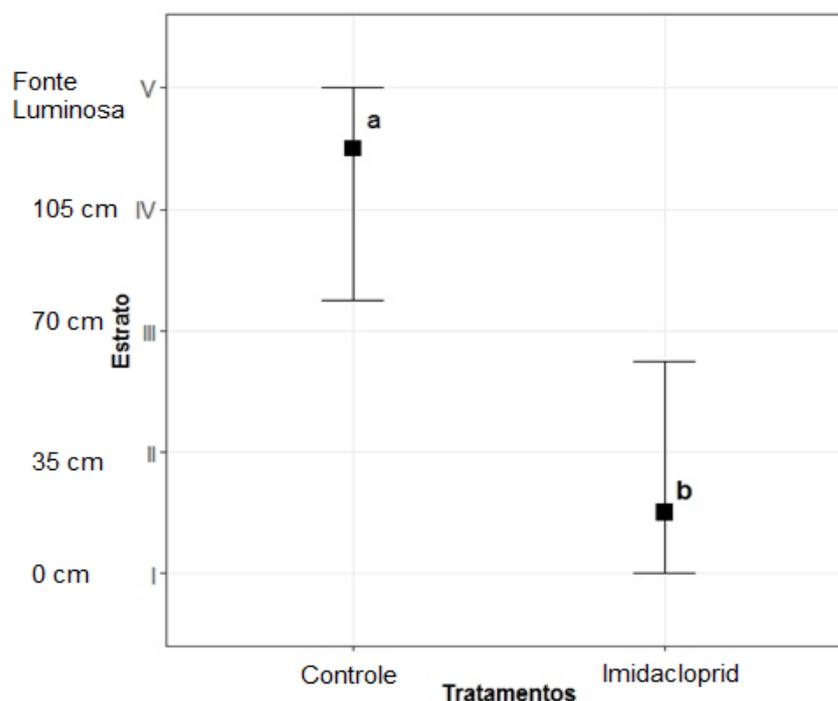


**Figura 12** Gráfico de sobrevivência de abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada, por Kaplan-Meier, após contato com superfície contaminada com inseticida imidacloprid: a) Ajustado ao período de 48 horas; b) Ajustado ao período de 72 horas; c) Ajustado ao período de 120 horas.

**Nota:** Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Análise de voo (deslocamento vertical) e retomada de voo (queda livre) de *A. mellifera* africanizada

As operárias de *A. mellifera* africanizada expostas ao inseticida imidacloprid e submetidas à avaliação de efeitos subletais por meio da análise de capacidade de voo tiveram o deslocamento e a retomada do voo afetados, conforme Figura 13. Não conseguiram se deslocar verticalmente e nem retomar voo em direção a fonte luminosa da torre.



**Figura 13** Análise de capacidade de voo de operárias de *A. mellifera* africanizada, após 24 horas de contato com superfície contaminada com inseticida imidacloprid.

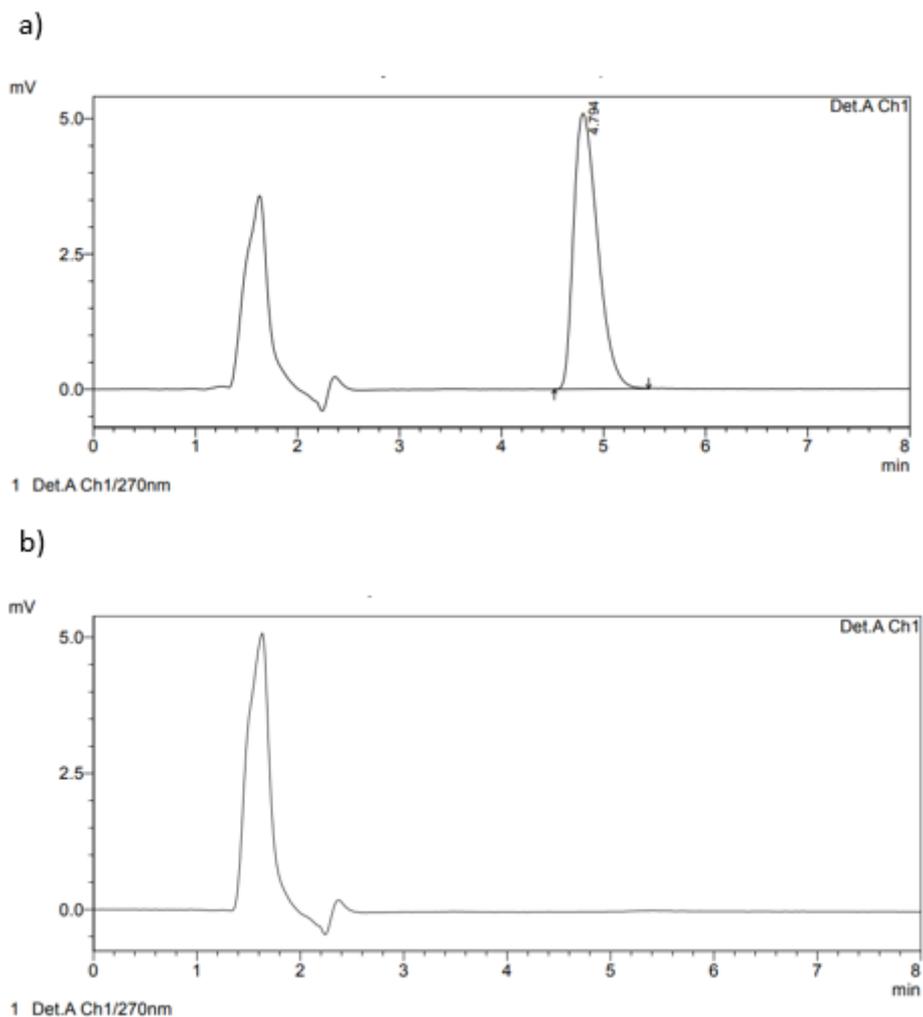
**Nota:** Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 Determinação de imidacloprid em mel

Os parâmetros de validação cromatográfico para extração, detecção e quantificação de imidacloprid em amostras de mel por cromatografia líquida de alta eficiência foram satisfatórios, estando de acordo com as recomendações da Anvisa (2017) e GARP (1999). A seletividade apresentou bons resultados, não havendo interferência de outros resíduos no método além do solvente metanol e do padrão imidacloprid, garantindo que o pico de resposta fosse exclusivamente do composto de interesse, como se observa nas Figuras 14a e 14b.

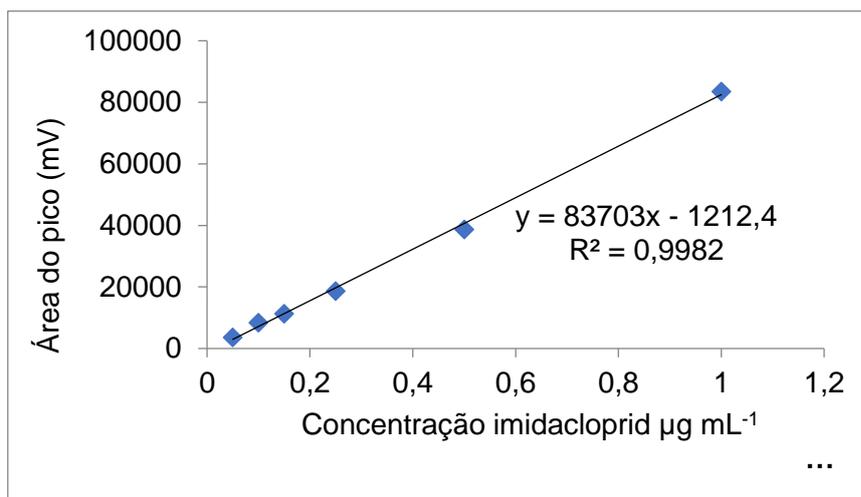
O tempo de retenção do pico do imidacloprid foi de 4,794 min (Figura 13a), apresentando simetria no formato do pico. No tempo entre 1 e 3 min, observou-se outro pico,

o qual é referente à solução da fase móvel água-acetonitrila (70:30 v/v), como se observou no cromatograma do solvente metanol utilizado para a diluição do imidacloprid (Figura 13b).



**Figura 14** a) Cromatograma correspondente ao tempo de retenção do composto químico imidacloprid; b) Cromatograma correspondente ao solvente metanol utilizado para a diluição do composto químico imidacloprid.

A curva analítica do imidacloprid que expressa a equação da reta e sua linearidade está apresentada na Figura 15.



**Figura 15** Curva analítica do imidacloprid realizada no HPLC.

A linearidade do método apresentou excelente resultado, estando de acordo com o recomendado pela Anvisa (2017), que define um coeficiente de determinação igual a 0,99. O limite de detecção (LD) encontrado para imidacloprid foi de  $0,007 \mu\text{g mL}^{-1}$  e de quantificação  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ , demonstrando uma ótima sensibilidade do detector UV utilizado. A taxa de recuperação encontrada no presente estudo foi de 92,25%, valor considerado ideal e que está de acordo com os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos, os quais, geralmente, estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  (GARP, 1999), demonstrando que o método de extração utilizado foi adequado. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das concentrações de imidacloprid encontradas nas amostras de mel.

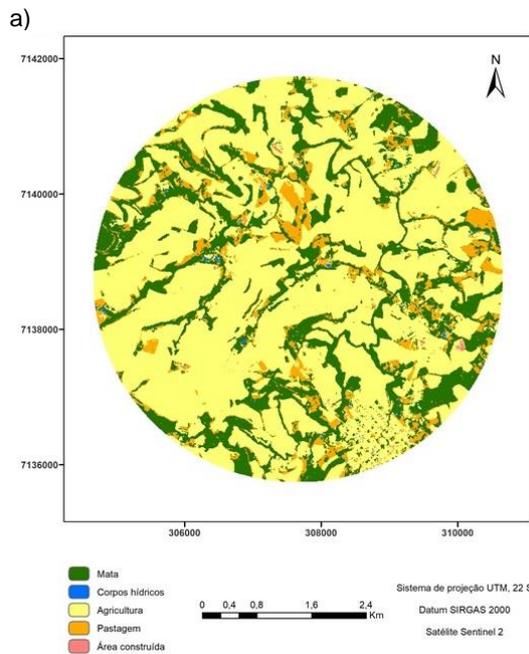
**Tabela 3** Concentração do inseticida imidacloprid em amostras de mel de sete apiários

Amostras de mel	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Apiário 1 (propriedade agroecológica)	nd a
Apiário 2 (propriedade agroecológica)	nd a
Apiário 3 (propriedade lindeira)	nd a
Apiário 4 (propriedade lindeira)	nd a
Apiário 5 (propriedade lindeira)	nd a
Apiário 6 (propriedade lindeira)	nd a
Apiário 7 (propriedade lindeira)	0,06 b
p-valor	<0.01

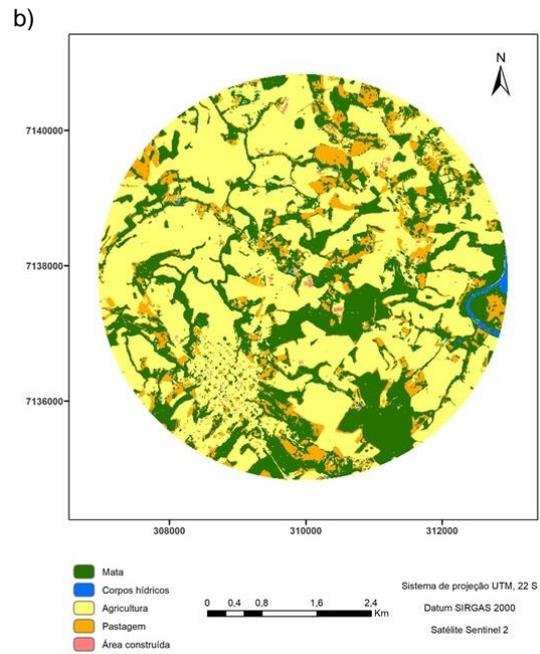
**Notas:** Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

nd = não detectado.

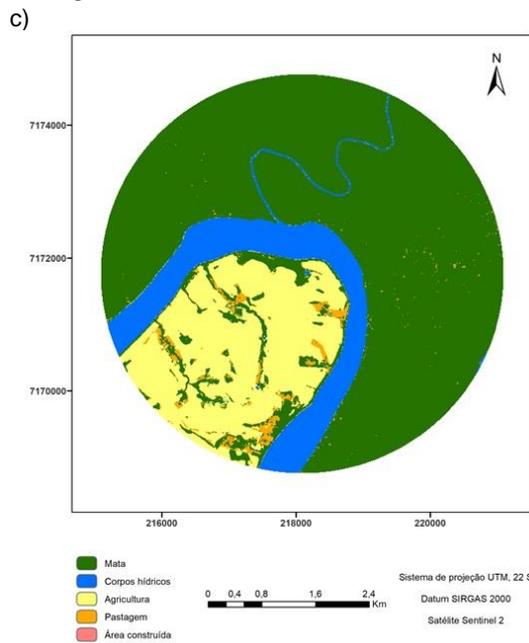
Dentre as amostras de mel coletadas dos sete apiários em análise (Figura 16), apenas uma das amostras de mel, proveniente de uma propriedade convencional (Figura 16g), apresentou contaminação do inseticida imidacloprid.



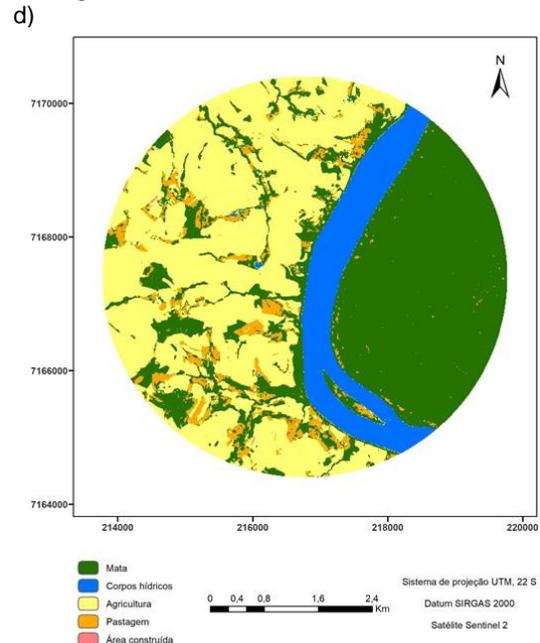
Propriedade agroecológica (Apiário 1): Mata: 24,01%;  
Corpos hídricos: 0,25%; Agricultura: 64,94%;  
Pastagem: 10,54%; Área construída: 0,27%.



Propriedade agroecológica (Apiário 2): Mata: 30,45%;  
Corpos hídricos: 0,59%; Agricultura: 55,55%;  
Pastagem: 13,05%; Área construída: 0,37%.



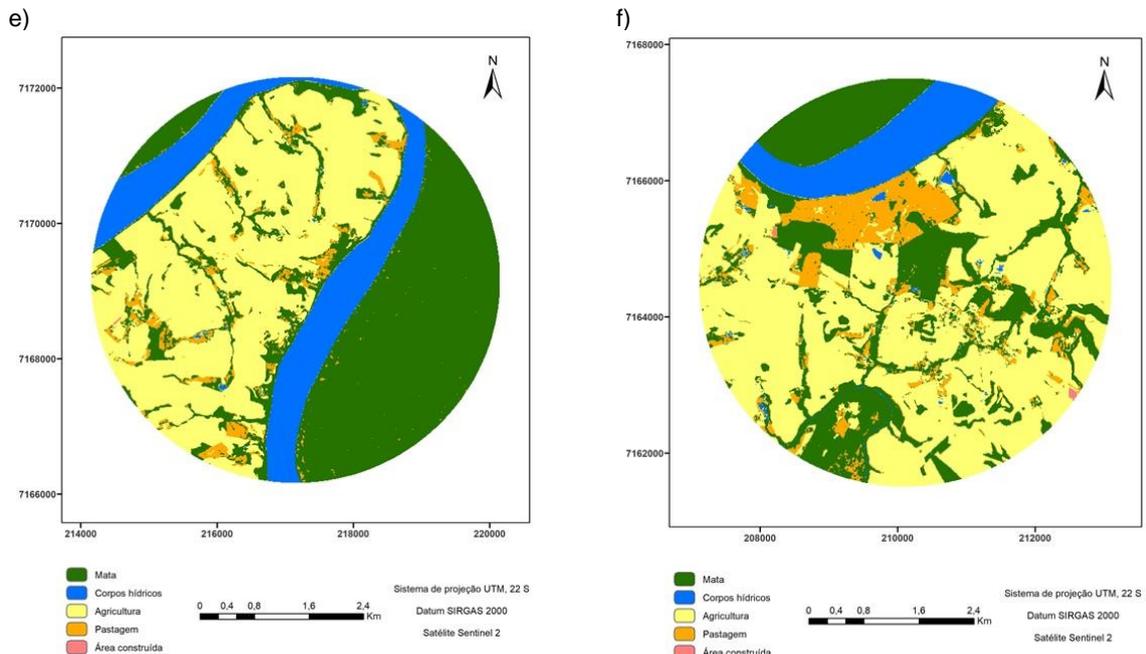
Propriedade convencional (Apiário 3): Mata: 65,77%;  
Corpos hídricos: 12,38%; Agricultura: 20,00%;  
Pastagem: 1,85%; Área construída: 0,00%.



Propriedade convencional (Apiário 4): Mata: 40,38%;  
Corpos hídricos: 11,24%; Agricultura: 41,95%;  
Pastagem: 6,39%; Área construída: 0,04%.

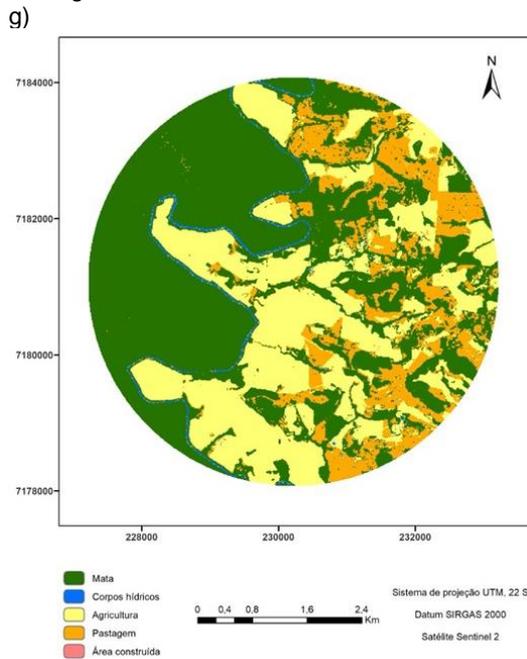
(continua)

**Figura 16** Classificação do uso e ocupação das terras.



Propriedade convencional (Apiário 5): Mata: 39,76%;  
 Corpos hídricos: 14,97%; Agricultura: 41,04%;  
 Pastagem: 4,20%; Área construída: 0,02%.

Propriedade convencional (Apiário 6): Mata: 27,53%;  
 Corpos hídricos: 8,73%; Agricultura: 53,56%;  
 Pastagem: 10,04%; Área construída: 0,13%.



Propriedade convencional (Apiário 7): Mata: 52,6%;  
 Corpos hídricos: 1,1%; Agricultura: 30,29%;  
 Pastagem: 15,93%; Área construída: 0,03%.

(conclusão)

**Figura 16** Classificação do uso e ocupação das terras.

**Nota:** As figuras dos apiários estão apresentadas nos Anexos.

## 5.4 DISCUSSÃO

As abelhas operárias, durante o processo de forrageamento, estão propensas à contaminação por inseticidas como o imidacloprid, principalmente quando suas colônias estão localizadas próximas a áreas de produção agrícola (PIMENTEL, 1995). Essa contaminação pode ocorrer pelo contato direto das abelhas, durante a aplicação do princípio ativo no campo, como no caso da pulverização do produto, o qual pode cair sobre o corpo das abelhas. A contaminação pode ser oral, durante a alimentação, quando pólen e néctar são contaminados no campo e a abelha os coleta ou durante o seu hábito de higiene, na qual utilizam a probóscide para se limpar e limpar as demais operárias das colônias, podendo se contaminar oralmente, caso haja resíduo do produto sobre seu corpo (PEREIRA et al., 2003; AMARO; GODINHO, 2012; BONMATIN et al., 2015).

Quando simulado o contato das abelhas operárias em superfície contaminada com o inseticida imidacloprid por um período de duas horas, verifica-se  $CL_{50}$  (48 horas) de  $32,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que está muito abaixo da dose do produto recomendada para aplicação no campo, com referência ao produto comercial imidacloprid Nortox<sup>®</sup> ( $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), destacando-se a sua toxicidade para organismos não-alvos, como as abelhas. A liberação e a regulamentação de produtos fitossanitários sintéticos devem ser revistas, considerando evidências científicas sólidas e atualizadas, de forma que os produtos que apresentem efeitos inaceitáveis ao ambiente não sejam aprovados ou tenham sua comercialização e utilização restritas (SGOLASTRA et al., 2020).

No contato por via oral das abelhas com o inseticida imidacloprid, observou-se que a  $CL_{50}$ , após 48 horas de alimentação no presente estudo, foi de  $18,27 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo menor do que a  $CL_{50}$  obtida no bioensaio por contato em superfície contaminada. Para *A. mellifera* africanizada encontraram-se  $CL_{50}$  (2 horas) em torno de  $0,1 \mu\text{g abelha}^{-1}$  (CARRILO et al., 2013), em 24 horas de  $22,78 \text{ ng abelha}^{-1}$  (JACOB et al., 2019) e  $30,6 \text{ ng abelha}^{-1}$  em 48 horas (DECOURTYE; LACASSIE; PHAM-DELÈGUE, 2003). É relevante citar que a variação da concentração ou dose letal do inseticida imidacloprid por via oral em cada estudo, está relacionada aos tempos de análise e a espécie de *A. mellifera* utilizada. Para a espécie *A. mellifera carnica* foi determinada uma  $DL_{50}$  de  $0,14 - 1,57 \mu\text{g mL}^{-1}$ , quando ingeriram doses do inseticida imidacloprid (SCHMUCK et al., 2001).

A  $CL_{50}$  média por via tópica é menor, quando comparada com a  $CL_{50}$  por contato em superfície contaminada e por via oral, durante 48 horas, demonstrando que o inseticida imidacloprid pode ser letal com menor concentração, para a abelha *A. mellifera* africanizada, quando entra em contato com o princípio ativo por via tópica, ou seja, contato direto com o produto, durante a pulverização. Esse contato, geralmente, acontece durante o forrageamento

das abelhas no campo nos períodos em que ocorre a aplicação do imidacloprid nas culturas. O ideal é que a aplicação de produtos fitossanitários sintéticos seja realizada, preferencialmente, em horários nos quais as abelhas não estejam forrageando, no início da manhã e no final da tarde, evitando o período entre 10:00 e 16:00 horas, durante o qual é constatada a maior incidência de abelhas no campo para a cultura da soja (JUNG et al., 2013; GAZZONI, 2017). Outras medidas a serem tomadas são: não realizar a aplicação de imidacloprid na época da florada e pulverizar a uma distância mínima de 6 km das áreas de preservação, utilizando técnicas que reduzam o efeito de deriva do produto fitossanitário sintético (BRASIL, 2013; GAZZONI, 2017).

A  $CL_{50}$  de imidacloprid diminuiu a partir de 48 horas; após 72 horas, os valores de  $CL_{50}$  determinados foram negativos, estando abaixo dos níveis de concentração a que as abelhas foram submetidas, demonstrando o efeito residual que o imidacloprid tem sobre a *A. mellifera*. A sobrevivência dessas abelhas foi reduzida em todos os tratamentos com a presença do inseticida imidacloprid, ao longo do tempo. Em 72 horas, 50% das abelhas estavam mortas e após 120 horas as abelhas oriundas dos tratamentos T5 e T6 tiveram taxas de sobrevivência abaixo de 8%. Estudos demonstram que após uma hora de contato das abelhas com o imidacloprid em uma concentração de  $39 \mu\text{g L}^{-1}$ , a taxa de mortalidade esteve próxima de 100%, seguindo com aumento até 96 horas (NAIARA-GOMES et al., 2020). Destaca-se que a sobrevivência das abelhas operárias quando expostas aos neonicotinoídeos não é afetada apenas em sua idade adulta, mas também desde a fase larval (TESOVNIK et al., 2020).

Os inseticidas do grupo químico dos neonicotinoídeos, no qual o imidacloprid se classifica, provocam impactos em relação à longevidade das abelhas operárias *A. mellifera*, não apenas em condições laboratoriais como verificado no presente trabalho, mas também em condições de campo. Colônias localizadas próximas ao campo de cultivo de milho com sementes tratadas com neonicotinoídeos tiveram um aumento na mortalidade diária de abelhas, 3,5 vezes maior em relação aos períodos em que não se realizavam esses cultivos (SAMSON-ROBERT et al., 2014). Os resultados não são satisfatórios, pois o serviço ecossistêmico é atingido, uma vez que o aumento na produtividade das culturas está relacionado com o manejo de polinizadores, como as abelhas (MONASTEROLO et al., 2015; GAZZONI, 2017; GARIBALDI et al., 2021).

Devido à importância das abelhas para a produtividade das culturas, o ideal é que o manejo de áreas agrícolas seja realizado com práticas que favoreçam a presença e a permanência de insetos benéficos nos campos de cultivos (GAZZONI, 2017), com práticas livres de aplicação do princípio ativo imidacloprid. Além de provocar toxicidade aguda com altas taxas de mortalidade das colônias o imidacloprid também ocasiona efeitos deletérios interferindo na expressão de genes imunológicos (TESOVNIK et al., 2020), na capacidade cognitiva e no comportamento das abelhas em relação ao forrageamento e higiene (TOSI;

BURGIO; NIEH, 2017; IQBAL; ALQARNI; RAWEH, 2019; JACOB et al., 2019; LI et al., 2019; LIU et al., 2019; MORFIN et al., 2019; COLIN et al., 2020), e na capacidade de voo (STANLEY et al., 2016; ROAT et al., 2017; NAIARA-GOMES et al., 2020).

No presente estudo, o inseticida imidacloprid afetou a capacidade de deslocamento e retomada de voo das abelhas *A. mellifera*, quando submetidas à menor concentração do princípio ativo em um período de 24 horas. Esse comprometimento é negativo, pois mudanças no comportamento de voo influenciam diretamente a coleta de pólen e néctar, afetando todo o desenvolvimento da colônia e, conseqüentemente, a polinização das culturas circunvizinhas, ocasionando perdas econômicas diretas (BRITTAIN; POTTS, 2011; NAIARA-GOMES et al., 2020; LIBARDONI et al., 2021). A capacidade de voo da *A. mellifera* durante o forrageamento é reduzida significativamente, quando expostas ou se alimentam do imidacloprid, demonstrando os efeitos subletais que esse princípio ativo ocasiona no comportamento forrageiro, mesmo em baixas concentrações (SCHNEIDER et al., 2012; TEETERS et al., 2012; STANLEY et al., 2016; ABATI, 2021). É importante enfatizar também que abelhas recém-emergidas, quando expostas a produtos químicos, sofrem maior impacto na sua capacidade de deslocamento e retomada de voo (LIBARDONI et al., 2021).

Observou-se no presente estudo que o inseticida imidacloprid não afeta apenas a longevidade e o comportamento das abelhas, mas também os seus subprodutos, como o mel. Amostras provenientes de um apiário convencional apresentaram contaminação pelo inseticida imidacloprid com LMR acima dos preconizados pela União Europeia de  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  (UE, 2014). A atividade agrícola é uma das principais atividades econômicas na região, sendo que, no raio de forrageamento das abelhas, a classificação do uso e ocupação das terras em relação à agricultura corresponde a 30,29%. A ocorrência dessa contaminação pode ser devida à abelha *A. mellifera* não repelir alimentos em que o princípio ativo imidacloprid esteja presente (NAIARA-GOMES et al., 2020), coletando pólen e néctar contaminados e transportando esse inseticida para o interior da colônia (GILL; RAMOS-RODRIGUEZ; RAINE, 2012; BIDDINGER et al. 2013), contaminando as outras abelhas e seus subprodutos, como o mel.

Resultados de contaminação de produtos apícolas com produtos químicos, como o imidacloprid, foram relatados em diversos locais do mundo. Um levantamento global da contaminação de cinco neonicotinóides (Acetamipride, clotianidina, imidacloprido, tiaclopride e tiametoxam), em 198 amostras de mel de todos os continentes, demonstrou que o inseticida imidacloprid apresentou maior quantificação entre as amostras, correspondendo a 51% e a concentração total dos cinco neonicotinóides avaliados atingiu  $0,056 \mu\text{g mL}^{-1}$  (MITCHELL et al., 2017). No Uruguai foram encontradas concentrações entre  $0,024$  e  $0,045 \mu\text{g mL}^{-1}$  para as amostras de mel analisadas (PAREJA et al., 2011), resultados semelhantes aos do presente estudo ( $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). No Brasil, na região do Triângulo Mineiro, as concentrações de

imidacloprid nas amostras de mel variaram de 0,0045 a 0,014  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (SILVA; FARIA, 2020), sendo menores às que foram detectadas no apiário 7 do presente estudo.

Para o consumo de mel no Brasil, não há valores de LMR para alguns produtos fitossanitários sintéticos, sendo estabelecidos LMR para apenas 29 princípios ativos, pertencentes aos seguintes grupos químicos: halogenados, organoclorados, carbamatos, piretroides e organofosforados (BRASIL, 2015). Não é estabelecido nenhum LMR para compostos do grupo químico dos neonicotinoides, gerando incertezas nos procedimentos de controle desses inseticidas para o consumo de mel no Brasil. Dessa forma, no presente estudo, foi considerado o LMR preconizado pela União Europeia de 0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do princípio ativo imidacloprid para o consumo de mel.

Os parâmetros de validação no presente estudo apresentaram resultados satisfatórios para a análise do princípio ativo imidacloprid nas amostras de mel, estando de acordo com as recomendações da GARP (1999), da Anvisa (2017) e de estudos anteriores. Métodos que utilizaram o UHPLC-MS/MS obtiveram para imidacloprid um coeficiente de determinação  $\geq 99$ , LQ de 0,07  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com taxas de recuperação entre 70 e 120%, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo (SILVA; FARIA, 2020). Outros autores também encontraram resultados que são corroborados neste estudo, como os de Pareja et al. (2011), Jovanov et al. (2015), Calatayud-Vernich et al. (2017) e Valverd et al. (2018). É relevante citar que as pequenas diferenças entre um estudo e outro estão relacionadas aos métodos de extração e sensibilidade dos detectores utilizados.

Considerando-se os resultados obtidos em condições laboratoriais, pode-se compreender os impactos ambientais que o inseticida imidacloprid, em baixas concentrações, provoca em relação à sobrevivência das abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada e a qualidade dos seus subprodutos (mel) na região Oeste e Sudoeste do Estado do Paraná, afetando diretamente o processo de polinização e, conseqüentemente, a produção e a demanda por alimentos livres de contaminantes. Nesse sentido, futuras estratégias de manejo de produção devem ser tomadas, visando reduzir os impactos desses compostos nos polinizadores, contribuindo para a preservação de abelhas *A. mellifera* nos ecossistemas agrícolas e evitando a contaminação dos produtos apícolas. Salienta-se que estudos que caracterizem o efeito residual em diferentes concentrações desse produto e o impacto em operárias, larvas, rainhas e zangões de abelhas *A. mellifera* tornam-se importantes, bem como o estudo de concentrações subletais e o seu efeito em proteínas e enzimas desse inseto.

## 5.5 CONCLUSÕES

O inseticida imidacloprid, ao longo do tempo, ocasiona redução na taxa de sobrevivência de abelhas *A. mellifera* africanizada, provocando alterações na capacidade de voo. O inseticida imidacloprid também foi detectado, acima dos limites máximos permitidos pela União Europeia, em uma propriedade convencional; por outro lado, não foi detectado em amostras de mel de propriedades agroecológicas e de outras de manejo convencional.

## REFERÊNCIAS

ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; MACIEL, R. M. A.; COLOMBO, F. C.; LIBARDONI, G.; BATTISTI, L.; LOZANO, E. R.; GHISI, N. C.; COSTA-MAIA, F. M.; POTRICH, M. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, p. 32282–32298, 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Edição 141, Seção: 1, p. 87, 25 jul. 2017.

ALIFERIS, K. A.; TARANTILIS, P. A.; HARIZANIS, P. C.; ALISSANDRAKIS, E. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. **Food Chemistry**, v. 121, n.3, p. 856–862, 2010.

AL-WAILI, N.; SALOM, K.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M. J. E. N. SCOZZAFAVA, A.; TAN, D. X.; VIDELA, L. A. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. **The Scientific World Journal**, p. 9, 2012.

AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e abelhas. **Revista de ciências Agrárias**, v. 5, p. 53–62, 2012.

ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS - GARP. **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos** (Apostila), 1999.

BAPTISTA, A. P. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, S. M.; CARVALHO, C. F.; BUENO FILHO, J. S. S. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 955–961, 2009.

BIDDINGER, D. J.; ROBERTSON, J. L.; MULLIN, C.; FRAZIER, J.; ASHCRAFT, S. A.; RAJOTTE, E. G.; JOSHI, N. K.; VAUGHN, M. Comparative toxicities and synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). **PLOS ONE**, v.8, n.9, p. 72587, 2013.

BILANDZIC, N.; DOKIĆ, M.; SEDAK, M.; KOLANOVIĆ, B. S.; VARENINA, I.; KONČURAT, A.; RUDAN, N. Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. **Food Chemistry**, v.128 p. 1160-1164, 2011.

BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A.; NOOME, D. A.; SIMON-DELSO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, 35–67, 2015.

BRANDT, A.; GORENFLO, A.; SIEDE, R.; MEIXNER, M.; BÜCHLER, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 40–47, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 13, de 15 de julho de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 5. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Instrução Normativa Conjunta nº 01, de 28 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a aplicação dos ingredientes ativos imidacloprido, clotianidina, tiametoxam e fipronil. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, Seção 1, pág. 10, 4 de janeiro de 2013.

BRIGHENTI, D. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; BRIGHENTI, C. BIOATIVIDADE do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 279–289, 2007.

BRITO, R. L.; BRITO, P. L. . **Geoprocessamento**: noções sobre cartografia e sistema de informações geográficas aplicado à apicultura. 1. ed. Taubaté: EDUNITAU, 2014. v. 5000. 60 p.

BRITAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic Appl E**, 2011.

CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMO, E.; PICO, Y. Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. **Science Total Environ**. v. 605-606, p.745-754, 2017

CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R. **Sistema de Produção de Mel**. Teresina: EMBRAPA Meio Norte, 2002.

CAMARGO, S. C.; GARCIA, R. C.; FEIDEN, A.; VASCONCELOS, E. S.; PIRES, B. G.; HARTLEBEN, A. M.; MORAES, F. J.; OLIVEIRA, L. ; GIASSON, J. ; MITTANCK, E. S.; GREMASCHI, J. R. ; PEREIRA, D. J. . Implementation of a geographic information system (GIS) for the planning of beekeeping in the west region of Parana. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 955-971, 2014.

CARRILLO, M. P.; BOVI, T. S.; NEGRÃO, A. F.; ORSI, R. Influence of agrochemicals fipronil and imidacloprid on the *learning behavior* of *Apis mellifera* L. honeybees. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.35, p. 431–34, 2013.

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G.A.; CARVALHO, C.F; BUENO FILHO, J.S.S; BAPTISTA, A.P.M;. Toxicidade De Acaricidas / Inseticidas Empregados Na Citricultura Para a Abelha Africanizada *Apis Mellifera* L ., 1758 (Hymenoptera : Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 597–606, 2009.

CHIESA, L.M.; LABELLA, G.F.; GIORGI, A.; PANSERI, S.; PAVLOVIC, R.; BONACCI, S.; ARIOLI, F. The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution. **Chemosphere**, v. 154, p.482-490, 2016.

COLIN, T.; PLATH, J. A.; KLEIN, S. VINE, P.; DEVAUD, J. M.; LIHOREAU, M.; MEIKLE, W. G.; BARRON, A. B. The miticide thymol in combination with trace levels of the neonicotinoid imidacloprid reduces visual learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 51, p. 499–509, 2020.

DAI, P.; JACK, C. J.; MORTENSEN, A. N.; BUSTAMANTE, T. A.; BLOOMQUIST, J. R.; ELLIS, J. D. Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprid, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. **Pest Management Science**, v.75, n.1, p. 29–36, 2019.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. **Pest Management Science**, v. 59, n.3, p. 269–78, 2003.

ELBERT, A.; HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELERT, W.; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1099–1105, 2008.

ERICKSON, B. Regulation: Europe bans three neonicotinoids linked to honeybee population declines. **ACS Macro Letters**, v.2, n.5, p.361–365, 2013.

EUROPEAN UNION - U. E. Commission Regulation (EU) N°. 491/2014. **Official Journal of the European Union**, L 146/1, 2014. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32014R0491>. Acesso em: 8 jun. 2021.

GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, n. 3, p. 810–821, 2009.

GARIBALDI, L. A.; SCHULTE, L. A.; NABAES JODAR, D. N.; GOMEZ CARELLA, A. S.; KREMEN, C. Time to Integrate Pollinator Science into Soybean Production. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 36, n.7, p. 573-575, 2021.

GARRIDO FRENICH, A.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L.; LÓPEZ, T.; CORTÉS AGUADO, S.; MARTÍNEZ SALVADOR, I. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1048. n. 2, p.199–206, 2004.

GAWEŁ, M.; KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; SEMENIUK, S.; GOLISZEK, M.; BUREK, O.; POSYNIK, A. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 282, p. 36–47, 2019.

GAZZONI, D. L. **Soja e abelhas**. Embrapa: Brasília, DF, p. 151, 2017.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.108, p. 849–857, 2015.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 105-108, 2012.

GOULSON, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n.4, p. 977–987, 2013.

HAN, P.; NIU, C. Y.; LEI, C. L.; CUI, J. J.; DESNEUX, N. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products

and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v.19, n.8, p.1612–1619, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Sistema Eletrônico de Informações – SEI. **Memorando 1019510**. Brasília – DF: 22 fev 2019a. 7 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Sistema Eletrônico de Informações – SEI. **Avaliação de risco ambiental do ingrediente ativo imidacloprido para insetos polinizadores** - Parecer Técnico Nº SEI IBAMA 6220406. Brasília – DF: 2019b. 298 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Brasília, DF: INMETRO, 2007.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES - IPBES. POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T. et al. (eds.). **The Assessment report of the Intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services on pollinators, pollination and food production**. Bonn, Germany: IPBES, 2016. 552 p.

IQBAL, J.; ALQARNI, A. S.; RAWEH, H. S. A. Effect of sub-lethal doses of imidacloprid on learning and memory formation of indigenous Arabian bee (*Apis mellifera jemenitica* Ruttner) adult foragers. **Neotropical Entomology**, v. 48, p 373–380, 2019.

JACOB, C. R. O.; MALAQUIAS, J. B.; ZANARDI, O. Z.; SILVA, C. A. S.; JACOB, J. F. O.; YAMAMOTO, P. T. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 28, n.7, p. 744–753, 2019.

JOVANOVIĆ, P.; GUZSVÁNY, V.; LAZIC, S.; FRANKO, M.; SAKAC, M.; SARIC, L.; KOS, J.; Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 106–113, 2015.

JUNG, A.; MACHADO, M. R. B.; STEFANELO, L. S.; TASCHETO, R.; GUEDES, J. C. Horários de forrageamento de *Apis mellifera* L. em soja e riscos de contaminação com pesticidas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIPAMPA**, Bagé – RS, v. 5, n. 4, 2013.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n.1608, p. 303–313, 2007.

LI, Z.; YU, T.; CHEN, Y.; HEERMAN, M.; HE, J.; HUANG, J.; NIE, H.; SU, S. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.156, p. 36–43, 2019.

LIBARDONI, G.; Neves, P. M. O. J.; ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; COSTA-MAIA, F. M.; VISMARA, E. S.; LOZANO, E. R.; POTRICH, M. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 11, p. 3482, 2021.

LIU, S.; LIU, Y.; HE, F.; ZHANG, H.; LI, X.; TAN, H. Food safety and toxicology enantioselective olfactory effects of the neonicotinoid dinotefuran on honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019.

LUNDIN, O.; RUNDLÖF, M.; SMITH, H. G.; FRIES, I.; BOMMARCO, R. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: A systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–21, 2015.

MANDAL, M.D.; MANDAL, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.1, n.2, p. 154-160, 2011.

MITCHELL, E. A. D.; MULHAUSER, B.; MULOT, M.; MUTABAZI, A.; GLAUSER, G.; AEBI, A. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. **Science**, v. 358, n.6359, p. 109–111, 2017.

MONASTEROLO, M.; MUSICANTE, M. L.; VALLADARES, G. R.; SALVO, A. Soybean crops may benefit from forest pollinators. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 202, p. 217- 222, 2015.

MORFIN, N.; GOODWIN, P. H.; CORREA-BENITEZ, A.; GUZMAN-NOVOA, E. Sublethal exposure to clothianidin during the larval stage causes long-term impairment of hygienic and foraging behaviors of honey bees. **Apidologie**, v.50, p. 595–605, 2019.

NAIARA GOMES, I.; VIEIRA, K. I. C.; GONTIJO, L. M.; HELDER CANTO RESENDE, H. C. Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 97-107, 2020.

NEMENYI, P. **Distribution-free multiple comparisons**. 1963. 254 f. Ph.D. Thesis, Princeton University, 1963.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **OECD Guidelines for the testing of chemicals**: guia 213, Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, p. 1–8, 1998a

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **OECD Guidelines for the testing of chemicals**: guia214, Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, p. 1–7, 1998b.

PAREJA, L.; COLAZZO, M.; PARADA, A. P.; NIELL, S.; LETELIER, C.; BESIL, N.; CESIO, M. V.; HEINZEN, H.; Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 3844-3858, 2011.

PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R.; VIELA, S. L. O. **Sistemas de produção**: produção de mel. Teresina – PI. Embrapa Meio-Norte, 2003.

PIMENTEL, D. amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 8, p. 17–29,1995.

POHLERT, T. **The pairwise multiple comparison of mean ranks package** (PMCMR). R Package. 2014. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=pmcmr>. Acesso em: 03/04/2021.

QUIGLEY, T. P.; AMDAM, G. V.; HARWOOD, G. H. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. **Current Opinion in Insect Science**, v. 35, p. 132–137, 2019.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. 2019. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2019.

RAGHUNANDAN, K. S.; BASAVARAJAPPA, S. Analysis of multifloral honey of the giant honeybee, *Apis Dorsata* F., for pesticide residues in Southern Karnataka, India. **European Journal of Zoological Research**, v. 2, n.3, p.22–28, 2013.

RAYMANN, K.; MOTTA, E. V. S.; GIRARD, C.; RIDDINGTON, I. M.; DINSER, J. A.; MORAN, N. A. Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n.13, p. 1–13, 2018.

REILLY, J. R.; ARTZ, D. R.; BIDDINGER, D.; BOBIWASH, K.; BOYLE, N. K.; BRITTAIN, C.; BROKAW, J.; CAMPBELL, J. W.; DANIELS, J.; ELLE, E.; ELLIS, J. D.; FLEISCHER, S. J.; GIBBS, J.; GILLESPIE, R. L. GUNDERSEN, K. B.; GUT, L.; HOFFMAN, G.; JOSHI, N.; LUNDIN, O.; MASON, K. MCGRADY, C. M.; PETERSON, S. S.; PITTS-SINGER, T. L.; RAO, S.; ROTHWELL, N.; ROWE, L.; WARD, K. L.; WILLIAMS, N. M.; WILSON, J. K.; ISAACS, R.; WINFREE, R. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. **Proc. R. Soc.** p. 287, 2020.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N.; ANDRADE, R. M. B.; ALMEIDA, M. V. Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 950-955, 2006.

ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Biochemical response of the africanized honeybee exposed to fipronil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1652–1660, 2017.

SAMSON-ROBERT, O.; LABRIE, G.; CHAGNON, M.; FOURNIER, V. Neonicotinoid-contaminated puddles of water represent a risk of intoxication for honey bees. **PLOS ONE**, v. 9, n.12, p.1–17, 2014.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOULSON, D.; PENNACCHIO, F.; NAZZI, F.; GOKA, K.; DESNEUX, N. Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. **Environment International**, v.89, p. 7–11, 2016.

SANTOS, M. F.; GALBIATI, C.; NEVES, S. M. A. S.; LOUREIRO, E. M.; Temporal analysis of the use and vegetal coverage and the honey pollen diversity IN Cáceres (MT). **Geografia**, v. 36, p. 73-83, 2011.

SCHMUCK, R.; SCHÖNING, R.; STORK, A.; SCHRAMEL, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, v. 57, p. 225-238, 2001.

SCHNEIDER, C. W.; TAUTZ, J.; GRÜNEWALD, B.; FUCHS, S. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PLOS ONE**, v. 7, n.1, p.1–10, 2012.

SGOLASTRA, F.; MEDRZYCKI, P.; BORTOLOTTI, L.; MAINI, S.; PORRINI, C.; SIMONDELSON, N.; BOSCH, J. Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, v. 241, 2020.

SILVA, R. A. G.; FARIA, A. M.; Determinação de multirresíduos de agrotóxicos em méis produzidos na região do triângulo mineiro por UHPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 307-313, 2020.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2007.

STANLEY, D. A.; RUSSELL, A. L.; MORRISON, S. J.; ROGERS, C.; RAINE, N. E. Investigating the impacts of field-realistic exposure to a neonicotinoid pesticide on bumblebee foraging, homing ability and colony growth. **The Journal of Applied Ecology**, v. 53, n.5, p.1440– 1449, 2016.

TAYLOR-WELLS, J.; BROOKE, B. D.; BERMUDEZ, I.; JONES, A. K. The neonicotinoid imidacloprid, and the pyrethroid deltamethrin, are antagonists of the insect Rdl GABA receptor. **Journal of neurochemistry**, v. 135, n.4, p. 705-713, 2015.

TEETERS, B.S.; JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; BLAIR, D. Siegfried Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.31, p.1349- 1354, 2012.

TESOVNIK, T.; ZORC, M.; RISTANIC, M.; GLAVINIĆ, U.; STEVANOVIĆ, J.; NARAT, M.; ZORAN STANIMIROVIĆ, Z. Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees. **Environmental pollution**, v. 256, n. 10, 2020.

TETTE, P. A. S.; ROCHA GUIDI, L.; ABREU GLÓRIA, M. B.; FERNANDES, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**, v. 149, p. 124-141, 2016.

THERNEAU, T. **A package for survival analysis in S**. Version 2.38. 2015. (<https://CRAN.R-project.org/package=survival>).

TOME, H. V. V.; BARBOSA, W. F.; CORRÊA, A. S.; GONTIJO, L. M.; MARTINS, G. F.; GUEDES, R. N. C. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: Impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology**, v. 167, n.2, p. 186–196, 2015.

TOSI, S.; BURGIO, G.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1201, 2017.

TSVETKOV, N.; SAMSON-ROBERT, O.; SOOD, K.; PATEL, H. S.; MALENA, D. A.; GAJIWALA, P. H.; MACIUKIEWICZ, P.; FOURNIER, V.; ZAYED, A. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science**, v. 356, p. 1395–1397, 2017.

VALVERDE, S.; IBÁÑEZ, M.; BERNALA, J. L.; NOZALA, M. J.; HERNÁNDEZ, F.; BERNA, J.; Development and validation of ultrahigh performance-liquid chromatography–tandem mass spectrometry based methods for the determination of neonicotinoid insecticides in honey. **Food Chemistry**, v. 266, p. 215–222, 2018.

VENABLES W. N.; RIPLEY B. D. Modern Applied Statistics with S, Fourth edition. Springer, New York, 2002. ISBN 0-387-95457-0, <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.

WOLOWSKI, M.; AGOSTINI, K.; RECH, A. R.; VARASSIN, I. G.; MAUÉS, M.; FREITAS, L.; CARNEIRO, L. T.; BUENO, R. DE O.; CONSOLARO, H.; CARVALHEIRO, L.; SARAIVA, A. M.; SILVA, C. I. **Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil**. São Carlos, SP : Editora Cubo, 2019.

WU, Y. Y.; ZHOU, T.; WUBIE, A. J.; WANG, Q.; DAI, P. L.; JIA, H. R. Apoptosis in the nerve cells of adult honeybee (*Apis mellifera ligustica*) brain induced by imidacloprid. **Acta Entomol. Sinica**, v. 57, p.194–203, 2014.

ZHANG, E.; NIEH, J. C. The neonicotinoid imidacloprid impairs honey bee aversive learning of simulated predation. **Journal of Experimental Biology**, v.218, n.20, p. 3199–3205, 2015.

ZHANG, Z. Y.; LI, Z.; HUANG, Q.; YAN, W. Y.; ZHANG, L. Z.; ZENG, Z. J. Honeybees (*Apis mellifera*) modulate dance communication in response to pollution by imidacloprid. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n.2, p. 477–482, 2020.

## 6 ARTIGO 2: FIPRONIL: ESTÁ PRESENTE NO MEL? QUAL O IMPACTO EM OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA?

### RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) são primordiais no processo de polinização, assegurando a produção de alimentos no mundo. Contudo, o uso de produtos fitossanitários sintéticos pode afetar a qualidade de seus subprodutos, a sobrevivência e o comportamento das abelhas. Por essa razão, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o inseticida fipronil está presente em amostras de mel, bem como os níveis de toxicidade que este inseticida provoca por via oral, tópica e por contato em operárias de *A. mellifera* africanizada, assim como as possíveis alterações comportamentais. Amostras de mel foram coletadas em apiários agroecológicos e convencionais georreferenciados, sendo os traços do inseticida fipronil, detectados através de cromatografia gasosa (CG-ECD) com extração por SPE C18. Os níveis de toxicidade de fipronil em *A. mellifera* foram verificados através de bioensaios. No bioensaio 1 os níveis correspondem às porcentagens de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01% da concentração recomendada de aplicação do produto comercial fipronil Nortox 800 WG® (princípio ativo fipronil) no campo, obtendo-se a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) em 48 horas por contato em superfície contaminada e determinando. Assim, os intervalos dos níveis de concentração a serem utilizados para os próximos bioensaios. Os bioensaios 2 e 3 seguiram as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD guias nº 213 e nº 214 de 1998), determinando a CL<sub>50</sub> (48 horas) do inseticida fipronil, através do contato por via tópica e oral. No bioensaio 4 foi determinado a CL<sub>50</sub> (48 horas) e a taxa de sobrevivências das abelhas por um período de 120 horas através do contato em superfície contaminada pelo fipronil e seu impacto no comportamento das abelhas. Amostras de mel provenientes de quatro apiários convencionais apresentaram detecção acima dos LMR permitidos pela EU. A sobrevivência das abelhas foi afetada diretamente em relação aos níveis de concentração e o tempo de exposição, demonstrando o efeito residual que o fipronil provoca. A alteração comportamental não foi observada durante o período de 24 horas. O fipronil está presente em amostras de mel e interfere diretamente na sobrevivência de *A. mellifera*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Abelha; Contaminação; Inseticida; Toxicidade.

## 6.1 INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) estão entre os polinizadores mais importantes do mundo, devido ao seu valor social, econômico e ambiental (ROAT et al., 2017; JACOB et al., 2019; ABATI et al., 2021). São responsáveis pela polinização, que desempenha um papel fundamental para as culturas com alto valor econômico, auxiliando na estabilidade e função das populações de plantas, garantindo a produtividade, a manutenção, a variabilidade genética das espécies e a segurança alimentar (CALDERONE, 2012; GIANNINI et al. 2015; ROUBIK, 2018; REILLY JR et al., 2020). Dentre essas culturas, destaca-se a soja, com área global cultivada de 129 milhões de hectares (GARIBALDI et al., 2021).

Estima-se que o serviço ecossistêmico de polinização contribua com 35% do volume de produção de alimentos, o que corresponde de 5 a 8% do valor total da produção mundial, equivalendo entre US\$ 235 e 577 bilhões por ano (IPBES, 2016). No Brasil, a contribuição econômica proveniente dos polinizadores representa, aproximadamente, 30% da renda agrícola anual total das culturas dependentes, totalizando um valor de US\$ 45 bilhões. Destaca-se aqui a cultura da soja, a qual representa um montante de US\$ 5,7 bilhões, que correspondem a US\$ 22 bilhões da receita anual (GIANNINI et al. 2015; WOLOWSKI et al., 2019).

Além de oferecer um serviço essencial para a agricultura, as abelhas são fonte de renda para muitas famílias que dependem do meio rural, através de atividades apícolas de produção de mel, própolis, apitoxina, cera e geleia real (VIUDA-MARTOS et al., 2008; BLACQUIÈRE et al., 2012; MITCHELL et al., 2017). Dentre esses produtos, destaca-se o mel, produto valioso não apenas pelo seu sabor e valor nutricional, mas também por suas múltiplas propriedades medicinais (MANDAL; MANDAL, 2011; AL-WAILI et al., 2012).

No entanto, as atividades apícolas e o processo de polinização das abelhas estão sendo prejudicados, pela mortalidade e declínio da população, afetando significativamente a produção de mel e de várias culturas (STAVELEY et al., 2014; MITCHELL et al., 2017). Em 2007, esse declínio foi nomeado como “Desordem do Colapso das Colônias (DCC)” (SKOKSTAD, 2007) e suas possíveis causas foram atribuídas a vários fatores: patógenos, parasitas, genética, desmatamento, mudança climática, perda de *habitat* de forrageamento e, principalmente, ao uso intensivo de produtos fitossanitários sintéticos nas culturas (GOULSON et al., 2015; ROAT et al., 2017; TSVETKOV et al., 2017; RAYMANN et al., 2018; ABATI et al., 2021). O aumento na mortalidade das abelhas está relacionado à expansão no uso desses produtos, sendo observada, nos anos 1990 na França, uma mortalidade em massa de abelhas, coincidindo com a introdução do inseticida fipronil (AMARO; GODINHO et al., 2012; HOLDER et al., 2018).

As atividades apícolas são afetadas, também, comercialmente, pois produtos com detecção de pesticidas acima dos limites permitidos pela legislação vigente são proibidos para consumo, sendo descartados (FRENICH et al., 2004; YUAN et al., 2014; ROAT et al., 2017). Um estudo na China continental verificou resíduos de fungicidas em amostras de pólen (TONG et al., 2016); na Espanha, de um total de 35 amostras de cera de abelha coletadas em diferentes áreas apícolas, 16 apresentaram contaminação por produtos fitossanitários sintéticos de diferentes grupos químicos (CALATAYUD-VERNICH et al., 2017). Resíduos do inseticida fipronil foram detectados em amostras de mel provenientes de colmeias abandonadas próximas a áreas com cultivo da soja, onde a aplicação desse produto fitossanitário sintético era constante. Das 31 amostras avaliadas, duas estavam contaminadas com concentrações de 0,01 e 0,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , estando acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) preconizados pela União Europeia de 0,005  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (PAREJA et al., 2011; UE, 2014).

Dentre os produtos fitossanitários sintéticos, citados por ocasionar a mortalidade e a contaminação nos produtos apícolas, destaca-se o inseticida fipronil ( $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_4\text{OS}$ ), do grupo químico pirazol. Sua vasta utilização ocorre devido ao seu amplo espectro de atividade inseticida e eficácia a baixas doses de aplicação, apresentando meia-vida moderadamente persistente (BONMATIN et al., 2015). Embora seu uso tenha sido restrito em diversos países como os Estados Unidos, o Uruguai e na União Europeia, em outros, o fipronil continua sendo utilizado em larga escala. No Brasil, a sua aplicação está liberada, tendo restrição apenas para pulverização aérea (IBAMA, 2015).

O fipronil atua diretamente no sistema nervoso central das abelhas, prejudicando suas habilidades cognitivas, capacidade locomotora, sistema imunológico e redução no número de ovos nas colônias (GUNASEKARA et al., 2007; ROAT et al., 2017; HOLDER et al., 2018; SILVA et al., 2021). O consumo humano de produtos apícolas contaminados por esse inseticida pode ocasionar dores de cabeça, náuseas, vômitos, tumores cancerígenos, paralização dos órgãos e, até mesmo, resultar em óbitos (AL-WAILI et al., 2012; MENDONÇA; BURLE; FIGUEIREDO, 2019).

Dessa forma, considerando a importância das abelhas *A. mellifera* como polinizadoras e suas relações ecológicas que aumentam a produtividade de sementes, a qualidade de frutas e a produtividade de alimentos (qualidade do mel), este estudo teve por objetivo avaliar a possível contaminação do mel com fipronil, bem como os níveis de toxicidade aguda oral, por via tópica e por contato em superfície de fipronil em operárias de abelhas *A. mellifera* africanizada, assim como possíveis alterações comportamentais.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Análise de fipronil em amostras de mel

Neste estudo, foi analisada a presença do inseticida fipronil em amostras de mel, coletadas em apiários localizados em propriedades agroecológicas e convencionais.

#### 6.2.1.1 Área de estudo

A área de estudo englobou sete apiários, sendo dois instalados em propriedades agroecológicas localizadas no município de Verê - PR (25° 52' 53" S 52° 54' 28" W). Outros cinco apiários estão instalados em propriedades convencionais: quatro no município de Capanema - PR (25° 40' 19" S 53° 48' 32" W) e um no município de Capitão Leônidas Marques - PR (25° 28' 44" S 53° 36' 50" W). Os apiários convencionais pertencem a regiões limdeiras ao Parque Nacional do Iguaçu, não ultrapassando uma distância de 7000 m da bordadura da reserva. Nesses cinco apiários, as colônias de *A. mellifera* recebiam suplementação alimentar (açúcar) constante.

#### 6.2.1.2 Coleta e georreferenciamento das amostras

A coleta das amostras de mel ocorreu no período de novembro de 2018 a janeiro de 2019. Esse período é considerado a safra, segundo os apicultores da região em estudo. Para a coleta utilizou-se EPI de corpo inteiro (Figura 17) e, em cada apiário, foram coletadas oito amostras de mel com, aproximadamente, 250 g cada, armazenadas em caixas gerbox devidamente higienizadas, esterilizadas e catalogadas. As amostras foram coletadas em favos de diferentes colmeias de cada apiário, totalizando 56 amostras.



**Figura 17** Coleta de mel em apiário de estudo, no município de Capanema - PR.

**Fonte:** o autor.

Os apiários foram georreferenciados com o auxílio de um receptor de sinal de sistema de posicionamento global (GPS) Juno 4 Trimble®. Os dados foram descarregados em um ambiente de sistemas de informações geográficas (SIG) e a delimitação espacial denominada como Buffer, correspondeu a uma área com raio de 3 km do centro de cada apiário em estudo (SANTOS et al. 2011; BRITO; BRITO, 2014; CAMARGO et al., 2014;). Essa distância foi estabelecida levando-se em consideração a metade da distância percorrida pelas abelhas ao redor do seu habitat, de até 6 km (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007). Para que o trabalho de forrageamento seja eficiente, as fontes de alimento devem estar no máximo a 3 km de distância das colônias, pois o desgaste metabólico em longos percursos podem ser maior do que o benefício com a apreensão do alimento (CAMARGO et al., 2002).

#### Aquisição e classificação das imagens Sentinel 2

Foram adquiridas gratuitamente imagens Sentinel 2, diretamente do portal eletrônico do Programa Europeu de Observação da Terra Copernicus. As imagens utilizadas foram capturadas em 22 de outubro de 2020, sendo que, para o processo de escolha, levou-se em consideração a presença de nuvens e ruídos. Ressalta-se também que as cenas foram disponibilizadas com as devidas correções geométricas e atmosféricas. Com isso, foi realizada a reprojeção das mesmas para o sistema de referência SIRGAS 2000 e feita uma composição colorida falsa cor com as bandas espectrais 8, 4 e 3, todas com 10 m de resolução espacial.

Em seguida, por meio de uma inspeção visual das áreas de interesse, como também das observações feitas em campo no momento das coletas, foram identificadas cinco classes

de uso e ocupação da terra para o estudo, sendo elas: mata, corpos hídricos, agricultura, pastagem e área construída. Com as classes definidas, coletaram-se 50 amostras para cada classe de uso, distribuídas na imagem e por meio do algoritmo de distância mínima euclidiana realizou-se a classificação supervisionada para cada região de coleta. Todas as etapas supracitadas foram realizadas no *software* QGIS 3.16.9, com o auxílio do plugin *Semi-automatic classification* (SCP) 7.9.5.

### 6.2.1.3 Armazenamento das amostras

As amostras de favos de mel coletadas foram maceradas e filtradas, extraindo-se apenas o mel. Depois desse procedimento foram armazenadas em recipientes de vidros com capacidade de 250 g, higienizados e esterilizados, próprios para alimentos e devidamente catalogados. As amostras foram levadas até o Laboratório de Análises Agro-Ambientais, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* de Cascavel – PR, e acondicionados sob temperatura reduzida (-5 °C) com o intuito de manter suas propriedades físico-químicas, até o processo de extração.

### 6.2.1.4 Extração das amostras de mel

As vidrarias utilizadas para o processo de extração foram devidamente lavadas e, posteriormente, passadas em água destilada por osmose reversa e deixadas em uma mufla por um período de 4 horas a 350 °C. Esse procedimento de limpeza é imprescindível para minimizar a presença de interferentes.

Após o processo de limpeza das vidrarias, pesou-se, aproximadamente,  $1,0 \pm 0,1$  g de cada amostra de mel em tubos de ensaio, utilizando-se uma balança analítica (Shimadzu®). Em seguida, cada amostra foi diluída em água até o volume de 3,0 mL e a solução foi homogeneizada sob agitação em vortex por 1 min.

O condicionamento dos cartuchos SPE C18 1000 mg / 6 mL foi realizado conectando os cartuchos a um minifold (Figura 18a), em seguida, foram adicionados 5,0 mL de metanol, aplicou-se vácuo e descartou-se o solvente, sem permitir a secagem do adsorvente. Esse, procedimento foi repetido com 5,0 mL de água ultrapura MilliQ. Os cartuchos foram carregados com 1,0 mL da solução da amostra e lavados com 5,0 mL de água destilada. Essas etapas foram realizadas permitindo a completa secagem do adsorvente.

Os extratos foram eluídos com 3,0 mL de metanol e coletados em tubos de ensaio (Figura 18b). Os eluídos foram secos sob fluxo de nitrogênio (Figura 18c) no equipamento TurboVap® LV (Figura 2d), à temperatura de 40 °C, até a completa evaporação do solvente.

Os analitos foram ressuspensos em metanol grau HPLC e transferidos quantitativamente para vials de cromatografia até se completar 1,0 mL de solução. Cada vial foi tampado, envolvido com papel alumínio e armazenado no congelador, até o momento da determinação cromatográfica.

a)



b)



c)



d)



**Figura 18** a) Condicionamento dos cartuchos SPE C18 1000 mg/6 mL conectados a um Minifold para a realização de extração de fipronil em mel; b) Coleta dos extratos eluídos das amostras de mel em tubos de ensaios; c) Secagem dos extratos eluídos das amostras de mel em fluxo de nitrogênio; d) Equipamento TurboVap® LV com fluxo de nitrogênio.

Fonte: o autor.

#### 6.2.1.5 Determinação de fipronil em mel

As vidrarias utilizadas para o preparo da curva padrão foram devidamente lavadas e, em seguida, foram enxaguadas com etanol 99,5%, metanol grau HPLC e hexano grau HPLC, todos por duas vezes. Esse procedimento de limpeza é necessário para minimizar a presença de interferentes.

Após o processo de limpeza das vidrarias, foi preparada uma solução estoque pesando-se 8,0 mg de fipronil ( $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$  - pureza 99,9% grau HPLC, Sigma-Aldrich) em uma balança analítica (Shimadzu®) com precisão de quatro casas decimais e dissolvendo-se esse sólido em 10,0 mL de metanol grau HPLC, obtendo-se uma concentração de  $800,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de fipronil. A partir dessa solução, foi preparada uma solução mãe (Fipronil) de  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a partir da qual foram preparadas seis soluções de trabalho, todas em metanol grau HPLC, com as seguintes concentrações: 0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,50 e  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A detecção de fipronil nas amostras de mel e os parâmetros para a validação foram analisados em sistema cromatográfico, utilizando um equipamento de cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons GC-ECD (Shimadzu® GC-2010; Figura 19), equipado com amostrador automático (AOC 20i), com volume de injeção de  $1 \mu\text{L}$ , com gás de arraste hélio 5.0, gás make-up nitrogênio 5.0 e coluna capilar cromatográfica com filme de 5% de fenil e 95% de metilpolisiloxano RTX-5MS Restek® (Comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,25 mm e espessura do filme:  $0,25 \mu\text{m}$ ). Os demais parâmetros cromatográficos do método estão descritos na Tabela 4.



**Figura 19** GC-ECD, Shimadzu CG-2010, localizado no Laboratório de Análises Agro-Ambientais, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (LAAA-UNIOESTE).

**Fonte:** o autor.

**Tabela 4** Condições cromatográficas do GC-ECD para determinação de fipronil em amostras de mel

Injetor	Temperatura (°C)	260
	Modo de injeção	<i>Split</i>
	Tempo de amostragem (min)	2,0
	Razão de <i>split</i>	1:10
	Gás de arraste	Hélio
	Modo de controle de fluxo	Pressão
	Fluxo na coluna (mL min <sup>-1</sup> )	0,92
Coluna	Temperatura (°C)	100
	Programação da temperatura	100 °C por 1 min; 15 °C min <sup>-1</sup> até 230 °C; 2 °C min <sup>-1</sup> até 256 °C por 2 min; 20 °C min <sup>-1</sup> até 280 °C por 10 min
	Tempo total da corrida cromatográfica (min)	35,87
Detector	Temperatura (°C)	340
	Gás <i>Make-up</i>	Nitrogênio
	Fluxo do gás <i>make-up</i> (mL min <sup>-1</sup> )	20
	Corrente	0.3

#### 6.2.1.6 Parâmetros de validação cromatográfico para análise de fipronil em mel

A fim de atestar a confiabilidade do método, alguns dos parâmetros de validação, seguindo as recomendações da *in-house validation*, foram avaliados (RIBANI et al., 2004). A validação em laboratório consistiu em analisar os seguintes parâmetros: seletividade; linearidade; limites de detecção; limites de quantificação e recuperação.

A seletividade foi realizada em triplicatas, comparando-se uma matriz com adição do analito (Padrão de fipronil com concentração de 4 µg mL<sup>-1</sup>) e uma matriz sem a adição do analito. O resultado dessas medições foi avaliado considerando-se os tempos característicos de retenção do pico, sendo observado que não há sinal do analito na matriz sem adição do composto fipronil.

A linearidade foi obtida por padronização externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis, área do pico e a concentração da substância, a serem quantificadas é expressa pela Equação 1 (INMETRO, 2007).

$$y = ax + b \quad (1)$$

em que:

y: resposta medida (absorbância, altura ou área do pico etc.);

x: concentração;

a: inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b: interseção com o eixo y, quando x = 0.

Através da equação da reta, a linearidade foi avaliada levando-se em consideração o coeficiente de correlação linear ( $r^2 \geq 0,99$ ) como indicador do modelo matemático. Para o ajuste da curva analítica, foram preparadas soluções estoques e de trabalho conforme a seção 6.2.1.5, com três triplicatas injetadas em ordem crescente.

O limite de detecção (LD) foi determinado utilizando-se o método visual, que consiste em injetar soluções de concentração crescente, até o aparecimento de um sinal analítico visível. O limite de quantificação (LQ) foi considerado a concentração do menor ponto da curva analítica, visto que amostras com concentrações inferiores a esse valor não poderiam ser quantificadas por fugirem da linearidade do método.

O ensaio de recuperação foi realizado comparando-se os resultados analíticos da solução padrão de fipronil de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , submetidos ao processo de extração em fase sólida, com os resultados que serão obtidos com a mesma solução padrão não extraída. O ensaio de recuperação será calculado conforme a Equação 2 (ANVISA, 2017).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos, geralmente, estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (GARP, 1999).

## 6.2.2 Toxicidade do inseticida fipronil a operárias de *Apis mellifera* africanizada

Uma vez detectado o fipronil em amostras de mel, realizou-se uma bateria de testes de toxicidade deste produto para a *A. mellifera*.

### 6.2.2.1 Local dos experimentos

Os experimentos (bioensaios) foram realizados na Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) – Apicultura e no Laboratório de Controle Biológico (LABCON), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - *campus* de Dois Vizinhos - PR (UTFPR-DV). Os experimentos foram conduzidos com adaptações nas metodologias recomendadas por Baptista et al. (2009), Brighenti et al. (2007), Carvalho et al. (2009) e Libardoni et al. (2021), seguindo as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), para o ensaio de produtos químicos nº 213 e nº 214, de 21 de setembro de 1998.

### 6.2.2.2 Obtenção do padrão de fipronil e das operárias de *A. mellifera* africanizada

O padrão de fipronil ( $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$  - pureza 99,9% grau HPLC) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich® e uma solução estoque foi preparada, pesando-se 2,5 mg de fipronil em uma balança analítica (Shimadzu®), com precisão de quatro casas decimais, dissolvendo esse sólido em 10 mL de metanol, obtendo-se uma concentração de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  de fipronil.

Operárias de *A. mellifera* africanizada foram obtidas de colônias provenientes do apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) – Apicultura, localizado na fazenda experimental da UTFPR-DV. Nesse apiário, as colmeias estão instaladas em estruturas de madeira do tipo Langstroth (Figura 20). Para os bioensaios, foram selecionadas colmeias com quadros identificados, que foram retirados do apiário contendo crias operculadas e padronizadas de 19 dias. Os quadros foram condicionados em sacos de papel Kraft (60 x70 cm com gramatura 50 mm), lacrados, perfurados e transportados ao Laboratório de Controle Biológico I e, então, alocados em câmara climatizada ( $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , U.R de  $60 \pm 10\%$ ), até a emergência das operárias, obtendo-se operárias de genealogia e idade padronizada (Aproximadamente, 48 horas de fase adulta).



**Figura 20** Colmeias instaladas em estruturas de madeira do tipo Langstroth, no apiário da Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) – Apicultura, localizado na fazenda experimental da UTFPR-DV.

**Fonte:** o autor.

### 6.2.2.3 Bioensaio 1: determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) por contato de operárias de *A. mellifera* africanizada em superfície vítrea tratada com fipronil

Para a determinação da concentração letal média CL<sub>50</sub> do fipronil sobre operárias de *A. mellifera* africanizada com, aproximadamente, 24 horas de fase adulta, foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo sete tratamentos com cinco repetições cada, dois controle e cinco níveis de concentração do inseticida fipronil. Os níveis correspondem às porcentagens de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01% da concentração recomendada de aplicação do produto comercial Nortox 800 WG® ((RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile (Fipronil) – 800,0 g/kg) no campo, para a cultura da soja no combate ao Tamanduá-da-soja (*Sternechus subsignatus*). Os tratamentos foram classificados da seguinte forma: T1 - controle composto com água destilada esterilizada; T2 - controle com água destilada esterilizada e metanol grau HPLC; T3 - 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (100%); T4 - 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (10%); T5 - 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (1%); T6 - 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0,1%); T7 – 0,025  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0,01%) de fipronil padrão Sigma-Aldrich .

Para o contato das operárias com os tratamentos em superfície vítrea, foram pulverizados 290  $\mu\text{L}$  dos tratamentos em placas de Petri de vidro (15 cm diâmetro x 1,5 cm de altura). Para a pulverização, utilizou-se um aerógrafo Pneumatic Sagyma® acoplado a uma bomba Tecnal® (TE-058) de pressão constante (1,2  $\text{kgf.cm}^{-1}$ ). As placas foram montadas de forma que houvesse fluxo de ar e acondicionadas em câmara de fluxo laminar horizontal (Veco®) para a evaporação completa da água (Metodologia adaptada de Carvalho et al. (2009) e Libardoni et al. (2021)).

Posteriormente, dez operárias de *A. mellifera* africanizada, anestesiadas com CO<sub>2</sub> por até 120 segundos, foram inseridas no interior dessas placas, durante 2 horas, simulando o contato em campo. Após as 2 horas, as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro), identificadas e desinfetadas, cobertas com *voile*, sendo cada gaiola considerada uma repetição. Sobre o *voile* foi adicionado algodão embebido em água destilada esterilizada e pasta Cândi (Açúcar de confeitaria e mel) (Metodologia adaptada de Brighenti et al. (2007)).

As gaiolas contendo as operárias foram mantidas em sala climatizada para criação de insetos (27  $\pm$  2 °C, U.R. de 60  $\pm$  10% e fotofase de 10/14 horas C/E). A mortalidade das operárias foi avaliada 48 horas após o contato das abelhas com as placas pulverizadas com os tratamentos, realizando-se a contagem das abelhas mortas. As abelhas foram consideradas mortas quando não reagiram ao toque de uma pinça Bioquip®. A concentração letal média encontrada nesse bioensaio foi utilizada para determinar os intervalos de níveis de concentração a serem usadas nos bioensaios 2 e 3, conforme recomendado pela OECD guia 213 e 214 (1998).

#### 6.2.2.4 Bioensaio 2: concentração letal média oral (CL<sub>50</sub>) - OECD

A análise dos níveis de toxicidade aguda, por via oral, de abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada para o inseticida fipronil foi realizada de acordo com a metodologia proposta pela OECD (1998a), guia 213. As operárias de *A. mellifera* africanizada com idade padronizada (Aproximadamente, 48 horas) ficaram sem alimento por um período de 2 horas para garantir que se alimentassem quando o bioensaio fosse iniciado. Em seguida, foram preparadas as dietas compostas por uma solução de água: açúcar (1:1).

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo sete tratamentos (T1; T2; T3; T4; T5; T6 e T7), com cinco repetições cada. Cada tratamento foi composto com dez abelhas por repetição. Os tratamentos foram classificados da seguinte forma: T1 - controle (Apenas a dieta); T2 - 1 µg mL<sup>-1</sup>; T3 - 2 µg mL<sup>-1</sup>; T4 - 7 µg mL<sup>-1</sup>; T5 - 12 µg mL<sup>-1</sup>; T6 - 17 µg mL<sup>-1</sup>; T7 - 22 µg mL<sup>-1</sup> do inseticida fipronil. As respectivas concentrações foram diluídas na solução da dieta, conforme fator 2.2, determinado pela OECD (1998a).

Para isso, dez operárias de *A. mellifera* africanizada, anestesiadas com CO<sub>2</sub> por até 120 segundos, foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) identificadas e desinfetadas, cobertas com *voile*, sendo cada gaiola considerada uma repetição. A dieta foi oferecida em recipientes plásticos (1 cm de altura x 2.5 cm de diâmetro), com capacidade para 2 mL (Figura 21), cobertos com tela antiafídica e fixados na parte interna de cada gaiola.



**Figura 21** Recipientes plásticos com tela antiafídica, para oferecimento da dieta alimentar de cada tratamento do inseticida fipronil para abelhas *A. mellifera* africanizada.

**Fonte:** o autor.

A quantidade de dieta com os tratamentos que receberam concentrações de fipronil foi monitorada, obtendo-se o peso dos recipientes com o volume da dieta no início e ao final do experimento, afim de fornecer informações sobre palatabilidade de cada tratamento. Depois de 4 horas, os recipientes com as dietas restantes foram removidos da gaiola e pesados em balança analítica, sendo substituídos por um recipiente contendo a dieta do T1 (controle). Nos tratamentos em que não se observou o consumo da dieta durante as primeiras 4 horas (variação nos pesos dos recipientes), foram mantidos por mais 2 horas até ser realizada a troca, conforme recomendação da OECD (1998a).

As unidades experimentais foram mantidas em sala climatizada a  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ , no escuro, conforme recomendado pela OECD (1998a), guia 213. A mortalidade foi registrada 4 horas após o início do teste e, posteriormente, com 24 e 48 horas do início. As abelhas foram consideradas mortas quando não reagiram ao toque de uma pinça Bioquip®. Todos os efeitos comportamentais anormais observados durante o período do bioensaio foram registrados.

#### **6.2.2.5 Bioensaio 3: concentração letal média por aplicação tópica (CL<sub>50</sub>) - OECD**

Os níveis de toxicidade aguda por contato das abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada para o inseticida fipronil foram escolhidos seguindo a metodologia proposta pela OECD (OECD, 1998b), guia 214. Foram utilizados sete tratamentos e as concentrações do inseticida fipronil utilizadas para os tratamentos foram as mesmas do bioensaio 2, as respectivas soluções foram diluídas em água.

Operárias de *A. mellifera* africanizada com idade padronizada de até 48 horas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> por até 120 segundos. Grupos de dez abelhas receberam individualmente os tratamentos por aplicação tópica. Um volume de 1 µL de solução de cada tratamento foi aplicado com uma micropipeta Kasvi® (Capacidade de 1-2 µL) no lado dorsal do toráx (Figura 22). Após a aplicação as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro), identificadas e desinfectadas, cobertas com *voile*, totalizando cinco repetições por tratamento. A alimentação foi composta por uma solução de água e açúcar (1:1), oferecida em recipientes plásticos, conforme seção 6.2.2.4.



**Figura 22** Aplicação tópica de 1  $\mu\text{L}$  de solução de cada tratamento do inseticida fipronil, aplicado com uma micropipeta no lado dorsal do tórax das abelhas *A. mellifera* africanizada.

**Fonte:** o autor.

As unidades experimentais foram mantidas em sala climatizadas a  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ , no escuro. A mortalidade foi registrada 4 horas após o início do teste e, posteriormente, com 24 e 48 após o início. Os demais parâmetros foram os mesmos descritos no bioensaio 2.

#### **6.2.2.6 Bioensaio 4: comportamento de *A. mellifera* africanizada, após contato com superfície contaminada pelo inseticida fipronil**

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo seis tratamentos (T1; T2; T3; T4; T5 e T6), com quinze repetições cada, contendo 10 abelhas. Os tratamentos foram classificados da seguinte forma: T1 - controle; T2 -  $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; T3 -  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; T4 -  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; T5 -  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  e T6 -  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  do inseticida fipronil, conforme fator 2.2, determinado pela OECD (1998a). Após a preparação desse bioensaio, cinco repetições de cada tratamento foram selecionadas, aleatoriamente, para a avaliação pertinente ao bioensaio 4, cinco repetições aleatórias foram utilizadas para análise de caminhamento e cinco repetições para a análise de voo.

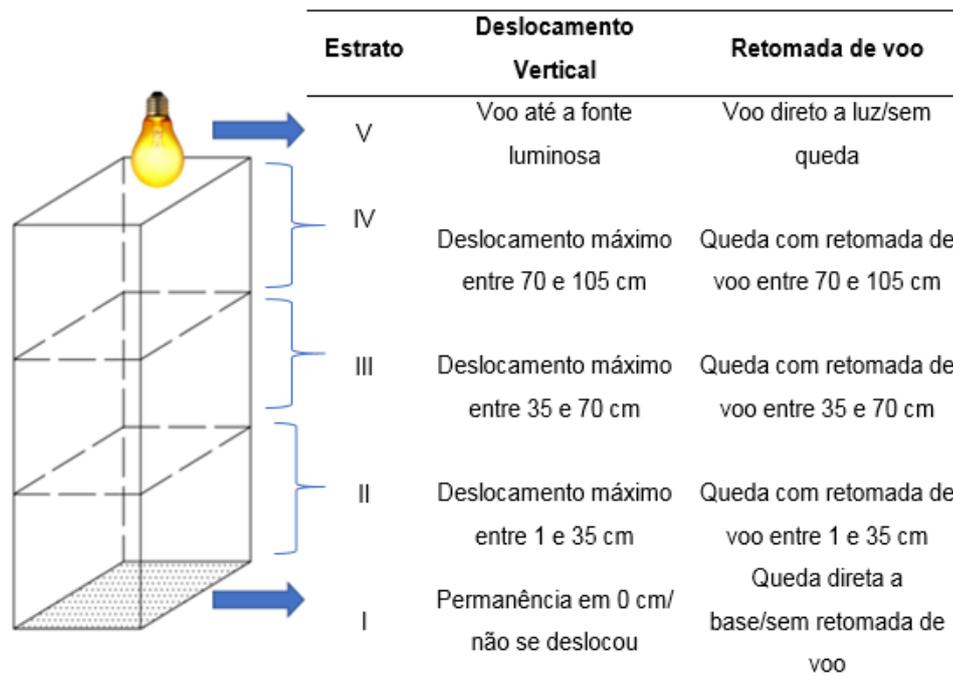
A pulverização e a secagem das placas de petri com os tratamentos foram realizadas conforme o bioensaio 1. Posteriormente, dez operárias de *A. mellifera* africanizada,

anestesiadas com CO<sub>2</sub> por até 120 segundos, foram inseridas no interior dessas placas, durante duas horas. Na sequência as abelhas foram transferidas para gaiolas de PVC, conforme executado no bioensaio 1, sendo cada gaiola considerada uma repetição.

As gaiolas contendo as operárias foram mantidas em sala climatizada (27 ± 2 °C, U.R. de 60 ± 10% e fotofase de 10/14 horas C/E). A mortalidade das operárias foi avaliada a 1, 2, 4, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, após contato com os tratamentos (Metodologia adaptada de Baptista et al. (2009)). As abelhas foram consideradas mortas quando não reagiram ao toque de uma pinça Bioquip®.

Análise de voo (deslocamento vertical) e retomada de voo (queda livre) de *A. mellifera* africanizada

Após 24 horas do início da montagem do bioensaio 4, 10 abelhas oriundas do tratamento que apresentava a menor concentração de fipronil (T2 - 0,75 µg mL<sup>-1</sup>) foram selecionadas, aleatoriamente, entre as cinco repetições e submetidas à análise de deslocamento vertical e outras 10 abelhas selecionadas para queda livre. Esse bioensaio foi realizado em sala com ausência de iluminação natural, com uma torre de madeira (35 cm x 35 cm de largura e 105 cm de altura), a qual continha uma fonte luminosa na parte superior e uma fita métrica em seu interior, com cinco níveis (estratos), conforme Figura 23.



**Figura 23** Ilustração da torre de voo e classificação dos estratos, de acordo com o comportamento das abelhas nos testes de queda e voo.

Fonte: Adaptado de Tome et al. (2015).

Para o deslocamento vertical, as abelhas, individualmente, foram liberadas na base inferior da torre. Durante um minuto observou-se o seu comportamento e foi contabilizado o estrato máximo que ela atingiu, conforme Figura 23. Para a análise de retomada de vôo (queda livre) as abelhas, uma a uma, foram liberadas da base superior aberta da torre e, com um toque, foram estimuladas a sair dessa base. Verificou-se em qual dos estratos a abelha conseguiu retomar o voo ou se houve queda até o estrato I.

### 6.2.3 Análise estatística

Para as análises de contaminação no mel, foi verificada a homogeneidade e/ ou normalidade dos dados pelo teste de Shapiro Wilk. Os dados não apresentaram normalidade, sendo, então, aplicados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de Nemenyi (NEMENYI, 1963), utilizando-se o pacote PMCMR (POHLERT, 2014) do *software* R (R CORE TEAM, 2019).

Para os bioensaios 1, 2 e 3, foi realizada a análise de concentração letal do inseticida fipronil em operárias de *A. mellifera* africanizada, utilizando-se o pacote MASS (VENABLES; RIPLEY, 2002) do *software* R (R CORE TEAM, 2019).

Para o bioensaio 4 foi realizada análise de sobrevivência das operárias de *A. mellifera* africanizada usando Kaplan-Meier. Os tratamentos foram comparados usando o teste de *log-rank* e a análise completa foi realizada utilizando-se o pacote de sobrevivência (THERNEAU, 2015) do *software* R (R CORE TEAM, 2019).

Para a análise de caminhamento das abelhas foi utilizado o teste de comparação de médias (Tukey), com o *software* R, para verificar se houve ou não diferença entre os tratamentos para  $p$ -valor  $<0,05$ . Para a análise de vôo (Deslocamento vertical) e retomada de voo foram utilizados Modelos Lineares Generalizados, regressão ordinal, através do teste de Wald (qui-quadrado), utilizando o *software* R, pacote ordinal.

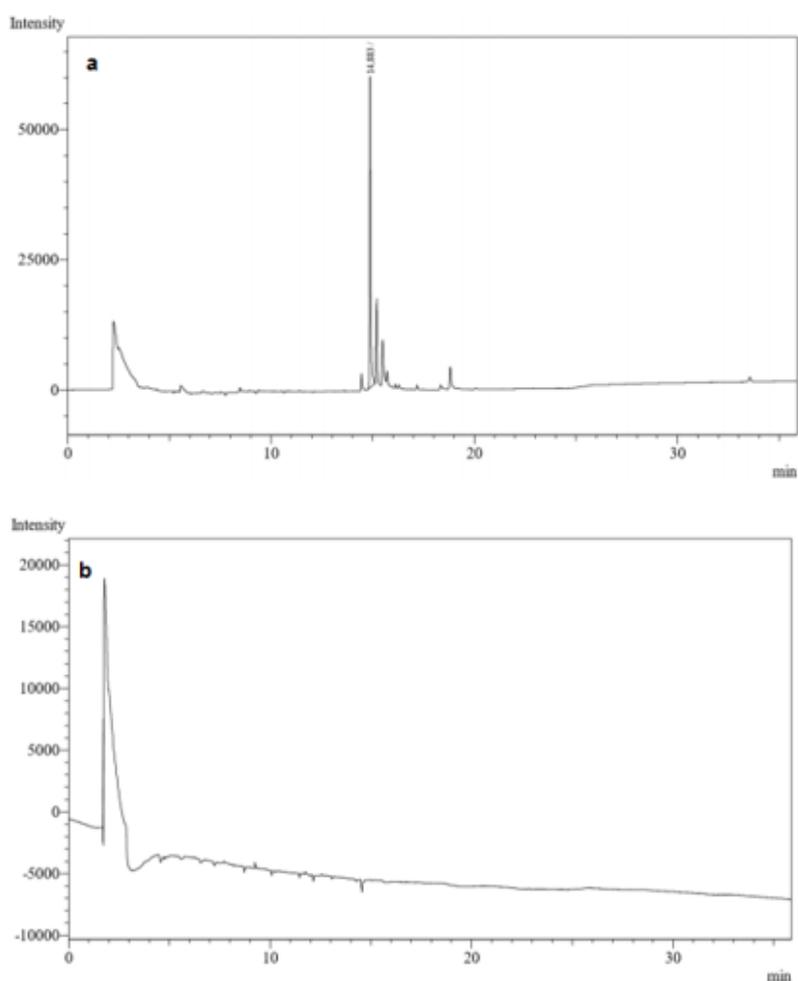
## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Deteminação de fipronil em mel

Os parâmetros de validação cromatográfico para extração, detecção e quantificação de fipronil em amostras de mel por cromatografia gasosa, utilizando detector de captura de

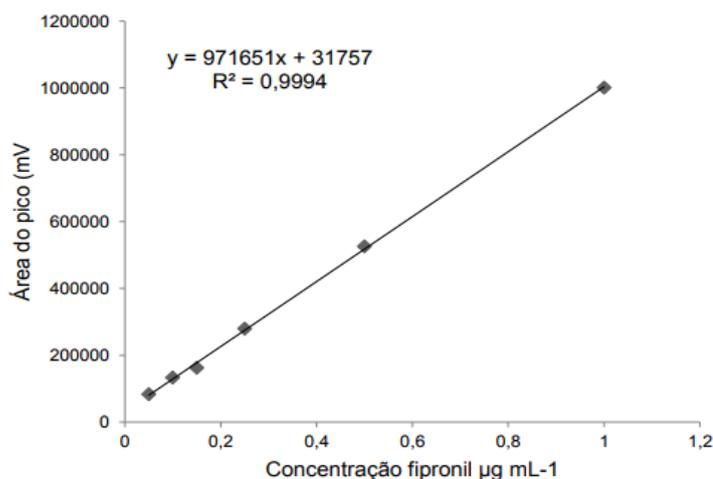
elétrons (GC-ECD), foram satisfatórios. A seletividade apresentou bons resultados, não ocorrendo interferência de outros resíduos no método, além do solvente metanol, do padrão fipronil e de seus componentes de degradação, como se observa nas Figuras 8a e 8b.

O fipronil apresentou algum tipo de degradação durante a estocagem ou durante a análise cromatográfica, visto que nos cromatogramas dos padrões foram detectados picos adicionais ao do analito em pesquisa. O tempo de retenção do pico do princípio ativo fipronil foi de 14,88 min, apresentando simetria no formato do pico (Figura 8a) e linearidade adequada (Figura 24). Nos tempos entre 12 e 20 min, observaram-se picos referentes aos produtos de degradação (Figura 24a) e no tempo entre 1 e 3 min foi observado outro pico, referente ao solvente metanol utilizado para a diluição do fipronil (Figura 24b).



**Figura 24** a) Cromatograma correspondente ao tempo de retenção do composto químico fipronil; b) Cromatograma correspondente ao solvente metanol utilizado para a diluição do composto químico fipronil.

A curva analítica do fipronil que expressa a equação da reta e sua linearidade está apresentada na Figura 25.



**Figura 25** Curva analítica do fipronil realizada no CG-ECD.

A linearidade do método apresentou excelente resultado, estando de acordo com o recomendado pela Anvisa (2017), que define um coeficiente de determinação igual a 0,99. O limite de detecção (LD) encontrado para fipronil foi de 0,003 µg mL<sup>-1</sup> e de quantificação 0,05 µg mL<sup>-1</sup>, demonstrando uma ótima sensibilidade do detector ECD. A taxa de recuperação encontrada no presente estudo foi de 118,32%, valor considerado ideal, estando de acordo com os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos, os quais geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20% (GARP, 1999), demonstrando que o método de extração utilizado foi adequado. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados das concentrações do princípio ativo fipronil (µg mL<sup>-1</sup>) encontradas nas amostras de mel.

**Tabela 5** Concentração do inseticida fipronil em amostras de mel de sete apiários

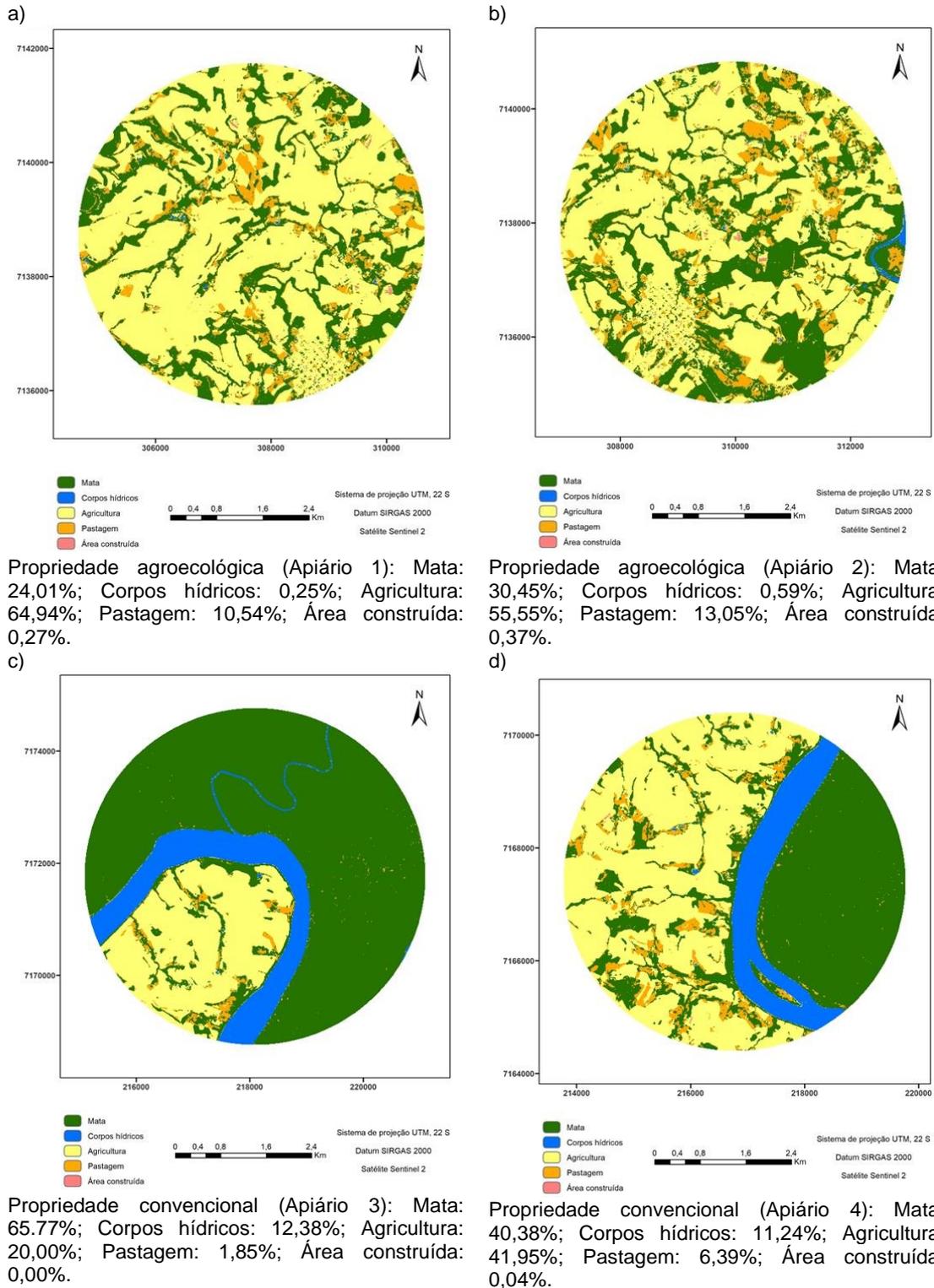
Amostras de mel	Concentração (µg mL <sup>-1</sup> )
Apiário 1 (propriedade agroecológica)	nd a
Apiário 2 (propriedade agroecológica)	nd a
Apiário 3 (propriedade lindeira)	nd a
Apiário 4 (propriedade lindeira)	0,064 b
Apiário 5 (propriedade lindeira)	0,059 b
Apiário 6 (propriedade lindeira)	0,079 b
Apiário 7 (propriedade lindeira)	0,053 b
p-valor	<0,01

**Notas:** Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

nd = não detectado.

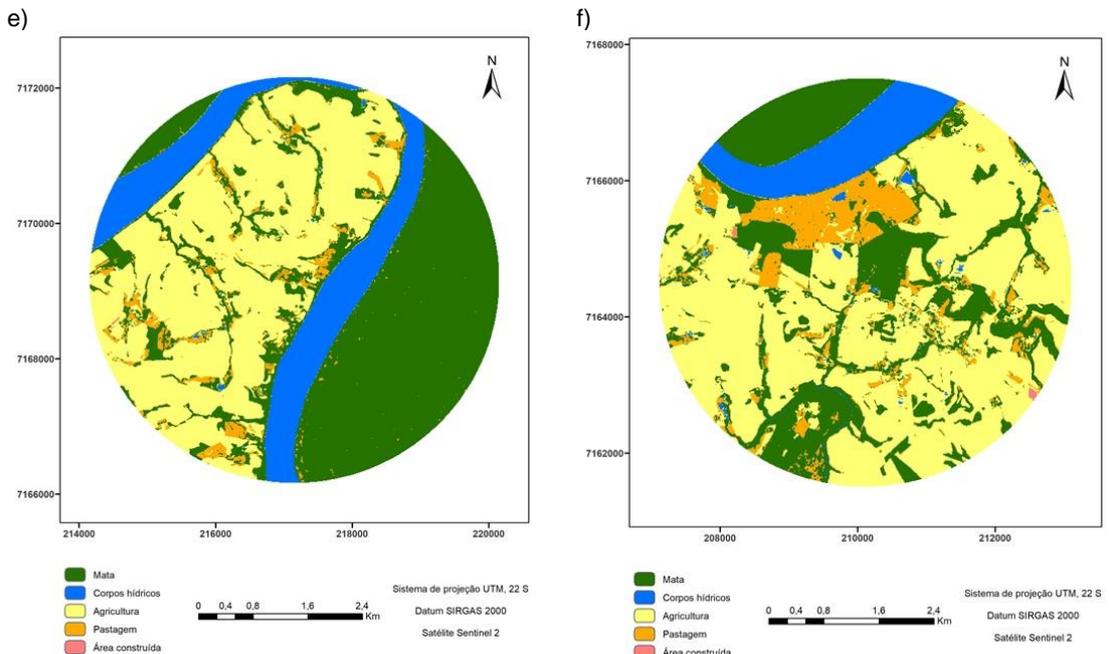
Dentre as amostras de mel coletadas dos sete apiários (Figura 26), apenas as amostras de mel provenientes das propriedades agroecológicas e de uma propriedade convencional não apresentaram detecção e quantificação do inseticida fipronil. O mel dos

apiários 4, 5, 6 e 7 apresentaram detecção acima dos LMR definidos pela União Europeia de 0,005 µg mL<sup>-1</sup> (UE, 2014).



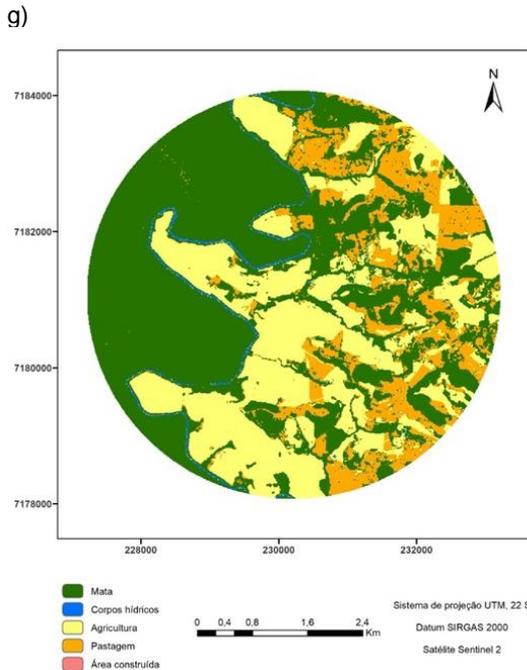
(continua)

**Figura 26** Classificação do uso e ocupação das terras.



Propriedade convencional (Apiário 5): Mata: 39,76%; Corpos hídricos: 14,97%; Agricultura: 41,04%; Pastagem: 4,20%; Área construída: 0,02%.

Propriedade convencional (Apiário 6): Mata: 27,53%; Corpos hídricos: 8,73%; Agricultura: 53,56%; Pastagem: 10,04%; Área construída: 0,13%.



Propriedade convencional (Apiário 7): Mata: 52,6%; Corpos hídricos: 1,1%; Agricultura: 30,29%; Pastagem: 15,93%; Área construída: 0,03%.

(conclusão)

**Figura 26** Classificação do uso e ocupação das terras.

**Nota:** As figuras dos apiários estão apresentadas nos Anexos.

Por meio das medidas de classes do uso e ocupação das terras no entorno dos apiários, foi possível determinar a porcentagem existente de cada classe, em um raio de 3

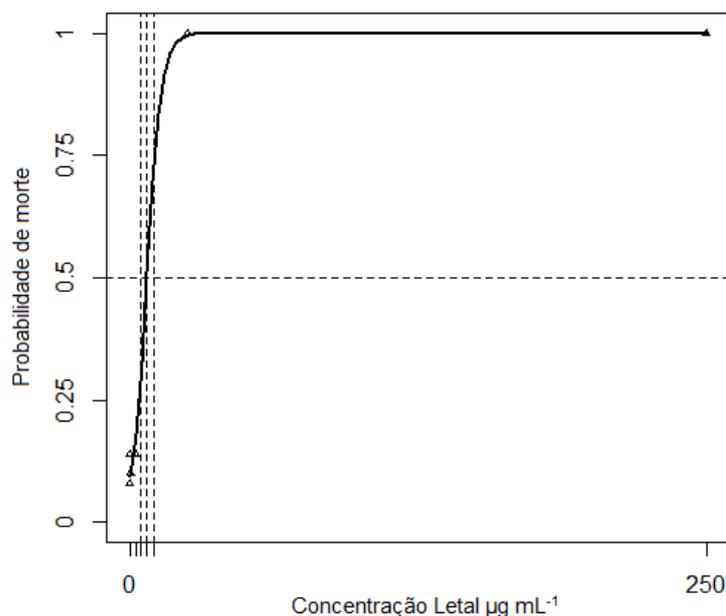
km, sendo possível, observar que os apiários que apresentaram detecção do inseticida fipronil, a classificação para agricultura foi de 40,95% (Apiário 4), 41,04% (Apiário 5), 53,56 (Apiário 6) e 30,29% (Apiário 7). Os apiários que não apresentaram detecção realizavam atividades de cultivos agroecológicos (Apiários 1 e 2) e o apiário 3 apresentou área de agricultura de 20%.

### 6.3.2 Toxicidade de fipronil a operárias de *A. mellifera* africanizada

Em todos os bioensaios realizados, a mortalidade das abelhas provenientes do controle, foi inferior a 10%, conforme recomendado pelas diretrizes da OECD guia 213 e 214 (1998).

#### 6.3.2.1 Bioensaio 1: determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) por contato de operárias de *A. mellifera* em superfície vítrea tratada com fipronil

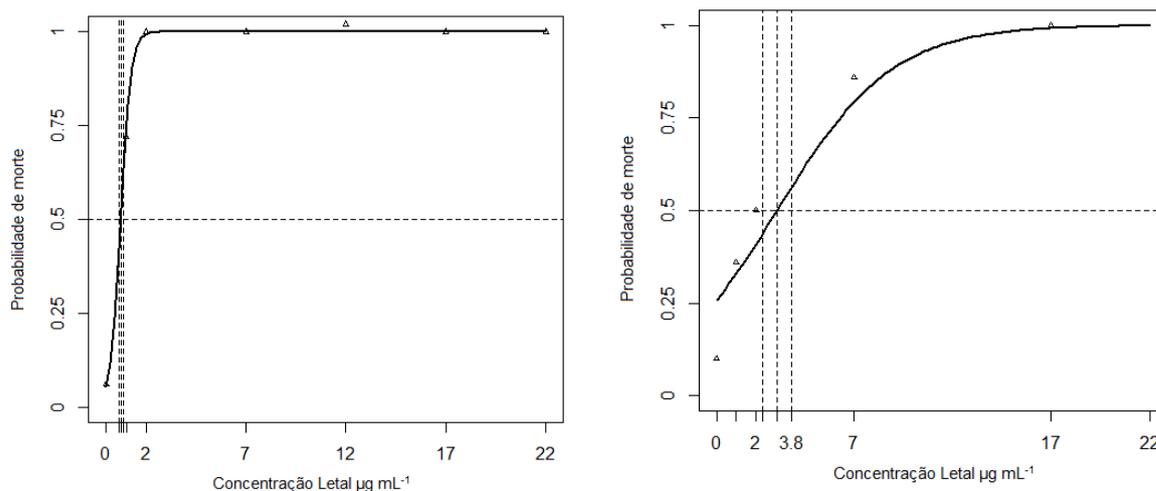
A CL<sub>50</sub> do inseticida fipronil, obtida 48 horas após o início do experimento, para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em contato com superfície vítrea foi de 7,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 27).



**Figura 27** Determinação da CL<sub>50</sub> (48 horas) do inseticida fipronil em abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada, em contato com superfície vítrea. IC<sub>95%</sub>: 4,38 - 10,34  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 6.3.2.2 Bioensaios 2 e 3: concentração letal média oral (CL<sub>50</sub>) e por via tópica (CL<sub>50</sub>) – OECD

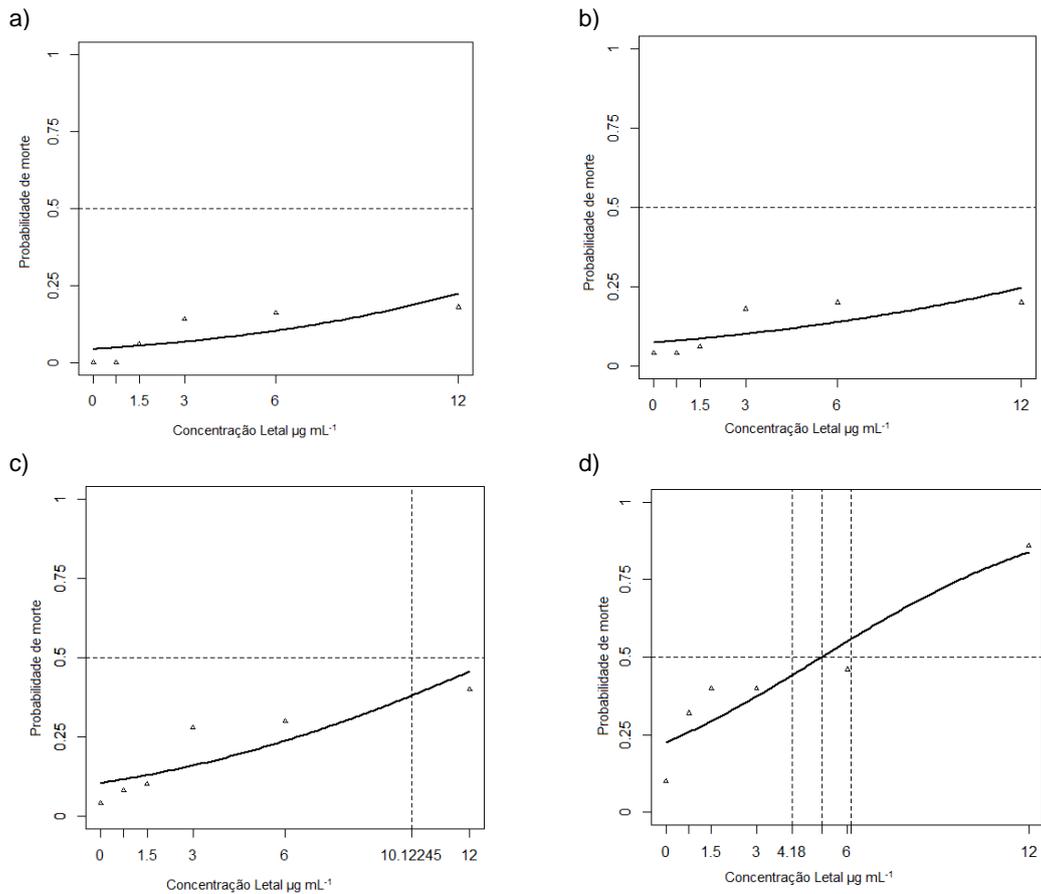
A CL<sub>50</sub> do inseticida fipronil, obtida 48 horas após o início do experimento, para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada em contato via oral foi de 0,74 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 28a) e por via tópica foi de 3,07 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 28b).



**Figura 28** a) Determinação da CL<sub>50</sub> (48 horas) do inseticida fipronil para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada, por via oral. IC<sub>95%</sub>: 0,62 -0,86 µg mL<sup>-1</sup>; b) Determinação da CL<sub>50</sub> (48 horas) do inseticida fipronil para as abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada, por via tópica. IC<sub>95%</sub>: 2,31 -3,83 µg mL<sup>-1</sup>.

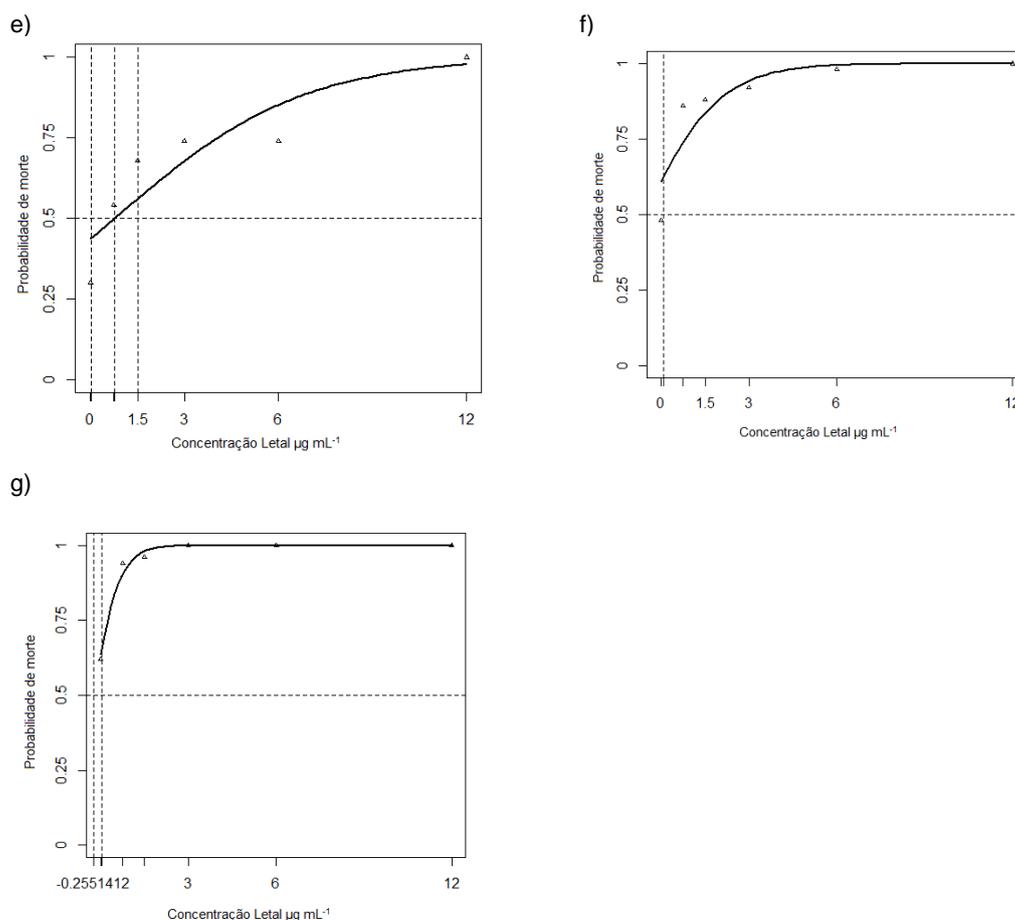
### 6.3.2.3 Bioensaio 4: comportamento de *A. mellifera* africanizada, após contato com superfície contaminada com inseticida fipronil

A CL<sub>50</sub> do inseticida fipronil, obtida 4 horas após o início do experimento, para as abelhas operárias *A. mellifera* africanizada por contato de superfície contaminada foi de 20,00 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 29a). Após 12 horas, foi de 21,44 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 29b), depois de 24 horas foi 13,07 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 29c), 48 horas após foi de 5,15 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 29d), em 72 horas foi 0,78 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 29e), 96 horas foi de -0,55 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 29f) e após 120 horas, foi de -0,26 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 29g).



(continua)

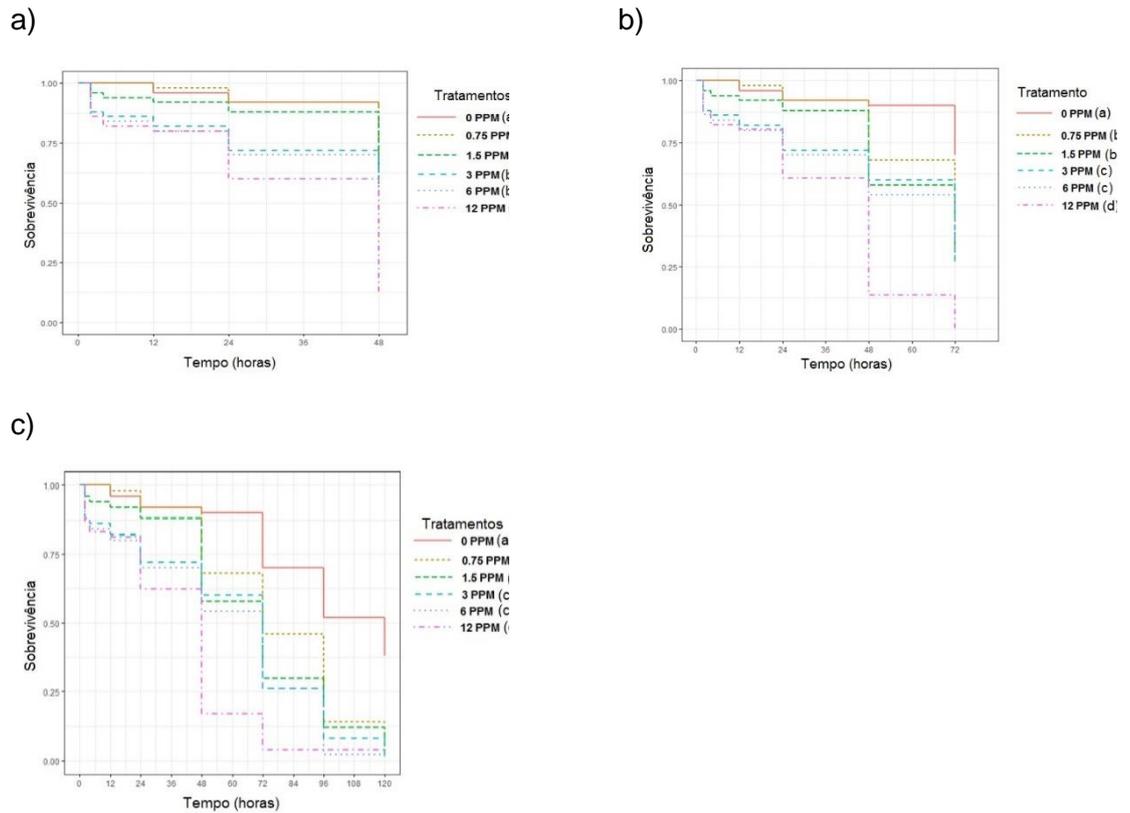
**Figura 29** Determinação da  $CL_{50}$  do inseticida fipronil: a) 4 horas após o início do experimento.  $IC_{95\%}$ : entre 13,28 e 26,73  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; b) 12 horas após o início do experimento.  $IC_{95\%}$ : entre 12,52 e 30,52  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; c) 24 horas após o início do experimento.  $IC_{95\%}$ : entre 10,12 e 16,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; d) 48 horas após o início do experimento.  $IC_{95\%}$ : entre 4,18 e 6,12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; e) 72 horas após o início do experimento.  $IC_{95\%}$ : entre 0,03 e 1,53  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; f) 96 horas após o início do experimento.  $IC_{95\%}$ : entre -1,20 e 0,09  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; g) 120 horas após o início do experimento.  $IC_{95\%}$ : entre -0,53 e 0,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



(conclusão)

**Figura 29** Determinação da CL<sub>50</sub> do inseticida fipronil: a) 4 horas após o início do experimento. IC<sub>95%</sub>: entre 13,28 e 26,73 µg mL<sup>-1</sup>; b) 12 horas após o início do experimento. IC<sub>95%</sub>: entre 12,52 e 30,52 µg mL<sup>-1</sup>; c) 24 horas após o início do experimento. IC<sub>95%</sub>: entre 10,12 e 16,02 µg mL<sup>-1</sup>; d) 48 horas após o início do experimento. IC<sub>95%</sub>: entre 4,18 e 6,12 µg mL<sup>-1</sup>; e) 72 horas após o início do experimento. IC<sub>95%</sub>: entre 0,03 e 1,53 µg mL<sup>-1</sup>; f) 96 horas após o início do experimento. IC<sub>95%</sub>: entre -1,20 e 0,09 µg mL<sup>-1</sup>; g) 120 horas após o início do experimento. IC<sub>95%</sub>: entre -0,53 e 0,02 µg mL<sup>-1</sup>.

Após a determinação da CL<sub>50</sub>, foi analisada a sobrevivência das abelhas operárias *A. mellifera*, durante os períodos de 48, 72 e 120 horas. Em todos os tempos, os tratamentos com a presença do inseticida fipronil causaram redução nas taxas de sobrevivência em relação ao controle. Em 48 horas, a taxa de sobrevivência das abelhas oriundas do tratamento com 12 µg mL<sup>-1</sup> estava abaixo de 50% (Figura 30a). Após 72 horas (Figura 30b), todos os tratamentos com o princípio ativo fipronil provocaram queda na taxa de sobrevivência das abelhas, estando abaixo de 50%. No período de 120 horas (Figura 30c), a taxa de sobrevivência das abelhas, em todos os tratamentos com o inseticida fipronil, estava próxima de 0%.

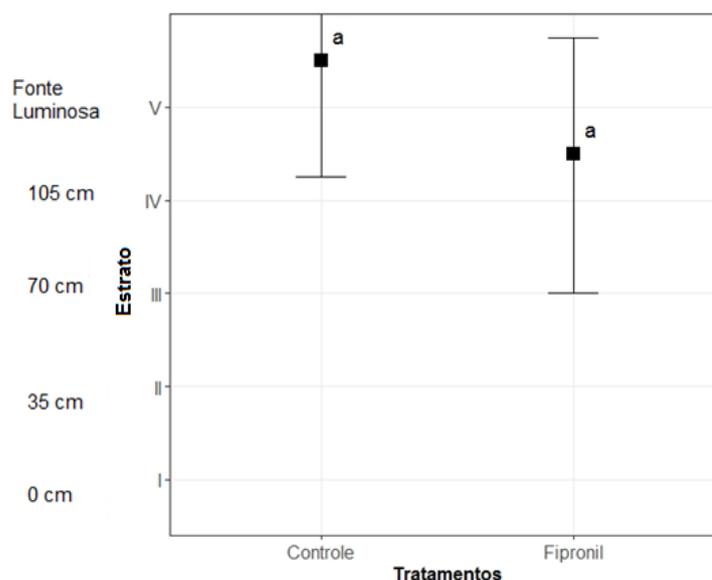


**Figura 30** Gráfico de sobrevivência de abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada, por Kaplan-Meier, após contato com superfície contaminada com inseticida fipronil: a) Ajustado ao período de 48 horas; b) ajustado ao período de 72 horas; c) Ajustado ao período de 120 horas.

**Nota:** Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Análise de voo (deslocamento vertical) e retomada de voo (queda livre) de *A. mellifera* africanizada

As operárias de *A. mellifera* africanizada expostas ao inseticida fipronil e submetidas à avaliação de efeitos subletais por meio da análise de capacidade de voo não tiveram o deslocamento e a retomada do voo afetados. (Figura 31). Dessa forma, as abelhas conseguiram se deslocar verticalmente na torre e retomar voo em direção a fonte luminosa.



**Figura 31** Análise de capacidade de voo de operárias de *A. mellifera* africanizada, após 24 horas de contato com superfície contaminada com inseticida fipronil.

**Nota:** Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

## 6.4 DISCUSSÃO

Amostras de mel provenientes dos apiários agroecológicos e de um apiário convencional exibiram resultados satisfatórios, pois não apresentaram detecção e nem quantificação do princípio ativo fipronil, garantindo segurança à saúde humana, quando consumido. Vale ressaltar a importância do método produtivo realizado em propriedades agroecológicas, pois, mesmo sendo constatadas atividades agrícolas em áreas circunvizinhas, não houve interferência na presença de fipronil nas amostras de mel oriundas das propriedades agroecológicas.

Devido à ampla diversidade de cultivos que as propriedades agroecológicas apresentam, não houve necessidade de as abelhas realizarem a coleta de alimentos fora dos perímetros da propriedade, reduzindo assim, a possibilidade de contaminação das abelhas e do mel. Áreas de menor extensão e que utilizam a mão-de-obra familiar causam menor impacto sobre as abelhas, pois o ritmo de manejo é diferenciado, não havendo aplicação de produtos fitossanitários sintéticos (PINHEIRO; FREITAS, 2010).

Porém, amostras de mel provenientes de quatro apiários convencionais, apresentaram detecção do inseticida fipronil acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) definidos pela União Europeia de  $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$  (UE, 2014). A presença do inseticida fipronil acima dos LMR em amostras de mel nas propriedades convencionais indica o uso desse produto fitossanitário

sintético nas proximidades das colmeias ou em locais possíveis de serem explorados e visitados pelas operárias forrageiras de *A. mellifera*. Observou-se que a prática agrícola representa uma das principais atividades econômicas na região onde estes apiários estão localizados, demonstrando que no raio de forrageamento das abelhas, a classificação do uso e ocupação das terras em relação à agricultura corresponde a 41,95% (Apiário 4), 41,04% (Apiário 5), 53,56% (Apiário 6) e 30,29% (Apiário 7).

Resultados de contaminação de produtos apícolas, com fipronil, semelhantes aos do presente estudo, foram relatados em diversos locais do mundo. No Uruguai, foram encontradas concentrações entre 0,04 a 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para amostras de mel analisadas (PAREJA et al., 2011); na Grécia, concentrações de 0,082  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (KASIOTIS et al., 2014); na Itália, concentrações de 0,085  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (NOTARDONATO et al., 2014), resultados semelhantes aos do presente estudo. A detecção e quantificação de produtos fitossanitários sintéticos em amostras de mel são métodos importantes, pois o mel pode ser considerado um bioindicador da contaminação ambiental (RISSATO et al., 2006; CHIESA et al., 2016), além de ser utilizado *in natura* para o consumo humano.

Para garantir que as análises de detecção e quantificação do princípio ativo fipronil em amostras de mel tenham sido realizadas corretamente, é indicada a utilização de métodos analíticos que sejam os mais minuciosos possíveis. Os métodos de análises de produtos fitossanitários sintéticos devem apresentar algumas especificações, tais como: linearidade, seletividade, limite de detecção e quantificação e recuperações de extração (BARR; NEEDHAM, 2002). Os parâmetros de linearidade, limite de detecção, quantificação e a taxa de recuperação, apresentaram resultados satisfatórios para a análise do princípio ativo fipronil nas amostras de mel do presente trabalho, estando de acordo com as recomendações da Anvisa (2017) e do GARP (1999) e de acordo com estudos anteriores. Métodos desenvolvidos e validados, utilizando o QuEChERS modificado associado à LC-MS/MS para determinação simultânea de cimiazol, fipronil, coumafós, fluvalinato, amitraz e seus metabólitos em vários tipos de mel e geleia real, resultaram em coeficiente de determinação  $\geq 0,99$ , taxa de recuperação de 62,06–108,79% (ZHENG et al., 2018), semelhantes ao encontrado no presente estudo.

Métodos utilizando a LC-MS/MS também apresentam resultados satisfatórios, em relação à validação para análises de detecção e quantificação do inseticida fipronil, relatando para os produtos apícolas (Abelhas, mel e pólen), com taxa de recuperação de 95%, LD de 1,3  $\text{ng.g}^{-1}$  e LQ de 4,4  $\text{ng.g}^{-1}$  (KASIOTIS et al., 2014). Outros autores também verificaram resultados semelhantes aos do presente estudo, dentre eles: Pareja et al. (2011), Notardonato et al. (2014), Calatayud-Vernich et al. (2017) e Rafique et al. (2018). É relevante citar que as diferenças observadas estão relacionadas ao método de extração SPE-C18 e à sensibilidade

do detector utilizado (ECD). No presente estudo, a taxa de recuperação apresenta melhores percentuais quando comparada à dos trabalhos citados.

Ainda, no presente estudo, observou-se que o inseticida fipronil não afeta apenas o mel, mas também prejudica a sobrevivência e o comportamento das abelhas. Durante o processo de forrageamento, as abelhas estão propensas à contaminação pelo inseticida fipronil, principalmente quando suas colônias estão localizadas próximas a áreas de produção agrícola (PIMENTEL, 1995), fator corroborado pelo presente trabalho, pela quantificação desse inseticida nas amostras de mel acima dos LMR permitidos pela União Europeia (UE, 2014), produto oriundo de propriedades localizadas em regiões com expressivo percentual da classe agricultura, verificado nos mapas de uso e ocupação das terras.

A contaminação das abelhas com fipronil pode ocorrer através do contato direto, durante a pulverização do produto no campo, que pode atingir esse organismo não-alvo, diretamente no dorso. Por outro lado, se a abelha chegar na cultura após a pulverização do fipronil, o contato com o produto pode ocorrer por meio dos tarsos e antenas, em superfícies que apresentam o contaminante ou por via oral, caso a abelha se “limpe” (*Grooming*) ou, ainda, na coleta de néctar e pólen. Verificou-se no presente estudo, que o contato de *A. mellifera* com esse inseticida, mesmo em baixas concentrações, provocou taxas elevadas de mortalidade. Na França em 1990, o inseticida fipronil foi considerado um dos principais fatores a ocasionar elevada mortalidade de abelhas (HOLDER et al., 2018).

O contato direto das abelhas operárias em superfície contaminada pelo inseticida fipronil demonstrou valores de  $CL_{50}$  (48 horas) de  $7,34 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Essa concentração está muito abaixo do que é recomendado para aplicação do produto comercial fipronil Nortox 800 WG® ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no campo, observando-se o quão tóxica essa recomendação é para os organismos não alvos. A liberação e a regulamentação de produtos fitossanitários sintéticos devem ser revistas, considerando evidências científicas sólidas e atualizadas, de forma que os produtos que apresentem efeitos inaceitáveis ao ambiente, não sejam aprovados para comercialização (SGOLASTRA et al., 2020). Enquanto essas medidas não são aplicadas, é importante considerar o manejo das colônias e o hábito de forrageamento das abelhas, antes da aplicação do produto.

O contato das abelhas por via tópica com o inseticida fipronil, no presente estudo, demonstrou maior toxicidade, em relação ao modo de exposição por contato em superfície, durante 48 horas. Porém, em menor toxicidade quando comparado ao contato por via oral, sendo esse o modo de exposição que mais afetou a sobrevivência das abelhas. Isto demonstra que o inseticida fipronil pode ser letal, com menor concentração para as abelhas *A. mellifera*, quando em contato por via oral. Uma simulação demográfica realizada para colônias expostas ao princípio ativo fipronil por via oral, com concentrações entre 1 e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , prevê uma mortalidade entre 4.000 a 9.000 abelhas (Equivalento entre 20% e 50% da

população inicial), durante a primeira semana de contato, destacando o elevado grau de toxicidade do fipronil sobre as abelhas *melliferas* (HOLDER et al., 2018). Esse contato pode ocorrer durante o forrageamento em culturas com aplicação de produtos fitossanitários sintéticos que contenham o princípio ativo fipronil, pois apresentam efeito residual de longa duração, contaminando as flores, o pólen e o néctar das plantas (AMARO; GODINHO, 2012; HOLDER et al., 2018; APARICIO-MURIANA et al., 2020).

A CL<sub>50</sub> de fipronil reduziu a partir de 24 horas e após 96 horas, sendo que os valores de CL<sub>50</sub> ficaram abaixo dos níveis de concentração a que as abelhas foram submetidas, demonstrando o efeito residual que o fipronil tem sobre *A. mellifera*. A sobrevivência das abelhas reduziu em todos os tratamentos com a presença do inseticida fipronil ao longo do tempo, em 72 horas, 50% das abelhas estavam mortas, mas, após 120 horas, o percentual de mortalidade estava próximo de 0%. A sobrevivência das abelhas *A. mellifera* é afetada diretamente pelo nível de concentração do produto e dos dias de exposição que estão em contato com o inseticida fipronil (HOLDER et al., 2018).

Esses resultados não são satisfatórios, pois o serviço ecossistêmico realizado pelas abelhas é diretamente atingido. É relevante citar que a produtividade da soja, em que o fipronil é usualmente utilizado, pode aumentar com o manejo de polinizadores, como as abelhas, porém, as práticas de cultivo dessa cultura, geralmente, ignoram a polinização biótica (MONASTEROLO et al., 2015; GAZZONI, 2017; GARIBALDI et al., 2021). A polinização biótica aumenta a produtividade da cultura da soja, em torno de 21%, enquanto o aumento da produtividade da soja devido a outros fatores genéticos e manejos, como o uso de produtos fitossanitários sintéticos, corresponde a valores inferiores a esses (GARIBALDI et al., 2021).

Devido à importância que as abelhas têm para a produtividade das culturas, o ideal é que o manejo de áreas agrícolas seja realizado com práticas que favoreçam a presença e a permanência de insetos benéficos nos campos de cultivos (GAZZONI, 2017), práticas livres de aplicação do princípio ativo fipronil, uma vez que já foi verificado o quão negativo esse inseticida é, em relação à sobrevivência e à saúde das abelhas (HOLDER et al., 2018). Além de provocar toxicidade aguda com altas taxas de mortalidade das colônias, o fipronil também ocasiona efeitos deletérios interferindo na capacidade cognitiva e no comportamento das abelhas (TOSI; BURGIO; NIEH, 2017; HOLDER et al., 2018; JACOB et al., 2019), prejudicando diretamente a capacidade locomotora (Comunicação/ orientação de voo) (STANLEY et al., 2016; ROAT et al., 2017).

Apesar de o fipronil prejudicar a capacidade locomotora (STANLEY et al., 2016), no presente trabalho o fipronil não afetou a capacidade de deslocamento e retomada de voo das abelhas *A. mellifera*, quando submetidas à menor concentração do princípio ativo (0,75 µg mL<sup>-1</sup>) em um período de 24 horas. Esses resultados são positivos, pois, mudanças no comportamento de voo influenciam a coleta de pólen e néctar, afetando todo o

desenvolvimento da colônia e, conseqüentemente, a polinização das culturas circunvizinhas, ocasionando perdas econômicas (NAIARA-GOMES et al., 2020; LIBARDONI et al., 2021). A não interferência no comportamento de voo das abelhas em um período de 24 horas no presente estudo, assim como as baixas taxas de mortalidade podem estar relacionadas ao fato de o fipronil não ter sofrido degradação durante esse período. A degradação do fipronil ocorre em condições oxidativas e de redução, produzindo, assim, diferentes produtos de degradação: fipronil sulfona, fipronil sulfide e fipronil dessulfenil (LIN et al., 2009). Esses produtos são considerados mais tóxicos do que o composto fipronil e têm a capacidade de se bioacumular no organismo das abelhas, demonstrando que os níveis de toxicidade se mantêm elevados ao longo do tempo de exposição, permanecendo por pelo menos 6 dias inalterados no organismo das abelhas *A. mellifera* (WU et al., 2011; HOLDER et al., 2018).

Considerando os resultados obtidos em condições laboratoriais, pode-se compreender os impactos que o inseticida fipronil ocasiona, em relação à sobrevivência das operárias de *A. mellifera* africanizada e a qualidade dos seus subprodutos (mel) na região Oeste e Sudoeste do Estado do Paraná. Com esses dados, podem ser desenvolvidas novas estratégias de manejo de produção, que visem reduzir os impactos desses compostos nos polinizadores e na contaminação do mel, como: evitar a pulverização do fipronil na cultura da soja em horários nos quais as abelhas estejam forrageando e a aplicação na época de floração, período em que ocorre a maior visitação das abelhas na cultura. Dado que o serviço ecossistêmico de polinização realizado pelas abelhas é benéfico para a cultura da soja, pois quanto maior for a presença de *A. mellifera* nesses cultivos, maior será a produção da lavoura. Salienta-se, ainda, que estudos que caracterizem a degradação desses compostos à luz e o impacto em operárias de *A. mellifera* tornam-se importantes, bem como concentrações subletais e o efeito em proteínas e enzimas desse inseto.

## 6.5 CONCLUSÕES

O inseticida fipronil está presente em amostras de mel em propriedade convencionais acima dos limites máximos permitidos pela União Europeia. Além disso, o contato das abelhas *A. mellifera* africanizada com o inseticida fipronil provoca elevadas taxas de mortalidade e a sua CL<sub>50</sub> reduz ao longo do tempo, porém em um período de 24 horas esse princípio ativo não provoca alterações comportamentais nas abelhas.

## REFERÊNCIAS

- ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; MACIEL, R. M. A.; COLOMBO, F. C.; LIBARDONI, G.; BATTISTI, L.; LOZANO, E. R.; GHISI, N. C.; COSTA-MAIA, F. M.; POTRICH, M. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, p. 32282–32298, 2021.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Edição 141, Seção: 1, p. 87, 25 jul. 2017.
- AL-WAILI, N.; SALOM, K.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M. J. E. N. SCOZZAFAVA, A.; TAN, D. X.; VIDELA, L. A. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. **The Scientific World Journal**, p. 9, 2012.
- AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e abelhas. **Revista de ciências Agrárias**, v. 5, p. 53-62, 2012.
- APARICIO-MURIANA, M. M.; LHOTSKA, I.; GARCIA-CAMPANA, A. M.; LARA, F. J. A first approach using micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of fipronil and fipronil-sulfone in eggs. **Electrophoresis**, v. 41, n. 3-4, p. 202-208, 2020.
- ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS (GARP); Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (Apostila), 1999.
- BAPTISTA, A. P. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, S. M.; CARVALHO, C. F.; BUENO FILHO, J. S. S. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 955–961, 2009.
- BARR, D.B.; NEEDHAM, L. L. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. **Journal of Chromatography B**, v.778, p. 5-29, 2002.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; CORNELIS A. M.; GESTEL, V.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p.973–992, 2012.
- BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A.; NOOME, D. A.; SIMON-DELISO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, n.1, 35–67, 2015.
- BRIGHENTI, D. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; BRIGHENTI, C. BIOATIVIDADE do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner,1915) para adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 279–289, 2007.
- BRITO, R. L.; BRITO, P. L. . **Geoprocessamento**: noções sobre cartografia e sistema de informações geográficas aplicado à apicultura. 1. ed. Taubaté: EDUNITAU, 2014. v. 5000. 60 p .
- CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMO, E.; PICO, Y. Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. **Science of The Total Environment**, v. 605-606, p. 745-754, 2017.

CALDERONE, N. W. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992- 2009. **PLOS ONE**, v. 7, p. 24–28, 2012.

CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R. **Sistema de Produção de Mel**. Teresina: EMBRAPA Meio Norte, 2002.

CAMARGO, S. C.; GARCIA, R. C.; FEIDEN, A.; VASCONCELOS, E. S.; PIRES, B. G.; HARTLEBEN, A. M.; MORAES, F. J.; OLIVEIRA, L. ; GIASSON, J. ; MITTANCK, E. S.; GREMASCHI, J. R. ; PEREIRA, D. J. . Implementation of a geographic information system (GIS) for the planning of beekeeping in the west region of Parana. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 955-971, 2014.

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G.A.; CARVALHO, C.F; BUENO FILHO, J.S.S; BAPTISTA, A.P.M;. Toxicidade De Acaricidas / Inseticidas Empregados Na Citricultura Para a Abelha Africanizada *Apis Mellifera* L ., 1758 (Hymenoptera : Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 597–606, 2009.

CHIESA, L. M.; LABELLA, G. F.; GIORGI, A.; PANSERI, S.; PAVLOVIC, R.; BONACCI, S.; ARIOLI, F. The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution. **Chemosphere**, v. 154, p.482-490, 2016.

EUROPEAN UNION - U. E. Commission Regulation (EU) N°. 1127/2014. **Official Journal of the European Union**, L 305/4, 2014. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32014R1127>. Acesso em: 08 jun. 2021.

FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L.; LÓPEZ, T. L.; AGUADO, S. C.; SALVADOR, I. M. Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 199-206, 2004.

GARIBALDI, L. A.; SCHULTE, L. A.; NABAES JODAR, D. N.; GOMEZ CARELLA, A. S.; KREMEN, C. Time to Integrate Pollinator Science into Soybean Production. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 36, n.7, p. 573-575, 2021.

GAZZONI, D. L. **Soja e abelhas**. Embrapa: Brasília, DF, 2017. 151 p.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, p. 849–857, 2015.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v.3 47, n. 1255957, 2015.

GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal Pesticides Science**, v. 32, n. 3, p. 189-199, 2007.

HOLDER, P. J.; JONES, A.; TYLER, C. R.; CRESSWELL, J. E. Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 51, p. 13033-13038, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Câmara setorial da cadeia produtiva do mel e produto das abelhas registro de agrotóxicos e polinizadores**. 2015. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camarassetoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/mel-e-produtos-das-abelhas/anos-anteriores/registros-de-agrotoxicos-e-polinizadores.pdf/view>. Acesso em: 20 maio 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Brasília, DF: INMETRO, 2007.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES - IPBES. POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T. et al. (eds.). **The Assessment report of the Intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services on pollinators, pollination and food production**. Bonn, Germany: IPBES, 2016. 552 p.

JACOB, C. R. O.; MALAQUIAS, J. B.; ZANARDI, O. Z.; SILVA, C. A. S.; JACOB, J. F. O.; YAMAMOTO, P. T. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 28, p. 744–753, 2019.

KASIOTIS, M. K.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; ANASTASIADOU, P.; MACHERA, K.; Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. **Science of the Total Environment**, v. 485, p. 633–642, 2014.

LIBARDONI, G.; NEVES, P. M. O. J.; ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; COSTA-MAIA, F. M.; VISMARA, E. S.; LOZANO, E. R.; POTRICH, M. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 11, p. 3482, 2021.

LIN, K.; HAVER, D.; OKI, L.; GAN, J. Persistence and sorption of fipronil degradates in urban stream sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 7, p. 1462-1468, 2009.

MANDAL, M.D.; MANDAL, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154-160, 2011.

MENDONÇA, A. C.; BURLE, E. C.; FIGUEIREDO, R. T.; Agrotóxicos: danos à saúde humana e ambiental. **Existem outros caminhos? Ciências Biológicas e de Saúde UNIT**; v. 5, n. 3, p. 91-106, 2019.

MITCHELL, E. A. D.; MULHAUSER, B.; MULOT, M.; MUTABAZI, A.; GLAUSER, G.; AEBI, A. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. **Science**, v. 358, n.6359, p. 109–111, 2017.

MONASTEROLO, M.; MUSICANTE, M. L.; VALLADARES, G. R.; SALVO, A. Soybean crops may benefit from forest pollinators. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 202, p. 217- 222, 2015.

NAIARA GOMES, I.; VIEIRA, K. I. C.; GONTIJO, L. M.; HELDER CANTO RESENDE, H. C. Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 97-107, 2020.

NEMENYI, P. **Distribution-free multiple comparisons**. 1963. 254 f. Ph.D. Thesis, Princeton University, 1963.

NOTARDONATO, I.; PASQUALE A.; CINELLIA, G.; RUSSO, M. V.; Trace determination of acaricides in honey samples using XAD-2 adsorbent and gas chromatography coupled with

an ion trap mass spectrometer detector. **Royal Society of Chemistry**; v. 4, p. 42424–4243, 2014.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **OECD Guidelines for the testing of chemicals**: guia 213, Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, p. 1–8, 1998a

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **OECD Guidelines for the testing of chemicals**: guia214, Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, p. 1–7, 1998b.

PAREJA, L.; COLAZZO, M.; PARADA, A. P.; NIELL, S.; LETELIER, C.; BESIL, N.; CESIO, M. V; HEINZEN, H.; Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 3844-3858, 2011.

PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 8, p. 17–29,1995.

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

POHLERT, T. **The pairwise multiple comparison of mean ranks package** (PMCMR). R Package. 2014. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=pmcmr>. Acesso em: 03/05/2021.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. 2019. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2019.

RAFIQUE, N.; NAZIR, S.; AKRAM, S.; AHAD, K.; GOHAR, A.; ABBASI, S. T.; AHMED, I.; RAFIQUE, K.; Screening of multiclass pesticide residues in honey by SPE-GC/MSD: a pilot study. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, v. 11, A. 666, 2018.

RAYMANN, K.; MOTTA, E. V. S.; GIRARD, C.; RIDDINGTON, I. M.; DINSER, J. A.; MORAN, N. A. Imidacloprid decreases honeybee survival rates but does not affect the gut microbiome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, p. 1-13, 2018.

REILLY, J. R.; ARTZ, D. R.; BIDDINGER, D.; BOBIWASH, K.; BOYLE, N. K.; BRITAIN, C.; , BROKAW, J.; CAMPBELL, J. W.; DANIELS, J.; ELLE, E.; ELLIS, J. D.; FLEISCHER, S. J.; GIBBS, J.; GILLESPIE, R. L. GUNDERSEN, K. B.; GUT, L.; HOFFMAN, G.; JOSHI, N.; LUNDIN, O.; MASON, K. MCGRADY, C. M.; PETERSON, S. S.; PITTS-SINGER, T. L; RAO, S.; ROTHWELL, N.; ROWE, L.; WARD, K. L.; WILLIAMS, N. M.; WILSON, J. K.; ISAACS, R.; WINFREE, R. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. **Proceedings Royal Society B**, p. 287, 2020.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N.; ANDRADE, R. M. B.; ALMEIDA, M. V. Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 950-955, 2006.

ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Biochemical response of the africanized honeybee exposed to fipronil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1652–1660, 2017.

ROUBIK, D. W. **The pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners**. Roma: Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2018.

SANTOS, M. F.; GALBIATI, C.; NEVES, S. M. A. S.; LOUREIRO, E. M.; Temporal analysis of the use and vegetal coverage and the honey pollen diversity in Cáceres (MT). **Geografia**, v. 36, p. 73-83, 2011.

SGOLASTRA, F.; MEDRZYCKI, P.; BORTOLOTTI, L.; MAINI, S.; PORRINI, C.; SIMONDELSON, N.; BOSCH, J. Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, p. 241, 2020.

SILVA, R. C. M.; TORRE, P. AP.; MATOS, J. C. O uso incorreto do inseticida fipronil e sua influência na morte das abelhas no sul do Brasil. **Processando o saber**, v.13, p.93-110, 2021.

SKOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 970-972, 2007.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 3, 1-7, 2007.

STANLEY, D. A.; RUSSELL, A. L.; MORRISON, S. J.; ROGERS, C.; RAINE, N. E. Investigating the impacts of field-realistic exposure to a neonicotinoid pesticide on bumblebee foraging, homing ability and colony growth. **The Journal of Applied Ecology**, v. 53, n.5, p. 1440-1449, 2016.

STAVELEY, J. P.; LAW, S. A.; FAIRBROTHER, A.; MENZIE, C. A. A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). **Hum Ecol. Risk Assess**, v. 20, p. 566–591, 2014.

THERNEAU, T. **A package for survival analysis in S**. Version 2.38. 2015. (<https://CRAN.R-project.org/package=survival>).

TOME, H. V. V., BARBOSA, W. F., CORRÊA, A. S., GONTIJO, L. M., MARTINS, G. F., & GUEDES, R. N. C. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: Impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology**, v. 167, n. 2, p. 186–196, 2015.

TONG, Z.; WU, Y. C.; LIU, Q. Q.; SHI, Y. H.; ZHOU, L. J.; LIU, Z. Y.; YU, L. S.; CAO, H. Q. Multi-residue analysis of pesticide residues in crude pollens by UPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 21. p. 1652, 2016.

TOSI, S.; BURGIO, G.; NIEH, J.C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific Reports**, v 7, n. 1201, 2017.

TSVETKOV, N.; SAMSON-ROBERT, O.; SOOD, K.; PATEL, H. S.; MALENA, D. A.; GAJIWALA, P. H.; MACIUKIEWICZ, P.; FOURNIER, V.; ZAYED, A. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science**, v. 356, p. 1395–1397, 2017.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food**, 2018. Disponível em: [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-dx?SID=e2cdd6c5583f6a8893f98e9d51c52d69&node=pt40.24.180&rgn=div5#se40.24.180\\_1222](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-dx?SID=e2cdd6c5583f6a8893f98e9d51c52d69&node=pt40.24.180&rgn=div5#se40.24.180_1222). Acesso em: 18 fev. 18.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern applied statistics with S**. Fourth edition. Springer, New York, 2002. ISBN 0-387-95457-0. <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.

VIUDA-MARTOS M.; RUIZ-NAVAJAS Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ J.; PÉREZ-ÁLVAREZ J. Á. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 117–124, 2008.

WOLOWSKI, M.; AGOSTINI, K.; RECH, A. R.; VARASSIN, I. G.; MAUÉS, M.; FREITAS, L.; CARNEIRO, L. T.; BUENO, R. DE O.; CONSOLARO, H.; CARVALHEIRO, L.; SARAIVA, A. M.; SILVA, C. I. **Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil**. São Carlos, SP : Editora Cubo, 2019.

WU, J.; LIN, Y.; LU, J.; WILSON, C. Copper clean-up procedure for ultrasonic extraction and analysis of pyrethroid and phenylpyrazole pesticides in sediments by gas chromatography-electron capture detection. **Science of Total Environment**, v. 409, p. 3482- 3491, 2011.

YUAN, Z.; YAO, J.; LIU, H.; HAN, J.; TREBŠE, P. Photodegradation of organophosphorus pesticides in honey medium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 108, p.84-88, 2014.

ZHENG, W., PARKA, J. A.; ATYA, A. M. A. E.; KIMA, A.K.; CHOA, S. H.; CHOIA, J.M.; YIA, H.; CHOA, S. M.; RAMADANB, A.; JEONGC, J. H.; SHIMD, J. H.; SHIN, H. C.; Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC–MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly; **Journal of Chromatography**, v. 1072, p. 60–69, 2018.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a importância da ação das abelhas *A. mellifera* africanizada no processo de polinização, que contribui para o aumento na produção de alimentos, através dos serviços ecossistêmicos, e na produção de produtos apícolas com grande valia para o consumo humano, é relevante recomendar que ocorra a preservação destes polinizadores. Pois, se a mortalidade das abelhas atingir um nível elevado, a produção de alimentos será diretamente afetada, ocasionando um desequilíbrio no ecossistema.

Dessa forma, é entendível a preocupação que se deve ter em relação à sobrevivência das abelhas e à qualidade dos seus subprodutos, principalmente de colônias circunjacentes a áreas de cultivo, onde a aplicação de inseticidas com os princípios ativos imidacloprid e fipronil é realizado com maior frequência. Dentre essas culturas, destaca-se a soja, com elevada produção na região Oeste e Sudoeste do Paraná. Os resultados apontam o uso desses inseticidas em áreas cultivadas no entorno dos apiários, que apresentaram detecção de imidacloprid e fipronil nas amostras de mel. Sendo o mel considerado um bioindicador de contaminação ambiental. Recomenda-se, assim, a análise em um maior número de apiários em toda a região.

Verifica-se que, além de afetar a qualidade do mel, os inseticidas fipronil e imidacloprid acometem a sobrevivência e a capacidade de voo das abelhas, mesmo quando aplicados em baixas concentrações no campo. Em um período de 24 horas, não foram observadas alterações na capacidade de voo das abelhas quando expostas ao inseticida fipronil. Sugere-se o desenvolvimento de novos trabalhos, avaliando intervalos maiores, para verificar a degradação do fipronil e o impacto sobre as abelhas, assim como análises da alteração de proteínas e enzimas que ambos os inseticidas podem provocar.

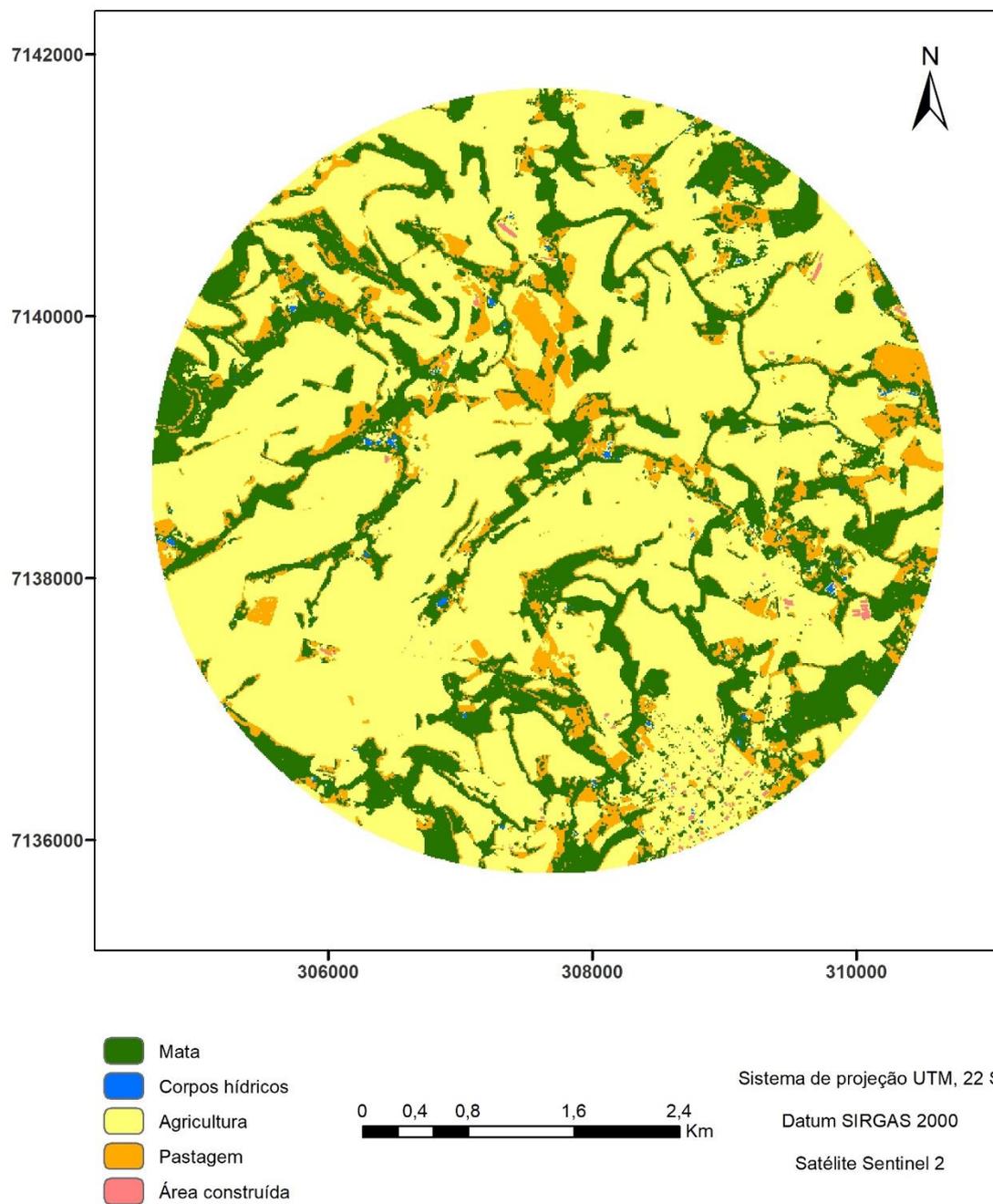
É indicado também que todos os apiários sejam georreferenciados, para que sejam traçadas estratégias futuras em relação ao uso dos inseticidas imidacloprid e fipronil no entorno das colônias, evitando-se a aplicação desses princípios ativos nessas áreas, principalmente nos horários de maior atuação das abelhas nos campos de cultivo. Evitando, dessa forma, os efeitos subletais e a mortalidade das abelhas ocasionada por esses inseticidas, mesmo em baixas concentrações, assim como, a contaminação de produtos apícolas como o mel, produto de elevado valor nutricional e medicinal.

Por fim, destaca-se que o uso e ocupação do solo e suas relações com as alterações da paisagem, realçando a fragmentação da cobertura vegetal nativa para o uso na produção agrícola, ocasionam um aumento no uso de produtos fitossanitários sintéticos, principalmente

em propriedades convencionais e, conseqüentemente, maior probabilidade das abelhas estarem em contato com esses produtos, destacando se os inseticidas imidacloprid e fipronil, os quais provocam elevadas taxas de mortalidade e efeitos deletérios em *A. mellifera*, assim como, contaminação dos seus subprodutos. Dessa forma, é relevante enfatizar que métodos de cultivos os quais não apliquem esses inseticidas sejam predominantes.

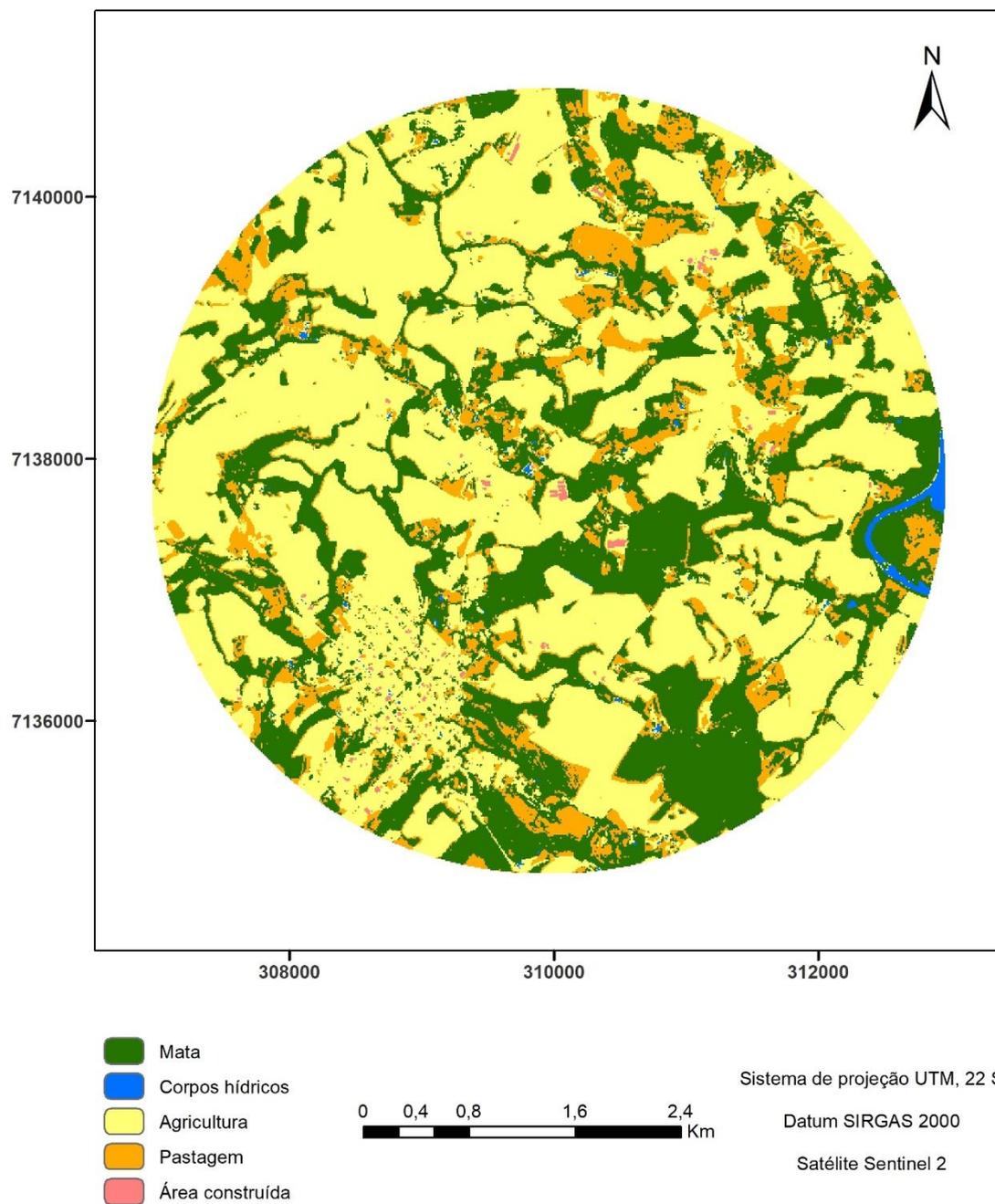
**ANEXOS**

## ANEXO A: MAPA DO APIÁRIO 1



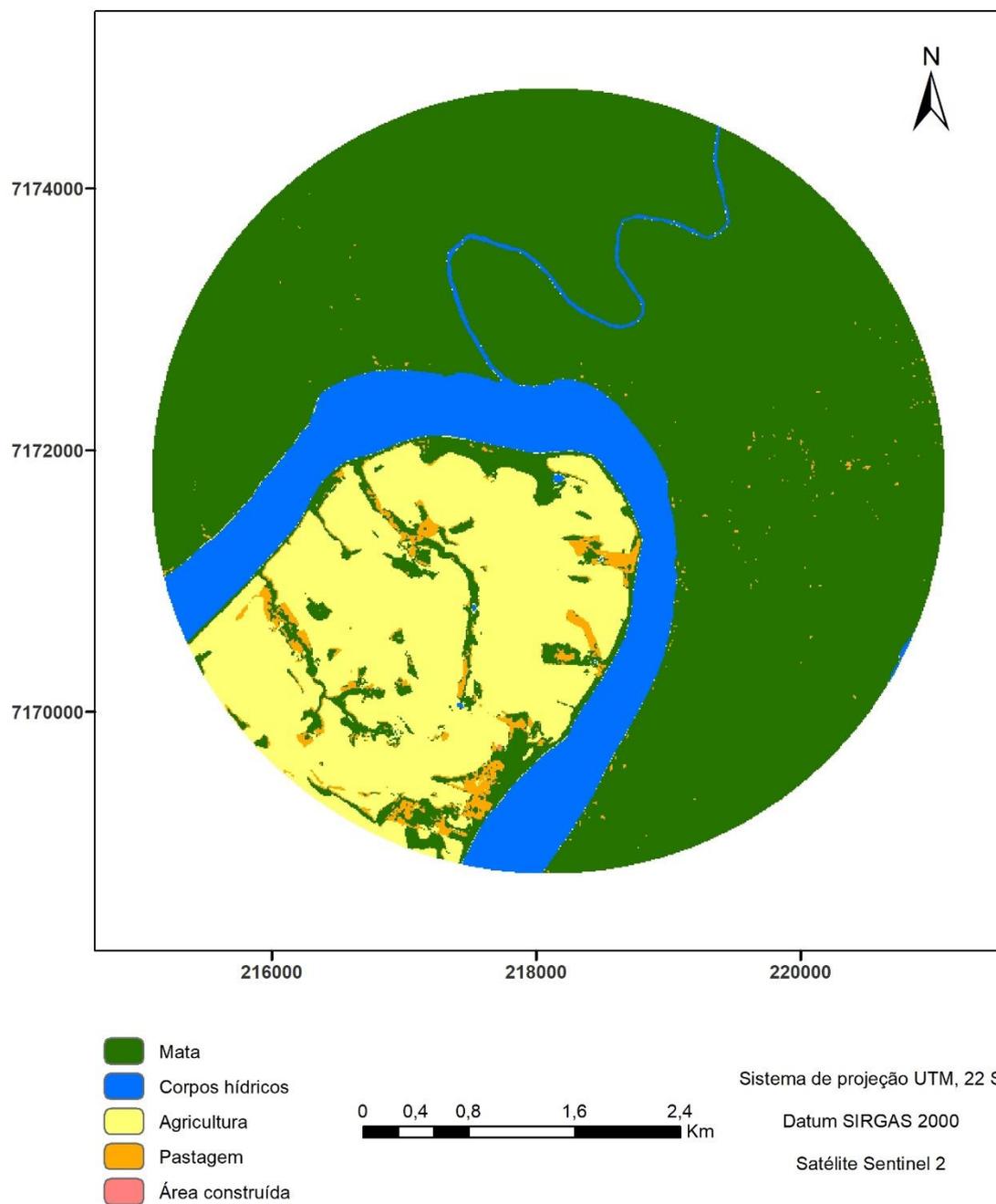
**Apiário 1** - Propriedade agroecológica: Mata: 24,01%; Corpos hídricos: 0,25%; Agricultura: 64,94%; Pastagem: 10,54%; Área construída: 0,27%.

## ANEXO B: MAPA DO APIÁRIO 2



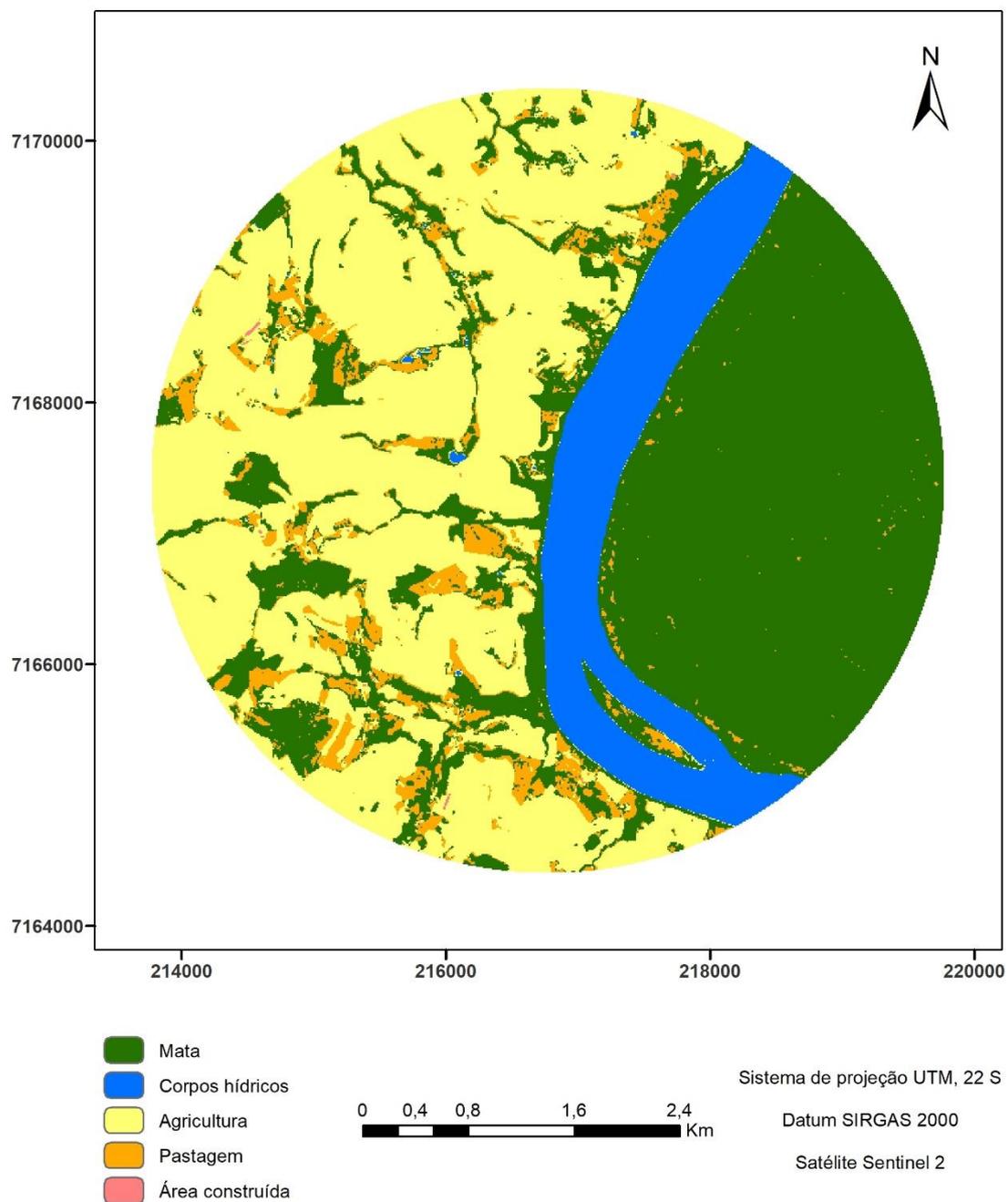
**Apiário 2** - Propriedade agroecológica: Mata: 30,45%; Corpos hídricos: 0,59%; Agricultura: 55,55%; Pastagem: 13,05%; Área construída: 0,37%.

## ANEXO C: MAPA DO APIÁRIO 3



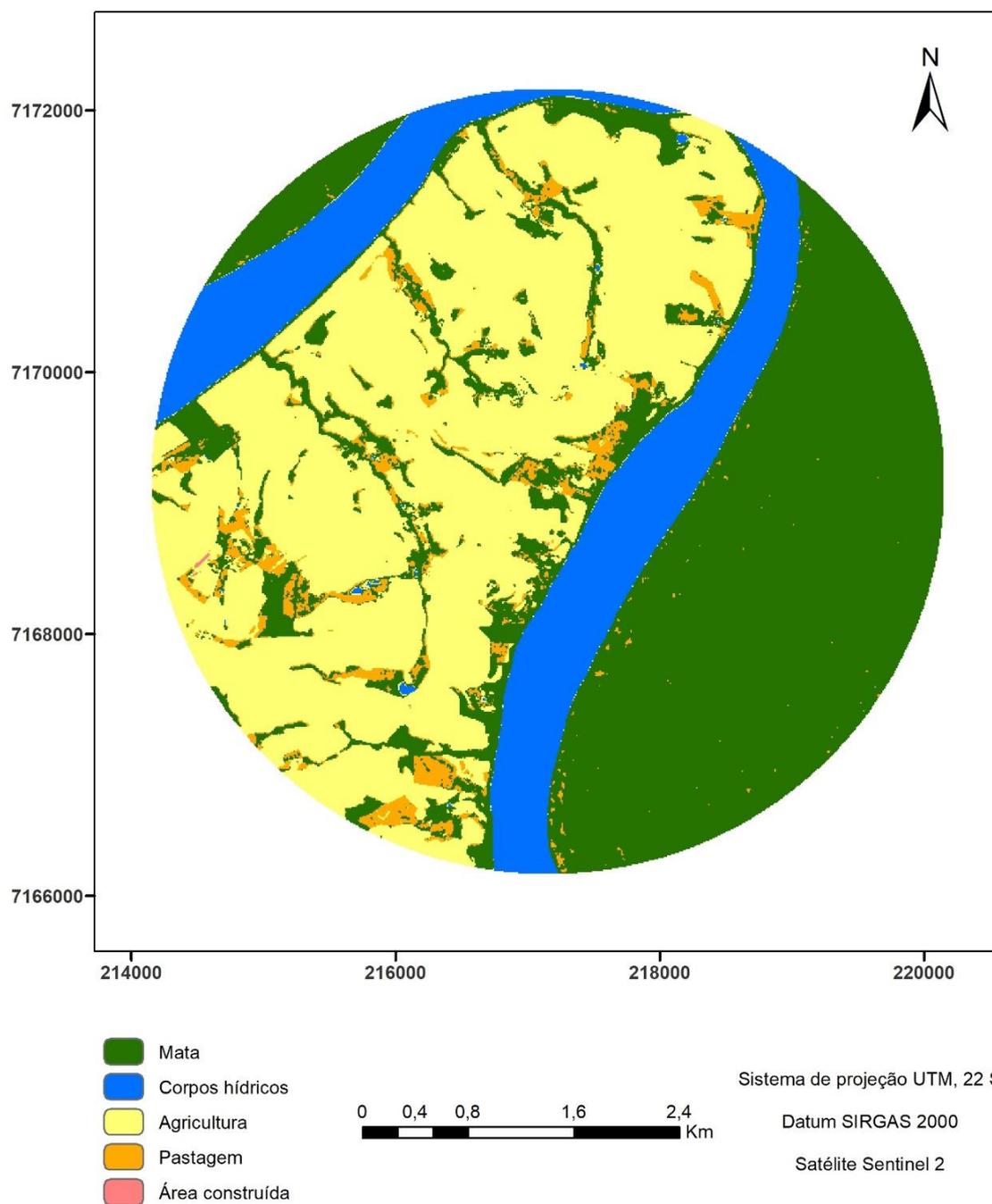
**Apiário 3** - Propriedade convencional: Mata: 65,77%; Corpos hídricos: 12,38%; Agricultura: 20,00%; Pastagem: 1,85%; Área construída: 0,00%.

## ANEXO D: MAPA DO APIÁRIO 4



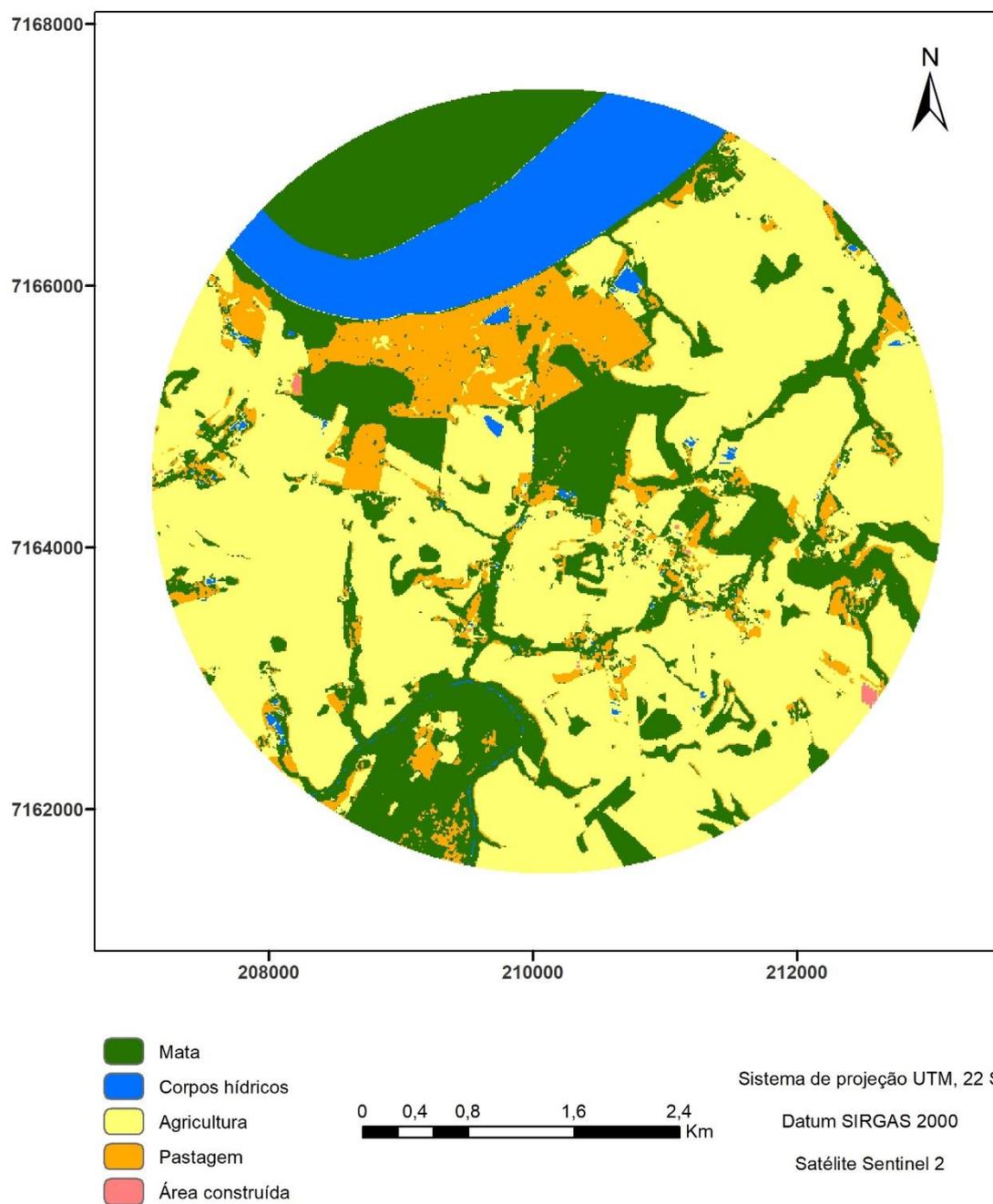
**Apiário 4** - Propriedade convencional: Mata: 40,38%; Corpos hídricos: 11,24%; Agricultura: 41,95%; Pastagem: 6,39%; Área construída: 0,04%.

## ANEXO E: MAPA DO APIÁRIO 5



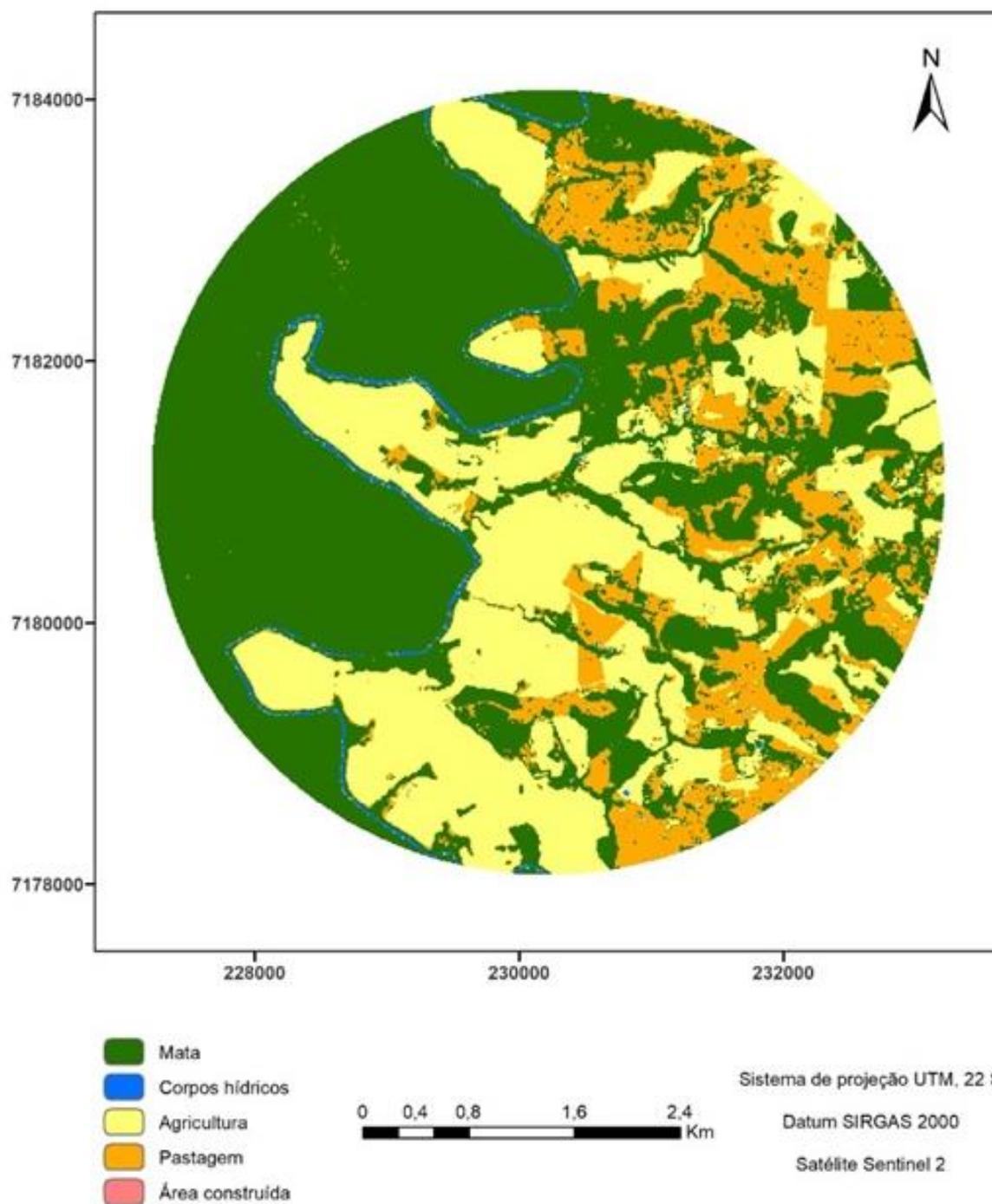
**Apiário 5** - Propriedade convencional: Mata: 39,76%; Corpos hídricos: 14,97%; Agricultura: 41,04%; Pastagem: 4,20%; Área construída: 0,02%.

## ANEXO F: MAPA DO APIÁRIO 6



**Apiário 6** - Propriedade convencional: Mata: 27,53%; Corpos hídricos: 8,73%; Agricultura: 53,56%; Pastagem: 10,04%; Área construída: 0,13%.

## ANEXO G: MAPA DO APIÁRIO 7



**Apiário 7** - Propriedade convencional: Mata: 52,6%; Corpos hídricos: 1,1%; Agricultura: 30,29%; Pastagem: 15,93%; Área construída: 0,03%.