

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

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MEL DE *Apis mellifera* PRODUZIDOS NA
MICROREGIÃO DE TOLEDO - PARANÁ**

KATHLEEN JENIFFER MODEL

CASCAVEL - PARANÁ - BRASIL

SETEMBRO DE 2021.

KATHLEEN JENIFFER MODEL

**RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MEL DE *Apis mellifera* PRODUZIDOS NA
MICROREGIÃO DE TOLEDO - PARANÁ**

Tese apresentada como cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador:

Prof. Dr. Silvio César Sampaio

CASCADEL - Paraná - Brasil

Setembro de 2021

Model, Kathleen Jeniffer

RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MEL DE *Apis mellifera*
PRODUZIDOS NA MICROREGIÃO DE TOLEDO - PARANÁ / Kathleen
Jeniffer Model; orientador Silvio César Sampaio. --
Cascavel, 2021.

114 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. Mel. 2. Fipronil. 3. Imidacloprido. 4. Abelhas *Apis*
mellifera. I. Sampaio, Silvio César , orient. II. Título.

Revisora: Silvana Vaillões

Data de revisão de português: 05 de dezembro de 2021

Data de revisão de inglês: 05 de dezembro de 2021

Data de revisão das normas de monografias do PGEAGRI: 05 de dezembro de 2021

KATHLEEN JENIFFER MODEL

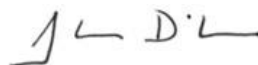
RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MEL DE *Apis mellifera* PRODUZIDOS NA MICROREGIÃO DE TOLEDO - PARANÁ

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 Recursos Hídricos, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



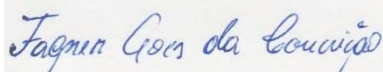
Orientador(a) - Silvio César Sampaio

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



Jonathan Dieter

Universidade Federal do Paraná (UFPR)



Fagner Goes da Conceição

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)



Marcelo Bevilacqua Remor

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



Natalia Pereira

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

Cascavel, 17 de setembro de 2021.

BIOGRAFIA

Nascida em 05 de junho de 1987, natural de Marechal Cândido Rondon – PR. Possui graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, no período de 2005 a 2008. Trabalhou desde sua formação, em laboratórios voltados a análises agrônômicas; posteriormente, em manipulação de medicamentos e afins; por final, antes de seu ingresso na Pós-Graduação, trabalhou com controle de qualidade na produção de alimentos. Iniciou como mestranda no primeiro semestre de 2015, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), sob orientação do Professor Dr. Silvio César Sampaio, com pesquisa voltada à contaminação de sedimentos por pesticidas. Atualmente, é aluna de doutorado, ingressante do primeiro semestre de 2017, também, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI). Orientada pelo Professor Dr. Sílvio César Sampaio, com pesquisa voltada a impactos da produção agrícola na qualidade do mel na microrregião de Toledo - Paraná.

A Deus, sempre em primeiro lugar; à minha
família e, em especial, à minha filha, Alice,
dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela dádiva da vida, por ter me abençoado sempre, por guiar meus passos, por me conceder discernimento, por me proteger, me transferir força nos momentos em que quis fraquejar, por iluminar minha família, me conceder oportunidade de ser mãe e por estar comigo a cada segundo que se passou.

À minha família, que é tudo na minha vida; é por eles que vivo, que encontro forças e ânimo para seguir em frente; é por eles que sorrio, choro e oro, a base da minha vida. Em especial, quero mais que agradecer, quero dedicar e dizer que, sem ela, eu não estaria onde estou e não entregaria esta pesquisa hoje, minha mãe. Obrigada por ser tão maravilhosa comigo, por se doar inteiramente, por largar tudo que está fazendo para me ajudar: você é a luz da minha vida. Obrigada por cuidar da minha filha com tanto amor; graças à sua doação de tempo, amor e carinho é que eu entrego este trabalho com todo o orgulho do mundo. Também, não poderia deixar de mencionar meu pai, que, muitas vezes, abriu meus olhos, me ajudou, me acalmou, me amou do jeitinho dele. Dedicou seu tempo, me deu um espacinho para trabalhar, cuidou com tanto amor da minha filha, brincou, sorriu, abraçou. Com certeza, não vou esquecer nunca tudo que fizeram e fazem por mim, Vilson e Aide Model. Gratidão resume tudo que estou sentindo hoje com a conclusão do doutorado. Obrigada, também, a todos da minha família, que alegraram os meus dias, que me animaram, que me abraçaram, que, de alguma forma, colaboraram para que eu chegasse onde estou hoje. Eu amo vocês mais do que ontem e menos do que amanhã, até meu último suspiro. Lorenzo, a dinda te ama mais do que você possa imaginar; você foi o primogênito da família, me ensinou a amar incondicionalmente; meu coração explode de tanto amor! Ber, meu gordinho, a dinda ama você e seu jeito bronco de ser, vou te amar para sempre.

Àquele que Deus me enviou como presente, meu marido, Murillo, obrigada meu amor por tanto; obrigada por estar comigo todos os dias, por me amar incondicionalmente, por me animar, por me fazer sentir a mulher mais amada do mundo, por ser esse pai que sempre sonhei para um filho. Você é incrível! Eu te agradeço tanto, mas tanto, que, mesmo que eu passasse o dia escrevendo, não seria suficiente. Você é o amor da minha vida; hoje, somos a família mais feliz do mundo e tudo isso começou quando te conheci; parece que estou vivendo um sonho, não me deixa acordar? Te amo demais, muito, muito obrigada por tudo! Alice, mamãe te ama mais do que tudo nesse mundo, você é o ar que eu respiro; espero um dia poder te orgulhar por esta pesquisa e por tudo que faço e farei por ti, meu bebê. Agradeço, também, à minha pequena, que está comigo há 12 anos; nada disso seria possível se eu não tivesse esse pedacinho de ser vivendo comigo, cada dia da minha vida; ela soube alegrar, deixar leve, dar um sentido, me dando amor, companheirismo e não pediu nada em troca. Cada dia foi único; eu amo você além da vida, minha pequena, minha linda, vou te amar até

o último segundo.

Aos meus amigos, os presentes do PGEAGRI, que fizeram dessa caminhada uma jornada feliz, divertida; nem existem palavras para agradecer, só posso dizer que amo cada um de vocês que passaram pela minha vida; obrigada pelos conselhos, risadas, conversas. Em especial, a você, Plínio Rodrigues, pois você é meu melhor amigo, eu te amo demais; sem dúvida, foi o melhor presente que ganhei da pós e eu vou te levar para qualquer lugar que eu for, porque você mora no meu coração; muito obrigada por tudo que fez por mim, o dono do melhor abraço que já senti. Obrigada a vocês, Viviane Cavaler, Caroline Portilho Trentini e Deisi Tápparo, por dividirem a vida e a casa comigo; morar com vocês foi maravilhoso. Eu sou muito grata por tudo que me ensinaram e por tudo que dividiram comigo; vou levar vocês para sempre na memória e no meu coração. Aos demais, com quem tive o prazer de conhecer e dividir histórias, conversas, abraços e lágrimas, vocês são a melhor família, fora de casa, que eu poderia querer: Cristiane Paloschi, Daniele Medina Rosa, Karine Medina Rosa, Mariana Sbizarro, Ariane, Marcelo Remor, Tamiris, Thais e, ao meu parceiro de trabalho, Isaque de Souza, pois, sem você, esta tese não seria concluída, sem a menor dúvida. À parceria de laboratório, Edison, por toda ajuda nas análises, dúvidas e conversas de incentivo.

A minhas amigas do coração, Debora Moratelli e Raquel Nienow, por cada colo, por cada palavra, por cada festa, por toda parceria, por cada tererê. Amigas, vocês são parte de mim, eu amo tanto vocês, amizades para a vida toda, para toda hora, de qualquer maneira; aquela que não tem preço! A vocês, de todo meu coração, meu muito obrigada por existirem. Gaby, a dinda te ama demais; você é meu pedacinho de amor. Tenho muito orgulho de poder fazer parte da sua vida e prometo estar contigo sempre.

Agradeço, também, de modo especial, aos amigos que fiz nos nossos grupos de vôlei; vou levar para sempre, pois foram os dias em que mais me diverti; foi um prazer imenso poder contar com a presença de cada um; vocês alegraram e muito toda essa jornada.

Ao meu orientador, professor Sílvio, por ter me concedido a honra de ser sua orientada, por todo apoio, por cada palavra de incentivo e todo conhecimento oferecido e transferido. Assim, também agradeço aos professores que passaram por essa jornada e marcaram minha vida: Mônica Sarolli, Ralpo Reis, Simone Damasceno, Márcio Villas Boas, Silvia, obrigada por toda ajuda e conhecimento; vocês são o espelho para mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, da UNIOESTE, campus Cascavel, e ao corpo docente da instituição, pelo aprendizado e pela oportunidade de realização desta etapa. À CAPES, pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

Expresso a minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que fosse possível a conclusão desta etapa da minha vida.

RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM MEL DE *Apis mellifera* PRODUZIDOS NA MICROREGIÃO DE TOLEDO - PARANÁ

RESUMO

O Brasil destaca-se na produção nacional e internacional de mel, por conta da repleta diversidade florística com clima favorável o ano todo. No espaço nacional, as regiões Sul e Nordeste são as maiores produtoras, responsáveis por cerca de 70% da produção de mel. Entretanto, esse cenário está em constante ameaça; isso porque as abelhas vêm sofrendo colapsos em suas colônias e o grande vilão têm sido os agrotóxicos. Dentre eles, destacam-se os inseticidas sistêmicos, imidacloprido e o fipronil, utilizados em larga escala, principalmente, nas culturas de soja e milho. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do mel quanto à concentração de fipronil e imidacloprido da microrregião de Toledo, Paraná, relacionando as concentrações com uso e ocupação das áreas de forrageamento aos apiários coletados. As amostras foram coletadas em dezembro de 2019 e o método proposto para extração e quantificação foi, primeiramente, validado em sistemas cromatográficos selecionados. Consecutivamente, as amostras passaram por um processo de extração em fase sólida, acopladas a cartucho, para posterior leitura em cromatografia. Os parâmetros da validação do método foram satisfatórios; a linearidade apresentou $R^2 \geq 0,99$ para ambos os compostos. A recuperação para o imidacloprido foi de 92,28%, com LD 0,007 e LQ $0,005 \mu\text{g ml}^{-1}$; já para o fipronil, a recuperação atingida foi de 118,32%, com LD 0,003 e LQ $0,005 \mu\text{g ml}^{-1}$. Em termos de representatividade, 41,34% das amostras apresentaram concentrações de imidacloprido com valores variando até $2,07 \mu\text{g ml}^{-1}$; já 87,8% das amostras, estavam contaminadas por fipronil com variação de até $0,0675 \mu\text{g ml}^{-1}$. As regiões com as maiores concentrações coincidiram com o uso da terra nas áreas de forrageamento das abelhas e com a utilização desses compostos nas áreas agricultáveis no ano de 2019. De forma geral, em termos de áreas agricultáveis, a microrregião apresentou 49,83% da área total, sendo o Grupo 1, com 70,96, seguida do Grupo 2, com 56,99%, que apresentaram as maiores concentrações de fipronil, e o Grupo 3, com 41,32% de território com atividade agrícola, a qual apresentou, em sua região abrangente, as maiores concentrações de imidacloprido. Em termos de comercialização do imidacloprido, destacaram-se Itaipulândia e Missal, que comercializaram, juntas, 18804,76 kg de imidacloprido para diversas culturas. Já quanto ao fipronil, destacaram-se Terra Roxa e Guaíra, que, juntas, comercializaram 1.822 kg de fipronil; e o sudoeste de Marechal Cândido Rondon, onde foram vendidos 864 kg do composto. Tal dado coincide com o mapeamento das concentrações na microrregião de estudo. De forma geral, todas as concentrações encontradas, de ambos os compostos, mesmo aquelas consideradas baixas para a pesquisa, ultrapassaram os Limites Máximos de Resíduos fornecidos por órgãos internacionais. Dessa forma, pode-se concluir que a utilização de fipronil e imidacloprido está afetando a qualidade do mel produzido e impactando todo o sistema de apicultura realizado na região. Então, se não alcançarmos um equilíbrio no uso de defensivos agrícolas, respeitando a extensão de forrageamento das abelhas, vamos não apenas comprometer a atividade apícola, quanto à produtividade e qualidade do mel, mas também ocasionaremos um declínio de colônias de abelhas, gerando um colapso ambiental, que pode afetar todo o sistema de polinização, sustentabilidade e equilíbrio do ecossistema envolvido.

Palavras-Chave: atividade apícola, fipronil, imidacloprido.

PESTICIDES RESIDUES IN HONEY FROM *Apis mellifera* PRODUCED IN THE MICROREGION OF TOLEDO - PARANÁ

ABSTRACT

Brazil stands out in national and international honey production, due to its rich floristic diversity and year-round favorable climate. Nationally, the South and Northeast regions are the largest producers, accounting for roughly 70% of total honey production. However, this scenario is under constant threat, because bee's colonies have been collapsing, and the main villain has been pesticides. Among them are systemic insecticides such as imidacloprid and fipronil, which are widely used, mainly in soybean and corn crops. Therefore, the aim of this study was to assess the quality of honey in terms of fipronil and imidacloprid concentrations in the microregion of Toledo, Paraná, and to relate the concentrations to the use and occupation of foraging areas in the collected apiaries. Samples were collected in December 2019, and the proposed method for extraction and quantification was first validated in selected chromatographic systems. Following that, the samples went through a solid-phase extraction process coupled to a cartridge for later reading in chromatography. The method validation parameters were satisfactory. The linearity presented $R^2 \geq 0.99$ for both compounds. With LD 0.007 and LQ 0.005 $\mu\text{g ml}^{-1}$, recovery for imidacloprid was 92.28%, while recovery for fipronil was 118.32%, with LD 0.003 and LQ 0.005 $\mu\text{g ml}^{-1}$. In terms of representativeness, imidacloprid concentrations ranged from up to 2.07 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in 41.34% of the samples, while fipronil contamination ranged from up to 0.0675 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in 87.8% of the samples. In the year 2019, the highest concentrations of these compounds coincided with land use in bee foraging areas and the use of these compounds in arable areas. Overall, the microregion represented 49.83% of the total area in terms of arable areas, with Group 1 accounting for 70.96, Group 2 for 56.99%, which had the highest concentrations of fipronil, and Group 3 accounting for 41.32% of the total area with agricultural activity, which had the highest concentrations of Imidacloprid in its comprehensive region. Itaipulândia and Missal, which together marketed 18804.76 kg of imidacloprid for various cultures, stood out in terms of commercialization of the insecticide. Terra Roxa and Guaíra, which together sold 1,822 kg of fipronil, and Marechal Cândido Rondon, to the southwest, sold 864 kg of the compound. This data matches the concentration mapping in the microregion under study. In general, all concentrations of both compounds found, even those considered low for the research, exceeded the international bodies' Maximum Residue Limits. As a result, it can be concluded that the use of fipronil and imidacloprid has an impact on the honey quality as well as the entire beekeeping system in the region. So, if we do not achieve a balance in the use of pesticides while respecting the extent of bee foraging, we will not only jeopardize beekeeping activity in terms of productivity and honey quality, but we will also cause a decline in bee colonies, resulting in an environmental collapse that will affect the entire pollination system, as well as the sustainability and balance of the ecosystem involved.

KeyWords: Beekeeping activity, fipronil, imidacloprid

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Abelhas com ferrão - <i>Apis mellifera</i>	4
3.2 Atividade apícola.....	8
3.3 Apicultura na mesorregião Oeste do Paraná.....	14
3.4 Polinização	18
3.5 Pesticidas	24
3.5.1 Inseticidas sistêmicos.....	32
3.5.2 Pirazóis - Fipronil.....	34
3.5.3 Neonicotinóides - Imidacloprido.....	41
3.6 Pesticidas x apicultura	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Área de estudo.....	55
4.2 Coleta, preservação e organização das amostras.....	56
4.3 Higienização de vidrarias e instrumentos laboratoriais.....	57
4.4 Processo analítico – Extração das amostras.....	57
4.4.1 Determinação de Imidacloprido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	59
4.4.2 Determinação de Fipronil por Cromatografia Gasosa com detecto de captura de elétrons – (CG-ECD).....	62
4.5 Espacialização das amostras e uso e ocupação das áreas de forrageamento das abelhas <i>Apis mellifera</i> nas regiões selecionadas	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 <i>In house validation</i> para detecção de imidacloprido em mel por HPLC	69
5.1.1 Detecção e quantificação de imidacloprido nas amostras de mel das regiões pesquisadas	71
5.2 <i>In house validation</i> para detecção de Fipronil em mel por CG-ECD.....	72

5.2.1 Detecção e quantificação de fipronil nas amostras de mel das regiões pesquisadas.....	75
5.3 Espacialização das concentrações de imidacloprido e fipronil nos méis pesquisados e uso do solo da microrregião de Toledo - Paraná.....	77
6 CONCLUSÃO.....	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Limite máximo de resíduo de pesticidas em mel.....	31
TABELA 2. Quantidade de amostras recebida de cada região.	56
TABELA 3. Condições cromatográficas para detecção de fipronil em mel.	64
TABELA 4. Classificação do índice Kappa.....	68
TABELA 5. Concentração de imidacloprido nas amostras de mel das regiões pesquisadas.....	71
TABELA 6. Concentração de fipronil nas amostras de mel dos Grupos 1 e 2.....	76
TABELA 7. Concentração de fipronil nas amostras de mel do Grupo 3.....	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 . Estágios de desenvolvimento das abelhas <i>Apis mellifera</i>	5
FIGURA 2. Esquematização da diferença de castas em colméias de <i>Apis mellifera</i>	6
FIGURA 3. Doenças em crias de abelhas: a) cria pútrida européia: área de crias com muitas falhas(inferior) e mudança de posição e coloração das larvas(superior); b) cria pútrida americana: favos falhados (inferior) e opérculos perfurados (superior); c) cria pútrida americana: consistência viscosa da cria – teste do palito (superior) e restos de crias mortas e ressecadas colados nas paredes do alvéolo (inferior); d) pré-pupas com sintomas de cria ensacada; e) sintomas de cria giz.....	13
FIGURA 4. Mel: Produção (IBGE) e Exportação (Secretaria de Comércio Exterior – Secex) de 2004 a 2015.....	15
FIGURA 5. Contribuição da região sul para a produção e lucratividade de mel para o Brasil. a) Produção de mel em quilogramas dos anos de 2010 a 2018 na região sul do Brasil; b) Lucratividade na produção de mel em R\$ dos anos de 2010 a 2018 na região sul do Brasil.....	17
FIGURA 6. Deficiência de polinização em culturas agrícolas: a) cultura de açaí (fruto com uma semente) deficiência na polinização aparente pela quantidade de frutos produzidos; b) cultura do melão (fruto com grante quantidade de sementes) deficiência de polinização observada pelo tamanho do fruto (menor). Normalmente frutos bem polinizados são também mais doces.....	20
FIGURA 7. Estrutura química geral compostos heterocíclicos: a) pirazóis; b) isoxazol.....	35
FIGURA 8. Estrutura química molecular do Fipronil	35
FIGURA 9. Estrutura molecular do imidacloprido.....	45
FIGURA 10. Histórico de comercialização de defensivos agrícolas de 2000 a 2019.....	53
FIGURA 11. Estrutura conceitual do sistema polinizador x pesticida. Os domínios das relações causais se sobrepõem nos principais fenômenos de ligação (alaranjado). A direção principal da causa é indicada por setas, geralmente fluindo de cima para baixo, exceto pelo feedback potencial (linha azul espessa) do Domínio 3 para o Domínio 1	54
FIGURA 12. Localização geográfica da região de estudo.....	55
FIGURA 13. Fluxograma do processo de extração para os compostos imidacloprido e fipronil.....	58
FIGURA 14. Processo de extração das amostras. a) Cartucho acoplado ao minifold – Início do condicionamento; b) eluição das amostras – coleta no tubo de ensaio; c) eluidos no processo de secagem forçada com nitrogênio; d) TurboVap® LV.....	59

FIGURA 15. Equipamentos para determinação de Imidacloprido em mel: a) HPLC (Shimadzu); b) Coluna cromatográfica Kromasil	60
FIGURA 16. Equipamentos para determinação de fipronil em mel: a) GC-ECD (Shimadzu GC- 2010; b) Coluna capilar dimethyl polysiloxane Rtx® Restek	63
FIGURA 17. Distribuição de amostras de treinamento na área de estudo.....	66
FIGURA 18. Distribuição de pontos para o teste de acurácia	67
FIGURA 19. Seletividade do método implantado em HPLC. a) Cromatograma com a adição padrão do analito de interesse - imidacloprido; b) Cromatograma sem o analito de interesse, pico do solvente metanol.....	69
FIGURA 20 Linearidade do método de detecção de imidacloprido em mel por HPLC	70
FIGURA 21. Seletividade do método implantado em CG-ECD. a) Cromatograma com a adição padrão do analito de interesse – fipronil; b) Cromatograma sem o analito de interesse, pico do solvente metanol.....	73
FIGURA 22. Linearidade do método de detecção de fipronil em mel por CG-ECD.....	74
FIGURA 23. Disposição geográfica das concentrações de imidacloprido e fipronil na microrregião de estudo: a) Imidacloprido; b) Fipronil.....	78
FIGURA 24. Uso e ocupação do solo das regiões de forrageamento das abelhas na microrregião de Toledo - Paraná: a) Agricultura; b) Áreas não agricultáveis.....	82

1 INTRODUÇÃO

A crescente atividade agrícola, vinculada à demanda por alimentos para consumo e exportação, unida ao uso desenfreado de pesticidas, com intuito de auxiliar a agricultura, vêm apresentando problemas em escala mundial. Além do uso inadequado, entra em questão a intensa produção de novos compostos, com propriedades melhoradas para o controle de pragas. Contudo, a maior parte desses novos agentes é sintética, implicando diretamente o seu destino no ambiente. Substâncias sintéticas são, em grande maioria, resistentes à degradação e apresentam maior persistência ambiental, podendo levar anos, até décadas para se decompor. O modo, número de aplicação e a quantidade de pesticidas aplicada acabam por afetar direta e indiretamente os maiores representantes da polinização agrícola e silvestre, as abelhas.

Pertencentes à ordem Hymenoptera e à superfamília dos Apoidea (grupo Apiformes), as abelhas formam por volta de 20 mil espécies. Além de suprir necessidades de culturas agrícolas e silvestres por meio da polinização, algumas abelhas são capazes de produzir mel. As mais conhecidas e maiores produtoras do mundo pertencem à subfamília Apinae e ao gênero *Apis*, as *Apis Mellifera*. Produtivas e prolíferas adaptam-se com facilidade a diferentes ambientes, propolisando com abundância, principalmente em regiões úmidas. Protegem-se facilmente contra ataques de predadores e ação das intempéries, seja por meio de estruturas físicas ou pela presença de muitas abelhas operárias guardiãs (OLIVEIRA, 2020). Um enxame de *Apis* é formado de 60.000 a 70.000 abelhas, representadas por três castas: uma rainha, de zero a algumas centenas de zangões e milhares de abelhas operárias (HICKMAN *et al.*, 2010).

A atividade apícola pode e é um meio de subsistência para muitos produtores rurais, visto que gera como produto a própria abelha, que, em muitos casos, é comercializada com outros produtores para auxiliar a polinização agrícola. A cera, o própolis, a apitoxina, o pólen, a geléia real são também subprodutos da atividade, unidos ao maior representante da apicultura: o mel. Ele contém glicose, frutose, água e pequenas quantidades de proteínas, minerais, ácidos orgânicos, vitaminas e enzimas. Além de alimento, possui atividades terapêuticas, como sua habilidade antimicrobiana e antisséptica. Somado a isso, o mel apresenta atributos antinêmicos, emolientes, antiputrefactes, digestivos, laxativos e diuréticos (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2006).

Em termos de qualidade do mel, o Brasil destaca-se na produção nacional e internacional. Isso porque o território é repleto de uma diversidade florística imensa com clima favorável o ano todo. Atualmente, o Brasil é o décimo maior produtor de mel e o oitavo maior exportador do produto do mundo. No espaço nacional, as regiões Sul e Nordeste são as maiores produtoras, responsáveis por mais de 70% da produção de mel. Entretanto, esse cenário é colocado em risco a cada novo dia, visto que as abelhas vêm sofrendo colapsos em

suas colônias e o grande vilão têm sido os pesticidas. Dentre os responsáveis por esses colapsos, destacam-se o neonicotinoide, imidacloprido e o fenil pirazol, fipronil. Esses inseticidas possuem ação sistêmica, ou seja, quando aplicados em vegetais de cultivo agrícola, penetram em toda a planta, tornando-a tóxica em qualquer superfície, para todos os organismos que a encontram. As abelhas entram em contato com esses pesticidas desde o momento da sementeira até a colheita, comprometendo toda a cadeia produtiva do mel. O contato pode ser agudo ou crônico, assim, podem sofrer morte imediata no contato, em casos de pulverização ou acumular essas substâncias em seus organismos (concentrações subletais). Nesse caso, sofrem inúmeras consequências nos processos mais importantes de forrageamento e aprendizagem. Além disso, podem levar essas substâncias para dentro da colméia, afetando diretamente a qualidade de produção do mel.

O desenvolvimento de pesquisas voltadas à qualidade do mel quanto à contaminação por pesticidas vem ganhando importância e se destacando em escala mundial. Contudo, há uma discrepância em termos de impugnação de legislações que controlem esses resíduos no mel. Inclusive, não existem determinações de Limites Máximos de Resíduos para o mel dos maiores vilões para abelhas, o imidacloprido e o fipronil. Inúmeros estudos focam nas abelhas e nas consequências que causam sobre a colônia e individualmente, sendo efeitos subletais ou agudos. Há, por exemplo, as pesquisas realizadas por El Hassani *et al.* (2005); Pedro (2008); Jhonson *et al.* (2010); Narashi *et al.* (2010); Perreira (2010); Gill *et al.* (2012); Renzi (2016); Castilhos (2018) e Kaplan (2020) com o inseticida fipronil. Ademais, há os trabalhos desenvolvidos por Suchail, Debrauwer e Belzunces (2003); Faucon *et al.* (2005); Girolami *et al.* (2009); Cassida (2011); Girolami *et al.* (2011); Tapparo *et al.* (2011); Tapparo *et al.* (2012); Teeters *et al.* (2012); Yang *et al.* (2012); Beddinger *et al.* (2013); Sanchez-Bayo e Goka (2014); Henru *et al.* (2015) e Pisá *et al.* (2015), com o inseticida imidacloprido. Unindo três pontos, temos uma questão ambiental, econômica e social importante a ser mantida. Uma seria a toxicidade sob efeitos imediatos ou cumulativos da utilização dos pesticidas. Em segundo, há a poluição pontual e difusa relacionada à utilização desses compostos. E, em terceiro, existe a importância das abelhas para a manutenção da biodiversidade florística e de cultivos agrícolas, unido a importância da apicultura e seus produtos. Logo, vemos a necessidade de estudos que busquem auxiliar ou melhorar a situação atual das abelhas. Envolve-se, nessa questão, a cadeia produtiva do mel, utilizando-o como bioindicador de qualidade do ambiente. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a qualidade do mel quanto à concentração de fipronil e imidacloprido da microrregião de Toledo – Paraná, relacionando as concentrações com uso e ocupação das áreas de forrageamento aos apiários coletados.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o teor de pesticidas no mel produzido por abelhas *Apis mellifera* na microrregião de Toledo - Paraná.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a presença e quantificação de imidacloprido e fipronil nas amostras de mel coletas nos apiários das regiões selecionadas.
- Relacionar a apicultura com o uso e ocupação do solo abrangendo as áreas de forrageamento, focando na interação da utilização de defensivos agrícolas com a produção melífera.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Abelhas com ferrão - *Apis mellifera*

As abelhas surgiram antes do homem, há cerca de mais de 100 milhões de anos. São admiradas ao longo da história pelas civilizações, como símbolo de riqueza, trabalho e perseverança, pela maneira com que defendiam seu território. A origem pode ter relação a um grupo de vespas, que alterou a sua dieta habitual de insetos e ácaros, para se alimentar de néctar e pólen na obtenção de nutrientes (Associação Brasileira de Estudos das Abelhas - A.B.E.L.H.A).

Pertencentes à ordem Hymenoptera e à superfamília dos Apoidea (grupo Apiformes), as abelhas formam por volta de 20 mil espécies. Apoidea é formada por diversas famílias, dentre elas, a Apidea, com a maior capacidade de socialização e vivência em grupos. É composta por quatro subfamílias: Apíneos, Meliponíneos, Bombíneos e Euglossíneos. Dessas, as Apíneas são abelhas com ferrão com hábitos sociais refinados. As mais conhecidas e maiores produtoras de mel do mundo pertencem à subfamília Apinae e ao gênero *Apis*, as *Apis Mellifera*. *Mellifera* significa que carrega mel; são abelhas grandes e escuras, com listras amarelas. Produtivas e prolíferas, adaptam-se, com facilidade, a diferentes ambientes, propolisando com abundância, principalmente em regiões úmidas. Protegem-se facilmente contra ataques de predadores e ação das intempéries, seja por meio de estruturas físicas (dentro dos buracos e ocos de árvores), ou pela presença de muitas abelhas operárias guardiãs. Seu ataque mais comum é o ferrão ligado a uma bolsa de veneno na extremidade do abdômen. Após a picada, a abelha morre, pouco tempo depois, por hemorragia e perda de órgãos (OLIVEIRA, 2020). O ferrão está presente apenas nas operárias e rainhas; nestas, serve de guia de postura ou ovopositor; naquelas, é utilizado como instrumento de defesa.

Do gênero *Apis*, existem sete espécies mais usadas para a produção comercial de produtos da apicultura. Dentre elas, cita-se a *Apis florea*, *A. andreniformes*, *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. mellifera*, *A. laboriosa* e *A. koschevnikov*. *Apis mellifera* apresenta algumas subespécies, conhecidas como raças geográficas, sendo abelha-europeia, abelha-alemã, abelha-comum, abelha-da-Europa, abelha-de-mel, abelha-doméstica, abelha-do-reino, abelha-escura, abelha-europa, abelha-preta e oropa. É considerada uma abelha social, introduzida na América por ingleses e espanhóis. É originária do Norte da Europa, do Centro-Oeste da Rússia, estendendo-se até a Península Ibérica. Adentrou no Brasil em 1839, para suprir apiários na produção de mel e cera. Habita savanas, florestas tropicais, desertos, regiões litorâneas e montanhosas (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2006). A abelha africanizada (*A. mellifera*) é a espécie de polinizador mais amplamente utilizada no mundo

para suplementar a polinização em áreas agrícolas, pelo manejo bem conhecido e por sua abundância.

Um enxame de abelhas *A. melífera*, em períodos de grandes floradas, é constituído, em média, de 60.000 a 70.000 abelhas, formadas por três castas. São representadas por uma única rainha, de zero a algumas centenas de zangões, dependendo da época do ano, e milhares de abelhas operárias (HICKMAN *et al.*, 2010). O desenvolvimento de todos os indivíduos da colônia compreende os estágios de ovo, larva e pupa. Assim, a rainha, zangões e operárias levam, respectivamente, 16, 24 e 21 dias para completar seu desenvolvimento, desde o ovo até o nascimento (PAGE; PENG, 2001).

Os estágios de desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera* e a diferenciação entre as castas estão destacados na Figura 1 (EMBRAPA, 2002).

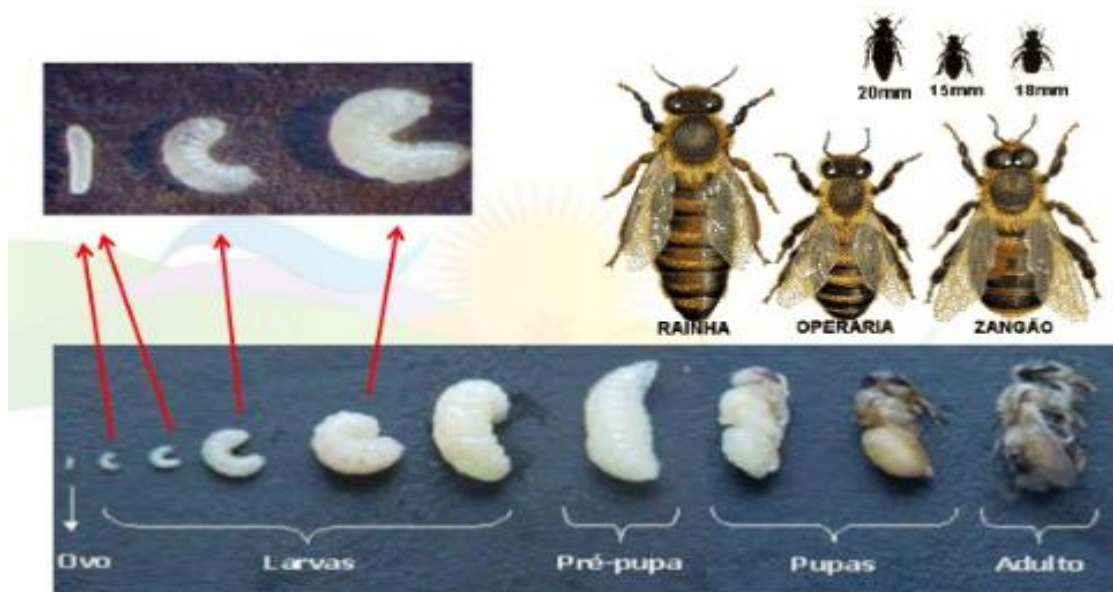


Figura 1. Estágios de desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera*.
Fonte: EMBRAPA, 2002.

Morfologicamente, medem de 12 a 13 mm de comprimento, apresentam pêlos no tórax, mais escuros, com poucas listras amarelas no corpo e possuem língua curta (de 5,7 a 6,4 mm), o que dificulta o trabalho em flores profundas. As fêmeas diferenciam-se dos zangões pela presença do ferrão. Quando ameaçada, é bastante agressiva e irritada. É no parêntese digestivo, no começo do abdômen, que se localiza o papo ou a vesícula nectarífera, responsável pelo transporte de água e néctar na formação do mel. Em um dos lados da vesícula, localiza-se uma válvula que previne que o néctar ou o mel não passem pelo sistema digestivo; a contração da musculatura do papo permite que o material de seu interior seja regurgitado. Durante o processo de regurgitamento, o conteúdo do papo é diluído por enzimas liberadas das glândulas hipofaríngeas e salivares das abelhas, que têm a capacidade de transformar os açúcares do néctar coletado em mel (CRANE, 1983).

As colônias da abelha-europeia são permanentes, formadas por uma rainha (no máximo duas), abelhas operárias, de 10 a 15 mil, e entre 500 e 1.500 zangões (machos). Os zangões são maiores e mais fortes do que as operárias, mas não possuem órgãos para trabalho nem ferrão. Apresentam olhos compostos mais desenvolvidos, antenas com maior capacidade olfativa, asas maiores e musculatura de voo mais desenvolvida. Tais características permitem maior orientação, percepção e rapidez para a localização de rainhas virgens durante o voo nupcial. No processo reprodutivo, os zangões são atraídos pelos feromônios da rainha à distância de até 5 km. No acasalamento, o órgão genital do zangão (endófalo) fica preso no corpo da rainha e se rompe, o que ocasiona sua morte; se sobrevivem, ou são inutilizados pelas operárias, ou expulsos da colmeia. A rainha ocupa-se exclusivamente em colocar ovos, sendo cerca de 3 mil por dia. A diferença entre zangão, rainha e operária leva em consideração a alimentação recebida, formando castas diferentes dentro dos favos (Figura 2) (EMBRAPA, 2007).

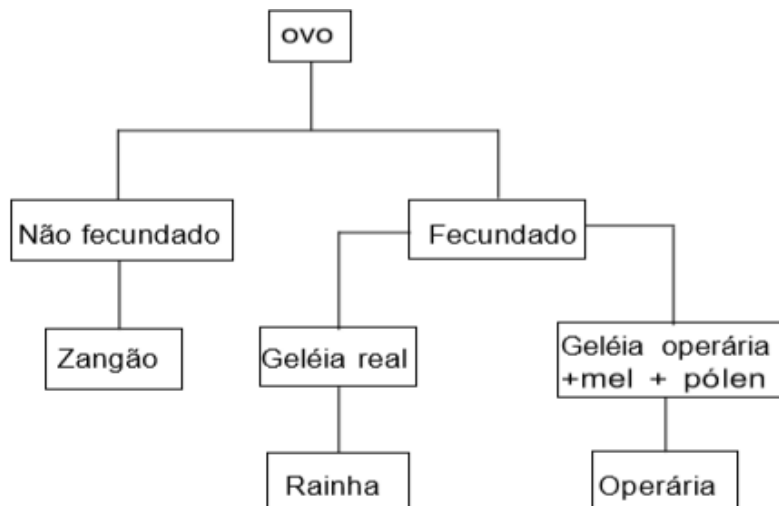


Figura 2. Esquemática da diferença de castas em colméias de *Apis mellifera*.
Fonte: EMBRAPA, 2002.

As operárias realizam todo o trabalho para a manutenção da colmeia com atividades específicas relacionadas à idade. Inicialmente, do primeiro ao quinto dia, realizam a limpeza dos alvéolos e de abelhas recém-nascidas. Do quinto ao décimo dia, chamadas de nutrizes, cuidam da alimentação das larvas em desenvolvimento. Nesse estágio, desenvolvem as glândulas hipofaríngeas e mandibulares, responsáveis pela produção de geleia real. Do décimo primeiro ao vigésimo dia, produzem cera para a construção de favos e desenvolvem as glândulas ceríferas. Além disso, recebem e desidratam o néctar trazido pelas campeiras, elaborando o mel. Do décimo oitavo ao vigésimo primeiro dia, realizam a defesa da colmeia. Nessa fase, as operárias apresentam os órgãos de defesa bem desenvolvidos, com grande acúmulo de veneno. Da mesma forma, participam do controle da temperatura na colmeia. Do vigésimo primeiro dia até a morte, realizam a coleta de néctar, pólen, resinas e água, denominadas campeiras. Entretanto, a necessidade da colmeia pode causar a reativação de

glândulas atrofiadas em operárias, com a finalidade de realizar determinada atividade. Ou seja, uma abelha mais nova pode sair para a coleta no campo e uma abelha mais velha pode encarregar-se de alimentar as larvas. As operárias possuem os órgãos reprodutores atrofiados, ou seja, não se reproduzem, porque, na fase de larva, elas recebem alimento menos nutritivo e em menor quantidade que a rainha. Em contrapartida, elas possuem órgãos de defesa e trabalho perfeitamente desenvolvidos, não observados na rainha e no zangão, como a corbícula (onde é feito o transporte de materiais sólidos) e as glândulas de cera (EMBRAPA, 2002).

A temperatura interna da colmeia é mantida em torno de 35°C, ideal para o desenvolvimento larval. Temperaturas fora dessa faixa podem provocar aumento da mortalidade na colônia e defeitos físicos nas operárias (asas ou outras partes do corpo). Quando é necessário baixar a temperatura da colmeia, as abelhas do interior da colônia distanciam-se dos favos e aglomeram do lado de fora da caixa. Algumas ficam posicionadas na entrada, movimentando suas asas, para direcionar uma corrente de ar ao interior da colmeia. Essa corrente, além de esfriar a colmeia, auxilia a evaporação da umidade do néctar, transformando-o em mel. Se houver duas entradas na colmeia, o ar é aspirado por uma entrada e expelido pela outra; se não, usa-se parte da entrada para aspirar e outra parte para expelir o ar. Se a temperatura do ar estiver muito alta, as operárias coletam água e espalham pequenas gotas pela colmeia e/ou regurgitam pequena quantidade de água, contida abaixo da língua, que será evaporada pela corrente de ar, auxiliando o resfriamento da colônia. Da mesma forma, a umidade evaporada do néctar é utilizada para esse fim. No inverno, para aumentar a temperatura do interior da colônia, as abelhas aglomeram-se em "cachos" e trocam de posição consecutivamente. Caso a temperatura continue caindo, elas aumentam sua taxa de metabolismo, provocando vibrações dos músculos torácicos, o que gera calor (EMBRAPA, 2007).

As abelhas forrageiam circundando a colmeia em um raio de até 3 km, buscando uma diversidade de lugares e interagindo intensamente com o meio ambiente. Unidos à sua capacidade de coletar e armazenar o material na sua colmeia, as abelhas e os produtos apícolas são considerados como indicadores apropriados para uma variedade de poluentes ambientais. Ou seja, podem ser consideradas rastreadoras de poluição ecológica, baseada em características, como comunidades com grande população, mobilidade, alcance de voo e números de inspeções de flores por dia. Também, baseia-se em características morfológicas, já que o corpo da abelha é coberto de pelos, aumentando a superfície de contato com o meio ambiente (BALAYIANNIS; BALAYIANNIS, 2008).

De maneira geral, as abelhas polinizadoras podem ser classificadas ou agrupadas de acordo com várias características, as quais são: nativas ou exóticas; melíferas ou não melíferas; solitárias (*Centris spp.*, *Eulaema spp.*, *Tetrapedia spp.*), eussociais (*Apini*, *Meliponini*) semissociais (*Bombini*, *Halictinae*, *Xylocopinae*); generalistas (abelhas sociais e a

maioria das abelhas solitárias; visitam todas as flores disponíveis em busca de néctar e pólen); ou especialistas (minoria das abelhas solitárias; visitam exclusivamente flores de poucas plantas) (MICHENER, 2000). Essa inter-relação entre planta e abelha é vital porque a diversidade e abundância das abelhas, na condição de maiores e melhores representantes dos polinizadores, serve como bioindicador da saúde do bioma, confirmando que os ecossistemas estão em equilíbrio sustentável (COUVILLON; RATNIEKS, 2015).

No Brasil, além da espécie *Apis mellifera* africanizada, híbrido entre abelhas africanas e europeias, existem mais de 1.500 espécies que são responsáveis pela polinização de 30% a 90% da flora nativa, dependendo do ecossistema, consideradas abelhas nativas, distribuídas em quase 300 gêneros (PIRES *et al.*, 2016).

3.2 Atividade apícola

A produção de mel é a base econômica da apicultura, entretanto, criar abelhas também se destina à polinização agrícola, à produção de própolis, pólen, geleia real e apitoxina. Esses produtos são utilizados como matéria-prima nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas e consumo in natura.

A cera da *Apis mellifera* possui por volta de 248 componentes diferentes; apresenta coloração clara, escurecendo com o tempo, em virtude do depósito de pólen e do desenvolvimento das larvas. As indústrias de cosméticos, medicamentos e velas são as principais consumidoras de cera. Outra substância produzida pela atividade das abelhas é o própolis, substância resinosa, adesiva e balsâmica, elaborada a partir da mistura da cera e da resina coletada das plantas. O própolis é usado pelas abelhas para fechar as frestas e a entrada do ninho, evitando correntes frias de ar, durante o inverno e na limpeza da colônia, devido às suas propriedades antissépticas. Serve, ainda, para isolar uma parte do ninho ou algum corpo estranho que não pode ser removido da colônia. É utilizada, principalmente, pelas indústrias de cosméticos e farmacêutica. Cerca de 75% do própolis, produzido no Brasil, é exportado, sendo o Japão o maior comprador (EMBRAPA, 2002).

O polén é outro produto da atividade apícola; é o gameta masculino das flores coletado pelas abelhas e armazenado nos alvéolos da colmeia. É alimento às abelhas na fase larval e adulta com até 18 dias de idade. Comercialmente, é usado como suplementação alimentar, misturado com o mel, seco, em cápsulas ou tabletes. Esse mesmo polén participa da apicultura em termos de polinização, afinal, o gameta masculino das plantas é transportado por agentes polinizadores, para o óvulo da mesma flor ou de outra espécie, concedendo diversidade florística. Em locais com alto índice de desmatamento e devastação ou com predominância da monocultura, os agricultores ficam extremamente dependentes das abelhas para poderem produzir. Com isso, muitos apicultores alugam suas colmeias durante o período da florada para serviços de polinização (EMBRAPA, 2002).

Produzida pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das operárias, usada como alimento das larvas e da rainha, a geleia real é outro subproduto da atividade das abelhas. Alguns apicultores praticam a comercialização in natura, misturada com mel ou liofilizada. A indústria de cosméticos e medicamentos utiliza na composição de diversos produtos. O último subproduto da produção apícola é a apitoxina, produzido pelas glândulas de veneno da operária e armazenado no “saco de veneno” na base do ferrão. Cada operária produz 0,3 mg de veneno, que é uma substância transparente, solúvel em água e composta de proteínas, aminoácidos, lipídios e enzimas. Embora a ação antirreumática do veneno seja comprovada e o preço no mercado seja muito atrativo, é um produto de difícil comercialização, porque só deve ser comercializado para farmácias de manipulação e indústrias de processamento químico, em razão da sua ação tóxica (EMBRAPA, 2002).

O principal produto da atividade apícola é o mel. Ele contém glicose (32%), frutose (38%), água e pequenas quantidades de proteínas, minerais, ácidos orgânicos, vitaminas e enzimas invertase, diástase, glicose oxidase, catalase e fosfatase (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2006). Além de alimento, possui atividades terapêuticas, já comprovadas, como sua habilidade antimicrobiana e antisséptica, devido a seus fatores físicos (alta osmolaridade e acidez) e químicos (inibição por peróxido de hidrogênio e substâncias voláteis, como flavanoides e ácidos fenólicos). Além disso, o mel apresenta propriedades antinêmicas, emolientes, antiputrefantes, digestivas, laxativas e diuréticas. Embora em baixas concentrações, o mel pode apresentar algumas vitaminas, como: E1 (tiamina), complexo E2 (riboflavina, niacina), E6 (pyridoxina), ácido pantotênico, C (ácido ascórbico) e D. São assimiláveis pela associação a outras substâncias, como o hidrato de carbono, sais minerais, oligoelementos e ácidos orgânicos. A filtração, por retirar o pólen do mel, é que pode reduzir o conteúdo de vitaminas, exceto de vitamina K (EMBRAPA, 2006).

O mel é classificado de acordo com sua origem em floral, quando as abelhas aproveitam o néctar das plantas e mel de melato; são adquiridos de secreções de líquidos açucarados, procurados e colhidos pelas abelhas como se fossem néctar (ANKLAM, 1998). Esses méis advêm de processos enzimáticos semelhantes, mas suas características físico-químicas são diferentes quando se tornam o produto final. Mel floral é chamado de monofloral, quando o néctar é coletado de uma espécie floral. Multifloral ou silvestre, quando é obtido a partir de diferentes origens florais (CAMPOS, 1998). O néctar coletado pelas operárias é carregado na vesícula nectarífera para a colônia, repassado para outra operária ou depositado diretamente no favo. Durante o transporte, é diluído pela saliva, de maneira que são acrescentadas enzimas (invertase, diastase e glicoseoxidase) provenientes das glândulas hipofaríngeas das abelhas. Elas agem no processamento do néctar para transformá-lo em mel. A composição do néctar de uma espécie produtora, que foi recolhido pelas abelhas, colabora diretamente na composição do mel elaborado, atribuindo características específicas. O mel de melato difere do mel floral em sua composição química; eles são mais escuros, têm

pH mais alto, menor teor de glicose, razão pela qual usualmente não cristaliza, e maior acidez (CASTRO-VAZQUEZ *et al.*, 2006).

Em relação à espécie coletora, existem vários tipos de méis no mundo. As abelhas do gênero *Apis* são as principais: *Apis mellífera*, *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*. No Brasil, existem outras espécies, como as abelhas sem ferrão (meliponídeos), do gênero *Melipona*, conhecidas popularmente como uruçú (*Melipona scutellaris*), tiúba (*Melipona compressipes*), jandaíra (*Melipona subnitida*), mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) (VARGAS, 2006). De maneira geral, o mel das espécies de meliponídeos tem como característica fundamental a diferenciação nos teores da sua composição. Destaca-se o teor de água (umidade), que o torna menos denso que o mel das abelhas africanizadas (CAMPOS, 1998).

O mel extraído dos apiários contém pólen, cera de abelha, leveduras e outros materiais indesejáveis, que devem ser removidos para melhor qualidade e prazo de validade. Dessa forma, para fins de comercialização, o mel é processado antes de ser embalado em garrafas ou outros recipientes. De maneira geral, o processamento convencional do mel inclui, consecutivamente: pré-aquecimento; suspensão das partículas (“*straining*”); filtração de partículas finas; aquecimento (remoção de umidade e redução na contagem de leveduras); resfriamento e engarrafamento. O tipo de equipamento e as etapas, durante o processamento, dependem da escala de operação. Duas etapas importantes são a filtragem e o aquecimento. A separação de restos de pólen, cera e outros materiais é feita por filtração por deformação e pressão. O tratamento térmico do mel elimina os microorganismos que causam deterioração e reduz o teor de umidade retardando o processo de fermentação. A separação física do material em suspensão é feita antes do processamento térmico do mel (SUBRAMANIAM, HEBBAR & RASTOGI, 2007).

Em locais com clima tropical, um problema enfrentado na apicultura é a rápida deterioração devido à fermentação. Isso porque o mel contém levedura osmofílica (tolerante ao açúcar). Assim, se o teor de umidade for alto o suficiente e a temperatura de armazenamento for favorável, ocorre a fermentação. A umidade influencia a taxa de fermentação, granulação e sabor do mel. Dessa forma, o teor de umidade abaixo de 17% é considerado um nível seguro para retardar a atividade das leveduras. Em contrapartida, a diminuição da umidade aumenta as chances de granulação do mel. Para evitar a fermentação, o mel passa pelo processo térmico antes do envasamento. Ele elimina os microorganismos responsáveis pela deterioração e reduz o teor de umidade para retardar a fermentação. O aquecimento provoca, inicialmente, uma diminuição na viscosidade, que pode ainda ser atribuída à composição dos açúcares individuais, ao material não açucarado e coloidal. Outra particularidade é a cristalização, propriedade indesejável no manuseio, processamento e comercialização, exceto para alguns fins. A glicose parece ser o principal componente que cristaliza no mel, pois está em um estado supersaturado (SUBRAMANIAM, HEBBAR & RASTOGI, 2007).

A qualidade do mel varia de acordo com alguns fatores, como a diversidade florística, a espécie de abelha, as condições ambientais e manejo pré e pós-colheita (MORAES, 2012). De acordo com a legislação brasileira emitida pela ANVISA, na normativa nº11 de 2000, um mel, para ser considerado de qualidade e com níveis aceitáveis de pureza, precisa apresentar cor, sabor, aroma, teor de umidade e consistência adequados. Nas análises físico-químicas, estabilidade e conservação, destacam-se o teor de umidade, teor de cinzas (quantidade de minerais no mel), microbiota (introduzidos pelas próprias abelhas ou por comportamentos antigênicos), pH (influencia a formação de outros componentes), acidez (nível de deterioração do mel – realça sabor), condutividade elétrica (deterioração da origem botânica do mel) e cor. Em termos de densidade óptica, o mel é classificado nas cores branco água, extra branco, branco, branco âmbar, âmbar claro, âmbar e âmbar escuro (Figura 9). Assim, o mais escuro apresenta uma concentração de sais minerais (Mn, K, Na e Fe) mais alta. As cores podem sofrer alterações devido a fatores, como tempo, temperatura de estocagem e contaminação por metais (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2006).

Ultimamente, a demanda por mel de melhor qualidade está aumentando, uma vez que o mel está sendo consumido também por seus benefícios à saúde. Assim, esforços para procurar alternativas ao processo térmico convencional estão surgindo, com a finalidade de produzir mel de melhor qualidade. Dentre as últimas inovações, destacam-se o uso de microondas, ultrassom e aquecimento infravermelho, por apresentarem a vantagem inerente à rapidez e ao produto de melhor qualidade. Os processos de membrana por pressão são notavelmente simples, já que funcionam em temperatura ambiente e exigem menos energia (SUBRAMANIAM, HEBBAR & RASTOGI, 2007).

Em termos de apicultura, existem dois tipos de apiário, fixo e migratório. No apiário fixo, há a permanência das colmeias durante todo o ano em um local delicadamente escolhido. As abelhas exploram as fontes florais disponíveis em seu raio de ação (máximo de 3 km para uma coleta produtiva). Em apiários migratórios, as abelhas são deslocadas ao longo do ano para locais com recursos florais abundantes. Pela necessidade de praticidade no transporte das colmeias e do restante do material, os cavaletes utilizados diferem daqueles considerados em apiários fixos. Assim, são desmontáveis ou dobráveis diminuindo o volume de carga a ser transportada e o tempo gasto na sua montagem e desmontagem (EMBRAPA, 2007).

Independentemente da instalação do apiário, no processo de produção de mel, as abelhas podem ser acometidas por algumas doenças, desde seu estágio larval, por bactérias, fungos, vírus, ácaros, protozoários e insetos. Essas doenças acarretam prejuízos diretos para a produtividade. Isso porque o aumento da mortalidade, tanto de crias quanto de abelhas adultas, ocasiona uma redução da população da colmeia (SÁNCHEZ-BAYO *et al.*, 2016).

Nas fases iniciais, os prejuízos são ainda maiores, devido à dificuldade de percepção. Nelas, os apicultores precisam observar os favos com as crias; quando muito falhados, é indício de doença. As falhas (Figura 3 a) aparecem porque as operárias tiram as crias doentes

da colmeia (comportamento higiênico). Há, ainda, problemas com a rainha (idade) ou zangões diploides (fecundação consaguínea), que são comidos pelas operárias, resultando também em falhas nos favos. Para ter certeza de que se trata de doença nas crias, os apicultores devem examinar cuidadosamente os opérculos, avaliando cor, a forma e a posição das crias; opérculos furados e/ou afundados são indicativos de doenças. Nas crias, as principais doenças são: cria pútrida europeia, cria pútrida americana, cria ensacada e cria giz (Figura 3) (EMBRAPA, 2002).

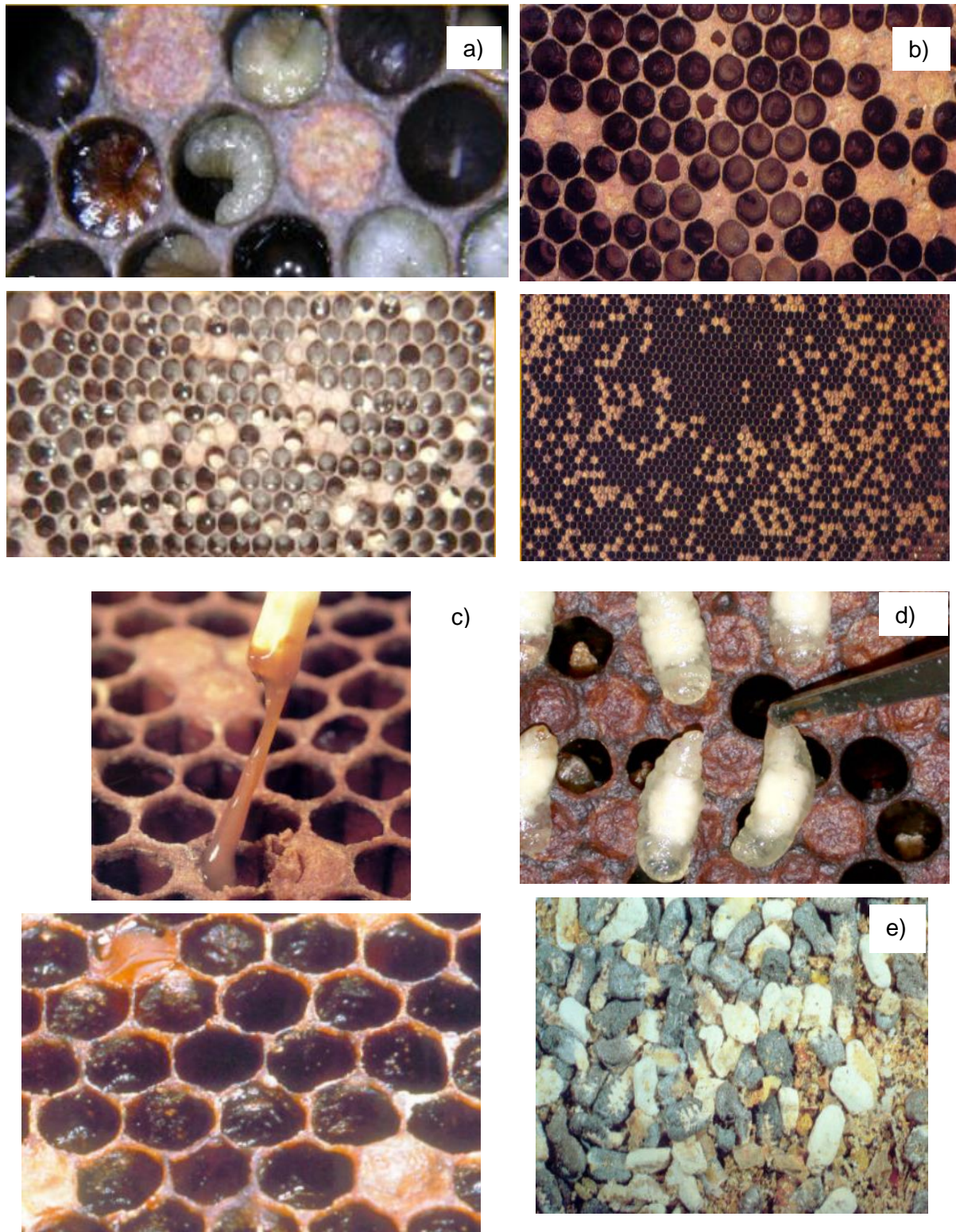


Figura 3. Doenças em crias de abelhas: a) cria pútrida européia: área de crias com muitas falhas(inferior) e mudança de posição e coloração das larvas(superior); b) cria pútrida americana: favos falhados (inferior) e opérculos perfurados (superior); c) cria pútrida americana: consistência viscosa da cria – teste do palito (superior) e restos de crias mortas e ressecadas colados nas paredes do alvéolo (inferior); d) pré-pupas com sintomas de cria ensacada; e) sintomas de cria giz.
 Fonte: EMBRAPA, 2004.

Em abelhas adultas, o diagnóstico é mais complicado porque a reação causada entre as doenças ou intoxicações é muito similar. O sintoma geral de doenças em abelhas adultas é a presença de abelhas mortas ou moribundas, rastejando na frente da colmeia. Dentre as

principais doenças em abelhas adultas, destacam-se a nosemose, causada por protozoário, que ataca o sistema digestivo, provocando disenteria. Ademais, há a acariose, causada por um ácaro, que se aloja na traqueia e alimenta-se da hemolinfa, causando a morte. Ambas as doenças não são mais comuns no Brasil; apareceram apenas nas décadas de 70-80. Outro ácaro (ectoparasita), que causa danos à apicultura, em crias e adultos, é o *Varroa destructor*. Nas crias, afeta principalmente os zangões; nos adultos, fica aderido principalmente na região torácica, próximo ao ponto de inserção das asas. Alimenta-se sugando a hemolinfa, podendo causar redução do peso, da longevidade das abelhas e deformações nas asas e pernas. As colônias que apresentarem infestações devem ter suas rainhas substituídas por outras provenientes de colônias resistentes (EMBRAPA, 2002; SÁNCHEZ-BAYO *et al.*, 2016).

O ácaro *V. destructor* é um vetor de vários vírus de abelhas, incluindo vírus de paralisia aguda de abelhas (ABPV), de paralisia de Israel (IAPV), vírus de abelha da Caxemira (KBV) e de asa deformado (DWV). Inicialmente, ele acometia somente as abelhas asiáticas *Apis ceranae*, mas hospedou-se na abelha europeia, *Apis mellifera*, no Extremo Oriente, em meados do século passado e se alastrou por todo o mundo (FRANCIS; NIELSEN; KRYGER, 2013).

As abelhas são acometidas ainda por doenças causadas por duas espécies de traças, que depositam ovos em frestas dos quadros e caixas, em colmeias fracas. As larvas alimentam-se da cera, construindo galerias nos favos, nos quais depositam fios de seda. Os quadros ficam repletos de fios de seda e fezes. Podem, ainda, afetar diretamente a cria e a cera armazenada. Insetos, como formigas e cupins, geram grandes danos à atividade apícola. As formigas consomem o alimento (mel e pólen) e as crias, além de causarem grande desgaste, ocasionam mortalidade das abelhas adultas, na tentativa de defender a colônia. Dependendo da intensidade do ataque, podem provocar o abandono da colmeia. Os cupins danificam a madeira das caixas e cavaletes, diminuindo sua vida útil e favorecendo a entrada de outros inimigos naturais (EMBRAPA, 2002).

3.3 Apicultura na mesorregião Oeste do Paraná

De forma geral, no Brasil, a apicultura teve início no começo do século 19 com a introdução da abelha-da-europa. A produção nacional aumentou após a introdução de *A. mellifera scutellata*, vinda da África, em 1956, com intuito de melhorar a produção de mel no país (MORAIS *et al.*, 2012). Esse avanço ocorreu, principalmente, devido à regulamentação, valorização, incentivos, utilização dos produtos das abelhas pela população e à renda adquirida. Até 2003, o Brasil era considerado o 7º maior exportador de mel no ranking mundial. Em 2005, era o 15º maior produtor, destacando-se até 2007 como o país que mais expandiu suas exportações, tanto em quantidade quanto em valor. Em 2010, o país alcançou a 11ª posição entre produtores mundiais, com a 5ª colocação entre os exportadores, em quantidade.

Já em 2013, houve um novo aumento na exportação, chegando a mais de 16 mil toneladas, com a 7ª posição entre os exportadores. Em 2014, um aumento na exportação de 82%, em relação a 2013, levou o Brasil a ocupar a 8ª posição entre os maiores exportadores, com pouco mais de 25.300 toneladas. Apesar do bom desempenho nas exportações, o país ocupou melhor posição no ranking mundial em quantidade do que em valor de produto, indicando que menores produtores não têm conseguido melhores preços. Isso aponta para a necessidade de melhorar a qualidade e o valor agregado do produto (BANDINI; SPISSO, 2017). Atualmente, o Brasil é o décimo maior produtor de mel e o oitavo maior exportador do produto do mundo, sendo a China e Argentina, respectivamente, as maiores representatividades. A produção nacional de mel é, em média, de 27 a 35 toneladas. Em 2017, por exemplo, o setor apícola movimentou U\$ 121 milhões (ABEMEL, 2018). Em 2006, segundo dados do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), cerca de 350 mil pessoas viviam no Brasil, em função da renda da apicultura, com representação significativa da agricultura familiar nessa área.

Dados fornecidos pelo IBGE, consolidados para o mel, foram adquiridos por meio do Sistema de Recuperação Automática – Sidra21 e pela Secretaria de Comércio Exterior – Secex. Utilizou-se o sistema AliceWeb22, todos em relação ao mel natural, única categoria disponibilizada, considerados para parâmetro nacional, pelos autores Bandini e Spisso (2017) (Figura 4). A partir de 2008, não há registros de importação de mel. Não foram encontrados dados que fizessem distinção entre diferentes tipos de mel, nem nessa fonte, nem nas demais.

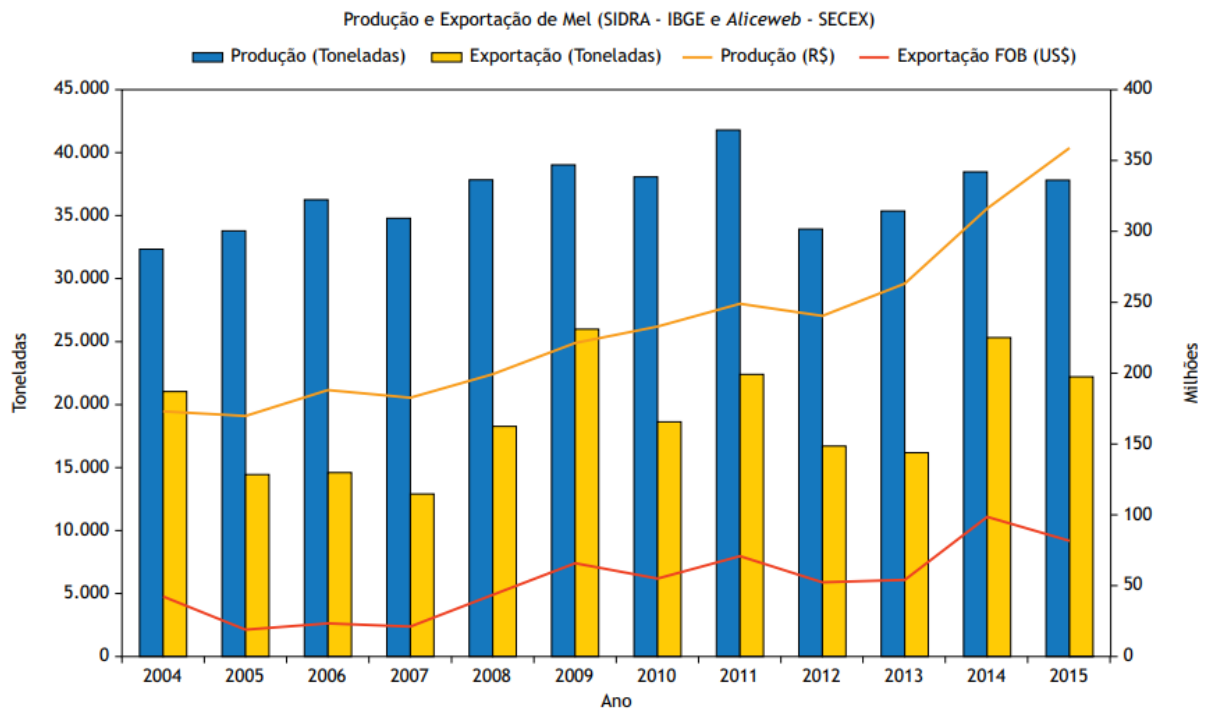


Figura 4. Mel: Produção (IBGE) e Exportação (Secretaria de Comércio Exterior – Secex) de 2004 a 2015.

Fonte: Bandini e Spisso (2017).

No espaço territorial, as regiões Sul e Nordeste são as maiores produtoras, responsáveis por mais de 70% da produção de mel. O Sudeste vem se destacando por apresentar um crescimento durante os últimos anos, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), registrados em 2016. Socioeconomicamente, a apicultura é uma atividade importante para a agricultura familiar. Tem papel social por meio da contratação de mão de obra local, familiar ou até mesmo permutada entre os apicultores, que formam associações ou cooperativas, garantindo, assim, a permanência das famílias no meio rural (SABBAG; NICODEMO, 2011).

Dados do estado do Paraná, na década de 1950, revelam que a atividade apícola enfrentou alguns desafios, por conta da miscigenação genética entre as abelhas africanas e europeias. Esse cruzamento apresentou maior produtividade às colmeias, mas o comportamento agressivo da espécie ocasionou uma queda no desenvolvimento da atividade. Já nos anos 1970, com a atividade agrícola em expansão, o uso indiscriminado de pesticidas também contribuiu para a redução da apicultura e, conseqüentemente, para a contaminação do mel. A partir de 1980, a atividade começou a ganhar um novo cenário, de forma crescente, com o surgimento de novas oportunidades na paisagem local, nacional e mundial. Em termos de Brasil, o Paraná é o segundo estado de destaque em exportação de mel, gerando por volta de 3,02 mil toneladas, averbando, aproximadamente, U\$ 9,7 milhões. Na região Oeste do Paraná, a atividade apícola teve início na década 1990, com o surgimento de associações de apicultores, incentivados por programas governamentais. Eles ofereciam equipamentos básicos para o desenvolvimento da atividade, principalmente para o processo de produção de cera alveolada (produto de alto custo para o apicultor). Consecutivamente, as associações passaram a confeccionar a cera. Em 2006, essas associações se organizaram e fundaram a Cooperativa Agrofamiliar Solidária dos Apicultores da Costa Oeste do Paraná (COOFAMEL). A cooperativa consolida-se comercializando o mel e seus produtos derivados, representando os produtores de mel da região da Oeste do Paraná. Ela agrega valor ao produto e expande o mercado, bem como consolida a marca COOFAMEL (RODRIGUES, DURSO, ROCHA JUNIOR, 2015).

Segundo dados preliminares do IBGE (2018), para municípios devidamente cadastrados, no Brasil, foram produzidos 42.346.250 kg de mel, gerando um lucro de R\$ 502.842.00 para o país. A maior representatividade desses dados pertence à região sul do Brasil, com uma produção de 16. 475.113 kg. O Paraná e o Rio Grande do Sul são os estados com maior produção em quilogramas da região e de todo o país, com 6.293.757 e 6.428.057 kg(s), respectivamente. Em termos de lucro, a região sul gerou ao Brasil, com a produção de mel, R\$ 215.487,00, sendo que, desses locais, o Paraná apresentou a maior lucratividade com R\$ 84.010,00 de todos os estados brasileiros (Figura 5).

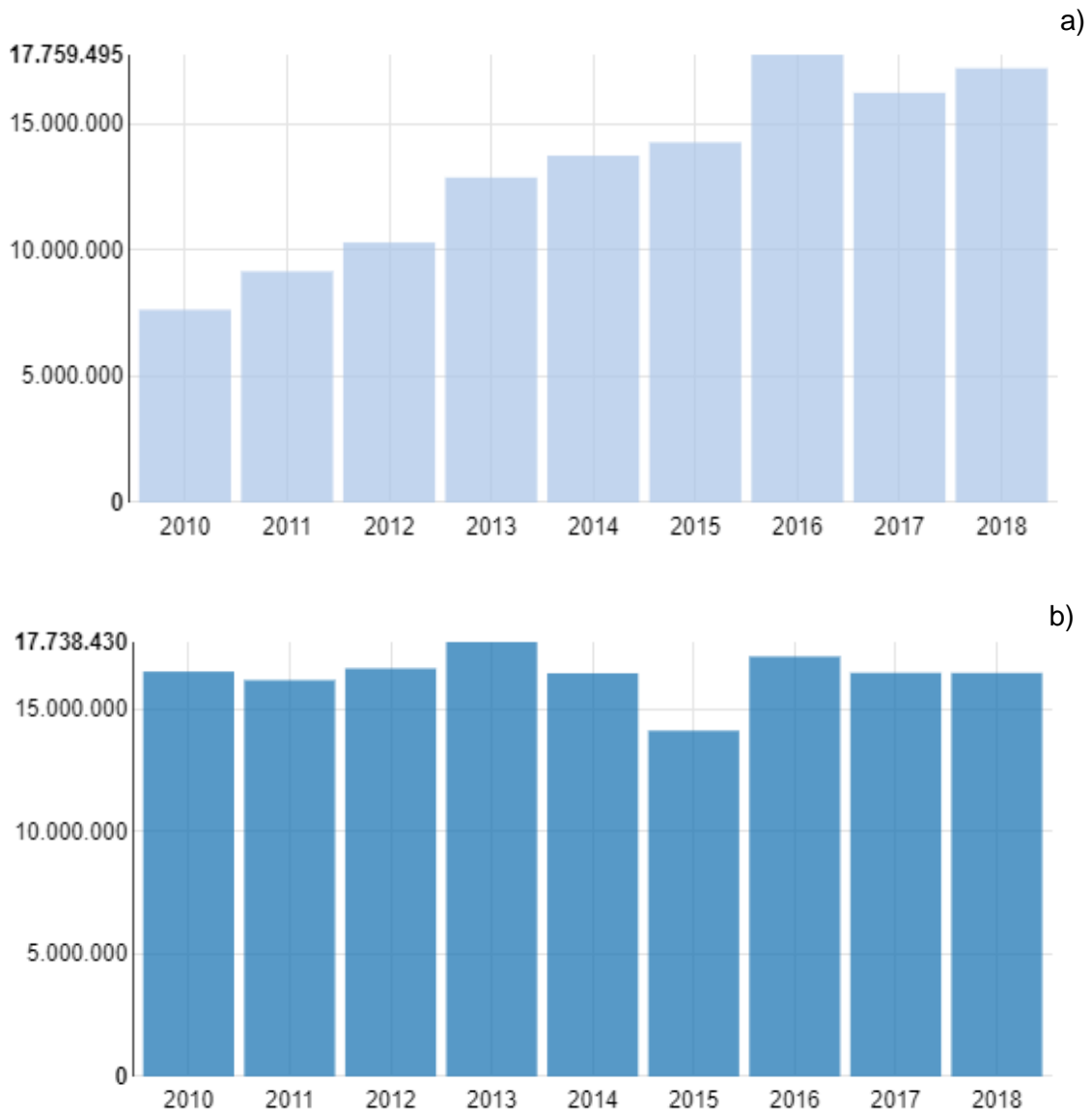


Figura 5. Contribuição da região sul para a produção e lucratividade de mel para o Brasil. a) Produção de mel em quilogramas dos anos de 2010 a 2018 na região sul do Brasil; b) Lucratividade na produção de mel em R\$ dos anos de 2010 a 2018 na região sul do Brasil. Fonte: IBGE – Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM – 2018).

No valor percentual da produção de origem animal por tipo de produto, o mel no Brasil representou 4,3% do total. A região sul e nordeste ficaram com a maior representatividade, 1,25 e 1,57%, respectivamente. Em relação aos municípios pertencentes ao estado do Paraná, para o ano de 2018, destacam-se, em maior produção de mel em quilogramas: Ortigueira, com 733.296 kg, Arapoti (576.000 kg), Prudentópolis (283.540 kg), Cruz Machado (252.000 kg), Bituruna (199.00 kg).

A microrregião de Toledo engloba, entre outros municípios, Marechal Cândido Rondon, Santa Helena e Terra Roxa; juntos esses municípios produziram, em 2018, um total de 165.500 kg de mel, rendendo ao Paraná R\$ 1.694.000,00. Uma pesquisa realizada por Sígolo (2019), unido à COOFAMEL, buscou, entre outros pontos, avaliar possíveis causas de perdas de colmeias de *Apis mellifera* e jataí, nas propriedades dos apicultores selecionados.

Dentre os problemas mais citados, destacaram-se a contaminação por defensivos agrícolas e roubo de caixas, sendo que, em 45,95% dos casos, suspeitava-se da contaminação por pesticidas. Tal fato foi justificado devido à região oeste do Paraná ter intensa atividade agrícola, mesmo que, em grande parte das propriedades, as caixas estivessem dipostas no interior da mata ciliar, o que comprometeu a qualidade do mel produzido. Outro ponto interessante foi a diminuição da produtividade, no ano de 2019, devido às condições climáticas. Nos períodos de seca, houve baixa produção de mel; isso porque as abelhas são sensíveis às mudanças bruscas de temperatura. Assim, com o alto calor, buscam ventilar a colmeia e reduzir a temperatura corporal. Além disso, o excesso de calor faz as larvas morrerem e as abelhas abandonarem a colmeia, prejudicando a produtividade do mel.

Moraes (2012) realizou uma pesquisa voltada à avaliação físico-química do mel dos associados da COOFAMEL, dos municípios de Terra Roxa e Santa Helena. Dentre outros resultados, o teor de umidade apresentou valores elevados, acima de 20%, comprometendo o tempo de vida consumível do produto (tempo de prateleira). Esse dado pode estar diretamente ligado à colheita prematura do mel, além do tempo de armazenamento, que, de certa forma, acaba por absorver água do ambiente, visto que é higroscópico. Unido a isso, o período de safra do mel evidenciou uma concentração elevada de chuvas durante sua produção. Todos esses fatores estão diretamente ligados ao manejo inapropriado por conta dos apicultores. Dessa forma, foram sugeridos cursos para estabilizar a situação.

Sabendo da importância da região sul para a produção de mel do país, a necessidade cada vez maior de mel de qualidade e as características da região, em termos de uso do solo, vale a pena destacar a importância de pesquisas que visem buscar a valorização do mel regional.

3.4 Polinização

É o transporte dos grãos de pólen das estruturas masculinas das flores (estames) para a parte feminina (estigma), da mesma flor ou de uma outra flor da mesma espécie vegetal. Essa fertilização faz com que cada óvulo forme um embrião, que, ao se desenvolver, produz fitormônios responsáveis pelo crescimento e amadurecimento do ovário, formando o fruto e/ou semente. Os polinizadores são seres vivos que visitam as flores de plantas em busca de recursos, como néctar, pólen, óleos florais, essências, resinas, aquecimento, abrigo, entre outros. Nessas visitas, entram em contato acidental ou proposital com os estames, apanhando pólenes em seus corpos, depositados em outros estigmas, a fim de realizar a polinização. As abelhas são as responsáveis pela manutenção da base da cadeia alimentar nos ecossistemas silvestres. Elas respondem pela polinização de mais de 50% das plantas das florestas tropicais e, no Cerrado brasileiro, podem chegar a polinizar mais de 80% das espécies vegetais (INÊS DA SILVA; FREITAS, 2015; ROUBIK, 2018).

No Brasil, existem nove grupos de polinizadores, sendo as abelhas representantes de 66,3% das espécies, besouros (9,2%), borboletas (5,2%), mariposas (5,2%), aves (4,4%), vespas (4,4%), moscas (2,8%), morcegos (2%) e hemípteros (0,4%). As abelhas, como maior grupo de polinizadores, contemplam cerca de 48% do total de espécies identificadas como visitantes florais de cultivos vinculados à produção de alimentos. Essas espécies se encontram associadas a 132 (92%) cultivos, sendo reconhecidas como polinizadores de 91 deles e constituindo polinizadores exclusivos de 74. A *Apis mellifera* está associada a 86 cultivos, polinizadora potencial de 54. Já as abelhas sem ferrão, têm sido registradas como visitantes florais de 107 cultivos e polinizadoras de 52. Em termos de culturas agrícolas, o manejo adequado de polinizadores é uma alternativa para incrementar a produção e suprimir o déficit na polinização em plantas cultivadas (LUCA; VALLEJO-MARÍN, 2013).

O cenário da polinização está em constante ameaça e qualquer atrelamento de uma espécie agrícola ser unicamente dependente da polinização é uma estratégia de risco. Logo, se a demanda por culturas polinizadas por insetos continuar a aumentar e, concomitantemente, o número de polinizadores diminuir, a escassez de culturas provavelmente ocorrerá na ausência de respostas técnicas ou econômicas compensatórias (GALLAI *et al.*, 2009). Grande parte das culturas básicas que servem de sustento para a produção de alimentos são polinizadas pelo vento ou amplamente autopolinizadas. Entretanto, aquelas polinizadas por insetos contribuem com variabilidade genética e micronutrientes vitais, como vitaminas e ácido fólico. Nesse viés, pode-se afirmar que o declínio de polinizadores tende a afetar diretamente o ecossistema. Em ambientes de clima temperados e tropicais, por exemplo, cerca de 78% a 94%, respectivamente, das plantas com flores são dependentes da polinização animal (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011).

Na agricultura, especificamente, a polinização oferece não somente volume de produção, mas influencia também o aspecto qualitativo dos frutos, a quantidade de substâncias nas sementes (óleo no girassol, canola, mamona), encurtamento do ciclo de culturas (melão, melancia) e uniformização da altura das plantas (gergelim, soja). Esses fatores contribuem para melhorar a produtividade, a eficiência do uso da terra e redução das perdas de colheita, aumentando a rentabilidade e lucratividade no cultivo. Esses aspectos podem ser percebidos pelos próprios produtores agrícolas, conforme apresentado na Figura 6 (MENEZES, 2018).

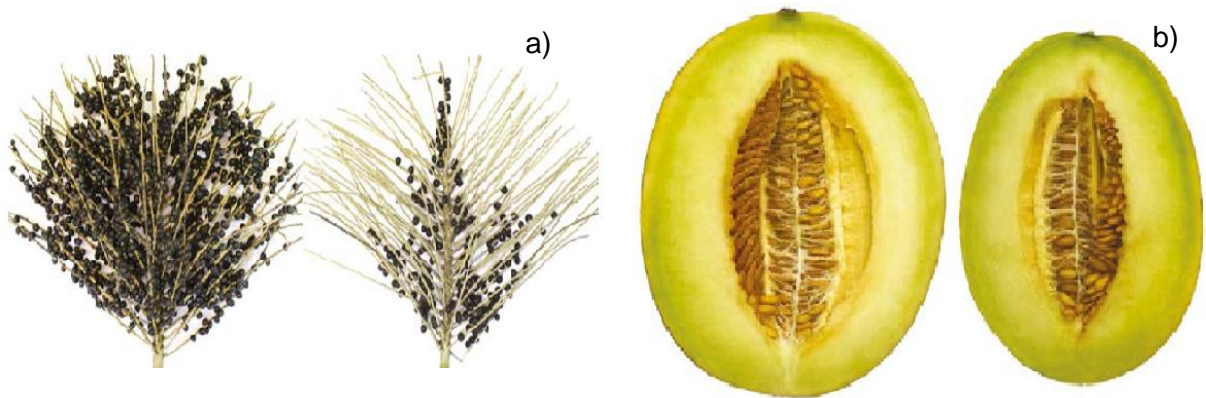


Figura 6. Deficiência de polinização em culturas agrícolas: a) cultura de açaí (fruto com uma semente) deficiência na polinização aparente pela quantidade de frutos produzidos; b) cultura do melão (fruto com grande quantidade de sementes) deficiência de polinização observada pelo tamanho do fruto (menor). Normalmente, frutos bem polinizados são também mais doces.
 Fonte: Menezes, 2018.

Uma alternativa importante para auxiliar as abelhas quanto a seu trabalho de polinizar é plantar flores atrativas que floresçam em períodos diferentes para alimentar as abelhas silvestres quando a cultura não estiver florida. Diversificar os cultivos na propriedade também colabora para aumentar a oferta de alimento aos polinizadores. O simples fato de não remover as plantas herbáceas das entrelinhas da cultura já ajuda a fornecer alimento para os polinizadores e aumentar a diversidade de abelhas na cultura. E, obviamente, manter áreas de mata próximas à plantação contribui para diversificar o cardápio dos polinizadores, o que é muito importante para as espécies mais generalistas, como as abelhas sociais (MENEZES, 2018).

Não há uma causa exclusiva de declínio dos polinizadores; a intensificação do uso da terra, alterações climáticas, introdução de espécies exóticas e as doenças causam perdas de polinizadores há muito tempo. Muitas vezes, as causas unem-se em interações em diferentes pressões e contribuem para esse declínio. De forma geral, os fatores potenciais podem ser agrupados em pragas, patógenos, estressores ambientais (desnutrição, exposição a pesticidas e má administração apícola), falta de diversidade genética e vitalidade. Por exemplo, abelhas expostas a concentrações subletais e crônicas de pesticidas podem melhorar a replicação de patógenos, comprometendo a imunidade individual, além de gerar consequências letais para colônias já enfraquecidas pela doença. Em contrapartida, uma diversidade genética reduzida pode resultar em maior susceptibilidade aos patógenos (NEUMANN; CARREK, 2010; RORTAIS *et al.*, 2017).

Impactos deletérios em abelhas resultam de efeitos a nível subcelular, como danos neurológicos, habilidades de desintoxicação diminuídas, deficiências imunológicas e desnutrição. Esses danos se amplificam a nível de colônia por meio de alterações no comportamento social, comunicação e assepsia das colmeias. A interdisciplinaridade é essencial para investigar como os impactos relacionados de patógenos-toxinas-nutrição afetam diferentes populações e espécies de polinizadores. É necessário entender como as

populações e comunidades de polinizadores responderão a esses efeitos unidos, ainda, a mudanças climáticas diretas (temperatura) e indiretas (dispersão de plantas e insetos). O entendimento das interações entre patógenos, toxinas e nutrição a níveis de organização biológica, dentro dos processos ecológicos, informará a previsão de mudanças nos serviços de polinização em diferentes cenários (VANBERGEN *et al.*, 2013).

O uso da terra, especificamente, pode eliminar certas espécies em escalas local e regional, alterando a estrutura e a função das comunidades nas relações plantas - polinizadores (BURKLE; MARLIN; KNIGHT, 2013). Além disso, o manejo intensivo e inadequado de culturas, incluindo a utilização desenfreada de pesticidas, afetam diretamente os polinizadores. Pesticidas sistêmicos espalham-se pelos tecidos das plantas e acumulam-se no néctar e no pólen, produzindo efeitos negativos subletais ao desempenho e comportamento (GILL; RAMOS-RODRIGUEZ; RAINE, 2012). Por exemplo, no forrageamento coletivo, o processamento e o armazenamento de alimentos por *Apis mellifera* ocasionam o acúmulo de inseticidas agrícolas usados pelos apicultores para combater ácaros e outros parasitas da colmeia (MULLIN *et al.*, 2010). Dessa forma, as abelhas são expostas cronicamente a um coquetel de diferentes produtos químicos que podem interagir sutilmente ou, por vezes, sinergicamente, com efeitos prejudiciais sobre sua sobrevivência, aprendizado e comportamento.

Em termos de declínio global das abelhas, muita atenção é dada à avaliação da possível contribuição dos inseticidas neonicotinoídeos para o enfraquecimento e colapso das colônias. São inseticidas sistêmicos, que representam cerca de 30% do uso de inseticidas no mundo. Assim que a substância ativa é absorvida pela planta, seus resíduos são translocados para o pólen e o néctar, os quais são coletados pelos forrageadores durante a floração. Após essa descoberta, pesquisas foram desenvolvidas, visando comparar os efeitos em campo com os obtidos em laboratório. No entanto, surgiu uma lacuna entre os resultados das avaliações de toxicidade em laboratório e em campo (GOULSON *et al.*, 2015). Resultados propiciaram a identificação de uma variedade de efeitos subletais (alterações fisiológicas ou comportamentais mensuráveis em níveis bem abaixo da dose letal de 50% - LD₅₀). Dentre eles, efeitos na mobilidade, orientação, forrageamento e desempenho de aprendizagem (PISA *et al.*, 2015). Contudo, não está claro se esses efeitos são refletidos a nível de campo, visto que há dificuldade em detectar qualquer mudança notável no desempenho das colônias.

Focando no estressor de origem biológica, dados relevantes da Europa e dos EUA mostram que, após o aparecimento da doença, causada pelo ácaro *Varroa destructor*, 59% e 25%, respectivamente, de colônias silvestres de *Apis mellifera* foram perdidas, que é a principal responsável pela polinização agrícola das regiões. Apesar do cenário ser preocupante, o número de colônias em todo o mundo vem aumentando: por volta de 45%, desde 1961. No entanto, a proporção de culturas agrícolas dependente dos polinizadores está crescendo de maneira mais veloz, superior a 300%. Ou seja, a necessidade por serviços de

polinização agrícola pode e deve superar a demanda pelo número de colmeias. Polinizadores especialistas em pólenes específicos, dieta e habitats têm suas habilidades funcionais restringidas. Nelas, incluem-se a perda da dispersão de pólen a longa distância, que reduz a resiliência dos serviços de polinização entre espécies, tempo e espaço (ALVES, 2015).

Pontualmente, a degradação de habitat (pastagem, incêndio, urbanização, intensificação agrícola) pode afetar as espécies de abelhas pela perda de recursos florais, de formação de ninhos e pela introdução de inseticidas com efeitos letais ou subletais. Herbicidas e fertilizantes, por exemplo, afetam indiretamente os polinizadores, diminuindo a disponibilidade de recursos florais. Além disso, os efeitos dos pesticidas podem não se restringir às próprias terras agrícolas, afinal, os pesticidas sofrem processos de deriva e se depositam em locais onde os polinizadores aninham e forrageiam. A queda de polinizadores afeta dois grandes grupos de plantas com flores: as silvestres e as culturas cultivadas. Cerca de 80% de plantas silvestres depende diretamente da polinização por insetos para frutos e sementes. Muitas dessas plantas, por volta de 73%, apresentam limitação de polinização, mesmo variando de locais e estações do ano. Nas culturas cultivadas, cerca de 75% necessitam da polinização por abelhas. Muitas culturas de maior volume (arroz e trigo) são polinizadas pelo vento, entretanto, uma grande porção de culturas de frutas (maçã, melão, acerola, melancia, tangerina) são dependentes dos polinizadores (POTTS *et al.*, 2010; ROUBIK, 2018).

A expansão, intensificação e a especialização da agricultura propiciaram uma paisagem mais homogênea e mais pobre, do ponto de vista das necessidades dos polinizadores. Para exemplificar: nas fazendas com produtividade orgânica, verifica-se que as comunidades de abelhas nativas fornecem serviços de polinização satisfatórios dispensando a polinização assistida. Em contraste, nas fazendas com sistemas convencionais de cultivo, distantes de formações de vegetação nativa, observa-se uma redução da diversidade e da abundância de abelhas nativas, resultando na insuficiência da polinização das culturas. Nesse cenário, um dos desafios que as abelhas enfrentam em paisagens agrícolas é a falta de fontes alimentares constantes ao longo da temporada. As culturas polinizadas por abelhas, como amêndoa, canola, ou melancia, podem fornecer algumas semanas de comida abundante. Contudo, a falta de plantas silvestres florescendo, antes e depois das culturas, pode resultar em um declínio da população de polinizadores. A diversidade de abelhas é frequentemente maximizada em paisagens onde 15 ou mais espécies de plantas com flores estão presentes no raio de ação de forrageamento (GAZZONI, 2015).

Ainda em termos de atividade agrícola e produção de mel, pensando no alimento das abelhas, o néctar pode ser contaminado por poluentes em um grau mais alto ou mais baixo, que vai depender das propriedades químicas da substância. Por ser um atraiante especial para as abelhas, colhido na flora de grandes áreas, é considerado um material transportador de poluentes. Assim, como a transformação do néctar em mel é principalmente um processo

de evaporação da água, os contaminantes presentes aumentam a concentração durante a formação do mel (BALAYIANNIS; BALAYIANNIS, 2008).

Tem-se notado, nos últimos anos, uma perda inexplicável de abelhas e depleções de colmeias. Esses fatos podem acontecer devido ao uso de sementes cobertas com pesticidas e aplicações desenfreadas de pesticidas para o controle de pragas. Essa questão revelou limitações e subestimação da exposição das abelhas após a aplicação do tratamento de sementes, falta de consideração adequada das toxicidades larvais e subletais e ausência de medidas de toxicidade crônica.

Para Galai *et al.* (2009), esse cenário coloca em risco a economia visada pela produtividade agrícola mundial. Por exemplo, em 2005, o valor econômico anual global da polinização foi estimado em 153 bilhões de euros. Ou seja, 95% do valor econômico total da produção agrícola mundial, considerando apenas as culturas usadas diretamente para a alimentação humana. Os autores propuseram um cálculo com objetivo de demonstrar a importância relativa da polinização por insetos, como importante insumo agrícola. Isso, considerando que a produção das culturas é apenas parcialmente reduzida na ausência de polinizadores. Suas respostas demonstraram vulnerabilidade alta para frutas (23%), vegetais (12%), nozes (31%), oleaginosas comestíveis (16%) e estimulantes (39%); considerada menor para leguminosas (4%) e especiarias (3%) e nenhuma vulnerabilidade para cereais, raízes, tubérculos e açucareiras.

Na América do Sul, estima-se que a polinização por insetos tenha um valor equivalente a € 11,6 bilhões (aproximadamente R\$ 37,12 bilhões). No Brasil, oito culturas dependentes da polinização geram de lucratividade cerca de R\$ 20,46 bilhões em exportações. Dentre as principais espécies polinizadas por abelhas no Brasil, destacam-se: cebola, caju, coentro, alface, girassol, canola, bacari, melancia, melão, pepino, mamona, pinhão manso, lavanda, afafa, feijão, soja, trevo, linho, acerola, algodão, maracujá, gergelim, amora preta, maçã, morango, pêssigo, café, limão, laranja, tangerina, pimentão e tomate (INÊS DA SILVA; FREITAS, 2015).

Mesmo a realidade sendo impactante, conforme demonstrado, a perspectiva de sustentabilidade entre atividade agrícola, polinização e apicultura, ainda se faz presente. O desenvolvimento sustentável da agricultura pode ocorrer visando à manutenção e preservação da polinização, por meio de práticas adotadas por agricultores. O pantio direto, por exemplo, fornece locais de nidificação e sobrevivência para abelhas; já a diversidade agrícola e de plantas não cultivadas permite a contínua oferta de alimentos e condições de habitat para as abelhas. Ademais, há o oferecimento de caminhos e estradas, as boas práticas agrícolas na utilização de pesticidas e a limitação das extensões contínuas de monoculturas (GAZZONI, 2015).

3.5 Pesticidas

Denominados também de agrotóxicos, agroquímicos, produtos fitossanitários ou defensivos agrícolas, são compostos manufaturados utilizados na agricultura com função de banir, prevenir ou reduzir os efeitos adversos causados pelas pragas agrícolas. Normalmente, são produtos orgânicos sintéticos com baixo peso molecular, baixa solubilidade em água e intensa atividade biológica. Sua utilização na agricultura visa a um aumento na produtividade, qualidade e redução de custos de mão de obra. A expansão da produção e utilização de pesticidas orgânicos sintéticos efetivou-se em meados de 1934, com os ditiocarbamatos, seguido pelo diclorodifeniltricloreto (DDT), maior representante e mais utilizado da classe dos inseticidas organoclorados. Posterior a esse composto, foram produzidos análogos, como o metoxicloro e outros, acarretando uma superprodução de pesticidas organoclorados com potentes ações de contato (PERES *et al.*, 2003; SILVA & FAY, 2004; TSIPI, BOTISTSI, ECONOMOU, 2015).

Dados da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos indicam cerca de 900 registros de produtos nomeados “pesticidas”, mesmo com a variação na produção de novos ingredientes ativos, com a entrada e retirada de produtos do mercado. Nota-se a permanência, em maior escala, de herbicidas, inseticidas, fungicidas e nematicidas. Dos ingredientes ativos, apenas 3,9% são de origem natural, isolados de plantas e organismos, 3,9% de produtos biológicos e 92% possuem registro com composição de produtos sintéticos (BARBOSA, 2004).

A nomenclatura adotada para os mais diversos tipos de pesticidas considera sua substância ativa, responsável pela capacidade de provocar a morte do organismo alvo. Essa pode corresponder a um produto químico natural ou sintético, obtido por meio de processos industriais. Na sua composição geral, entram, ainda, os chamados adjuvantes, os quais são substâncias sem atividade biológica, mas com capacidade de melhorar as características físico-químicas. Dessa forma, contribuem para o melhoramento da eficácia, persistência e segurança em relação ao uso. De maneira geral, são os pesticidas inorgânicos ou orgânicos, os quais, na atualidade, podem ser considerados os de maior importância, sendo naturais, como os piretroides, ou sintéticos, como os organoclorados, organofosforados, carbamatos e afins. Podem ser classificados em função da natureza do inimigo a combater, como acaricidas, fungicidas, inseticidas, bactericidas. Também, quanto ao número de substâncias ativas, sendo simples com uma substância ou mistura com duas ou mais substâncias ativas (AMARO, 2003). São também classificados quanto à família ou grupo químico, banidos ou ainda usados, a saber: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides e pirazóis.

Toda essa produção e geração de substâncias análogas e sintéticas formou uma problemática envolvendo questões sociais, ambientais e de saúde pública. Tal linha merece

destaque, já que existe um muro entre as informações conhecidas, quanto ao grau de contaminação e toxicidade desses compostos, em relação à saúde pública e ao ecossistema como um todo. Entrelaçado a isso, entra o entendimento e conscientização dos maiores responsáveis pela produção mundial de alimentos, os agricultores.

O uso desenfreado de pesticidas vem aumentando mundialmente, ocasionando prejuízos à biodiversidade (CONNOLLY, 2013). Desde 2008, por exemplo, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de pesticidas. Foram lançadas cerca de 673,9 mil toneladas de produtos ativos no ambiente. Em 2011, o consumo atingiu 853 mil toneladas, representando média de uso de 12 litros por hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de pesticidas por habitante (CARNEIRO *et al.*, 2012). Em 2014, esse consumo agrícola ultrapassou um milhão de toneladas e, em média, 5,2 quilos per capita de pesticidas foram usados. Em relação à área agrícola, de 1965 até 2004, o consumo nacional de pesticidas cresceu em 700%, sendo que a área agrícola cresceu somente 78% (INCA, 2015). De 1990 até 2016, o consumo nacional de pesticidas cresceu em 770%, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), sendo que a área agrícola do país cresceu somente 48%.

A primeira grande restrição ao uso de pesticidas motivada pela preocupação com a segurança dos polinizadores ocorreu em 1999, quando, na França, houve a suspensão do fipronil e do imidacloprido aplicado como tratamento de sementes em culturas de girassol, atraentes por polinizadores (SURYANARAYANAN; KLEINMAN, 2014). Em 2013, a United States Environmental Protection Agency (USEPA) ordenou a revisão de milhares de rótulos de pesticidas para reduzir a exposição aguda de abelhas aos neonicotinoides nas culturas que requerem serviços de polinização. Atualmente, a USEPA está empregando seu novo processo de avaliação de riscos para quatro inseticidas neonicotinoides como parte da reavaliação de 15 anos dos pesticidas registrados pela agência. Em janeiro de 2017, a USEPA lançou sua Política para Mitigar o Risco Agudo de Abelhas a Produtos Agrotóxicos, que afeta uma ampla gama de classes de pesticidas com foco no uso por aplicadores agrícolas. A política também encarrega agências estaduais e tribais de desenvolver planos voluntários de proteção gerenciada por polinizadores, reduzindo a exposição a pesticidas (FISHEL, ELLIS, MC AVOY, 2017).

As abelhas ou colônias de abelhas inteiras podem ser expostas a pesticidas por resíduos em diferentes matrizes ambientais, produtos apícolas e por meio de alimentos já contaminados. As abelhas que saem da colmeia podem estar em contato direto com pesticidas podendo ser transportado de volta para a colmeia, o que contamina as abelhas e a ninhada. Dessa forma, as forrageiras podem ser contaminadas: pelo consumo de gotículas de gutação das plantas; pelo contato com a poeira proveniente da semeadura de sementes tratadas e/ou pela inalação de compostos de alta pressão de vapor durante tratamentos de

pulverização. Por fim, as abelhas ainda podem ser contaminadas pelo consumo de néctar e/ou pólen contaminado por tratamentos via spray (RORTAIS *et al.*, 2017). A exposição a altas concentrações de um ou mais pesticidas por parte das abelhas forrageiras pode ocasionar a morte em massa, devido a efeitos neurotóxicos causados pelo contato. Contudo, níveis mais baixos de exposição podem prejudicar a capacidade das abelhas forrageiras de localizar recursos de néctar e pólen e devolvê-los ao ninho. Além disso, a exposição do desenvolvimento da ninhada a pesticidas pode reduzir a capacidade de forrageamento e a vida útil das abelhas adultas (TSVETKOV *et al.*, 2017).

Existem duas formas de absorção de pesticidas pelas abelhas, por contato ou oral. A avaliação de risco para a exposição por contato concentra-se nas abelhas forrageiras, que visitam o campo tratado ou áreas vizinhas no momento da aplicação do pesticida. É considerado um evento rápido e agudo (especialmente para formulações não sólidas), enquanto a exposição oral pode ser contínua e duradoura. Alimentos contaminados, pólen e néctar, carregados pelas abelhas, são armazenados e distribuídos na colmeia. Portanto, as exposições orais agudas e crônicas são relevantes para abelhas. Unido a isso, é considerado também um cenário de exposição oral crônica a ninhada (estágio larval) da colmeia. As abelhas forrageiras podem coletar água juntamente ao pólen e néctar, que também pode estar contaminada pelo pesticida. São três fontes diferentes de água que podem ser coletadas pelas abelhas, sendo fluido de gutação, água da poça e água de superfície. Essas fontes de água resultam em cenários de exposição substancialmente diferentes. Isso ocorre porque a concentração de pesticidas no fluido de gutação pode ser alta, mas a coleta e o uso dessas gotículas pelas abelhas são dependentes de fatores bióticos e abióticos. As culturas mostram variabilidade em termos de frequência e intensidade de gutação. A colheita de milho é considerada o pior cenário em termos de frequência, duração, intensidade de eventos de gutação e em termos de concentração de resíduos. Em geral, culturas mais jovens mostram os resíduos mais altos no fluido de gutação. Os fluidos de gutação podem ser relevantes tanto para os efeitos agudos (para os forrageiros quando coletam água de gutação) quanto para os crônicos (quando a água de gutação é usada para diluir o mel, por exemplo) (EFSA, 2013; REETZ *et al.*, 2011).

De forma geral, a exposição das abelhas a inseticidas prejudica o forrageamento (COLIN *et al.*, 2004), reduz a longevidade e peso das operárias e da rainha (PETTIS *et al.*, 2004); afeta a vitalidade da colônia (BELIEN *et al.*, 2009), dentre outras mudanças comportamentais e fisiológicas que dissimulam a sobrevivência das colônias. Efeitos subletais de diversos pesticidas ocasionam mudanças fisiológicas e no comportamento individual de abelhas (ALIOUANE *et al.*, 2009), além de alterações na fisiologia celular, devido ao estresse induzido por esses agentes (GREGORC e ELLIS, 2011).

Nas abelhas, a resistência individual a pesticidas inclui as barreiras mecânicas (cutícula, epiderme), barreira fisiológica (com mudanças de pH e outras mudanças químicas

do intestino das abelhas), sistema imunológico, entre outros (EVANS; SPIVAK, 2010). Além das rotas de exposição de contato e ingestão já mencionadas, o contato com a cera é outra rota que tem sido negligenciada, podendo induzir à interpretação errônea das causas de algumas perdas. Na pesquisa realizada por Johnson *et al.* (2010), fica evidente que os maiores resíduos de produtos da colônia são encontrados na cera, mesmo em colônias localizadas em áreas distantes daquelas da aplicação. Uma das grandes suspeitas de mortalidade e, mais frequentemente, de morbidade, em colônias localizadas em áreas livres de aplicação de pesticidas, recai sobre a cera advinda de áreas em que as colônias estiveram expostas a tais produtos. Após a troca e laminação da cera, as partículas permanecem, mesmo que em concentrações mais baixas, em comparação àquelas obtidas de colônias expostas diretamente aos pesticidas. Os apicultores têm o hábito, principalmente no Brasil, de reutilizar favos nos diferentes ciclos de produção, o que aumentaria a exposição ao longo do tempo.

No inverno de 2006/2007, nos Estados Unidos, surgiu uma síndrome caracterizada pelo agravamento da perda de abelhas operárias, com ausência de abelhas mortas no interior ou proximidades da colmeia, abandono das crias e alimento no ninho. Esse ocorrido foi denominado de *Colony Collapse Disorder* ou Distúrbio de Colapso das Colônias (CCD) acarretando, nesse período, a perda média de 45% das colmeias nos EUA (COX-FOSTER *et al.*, 2007; VANENGELSDORP *et al.*, 2009). Antes do surgimento da CCD, eram comuns as perdas anuais de até 10% das colmeias, índice que pode ser considerado normal (OLDROYD, 2007). No entanto, após a CCD, alguns países da Europa registraram perdas de até 50% dos seus enxames (CONTE *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, durante o inverno de 2012-2013, a CCD ocasionou a perda de 31,1% das colmeias (KAPLAN, 2020). As principais causas relacionadas ao aparecimento da CCD, que vêm sendo investigadas, incluem: a radiação por telefones celulares; cultivo de plantas geneticamente modificadas; disseminação de doenças causadas por vírus; microrganismos e parasitas; mudanças climáticas; destruição da flora nativa; nutrição inadequada e uso indiscriminado de pesticidas, sendo o último item o mais destacado nos últimos anos (RATNIEKS; CARRECK, 2010).

No Brasil, em termos de perdas de colônias de *Apis mellifera*, independentemente do fato causador, não houve registros científicos até os anos 2000, com exceção de perdas ocorridas devido à indisponibilidade de recursos naturais (secas prolongadas), manejo inadequado (em especial, relacionados à manutenção de rainhas improdutivas, entre outros fatores) ou em razão do pólen tóxico de barbatimão (*Stryphnodendron* spp.). A partir de 2007, já iniciaram alguns registros de perdas de colônias (colapso ou declínio) em jornais e revistas não científicos. Em 2010, foi levantada a possibilidade de CCD em abelhas africanizadas no município de Altinópolis, SP. As características eram semelhantes às descritas pelos americanos, crias amareladas, amarronzadas e com aparência anômala (abdômen retraído e ressecado). Os apiários estavam em área de plantio de cana-de-açúcar e eucalipto, com

considerável uso de neonicotinoides e fipronil. Houve também constatações de *V. destructor*, *N. ceranae* e de diversos outros patógenos (PIRES *et al.*, 2016).

Chauzat *et al.* (2009) desenvolveram uma pesquisa em campo com *Apis mellifera* a fim de visualizar danos subletais de pesticidas as colônias, incluindo matrizes como mel, pólen e cera. O resíduo mais frequente nas cargas de pólen, mel e matrizes de abelhas foi imidacloprido. Com médias de $1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ em abelhas, $0,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ em pólen e $0,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ em mel. As concentrações médias de fipronil foram de 0,5 nas abelhas e de $1,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas cargas de pólen e não foi detectado no mel. Os resíduos de fipronil no pólen foram estatisticamente associados à presença nas abelhas, sendo que, quando detectados nas cargas de pólen, havia sete vezes mais chances de serem detectados também nas abelhas. A mortalidade das colônias no inverno foi de 7,3%, em 2003, 9,2%, em 2004, e 5,8%, em 2005. A mortalidade sazonal foi de 6,7%, em 2003, 10,8%, em 2004, e 7,6%, em 2005. Os resíduos de imidacloprido foram a molécula mais frequentemente detectada nas cargas de abelhas, mel e pólen, embora em baixas concentrações.

A redução das concentrações de resíduos de pesticidas em pólen e subprodutos das abelhas, como mel, cera, própolis e geleia real, pode ser explicada por Wallner (1999). Quando em contato com os ingredientes ativos, as abelhas reagem aumentando a absorção de alimentos não contaminados, diminuindo a concentração dos ingredientes ativos no saco de mel, por meio da diluição da toxina. Na colmeia, elas regurgitam uma porção do alimento contaminado para as células, contaminando seu interior e paredes. Essa transferência de fora da colmeia para dentro da colônia, por meio de insetos individuais, diminui a concentração de pesticidas, por isso, as abelhas são consideradas como filtros naturais.

Em termos de uso de pesticidas, além da taxa e frequência de aplicação, os meios e a magnitude da contaminação são totalmente dependentes de elementos, como a metodologia, o tempo de aplicação e a cultura tratada. Parâmetros abióticos, a exemplo da composição da paisagem e das condições climáticas, também podem ter um efeito significativo na exposição dos pesticidas nas abelhas. Além disso, em paisagens dominadas por culturas, as plantas não cultivadas são uma importante fonte de pólen e néctar para as abelhas. Essas matrizes podem ser contaminadas por uma infinidade de pesticidas e, portanto, representam uma rota de exposição a pesticidas para abelhas durante toda a temporada. Concomitantemente, as propriedades físicas e químicas do pesticida também influenciam a intensidade e a duração da exposição e, finalmente, a toxicidade (LONG & KRUPKE, 2016).

Sabendo da demanda da produção de alimento, atrelada à necessidade de polinização na agricultura, o uso desenfreado de pesticidas e a queda mundial de polinizadores, temos a necessidade de proteção das abelhas para a garantia de sustentabilidade dessa questão. Segundo inferências na regulamentação de pesticidas da Comissão Europeia de 2009, os objetivos de proteção são definidos como a ausência de efeitos inaceitáveis no meio

ambiente, especialmente, aqueles impactos em espécies não-alvo, englobando comportamento, biodiversidade e ecossistema. Para as abelhas, especificamente, o regulamento estabelece que uma substância só deve ser aprovada para produção, se resultar em exposição insignificante ou ausência de efeitos agudos ou crônicos, impactos inaceitáveis à sobrevivência e desenvolvimento da colônia, incluindo os efeitos para as larvas e comportamento das abelhas.

Em termos de proteção, quanto ao uso e consumo de pesticidas e alimentos contaminados, órgãos competentes estabelecem os chamados Limite Máximo de Resíduos (LMR), responsáveis pela preservação do meio ambiente. No Brasil, os LMRs são estabelecidos pela ANVISA. A FAO é um órgão da ONU que também estabelece LMRs. Nem todas as matrizes são contempladas nos órgãos competentes. Alemanha, Itália e Suíça ajustaram o LMR para amitraz, bromopropilato, coumafós, ciamizol, flumetrina e fluvalinato, que oscilaram entre 0,01 e 0,1 mg kg⁻¹. Na Alemanha, 5 e 500 mg kg⁻¹ na Suíça, e 10 mg kg⁻¹ na Itália. Na legislação da união europeia, o LMR, para os acaricidas, amitraz, coumafós e ciamizol, em 0,2, 0,1, e 1 mg kg⁻¹, respectivamente. A Agência de Proteção Ambiental dos EUA estabeleceu LMR para amitraz (1 mg kg⁻¹), coumafós (0,1 mg kg⁻¹) e fluvalinato (0,05 mg kg⁻¹) (RISSATO, 2006). Dados da pesquisa de Saibt (2017) mencionam LMR para as matrizes mel, pólen apícola e geleia real, pela União Européia, sendo para fipronil 0,005 mg kg⁻¹ e imidacloprido 0,05 mg kg⁻¹.

Os parâmetros físico-químicos para méis brasileiros estão bem definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel, revoga a Portaria nº 367 de 04/09/1997. O regulamento estabelece a definição, classificação, designação, composição e requisitos quanto às características físico-químicas, sensoriais, condições de acondicionamento, aditivos, contaminantes, condições higiênicas (critérios macroscópicos e microscópicos) pesos e medidas, rotulagem, amostragem e definição de métodos de análises que devem ser seguidos. A legislação vigente (Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000) apresenta como parâmetros mínimos de qualidade físico-química a determinação de indicativos de maturidade (açúcares redutores, sacarose aparente e umidade), de pureza (sólidos insolúveis em água e minerais) e de deterioração (acidez, atividade diastásica e hidroximetilfurfural) (BRASIL, 2000).

Os parâmetros físico-químicos do mel conferem, além da qualidade, a caracterização regional do mel. Consideram a diversidade botânica, a variação do solo e clima de cada região. Nesse quesito, o Brasil destaca-se sobre outros países; aqui, o mel pode ser produzido o ano todo com grande diversidade florística, o que, em outros países, é impossível devido às características do clima (MARIA DA SILVA *et al.*, 2014).

A Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, acata o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando a rotulagem nutricional

obrigatória, inclusive, para o mel (BRASIL, 2003). A Portaria nº 50 de 20 de fevereiro de 2006 do MAPA aprova programas de controle de resíduos em vários produtos. O programa inclui o monitoramento de resíduos de antibióticos no mel (BRASIL, 2006). A Instrução Normativa nº 9, de 30 de março de 2007, do MAPA, retifica os programas para o ano de 2007 e prevê a execução de análises; além dos antibióticos, há a determinação de LMR para vários tipos de pesticidas, como compostos halogenados, organoclorados, carbamatos, piretroides e organofosforados (BRASIL, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Limite máximo de resíduo de pesticidas em mel

Classe	Composto	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g mL}^{-1}$)
Halogenados e Organoclorados	Aldrin	10
	Alfa-endosulfan	10
	4,4-DDE	10
	4,4-DDD	10
	4,4-DDT	10
	Dodecacloro	10
	Endrin	10
	Iprodiona	50
	Tetradifona	20
	Captana	50
	Lindane	10
	Vinclozolina	20
Carbamatos e Piretróides	Permetrina	64,6
	Ciflutrina	44
	Fenpropatrina	10
	Deltametrina	33,8
	Carbofurano	82
	Carbaril	37
Organofosforados	Pirimifós metil	36
	Clorpirifós	24,3
	Dimetoato	20
	Dissulfoton	10
	Paration	36,9
	Femamifós	17,1
	Terbufós	13
	Profenofós	36

LRM (Limite Máximo de Resíduo).

A ANVISA (2018) estabeleceu LMR de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal para várias matrizes, como ovino, caprino, aves, peixes, bovinos, mel, entre outros. Para o mel, constam somente o carrapaticida amitraz e cumafós, com $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ de LMR, respectivamente. Algumas classes de pesticidas, como os pirazóis e neonicotinóides, não estão contemplados na Normativa do MAPA (Tabela 1). Entretanto, são os maiores vilões na cadeia produtiva de mel e vêm sendo os maiores responsáveis por

colapsos em colônias de abelhas em todo mundo. O fenilpirazol fipronil e o neonicotinoide imidacloprido são considerados os mais tóxicos para as abelhas, assim, mostram a necessidade de serem analisados e do estabelecimento do LMR para o mel. O impacto que causam nas abelhas pode e é transferido para o mel, que é consumido por seres humanos. O grau de toxicidade para ambos é altamente tóxico, classificado pela ANVISA, causando impactos de gravidade considerada para o ambiente, abelhas e seres humanos.

O relatório do Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA, 2016), realizado de 2013 a 2015, pesquisou 12.051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal. Eram coletados em estabelecimentos varejistas, localizados nas capitais de todo o território brasileiro. Foram pesquisados 232 pesticidas diferentes nas amostras monitoradas. Do total, 5.062 (42,0%) não apresentaram resíduos dentre os pesticidas pesquisados e 4.618 (38,3%) apresentaram resíduos dentro do LMR, estabelecido pela ANVISA. Cerca de 2.371 amostras (19,7%) foram consideradas contaminadas, sendo que 362 dessas amostras (3,00%) apresentaram concentração de resíduos acima do LMR e 2.211 (18,3%) evidenciaram resíduos de pesticidas não autorizados para a cultura. De todos os pesticidas pesquisados, 98 não foram detectados nos alimentos monitorados. Ou seja, foram detectados resíduos de 134 pesticidas diferentes nas 12.051 amostras analisadas, resultando em 22.721 detecções. Os pesticidas carbendazim, acefato, ditiocarbamatos e tebuconazol apresentaram o maior índice de detecções. Carbendazim e imidacloprido apresentaram o maior número de detecções que excederam o LMR.

3.5.1 Inseticidas sistêmicos

De modo geral, os inseticidas mais usados, em todo o mundo, são de ação sistêmica. Dominam cerca de 1/3 do mercado mundial, perfazendo um consumo de 30% (JESCHKE *et al.*, 2011). Os inseticidas sistêmicos são aplicados como revestimento de sementes, imersões, pulverizações foliares, aplicações nos sulcos do solo antes do plantio e injeções nos caules e troncos. São usados para o controle de pragas em várias culturas agrícolas, no estoque de grãos, na horticultura, nos reflorestamentos, na silvicultura e na conservação da madeira. Também, são amplamente usados para controlar doenças causadas por insetos e vetores em animais domésticos, na aquicultura, no controle de pragas e insetos urbanos (SIMON-DELISO *et al.*, 2015). Esses compostos altamente tóxicos, também, potencializam seus efeitos quando misturados a outros pesticidas. Tal fato não tem sido considerado pelos usuários, apesar de que o modo de ação, o sinergismo e os mecanismos tóxicos de ação estejam sendo cientificamente documentados. Por serem persistentes no solo, solúveis em água, de fácil manejo, com menor custo/benefício e altamente eficientes, os inseticidas sistêmicos ganharam mercado e notoriedade no agronegócio, em milhares de experimentos e artigos científicos (CASTILHOS, 2018).

É conhecida a altíssima eficiência dos inseticidas sistêmicos para a melhoria da produtividade agrícola, mas a seletividade dos organismos a serem combatidos os tornam questionáveis. Isso porque sua ação é devastadora também para os organismos não-alvos e para o meio ambiente. Os efeitos negativos do uso dos inseticidas sistêmicos sobre os biomas e seus organismos, populações, comunidades e ecossistemas, ainda, são pouco conhecidos (BERNHARDT *et al.*, 2017). Sabe-se que apenas 5% dos seus ingredientes ativos são aproveitados pelas plantas e o restante é disperso no meio ambiente (WOOD; GOULSON, 2017). Assim, o uso indiscriminado resultou na contaminação generalizada de solos agriculturáveis, recursos hídricos, manguezais, vegetação não-alvo, estuários e sistemas fluvio-deltaicos, o que ocasionou exposição de modo letal e subletal a esses elementos, provocando o declínio e desaparecimento progressivo (CHAGNON *et al.*, 2015).

Cerca de 90% dos inseticidas possuem ação neurotóxica, que prejudica a transmissão dos impulsos nervosos nos organismos intoxicados. A condução do impulso nervoso ao longo das células nervosas é dependente da concentração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- . Logo, para que ocorra a propagação dos estímulos nervosos entre as sinapses, é necessária a ação de neurotransmissores. A acetilcolina e o ácido gama amino butírico (GABA) são os principais neurotransmissores dos insetos (DOWSON, 1977; PEREIRA, 2010). A acetilcolina atua nas extremidades nervosas pré-sinápticas, ligando-se à célula pós-sináptica e ao receptor do canal iônico, permitindo a passagem trans membrana de íons Na^+ e K^+ . A despolarização resultante da membrana pós-sináptica desencadeia a contração muscular ou inicia o potencial de ação no neurônio pós-sináptico (LEHNINGER *et al.*, 1996). Grande parte dos inseticidas possui ação específica sobre esse neurotransmissor. Normalmente, o GABA atua como inibidor do estímulo nervoso na membrana pós-sináptica, reestabelecendo o estado de repouso do sistema nervoso central e muscular, o que aumenta a permeabilidade da membrana aos íons Cl^- .

Quanto aos mecanismos de ação, os pesticidas sistêmicos, assim como muitos dos seus metabólitos tóxicos são absorvidos pelas raízes e folhas, transportados para todas as partes da planta. Isso torna a planta tóxica para os insetos nocivos às culturas agrícolas que estão sendo tratadas. Os pesticidas sistêmicos agem na transmissão neural do sistema nervoso central dos invertebrados. Os neonicotinoides imitam a acetilcolina e se ligam aos receptores de nicotina-acetilcolina (nAChRs) agressivamente (JESCHKE; NAUEN, 2008), ao passo que os pirazóis bloqueiam os receptores GABA dos canais de cloro (GUNASEKARA *et al.*, 2007). As duas classes de inseticidas sistêmicos são letais aos organismos alvos e não-alvos e desencadeiam uma série de efeitos adversos subletais em invertebrados e vertebrados (GIBBONS *et al.*, 2014).

A persistência dessas substâncias no solo, cursos de água e plantas não-alvos é variável, mas pode ser longa. A meia vida de alguns pesticidas sistêmicos no solo pode passar de 1.000 dias e, em plantas lenhosas, podem ultrapassar a um ano (BONMATIN *et al.*, 2015).

Essa combinação de exposição ao longo do tempo e a solubilidade em água tem causado uma contaminação em larga escala (HLADIK; KOLPIN, 2015).

As inúmeras formas de intoxicação crônica e aguda aos pesticidas sistêmicos colocam em risco, como já destacado anteriormente, os polinizadores, como ênfase para as abelhas. Elas estão em contato direto com esses elementos desde a semeadura, por meio da poeira das sementes revestidas, na coleta do pólen, do néctar, da gutação, da água e das resinas. Pesquisas feitas sobre estocagem de alimento em colônias de abelhas em vários biomas do planeta mostraram que as abelhas são sistematicamente contaminadas pelos inseticidas sistêmicos e seus metabólitos. As concentrações variam em até 100 ppbs (partes por bilhão), geralmente, com interações com outros pesticidas, em muitos casos, conhecidos por apresentarem sinergismo com os inseticidas sistêmicos (CASTILHOS, 2018).

Estudos recentes consideram que as aplicações de inseticidas sistêmicos não oferecem ganho real e até mesmo, em certas culturas, apresentam prejuízos econômicos (STEVENS; JENKINS, 2014). Essa afirmação coloca em xeque os sistemas de produção e aprovação de novos pesticidas, como também sistemas de avaliação de riscos ecológicos, que não abrangem a interação entre vários pesticidas e nem mesmo a longos prazos. Somado a isso, fica evidente a falta de fiscalização na utilização e no método de aplicação. Todas essas características mostram como a realidade dos pesticidas é diferente daquela conhecida pelos agricultores e deixa nítida a necessidade de pesquisas voltadas a esses fatos. Além disso, é necessário o desenvolvimento de estudos que visem avaliar o destino, no ambiente, desses compostos tóxicos, que ainda são desconhecidos.

A toxicidade dos pesticidas para as abelhas é determinada por meio da DL_{50} (dose letal capaz de ocasionar a mortalidade de 50% de uma população em um período de 24 ou 48 horas) (PEREIRA, 2010). Johansen e Mayer (1990) afirmam que os pesticidas que apresentam DL_{50} inferior a $2 \mu\text{g abelha}^{-1}$ são considerados altamente tóxicos às *A. mellifera*. Quando os recursos coletados pelas abelhas têm concentrações de pesticidas superiores ou iguais a DL_{50} , ocorre a contaminação aguda das abelhas, que ocasiona a mortalidade em curto espaço de tempo. Já as pequenas doses, inferiores à DL_{50} (subletais), podem ser levadas às colmeias, desencadeando mudanças fisiológicas e comportamentais para as abelhas, o que compromete o bem-estar, produtividade e a manutenção das colônias (MIRANDA *et al.*, 2003).

3.5.2 Pirazóis - Fipronil

Pirazóis são pertencentes à família dos 1,2-azóis. Azóis são heterocíclicos aromáticos pentagonais contendo um ou mais átomos de nitrogênio (N), com estrutura química em anel: dois átomos de nitrogênio (pirazol) (Figura 7 a), um átomo de oxigênio e um de nitrogênio

(isoxazol) (Figura 7 b). Além disso, há grupos radicais nas posições 1, 3, 4 e 5 com diferentes funcionalidades (FUSTERO *et al.*, 2011).

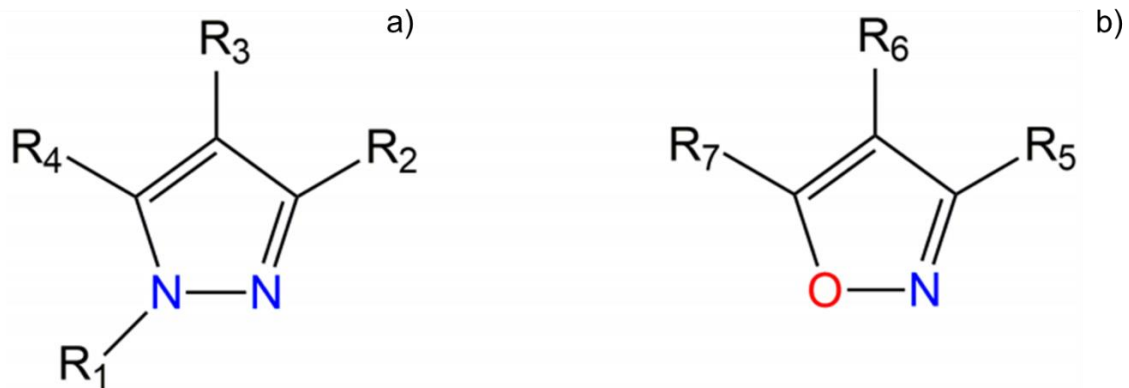


Figura 7. Estrutura química geral compostos heterocíclicos: a) pirazóis; b) isoxazol.
Fonte: Rufino (2018).

Essas peculiaridades estruturais fornecem ao grupo uma ampla variedade e propriedades físicas, químicas e biológicas relevantes para a indústria química, agroquímica e farmacêutica. O avanço do desenvolvimento de medicamentos levou pesquisadores a arquitetarem estruturas moleculares cada vez mais compostas, utilizando componentes heterocíclicos contendo nitrogênio. É aí que entram os pirazóis e seus derivados, fornecendo viabilidade para a descoberta de medicamentos. Em termos de agricultura, são amplamente utilizados como herbicidas, inseticidas e acaricidas (ANSARI *et al.*, 2017).

De acordo informações disponíveis na ANVISA (2019), o fipronil é representado pelo Cas Number 120068-37-3, com fórmula bruta $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ e estrutura química representada pela Figura 8.

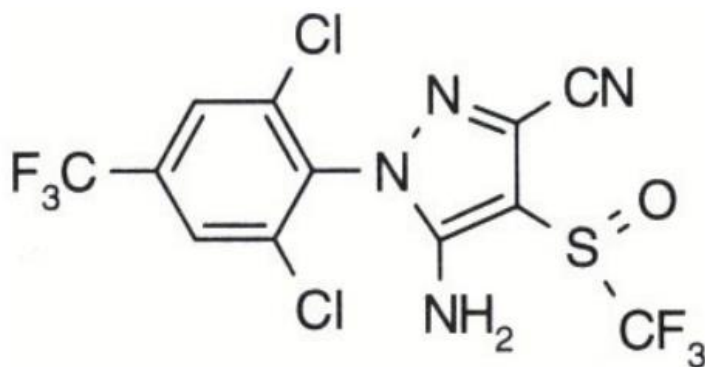


Figura 8. Estrutura química molecular do Fipronil.
Fonte: ANVISA, 2019.

Pertencente à classe dos pirazóis (fenil-pirazol), é considerado um inseticida, cupinicida e formicida, englobando-se na classe II (altamente tóxico) em termos de toxicidade. Pode ser caracterizado como um composto de contato e ingestão, com consequências que variam de espécie para espécie. De forma geral, pode ser aplicado no solo, em regiões foliares, em sementes e água de irrigação. Esse inseticida foi sintetizado pela Rhône Poulenc

Ag Company, atual Bayer Crop Science, em 1987. Lançado em 1993 e registrado nos EUA, em 1996, sendo considerado um inseticida que age por meio de mecanismos diferentes dos demais, não contamina as águas subterrâneas (BOBÉ *et al.*, 1998). É um praguicida sistêmico que penetra nos sistemas floemático e xilemático das plantas. Pode ser usado como inseticida preventivo de pulverização foliar ou aplicado nos sulcos da terra antes que as sementes sejam plantadas. Dessa maneira, a planta passa a ter uma proteção sistêmica preventiva contra as pragas antes mesmo que elas eventualmente surjam (SIMON-DELSO *et al.*, 2015).

O fipronil é considerado um composto de baixa polaridade à água; prefere matrizes lipofílicas (orgânicas), como lipídios, óleos, lignina, proteínas e solventes orgânicos, sendo estável à temperatura ambiente. É mais denso do que a água, portanto, não volátil, e é degradado, principalmente por fotólise. Tem sensibilidade à hidrólise em condições alcalinas e possui taxas de degradação microbiana variadas, dependendo das condições do ambiente. A deriva pelo ar do fipronil é considerada baixa, todavia, o modo de aplicação, que normalmente é em spray ou via aerossol, pode dispersar as partículas. Muitos insetos são altamente sensíveis ao fipronil em doses baixas, sendo extremamente tóxico para as abelhas, altamente tóxico para organismos aquáticos e tóxico para organismos vertebrados. A persistência ambiental varia de baixa à moderada, dependente dos processos de fotólise, hidrólise, sorção e volatilização. O fipronil pode ser formulado como um sólido (isca para insetos), spray/líquido ou como produto granular; tudo isso influencia seu destino ambiental (GUNASEKARA *et al.*, 2007).

A ligação do fipronil com os receptores GABA é diferente nos vertebrados se comparados aos insetos que possuem os receptores neuronais mais estreitos, tornando-o mais agressivo e fatal aos invertebrados (NARAHASHI *et al.*, 2010). Agindo do mesmo modo que os carbamatos e organofosforados, o fipronil atua sobre os receptores inibidores do sistema nervoso. Ele se liga aos receptores GABA e aos de glutamato, específicos dos invertebrados, fechando os canais de cloro. Assim, o fipronil bloqueia os receptores inibidores, ocasionando uma excitação do sistema nervoso. Ou seja, provoca uma hiperexcitação neuronal, devido à acumulação do neurotransmissor (GABA) nas junções sinápticas. O mecanismo de ação do fipronil é antagonista, enquanto os neonicotinoides são agonistas. Os receptores de glutamato afetados são específicos dos insetos, razão pela qual o fipronil é mais eficaz em invertebrados do que em vertebrados (CASTILHOS, 2018). O fipronil é capaz de provocar hiper-excitação, convulsões e paralisia, ocasionando a morte de insetos. Os neurônios imunorreativos do tipo GABA são amplamente distribuídos no cérebro das abelhas e estão agrupados no gânglio do tórax das himenópteras e ortópteros (WILDMAN; OTT; BURROWS, 2002). O bloqueio de receptores GABA em insetos pode prejudicar a atividade locomotora. O fipronil em doses subletais pode afetar a percepção gustativa, a aprendizagem olfativa e a função motora na abelha (EL HASSANI *et al.*, 2005).

Valores de DL_{50} de ingestão do inseticida fipronil em abelhas melíferas variam de 0,00327 a 0,23 $\mu\text{g abelha}^{-1}$; e as DL_{50} de contato encontradas estão entre 0,000157 a 0,013 $\mu\text{g abelha}^{-1}$ (MAYER; LUNDEN, 1999). As diferenças nos valores de DL_{50} obtidas para um mesmo pesticida são atribuídas a diversos fatores que influenciam os testes, como a variabilidade genética de cada população de abelhas testada, variações climáticas locais e manipulação do pesquisador (PEREIRA, 2010).

Esse inseticida é amplamente usado nas culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo. Quando comparado ao malation, inseticida organofosforado, utilizado nas mesmas culturas, é considerado mais eficaz e mais tóxico para alguns insetos, ou seja, é mais vantajoso. Quanto à sua aplicação, a concentração indicada para o fipronil é de 0,005 mg L^{-1} , enquanto para o malation é de 0,6 mg L^{-1} . Contudo, a vantagem atribuída ao fipronil, pela sua toxicidade mais pronunciada, pode acometer um maior comprometimento ambiental, visto que doses muito baixas eficientes para o aniquilamento de pragas podem atuar, com a mesma efetividade, sobre organismos não alvos. Esse foi um dos fatos que acordou para a proibição do uso de fipronil nos países da Europa, mas, mesmo assim, é largamente utilizado no Brasil (TINGLE *et al.*, 2003). Nacionalmente, o fipronil apresenta autorização da ANVISA para comercialização em diversas formulações, incluindo: isca granulada – Blitz® (0,03 g kg^{-1}), usada como formicida com aplicação terrestre; suspensão concentrada – Standak® (250 g L^{-1}), usado no tratamento de sementes; granulado – Regent® 20 G (20 g kg^{-1}), com aplicação no solo; granulado dispersível - Regent® 800 WG (800 g kg^{-1}), com aplicação terrestre e aérea; suspensão concentrada - Klap® (200 g L^{-1}), com aplicação terrestre e aérea. Também, é utilizado em formulações de produtos inseticidas no campo da veterinária, para o controle de pulgas e carrapatos em cães e gatos. Normalmente, é aplicado nos pelos, tendo sua ação prolongada pelo efeito reservatório nas glândulas sebáceas. O fipronil não é transportado pela corrente sanguínea, caracterizando-o como pouco tóxico e indicado para uso em pequenos animais.

O fipronil é considerado estável, na falta de metabólitos iônicos e em temperaturas moderadas, por cerca de um ano no solo. Em condições aeróbicas, com temperaturas de 22° C a 25°C, tem meia-vida de 18 a 308 dias, mesmo com pequenas variações decorrentes do tipo de solo, do pH e da matéria orgânica onde foi aplicado. No ambiente, o fipronil pode ser degradado em diversos metabólitos designados por siglas como: MB 46513 (desulfinil-fipronil – considerado metabólito mais persistente cerca de 420 h); MB 46136 (sulfone-fipronil); MB 45950 (sulfide-fipronil) e RPA 200766 (amide-fipronil), dentre outros. O fipronil degrada-se mais rapidamente em regiões tropicais, formando o metabólito, decorrente da fotodegradação, desulfinil (MB 46513 - destrofipronil). Em solos tropicais, a meia-vida do fipronil é de 36 horas, com degradação de 75% do composto após três dias da aplicação. A fotólise, volatilização, dissolução e hidrólise são os processos que mais contribuem para a dissipação do fipronil em campo. Contudo, não está esclarecido se as vias de dissipação

fotolítica efetivam-se de forma direta ou indireta (PEI *et al.*, 2004). O dessulfínil apresenta atividade toxicológica maior que o fipronil. Comercialmente, deve ser protegido da luz devido à rápida conversão via fotólise em dissulfínil.

Considerando as altas doses do fipronil utilizadas em cultivos agrícolas e sua alta persistência no ambiente, esse inseticida é um risco aos polinizadores. A exposição direta dos polinizadores a altas doses (superiores ou iguais à LD₅₀), durante a pulverização, pode resultar em sua morte imediata, devido à alta toxicidade do ingrediente ativo. Além dos efeitos agudos, a comprovada ação sistêmica do fipronil faz com que cultivos tratados, durante o plantio ou fora do período de floração, apresentem resíduos desse inseticida ou de seus metabólitos no pólen e néctar (TRAPP; PUSSEMIER, 1991). Como consequência, as abelhas polinizadoras podem degustar a exposição crônica a esse inseticida. Elas coletam recursos contaminados com doses subletais e os armazenam nas colmeias, afetando o desenvolvimento e sobrevivência das colônias em longo prazo (JOHNSON *et al.*, 2010).

Em doses subletais, o fipronil pode afetar a percepção gustativa e o aprendizado olfatório das abelhas, que são funções essenciais no forrageamento desses insetos (EL HASSANI *et al.*, 2005). Deve-se também considerar que, na maioria dos cultivos agrícolas, ocorrem aplicações subseqüentes de um ou mais pesticidas e outros produtos, visando combater diferentes pragas. Assim, os recursos coletados pelas abelhas podem ser contaminados por diversas substâncias, que geram combinações, provocando consequências ainda mais negativas às abelhas (GILL *et al.*, 2012). A atividade motora é importante para o forrageamento e orientação das abelhas, utilizada para indicar a localização de fontes de recursos para a colônia, que pode ser afetada por inseticidas (EL HASSANI *et al.*, 2005).

Renzi *et al.* (2016) avaliaram a toxicidade crônica do fipronil, em comportamentos fisiológicos nas abelhas *A. mellifera*, combinadas e/ou isoladas a esporos de *Bacillus thuringiensis*. As abelhas foram expostas por 10 dias a esporos da bactéria a 100 e 1000 µg L⁻¹ e fipronil a 1 µg L⁻¹, isoladamente ou em combinação, e a mortalidade foi registrada por um período total de 25 dias. A taxa de sobrevivência foi superior a 95% até 10 dias e permaneceu acima de 85% até o 25º dia de observação, para todos os grupos de tratamento. Na avaliação do comportamento alimentar, não houve respostas significativas sob qualquer condição, separada ou conjunta. A coexposição a um estressor químico como o fipronil não desencadeia nenhuma resposta aditiva para a sobrevivência, o que indica que o uso de *Bacillus thuringiensis* tem baixo impacto no caso de uma exposição combinada com fipronil. Contudo, o fipronil é capaz de modular os efeitos fisiológicos provocados por esporos da bactéria, mesmo quando não têm um efeito aparente por si só. Os resultados mostram alterações claras no funcionamento da cabeça e do intestino das abelhas. Tal resultado confirma que esse pesticida pode interagir em baixas concentrações com outros estressores ambientais.

Estudos demonstram que as abelhas entram em maior contato com pesticidas acumulados nas colmeias durante o inverno. Ficam mais susceptíveis ao ataque de parasitas, como o ácaro *V. destructor* e outros patógenos, que podem se desenvolver no mesmo período (DECOURTYE *et al.*, 2003; VANENGELSDORP *et al.*, 2009). O maior tempo de exposição das abelhas a pesticidas em doses subletais durante inverno é evidente pelo acúmulo dessas substâncias no corpo gorduroso das abelhas. No inverno, elas são quatro vezes mais suscetíveis ao efeito de pesticidas em doses subletais (DECOURTYE *et al.*, 2003). A toxicidade dessas doses subletais do fipronil pode estar relacionada ao desaparecimento das abelhas, principalmente em períodos de inverno, quando se observa o maior número de perdas de colmeias (KAPLAN, 2020).

Pedro (2008) sugere que a persistência da ação do fipronil sobre sistemas biológicos é contínua, mesmo quando se interrompe a exposição ao composto. Essa persistência pode estar relacionada com os metabólitos formados pela degradação, principalmente os derivados da fotólise. Além disso, afirma uma possível ação genotóxica para plantas não alvo, evidente para as menores concentrações, indicando um perigo para acúmulos residuais dispostos no ambiente. Assim, sugere-se que o fipronil apresenta uma maior permeabilidade celular quando em baixas concentrações, por não sinalizar a célula de sua toxicidade. Nas maiores concentrações, esse potencial seria reconhecido, havendo um impedimento da entrada do produto na célula. Logo, os resíduos de fipronil podem ser considerados perigosos para espécies vegetais não alvo, principalmente, quando expostas às baixas concentrações, decorrentes de aplicações nas culturas, que sofrem lixiviações. A USEPA afirma que o fipronil é estável para hidrólise em águas com pH de 5 a 7 (ligeiramente ácidas), em condições de ausência de luz. Em soluções aquosas, sem a presença de luz e em ambientes com temperatura de aproximadamente 22°C, 80% do inseticida permanece inalterado por 100 dias.

El Hassani *et al.* (2005) avaliaram o efeito de doses subletais do fipronil em abelhas *Apis mellifera* em laboratório. Levaram em consideração a exposição via oral ou absorvida topicamente por meio da atividade locomotora, sensibilidade à sacarose e aprendizado olfativo. Puderam observar que o fipronil não teve efeito na atividade locomotora, independentemente da via de exposição. No entanto, o método de aplicação, oral ou tópico, teve um efeito no comportamento. Uma gota de solução no tórax das abelhas induziu uma redução na mobilidade em comparação com as abelhas que bebiam o mesmo volume de solução. Doses superiores a 1 ng g⁻¹ de fipronil em solução contendo sacarose causam uma diminuição à sensibilidade das abelhas em relação à percepção de sacarose. Quanto ao processo de aprendizagem, a aplicação tópica de 0,5 ng de fipronil prejudicou a formação do traço de memória; em contrapartida, por via oral, não foram observadas diferenças significativas. Em níveis de mortalidade, a aplicação de fipronil em até 48 hrs de avaliação aumentou a taxa significativamente.

A sensibilidade à sacarose é importante para a tomada de decisões de forrageamento e organização da divisão do trabalho dentro de uma colmeia. Durante o processo de forrageamento, ocorre uma fase de aprendizado, ou seja, as características florais (odor, cor e forma) são associadas à recompensa do néctar. Assim, ao oferecer concentrações crescentes de sacarose para determinar qual delas provoca a extensão da probóscide, pode-se inferir o limiar de resposta de uma abelha individual (SCHEINER *et al.*, 2004). Nesse sentido, Bernadou *et al.* (2009) avaliaram a extensão da probóscide de abelhas a um estímulo de sacarose em apenas uma antena, para afirmar que não há transferência de informações de um lado para o outro. Após essa confirmação, realizaram os mesmos testes injetando uma concentração não letal de fipronil no tórax das abelhas (5 ng abelha^{-1}), 15 minutos antes de iniciar os testes. Comprovaram que o fipronil diminuiu o sucesso da aquisição e os desempenhos subsequentes da memória. Contudo, a distribuição das respostas aos estímulos táteis entre os lados permaneceu não afetada. Afirmam, também, que, mesmo os efeitos não sendo letais às abelhas em teste, há uma lacuna importante, que é a implicação desse contato com o fipronil em uma colônia (processos de amplificação). Isso porque comportamentos sociais, como divisão do trabalho e atividade de forrageamento em abelhas, dependem de fatores internos no nível individual (BEN-SHAHAR *et al.*, 2003; SCHULZ, ROBINSON, 2001).

Mayer e Lundem (1999) afirmam que, após 24 horas de aplicação do fipronil, a mortalidade das abelhas expostas diminuiu. Além disso, as abelhas deixam de procurar as flores onde foi aplicado o inseticida, devido à alta sensibilidade que possuem em seus órgãos olfativos (efeito inibidor do GABA que o inseticida promove). Isso ocasiona um déficit nas funções cognitivas do inseto. Dessa forma, não há passagem de informação e nem aprendizagem do local onde o recurso alimentar está disponível.

Na França, perdas de até 40% das colmeias foram registradas após a liberação do uso de fenilpirazóis em cultivos agrícolas. A redução de colônias de abelhas *A. mellifera* e a contaminação do ambiente na França, Itália, Alemanha e Eslovênia, após a liberação do uso de inseticidas fenilpirazóis, levaram esses países a proibirem sua utilização desde 1999 (GHISI *et al.*, 2011). Apesar disso, no Brasil, a utilização desses inseticidas vem aumentando anualmente, o que ocasiona prejuízos ao ambiente e ameaça os polinizadores.

Tal fato pode ser confirmado pela informação publicada pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC, 2019), a qual afirma que é a aplicação foliar de fipronil em lavouras que causa risco às abelhas. Ao entrar em contato com o pesticida em busca de pólen, retornam às colmeias e contaminam outras abelhas. Das colmeias atingidas pela mortalidade de abelhas, no estado de Santa Catarina, no Brasil, 93% apresentam fipronil. Segundo CIDASC, mais de 20 milhões de abelhas morreram entre o fim de 2018 e o início de 2019, sendo 300 colmeias, nas cidades de Canoinhas, Monte Castelo, Rio Negrinho e Itaiópolis, todas no Planalto Norte. Entre 2014 e 2017, foram monitoradas

mortes de 770 milhões de abelhas em 18 estados brasileiros. Esses fatos levaram a CIDASC a tentar, por meio de uma Assembléia Legislativa, propor a proibição do uso de fipronil no estado de SC.

3.5.3 Neonicotinoides - Imidacloprido

Os neonicotinoides foram desenvolvidos na década de 1980, tendo o imidacloprido seu primeiro princípio ativo comercial, desde o início dos anos 90. São agonistas nicotínicos dos receptores de acetilcolina no sistema nervoso central dos insetos. Causam estimulação nervosa em baixas concentrações, bloqueio do receptor, paralisia e morte em concentrações maiores. Podem ser classificados em três grupos químicos: nitroguanidinas (imidacloprido, tiametoxam, clothianidina e dinotefurano), nitrometilenos (nitenpirame) e cianoamidinas (acetamiprida e tiacloprida) (JESCHKE *et al.*, 2011; CASIDA; DURKIN, 2013). São considerados altamente tóxicos para os insetos, sendo LD₅₀ para ingestão de imidacloprido e clothianidina em abelhas, por exemplo, de 5 e 4 ng, respectivamente. Os neonicotinoides são solúveis em água e facilmente absorvidos pelas plantas por meio de suas raízes ou folhas. São, então, transportados pelos tecidos das plantas, tornando-se atrativo para a manutenção de culturas agrícolas (GOULSON, 2013).

Os neonicotinoides compõem a nova geração de pesticidas sintéticos. Atualmente, são utilizados comercialmente sete produtos desse grupo químico: acetamipride clotianidina, dinotefuran, imidacloprido, nitenpiram, tiaclopride e tiametoxam (JESCHKE *et al.*, 2011). Seus índices de contaminação são extremos e suas toxicidades são até 10.000 vezes mais letais que o DDT (GOULSON, 2013). Esses pesticidas penetram e permanecem na planta em seus sistemas floêmico (que conduz os nutrientes das folhas para a raiz) e xilêmico (que conduz os nutrientes da raiz para as folhas). Por serem compostos sistêmicos, contaminam todos os animais que visitam as plantas, sejam eles pragas, polinizadores, coletores de pólen, néctar, resina, seiva, raízes, folhas, flores, frutos ou sementes (PISA *et al.*, 2015).

Cerca de 60% dos neonicotinoides são usados no revestimento de sementes, protegendo profilaticamente todas as etapas da colheita, por vários meses após a semeadura. Pode ser aplicado de várias maneiras, como sprays foliares em culturas hortícolas (frutas macias, soja e para uso no jardim) ou como spray em flores e vegetais. São usados em formulações de iscas domésticas contra baratas e formigas e em grânulos para o tratamento de pastagens e pradarias para pragas de insetos que habitam o solo. Podem, ainda, ser aplicados em banho de solo ou na água de irrigação para defender culturas perenes (videiras), em madeira para combater cupins ou em árvores contra herbívoros. Finalmente, podem ser usados por meio de aplicações tópicas em animais de estimação, como cães e gatos, para controlar parasitas externos. As vantagens de baixa toxicidade para vertebrados, alta toxicidade para insetos, uso flexível e atividade sistêmica levaram os neonicotinoides a se

tornarem os pesticidas mais amplamente utilizados no mundo. São usados mais do que qualquer outra classe de inseticidas e compreendem aproximadamente 1/4 de todos os inseticidas comercializados. São licenciados para uso em mais de 120 países e têm um valor de mercado global em torno de US \$ 2,6 bilhões, sendo o imidacloprido representante de 41% desse mercado e o segundo pesticida mais amplamente usado (JESCHKE *et al.*, 2011).

Dos 80 a 98% do ingrediente ativo dos neonicotinoides revestidos nas sementes, que não são absorvidos pela cultura, uma pequena proporção (< 2%) é perdida como poeira durante a semeadura. Parte dessa poeira pode ser depositada nas vegetações às margens do campo em concentrações que variam de 1 a 9 partes por bilhão (ppbs) ou ainda podem intoxicar e matar organismos não alvo por contato direto, como os polinizadores (TAPPARO *et al.*, 2012).

Pode-se inferir que existe certa persistência e acúmulo de resíduos neonicotinoides no solo ao longo de um ou mais ciclos anuais de sucessão de culturas. Isso por movimentação lateral, lixiviação em encostas adjacentes ou até possíveis contaminações por meio do mecanismo de revestimento de sementes (BOTÍAS *et al.*, 2015). Na Europa, por exemplo, a semeadura de milho ocorre em meados de março e maio; nas regiões produtoras de milho da Itália e da Europa, frequentemente, é acompanhada por um desaparecimento de abelhas forrageiras, incluindo acúmulos de abelhas mortas na frente das colmeias. Essas mortes de colônias na primavera são cronologicamente diferentes daquelas por patógenos, que, normalmente, são controlados de maneira eficiente por apicultores profissionais.

Essa relação da semeadura de culturas agrícolas com a intoxicação de abelhas foi confirmada pela pesquisa realizada por Tapparo *et al.* (2012), durante a semeadura do milho, na fazenda experimental da Universidade de Pádua, Itália. Na semeadura com a furadeira de operação estática e normal, a morte de um número significativo de abelhas, cujas colmeias eram 100 m longe do campo de semeadura, foi observada. A concentração de clothianidina analisada nas abelhas mortas ficou na faixa de 78 a 1240 ng abelha⁻¹, cerca de 128-302 ng abelha⁻¹ de tiametoxam, 850 ± 330 ng abelha⁻¹ de fipronil. Sementes revestidas com inseticida (GAÚCHO, 2009) apresentaram concentrações de imidacloprido de até 3000 ng abelha⁻¹ naquelas coletadas no final da semeadura. De modo geral, o material particulado liberado pela máquina de perfuração, durante a semeadura do milho, representa um mecanismo significativo de difusão ambiental de inseticidas. As abelhas que voam sobre o campo de semeadura e se aproximam da nuvem de emissão da máquina de perfuração podem interceptar as partículas suspensas que estão contaminadas. O consequente efeito letal agudo evidenciado durante a semeadura em campo pode ser um influenciador dos fenômenos de perda de colônias relatados por apicultores na primavera e associados à semeadura de milho. Os resultados das emissões fatoriais, concentração de inseticida no ar ao redor da máquina de perfuração e contaminação das abelhas revelam que todos os tipos de

revestimentos de sementes testados não impedem a dispersão de grandes quantidades de partículas micrométricas contendo inseticidas, o que produz exposição letal para as abelhas.

Girolami *et al.* (2011) também avaliaram as influências da semeadura de milho nas mortes repentinas das abelhas na primavera. Inferiram, especificamente, a possibilidade de que a alta umidade fosse um possível fator-chave para aumentar os efeitos letais do pó. Após a exposição da poeira na semeadura, as abelhas foram mantidas em laboratório (Padua, Itália) com umidades distintas, 70 à saturação máxima de 90. Nas sementes revestidas com imidacloprido, quatro abelhas foram encontradas no chão perto do distribuidor. Durante a semeadura, continham uma média de 3661 ng abelha⁻¹ de imidacloprido. Já as abelhas coletadas saudáveis no dispensador, durante a semeadura, que morreram posteriormente em laboratório, apresentaram uma concentração de 442 ng abelha⁻¹ de imidacloprido. As amostras coletadas na frente das colmeias, horas após a semeadura, apresentaram teores de inseticida de 500 e 53 ng abelha⁻¹ de imidacloprido. Os autores confirmaram que uma condição de alta umidade é determinante no envenenamento letal de abelhas em laboratório, previamente pulverizadas com clotianidina e imidacloprido. Amostras de abelhas sem contaminação por inseticida, antes da partida da máquina ou quando utilizados apenas fungicidas, não apresentam diferenças de mortalidade, quando mantidas a diferentes umidades. Em condições de secas, as abelhas podem tolerar uma quantidade muito maior de inseticida em pó e podem sobreviver.

Além da poeira gerada durante a semeadura do milho, deve se levar em consideração as gotas de gutação que se formam nas plantas jovens e duram o dia todo. Com o objetivo de avaliar essa possível via de exposição para abelhas, Tapparo *et al.* (2011) realizaram um experimento coletando as gotas formadas nas plantas jovens e avaliaram a presença de neonicotinóides. Os resultados revelaram a translocação efetiva dos inseticidas das sementes para as folhas das plantas, durante todo o período de gutação. As concentrações dos inseticidas nas gotas de gutação foram altas para todos os neonicotinóides. Já o fipronil, estava sempre abaixo do limite de detecção (5,1 µg L⁻¹). As concentrações dos inseticidas mostraram variação temporal, diminuindo rapidamente durante os primeiros 10 dias após o surgimento das plântulas, enquanto aumenta novamente, nos últimos 10 dias do fenômeno, quando a evaporação da água pode concentrar significativamente o soluto. Por exemplo, a concentração de imidacloprido variou de 80,87 mg L⁻¹ no primeiro dia após o surgimento de plântulas a 17,30 mg L⁻¹ no 8º a 10º dias e aumentou novamente para 60,13 mg L⁻¹ nos últimos 10 dias. Os efeitos tóxicos dessas soluções de gutação, quando por administração oral em abelhas, induziram sintomas neurotóxicos característicos (contração do abdome e bloqueio irreversível das asas). O tempo de reação foi de alguns minutos e a concentração dos neonicotinóides foi tão alta que todas as abelhas testadas morreram em até quinze minutos. Como a escala de tempo é curta, as quedas de gutação podem explicar o súbito desaparecimento das abelhas operárias, durante o início da primavera, se elas usarem gutações de milho para a forragem ou hidratação. Provavelmente, as abelhas usam

gutação para forragear em condições particulares de seca, quando não há outras fontes visíveis principais de água.

Os neonicotinoides são considerados altamente tóxicos para as abelhas. Mesmo sendo aplicados como inseticidas foliares com riscos de exposição direta às abelhas, grande parte do uso de neonicotinoides é no revestimento de sementes ou na aplicação de imersão nas raízes. Diferentemente de classes mais antigas de pesticidas, os neonicotinoides tendem a ser mais tóxicos quando ingeridos. O nível ao qual as abelhas são expostas no néctar e pólen das plantas tratadas varia muito, incluindo o método de aplicação do pesticida. As encharcadas do solo e a aplicação foliar resultam em maiores concentrações dos compostos ativos nas plantas do que os tratamentos com sementes em sistemas anuais de cultivo, como grãos, algodão e oleaginosas (PISA *et al.*, 2015).

A ação sistêmica dos neonicotinoides foi investigada por Henry *et al.* (2015), por meio do monitoramento de abelhas individuais em relação aos níveis de exposição ao tiametoxam usado nos campos de estudo. Avaliaram se a sobrevivência individual e a dinâmica das colônias variariam de acordo com o campo e a exposição. A ocorrência concomitante de resíduos de imidacloprido dificultou a atribuição do excesso de mortalidade ao tiametoxam isoladamente ou a um efeito combinado. Para investigar a fonte de contaminação do imidacloprido no néctar da dieta, foram analisadas amostras de néctar floral da colza de 82 campos na área de estudo em 2014. O imidacloprido não foi detectado no néctar de 30 campos amostrados (36,6%) e variou de 0,1 a 1,6 ppbs nos 52 campos restantes (63,4%). Ou seja, pode ocorrer uma recaptção substancial de resíduos neonicotinoides em amostras de pólen e néctar de flores silvestres nas margens do campo. Essas concentrações podem ser ainda mais altas do que no próprio néctar da colheita. Assim, a exposição em campo ao tiametoxam, combinada com a contaminação por imidacloprido, está associada a um excesso significativo de mortalidade em abelhas de criação livre.

Para o imidacloprido, incluindo seus metabólitos neurotóxicos, a toxicidade letal pode aumentar até 100.000 vezes quando comparada à toxicidade aguda em exposição prolongada no tempo. Ou seja, o tempo de exposição amplifica a toxicidade do imidacloprido. O teste padrão de toxicidade crônica, que é de 10 dias para abelhas, é muito curto para testar neonicotinoides, dada a persistência e a provável exposição crônica em condições de campo (SUCHAIL *et al.*, 2001). Tal fato é confirmado pelo estudo realizado por Sanchez-Bayo e Goka (2014). Por meio de seus testes, demonstraram que resíduos realistas, no campo de inseticidas neonicotinoides no pólen, apresentam alto risco para as abelhas. No campo sinergismos com fungicidas inibidores de ergosterol, ampliaram ainda mais esses riscos. O imidacloprido apresentou o maior risco para as abelhas, com probabilidade de 49% de atingir a dose cumulativa mediana letal após 2 dias com alimentação de dose realista no campo (pólens). Para os autores, em geral, as avaliações de risco consideram apenas a toxicidade aguda dos produtos químicos por exposição tópica ou oral em 24 ou 48 horas. Assim, acabam

por ignorar os danos negativos advindos da exposição constante aos resíduos de pesticidas por períodos mais longos.

Algumas avaliações concentraram-se no destino ambiental dos pesticidas e em suas taxas de aplicação para estimar as Razões de Exposição à Toxicidade (TERs). São usadas como indicadores do risco para abelhas devido a rotas de exposição específicas, por exemplo, ingestão de pólen ou contato com exoesqueleto. De forma geral, a exposição subliminar aos neonicotinoides pode prejudicar a função cerebral e a capacidade aprendida dos polinizadores em forrageamento. Acaba, dessa maneira, por realocar colmeias de abelhas, reduz o desempenho da forragem e a taxa de crescimento. As alterações comportamentais individuais resultantes da exposição combinada a neonicotinoides e piretroides reduz a produtividade das colônias de abelhas e aumenta as chances de perdas de colmeias (PALMER *et al.*, 2013; GILL *et al.*, 2012).

O imidacloprido é um inseticida com grau de toxicidade III (medianamente tóxico), representado pelo CAS NUMBER 138261-41-3 e fórmula bruta $C_9H_{10}ClN_5O_2$ (Figura 20). É normalmente utilizado em aplicação foliar, tronco, solo e semente. Em formulações de granulado, isca gel, suspensão concentrada, bastonete e UVB (Ultrabaixo Volume) com as devidas recomendações. É mais utilizado nas culturas de abacaxi, abobora, alface, algodão, alho, almeirão, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, berinjela, brócolis, café, cana-de-açúcar, cebola, cevada, cenoura, chicória, citros, couve, couve-flor, crisântemo, eucalipto, feijão, fumo, gérbera, girassol, goiaba, jiló, mamão, mamona, manga, maracujá, melancia, melão, milho, palma forrageira, pastagem, pepino, pêssigo, pimentão, pinus, poinsetia, repolho, soja, sorgo, tomate, trigo e uva (ANVISA, 2019). Sua estrutura molecular está representada na Figura 9.

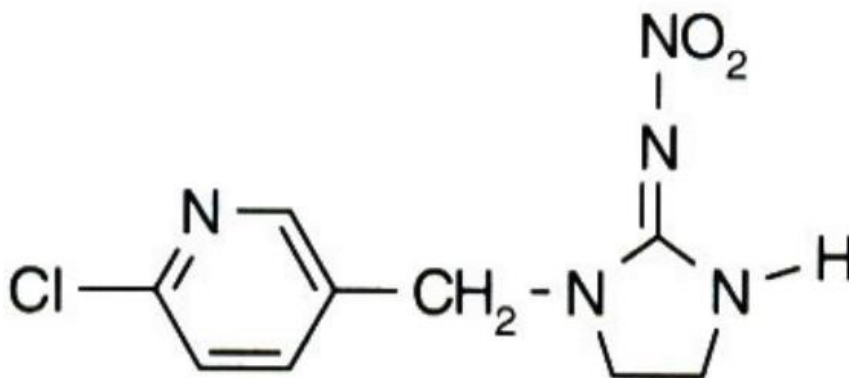


Figura 9. Estrutura molecular do imidacloprido.
Fonte: ANVISA, 2019.

Especificamente em abelhas, após a exposição oral ao imidacloprido, a relação dose-mortalidade apresenta-se em um perfil multifásico, contemplando fases ascendentes e descendentes. A cinética da mortalidade é adiada conforme as doses aumentam. Dessa forma, as vias metabólicas podem estar envolvidas na toxicidade do imidacloprido. Nota-se que os sintomas de neurotoxicidade aparecem rapidamente, enquanto a mortalidade ocorre

4 horas após a intoxicação aguda e é prolongada por mais de 96 horas. Assim, o imidacloprido tem uma ação prolongada ou retardada, mas os sintomas são sempre imediatos. Alguns metabólitos do imidacloprido são considerados altamente tóxicos, equivalentes a seu composto original, assim, causam os mesmos sintomas, nos mesmos níveis de toxicidade. Contudo, há uma discrepância entre a cinética da mortalidade e os sintomas de neurotoxicidade. Isso se deve ao fato de que ambas, combinadas, geram uma ação conjunta de baixas quantidades de metabólitos tóxicos e do próprio imidacloprido. Ou seja, os sintomas neurotóxicos iniciais podem ser desencadeados pelo imidacloprido, enquanto a mortalidade pode ser induzida por seus metabólitos tóxicos (SUCHAIL, DEBRAUWER & BELZUNCES, 2003).

Faucon *et al.* (2005) afirmam que o imidacloprido apresenta um modelo de mortalidade por dose bimodal. Ou seja, ocorre um pico inesperado de mortalidade em uma dose muito baixa, que pode ser explicado pela alta toxicidade dos metabólitos. Várias alterações comportamentais são descritas quando as abelhas são expostas a concentrações de imidacloprídeos, as quais são: mudanças no forrageamento e na coleta de alimentos; perda de capacidade de comunicar a localização das fontes de alimentos, como dança de balançar; e diminuição nas habilidades de aprendizado.

Em *Apis mellifera*, o imidacloprido induz rapidamente a paralisia dos músculos de voo, quando expostas a gotas de gutação contendo essa substância. Além disso, prejudica ainda mais a mobilidade das abelhas, pelas diminuições na corrida e caminhada e no aumento do tempo em que permanecem estacionárias (GIROLAMI *et al.*, 2009; MEDRZYCKI *et al.*, 2003). Pode prejudicar, ainda, a aprendizagem e o desempenho olfativo por exposição aguda ou crônica. Além dos efeitos nos adultos, os neonicotinoides, de modo geral, podem atuar no desenvolvimento larval, gerando consequências para a fase adulta. Abelhas adultas expostas ao imidacloprido no estágio larval apresentam comprometimento do comportamento associativo olfativo (desenvolvimento neural alterado) (YANG *et al.*, 2012).

De maneira geral, nos processos de aprendizado e memória, os neonicotinoides geram influências complexas. Possuem rotas específicas no metabolismo dos insetos, particularmente nas abelhas. O imidacloprido é degradado a metabólitos tóxicos, que podem se ligar a diferentes receptores de acetilcolina nas abelhas. Como são gerados múltiplos metabólitos ativos, ao longo do tempo, é difícil determinar quais etapas do processo de memória (aquisição, consolidação ou recuperação) são afetadas pelo imidacloprido ou por seus metabólitos (CASIDA, 2011). Quando expostas ao imidacloprido, as abelhas operárias da colmeia podem ser reduzidas e apresentar comportamentos que diminuem a eficiência dos voos das forrageiras. Indivíduos expostos podem passar períodos mais longos em uma fonte de alimentos, diminuir a frequência de visitas e aumentar o tempo entre viagens de forrageamento. Além disso, podem realizar voos mais longos, reduzir distâncias, apresentar problemas nas revisitações ou reduções na capacidade visual de aprendizagem. Doses

subletais de imidacloprido bloqueiam a recuperação da memória de navegação exploratória ou alteram essa forma de memória de navegação (TEETERS *et al.*, 2012).

Biddinger *et al.* (2013) realizaram testes de toxicidade comparativos em laboratório para duas espécies de polinizadores, *A. mellifera* e *Osmia cornifrons*. Foram definidos ensaios com os inseticidas e misturados com fungicidas, a fim de retratar a realidade da aplicação de pesticidas em áreas agrícolas, usadas para cultivo de maçã. Nenhuma das espécies era consistentemente mais suscetível que a outra. Suas respostas aos dois pesticidas neonicotinoides foram paralelas, mas não iguais. *O. cornifrons* foi significativamente mais suscetível do que *A. mellifera* ao acetamipride. Em contraste, *A. mellifera* foi significativamente mais suscetível ao imidacloprido no nível de resposta de 50%. Em ordem decrescente de toxicidade LD₅₀: imidacloprido, λ-cialotrina, dimetoato, fosmet e acetamipride. Para *O. cornifrons*, a ordem decrescente de toxicidade a LD₅₀ foi dimetoato, λ-cialotrina, o imidacloprid, o acetamiprid e fosmete. A interação do imidacloprido ou acetamipride com o fungicida fenbuconazol também foi testada na proporção de 1:1 para cada espécie. Para cada mistura, o resultado da interação do fenbuconazol foi significativo e positivo ao longo de toda a linha do pesticida. Os resultados mostram claramente que as respostas de *A. mellifera* não podem ser extrapoladas para *O. cornifrons*.

A habituação é considerada um comportamento importante de adaptação. Ela permite que os indivíduos diminuam suas respostas e, assim, seu investimento em energia, a estímulos sem importância. O imidacloprido altera os padrões de habituação em abelhas após exposição por contato a uma dose subletal, variando com a idade das abelhas e o tempo após a exposição. Além disso, essas alterações podem ser influenciadas pela sensibilidade de diferentes receptores de acetilcolina ao imidacloprido. Ou, ainda, o acúmulo de metabólitos pode atrasar ou acelerar os comportamentos de habituação (BORDEREAU-DUBOIS *et al.*, 2012).

Ao considerar a relação entre estressores aos polinizadores, o imidacloprido pode atuar sinergicamente com o agente patogênico, *Nosema ceranae*, fungo considerado potencialmente prejudicial às abelhas; quando em contato com imidacloprido, aumenta a mortalidade na colônia, afeta a imunidade social e eleva o número de esporos no trato gastrointestinal das abelhas (PETTIS *et al.*, 2012). Segundo Alaux *et al.* (2010), quando as abelhas infectadas com *Nosema* são expostas ao imidacloprido, elas perdem a capacidade de esterilizar a colônia e a ninhada de alimentos usando glicose oxidase, facilitando a disseminação desse patógeno nas colônias. Quando expostas a doses subletais de fipronil, observa-se maior mortalidade das abelhas do que em abelhas não expostas.

A atividade metabólica no cérebro das abelhas foi investigada usando a histoquímica da citocromo oxidase, enzima terminal na cadeia de transporte de elétrons dos processos respiratórios mitocondriais. Ou seja, é um marcador metabólico endógeno da atividade neuronal. Armengaud *et al.* (2000) relataram que a histoquímica da citocromo oxidase pode

ser usada para identificar as estruturas-alvo dos ligantes colinérgicos no cérebro das abelhas, particularmente no caso do imidacloprido. Em uma análise comportamental e histoquímica do efeito do imidacloprido na aprendizagem olfativa nas abelhas, o metabolismo oxidativo após tratamento aumentou significativamente, sugerindo um comprometimento da memória olfativa pelo inseticida. Esse aumento na atividade do citocromo oxidase no cérebro, após o tratamento, sugere que o imidacloprido prejudica a memória olfativa por um efeito fisiológico, que é relatado como tendo um papel essencial na memória olfativa. Os prejuízos cerebrais em abelhas expostas podem ser devido ao desenvolvimento neural alterado. Tomé *et al.* (2012) observaram danos no desenvolvimento do corpo de cogumelos no cérebro das abelhas e no comportamento de andar em indivíduos expostos ao imidacloprido no período larval. Hatjina *et al.* (2013) afirmam que, nos estágios iniciais da vida adulta, após o surgimento, o imidacloprido pode interromper o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas.

Suchail, Guez e Belzunces (2001) avaliaram a toxicidade aguda e crônica por via oral a doses alternadas de imidacloprido e seus metabólitos em abelhas operárias de *Apis mellifera*. Na intoxicação aguda, foram observados sintomas precoces de neurotoxicidade como hiperresponsividade, hiperatividade e tremores. Os sintomas desapareceram gradualmente e as abelhas tornaram-se hiporresponsivas e hipoativas. Quando compararam a toxicidade aguda de imidacloprido com seus metabólitos, observaram que o composto original teve uma porcentagem de mortalidade maior do que seus compostos derivados. Na toxicidade crônica, o imidacloprido e todos os metabólitos estudados eram tóxicos. A mortalidade das abelhas foi induzida 72 horas após o início da intoxicação. A diferença entre a toxicidade aguda e crônica do imidacloprido e seus metabólitos sugere que doses mais baixas da substância não são altas o suficiente para induzir mecanismos de desintoxicação. Enquanto doses altas podem induzir enzimas de desintoxicação para o composto original, que, normalmente, induz uma toxicidade mais baixa, doses baixas podem ativar um receptor de alta afinidade, induzindo mortalidade. Doses altas podem ativar os receptores de alta e baixa afinidade. Os de baixa afinidade poderiam ter uma ação compensadora oposta que induziria a um efeito protetor.

Suchail, Debrauwer & Belzunces (2003) realizaram uma pesquisa para avaliar a mortalidade de *Apis mellifera* ao imidacloprido e seus metabólitos tóxicos (5-hidroxiimidaclopride e a olefina), analisados por meio de doses ministradas por via oral às abelhas operárias. Após a ingestão, os primeiros sintomas de envenenamento foram hiperatividade e tremores. Após horas, esses sintomas desapareceram gradualmente e as abelhas tornaram-se hipoativas. A biodegradação do imidacloprido e o aparecimento de 5-hidroxiimidaclopride e olefina foram seguidos à aplicação oral do imidacloprido nas doses de 50 ou 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de abelhas. Após 6 horas, apenas 10,5% do imidacloprido foram detectados nas abelhas e, com 24 h, não foram mais encontrados. Os dois metabólitos atingiram o valor máximo 4 horas após intoxicação oral, representando, respectivamente, 9,5% e 13% da dose

inicial. A quantidade de resíduos dos metabólitos começou a diminuir 4 horas após a exposição e representou aproximadamente 5% da dose ingerida 48 horas após a exposição. Concluem que as abelhas são capazes de metabolizar rapidamente o imidacloprido por meio de um processo que reduz a exposição ao composto original e sua toxicidade. A degradação a 5-hidroxiimidaclopride e olefina, em doses baixas, em exposição crônica, e altas, em exposição aguda, coincide com o aparecimento de mortalidade induzida após intoxicação oral aguda por imidacloprido.

Para avaliar as respostas de colônias em condições de campo, Faucon *et al.* (2005) pesquisaram o possível efeito tóxico da exposição ao imidacloprido. Utilizaram o néctar, em campo (apiários), a fim de imitar o consumo natural de abelhas *Apis mellifera mellifera* de néctar contaminado. Várias colônias foram repetidamente alimentadas com uma das duas concentrações de imidacloprido (0,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$) em xarope de sacarose durante o verão. Em termos de atividade da colônia (número de visitas das operárias), houve uma hipoatividade em todas as colônias, sendo, no início, uma média de 27 abelhas por minuto, para 11,5 abelhas por minuto. Quanto ao transporte de pólen, houve um aumento das visitas às colônias após a alimentação por xarope. De agosto a outubro, observaram uma diminuição da postura de ovos em todas as colmeias, mesmo as sem alimentação induzida. A taxa de mortalidade média, analisada durante todo o experimento, não apresentou diferença significativa estatisticamente. Em uma análise realizada no mel, coletado no mês de julho, foram encontradas concentrações em média de 2,95 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de imidacloprido e ácido 6-cloronicotínico em apenas uma colmeia alimentada com o xarope.

Assim como fipronil, o imidacloprido é um dos responsáveis pelo desaparecimento de abelhas produtoras de mel, *A. mellifera*. Mesmo em concentrações abaixo de LD_{50} , os efeitos são notáveis a nível de indivíduo e colônia. Efeitos agudos são ainda mais preocupantes, visto que são os responsáveis pela perda em massa, que compromete toda a polinização, não apenas a agrícola, mas também a silvestre. Isso sem esquecer da queda de produção de mel que, para muitos apicultores, é o único meio de subsistência.

3.6 Pesticidas x apicultura

Estima-se que mais de 700.000 toneladas de pesticidas são lançadas no ambiente anualmente. Podem ser advindos da agricultura, com aplicação direta na plantação e no solo, aplicados no controle de pragas em pastagens; ademais, também são usados em florestas, para a produção de madeira, e no controle de insetos transmissores de doenças, tanto em centros urbanos quanto em meio rural (BARBOSA, 2004). Esse acúmulo de substâncias, com alto potencial de poluição e toxicidade, que oferecem riscos à saúde de seres vivos, é o desencorajamento e a motivação do desenvolvimento de pesquisas, os quais tenham como intuito provar, auxiliar e almejar o uso sustentável de pesticidas.

Do outro lado, temos a visão de que, sem a utilização de pesticidas, a produtividade não seria atingida, devido à demanda mundial por alimentos unida ao crescimento populacional. Gierer *et al.* (2019) afirmam uma perda de cerca de 80% da produção vegetal sem a utilização de pesticidas com consequências econômicas gravíssimas. Fora do setor agrícola, os pesticidas são um método eficiente em termos de custo e mão de obra para a proteção e manutenção de espaços públicos, por exemplo, no controle de ervas daninhas em ferrovias e ruas. Não há de se negar que esses produtos contribuem significativamente para o rendimento de lavouras, além da alta qualidade alimentar e prevenção de perdas econômicas, que é um fator-chave para permitir que o sistema global de alimentos continue operando no formato atual.

Mullin *et al.* (2010) realizaram um levantamento analítico abrangente de 200 mitocidas, inseticidas, fungicidas e herbicidas utilizados nas matrizes de cera, pólen, colmeia e abelhas, a fim de diagnosticar possíveis impactos na depleção de polinizadores. Nas 259 amostras de cera, foram encontrados 87 pesticidas e metabólitos com até 39 detecções diferentes em uma única amostra (média de 8 resíduos de pesticidas diferentes cada). Nas 350 amostras de pólen, foram identificados 98 pesticidas e metabólitos, com até 31 pesticidas diferentes em uma única amostra (média de 7,1 resíduos diferentes de pesticidas cada). Nas abelhas, obtiveram menos detecções e, em média, 2,5 resíduos por cada uma das 140 amostras (máximo de 25 em uma amostra). Apenas uma das amostras de cera, três de pólen e 12 de abelhas não apresentaram pesticidas detectáveis.

Para garantir a proteção dos polinizadores e permitir o escopo de desenvolvimentos na proteção de culturas, é necessário fornecer métodos precisos, dos resíduos de pesticidas no pólen e em outras matrizes importantes para as abelhas, que exijam esforços e gastos reduzidos. A identificação de padrões e relações de resíduos de pesticidas destroem uma planta e, entre diferentes espécies, fornece uma oportunidade para identificar métodos precisos dos níveis de resíduos para pesticidas e métodos de cultivo. No entanto, pouco se sabe sobre o comportamento e a relação dos resíduos nos recursos florais, que podem ser alterados e influenciados por inúmeros fatores (GIERER *et al.*, 2019).

Com o objetivo de garantir o mercado internacional de mel pela Índia, Choudhary e Sharma (2008) analisaram remessas comerciais de mel produzidas no estado de Himachal Pradesh. Do total, 18 amostras de mel (35,29%) estavam contaminadas com pesticidas organoclorados e ciclodienos. O HCH e seus isômeros foram os principais contaminantes (17,64%), seguidos pelo DDT e seus isômeros (13,72%). Resíduos de endossulfão e seus isômeros estavam presentes em 7,84% das amostras de mel. O mel de apiário comercial produzido pela *A. mellifera* estava mais contaminado com resíduos de pesticidas nas concentrações mais altas. A maioria das amostras contaminadas era de mostarda e colza como origem floral (90,90%), seguida de méis multiflorais (41,17%). Entre os quatro pesticidas piretróides analisados, foram encontrados resíduos de cipermetrina, lambda cialotrina,

deltametrina e fenvalerato em mel de mostarda e comerciais. Resíduos de dimetoato foram encontrados em mel de mostarda e multifloral; o malatião foi verificado em mostarda e orvalho e quinalfos em duas amostras de mel de mostarda. A contaminação do mel de mostarda foi maior, o que pode ser atribuído à contaminação de néctar e pólen por aplicação direta ou por desvio de pesticidas em plantas com flores. Do total, 49,02% das amostras estavam contaminadas com os resíduos de um ou outro pesticida, porém, apenas 5,88% das amostras tinham resíduos acima dos limites prescritos.

Balayiannis e Balayiannis (2008) utilizaram o mel, produzido próximo a áreas agrícolas, como bioindicador de qualidade ambiental, quanto à ocorrência de pesticidas em áreas adjacentes, na Grécia. As culturas selecionadas foram algodão, girassol e citrus, pois são plantas utilizadas nas forragens das abelhas e controladas com inseticidas pelos agricultores. Foram um total de 50 amostras divididas por culturas, coletadas e monitoradas por 2 anos. Os inseticidas analisados foram azinphos metil, clorfenvinfos, clorpirifós metil, etião, malatião, metidação, paration, forato, pirimifos e triazofos. Coumaphos (acaricida), utilizado para o controle da *Varroa destructor*, pelos apicultores, também foi investigado. As amostras mais contaminadas foram de citros; 16 continham resíduos de pesticidas, sendo clorfenvinfos (21,05%), clorpirifós (52,63%) e forato (10,53%). Das 17 amostras de algodão, 8 estavam contaminadas, forato (35,29%), clorfenvinfos (5,88%) e clorpirifós (5,88%). Das 9 amostras de girassol, quatro apresentaram resíduos de forato (44,44%). No geral, do total de 50 amostras analisadas, os resíduos de clorfenvinfos foram detectados em 5 amostras (10%), de clorpirifós em 11 amostras (22%) e de forato em 12 amostras (24%). As concentrações variaram entre 0,70 e 0,89 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resíduos de Coumaphos variaram de 0,10 a 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A presença desses resíduos pode ser explicada pela estabilidade das moléculas aos processos hidrolíticos, oxidativos e metabólicos, além da baixa volatilidade e o uso excessivo ou inadequado de pesticidas, pelos agricultores. A fonte mais importante de contaminação foi do acaricida coumaphos, usado por apicultores no tratamento do ácaro *Varroa*.

Fulcon *et al.* (2019) realizaram uma pesquisa envolvendo a queda acentuada de *A. mellifera* na Virginia (EUA), devido à extensa utilização de pesticidas, relacionando com uso e ocupação do solo abrangente na área de forrageamento. Das matrizes estudadas, foram detectados pesticidas em 3% das abelhas, 8% no pólen e 19% nas amostras de cera, sendo fluvalinato e coumaphos os mais frequentemente detectados. Eles são usados para controle do acaro *Varroa*. Dessa maneira, causam efeitos subletais em abelhas larvas ou adultas na colmeia, como a baixa sobrevivência da rainha e o estresse contínuo das operárias. A interação entre a classificação do uso da terra e os pesticidas não foi significativa para cera, abelha e pólen. O tipo de uso da terra afeta apenas a probabilidade de detecção de pesticidas no pólen, em que eram menos propensos a serem detectados nas paisagens florestais do que nas áreas urbanas, agrícolas ou pastagens. Dessa forma, os autores afirmam que os pesticidas colaboram para o declínio de abelhas *A. mellifera*, mas não são a causa majoritária

para tal ocorrido.

Tendo por base os descritos anteriores, unido à inter-relação agricultura x apicultura x polinização, tem-se, por impacto ambiental, qualquer alteração física, química e biológica do ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia. Isso é resultante das atividades antrópicas que, direta ou indiretamente, afetam a saúde, segurança e o bem-estar da população, da biota e as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente, bem como a quantidade de recursos naturais (BRASIL, 1986).

Apesar de tardia, a importância dos polinizadores ganhou destaque nas últimas décadas, sendo reconhecida pela Convenção da Diversidade Biológica (CDB). Em 2000, a Conferência das Partes (COP-5) aprovou a Iniciativa Internacional para Conservação e Uso Sustentável dos Polinizadores, que ficou sob a responsabilidade da Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), órgão ligado à Organização das Nações Unidas (ONU), que propôs um plano de ação mundial para trabalhar a questão. Em 2002, durante a COP-6, foram aprovadas três propostas de trabalho, entre elas, a Iniciativa Brasileira de Polinizadores, que até hoje está em andamento (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2007).

O consumo de pesticidas vem crescendo de forma expressiva no Brasil; o aumento nas vendas internas pode estar relacionado com a grande produção agrícola nacional. De acordo com o IBGE, o ano de 2019 teve recorde na safra agrícola, principalmente dos grãos, o que ocasionou a utilização em larga escala de pesticidas. O expressivo aumento na utilização de pesticidas está exposto na Figura 10.

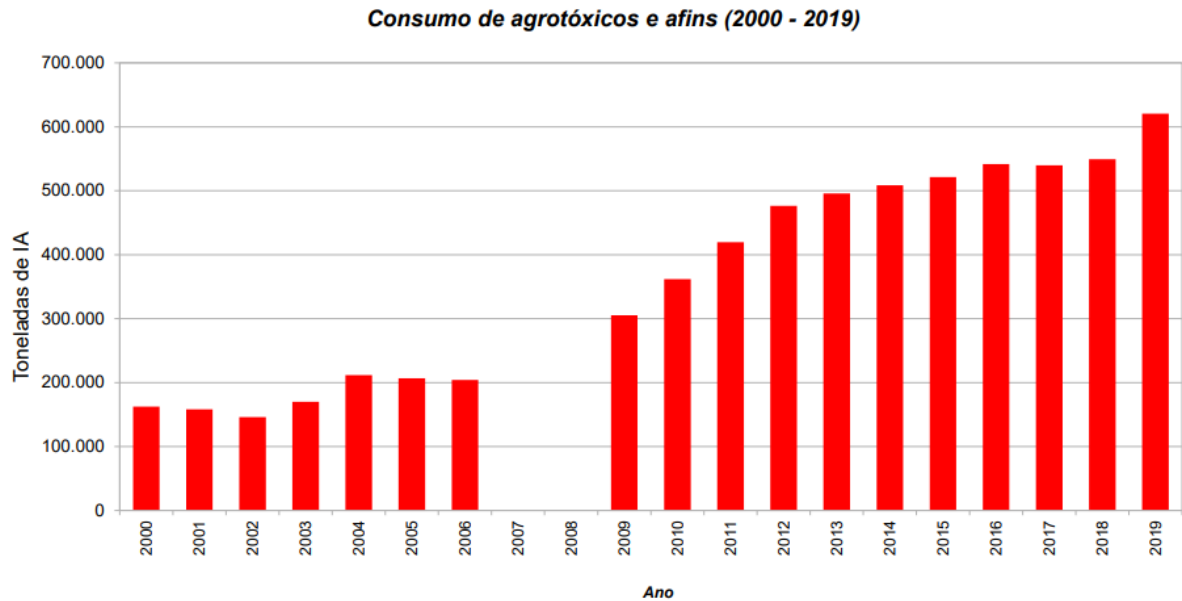


Figura 10. Histórico de comercialização de defensivos agrícolas de 2000 a 2019.

Fonte: IBAMA: Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto 4.074/2002 (Dados atualizados em 15/08/2020); IA (ingrediente ativo).

Em termos de comercialização nacional, segundo dados fornecidos pelo IBAMA, no ano de 2019, foram comercializados, no Brasil, 620.537,98 milhões de toneladas de pesticidas; desses, só a região sul representou 150.449,09 milhões de toneladas, com o Paraná usufruindo de 63.714,61 mil toneladas. Em termos de impactos direto nas abelhas e na produção de mel, do fipronil, em 2019, foram comercializadas 1.934,73 toneladas no Brasil, com o Paraná utilizando 188,24 toneladas do ingrediente ativo. O imidacloprido, comercializado em 2019, perfaz um total de 9.214,45 toneladas no Brasil, sendo o Paraná responsável por 934,76 toneladas usadas de ingrediente ativo.

Sponsler *et al.* (2019) propuseram um esquema para facilitar o entendimento das problemáticas que envolvem o uso e desenvolvimento de pesticidas com os sistemas de polinização. Ele engloba três domínios particulares que se interrelacionam, conforme exposto na Figura 11.

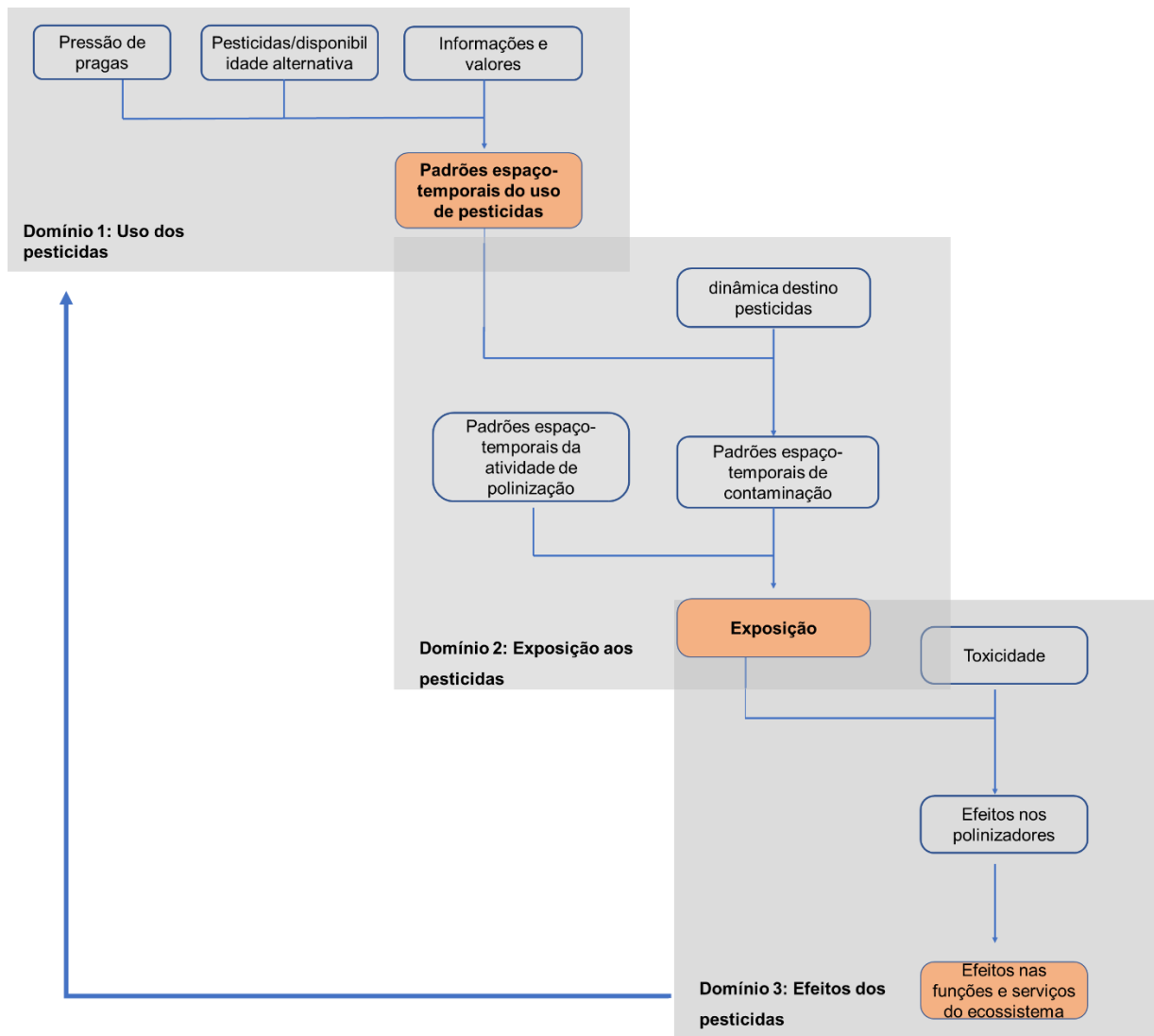


Figura 11. Estrutura conceitual do sistema polinizador x pesticida. Os domínios das relações causais se sobrepõem nos principais fenômenos de ligação (alaranjado). A direção principal da causa é indicada por setas, geralmente fluindo de cima para baixo, exceto pelo feedback potencial (linha azul espessa) do Domínio 3 para o Domínio 1. Adaptada de SPOSLER *et al.* (2019).

Assim, a visão geral e global do declínio de polinizadores, especialmente as abelhas, alarma produtores agrícolas e apicultores dependentes das atividades desenvolvidas pelas abelhas. Isso porque a exposição aguda ou crônica às mais diversas classes de pesticidas causa efeitos letais e subletais aos polinizadores, afetando diretamente a sobrevivência das colônias. A necessidade, agora, é de se encontrar medidas que sejam sustentáveis para ambos os lados do sistema, além de pesticidas menos tóxicos, pulverização adequada e, principalmente, uso correto e adequado seguindo as recomendações da ANVISA para cada cultura. Além disso, há a necessidade de proteção às abelhas, por meio de corredores, ou barreiras que supram o distanciamento de forrageamento (2-4 km) para evitar o contato direto com os pesticidas. A sustentabilidade, nesse caso, é necessária para garantir a vida dos polinizadores e, assim, a continuidade da atividade agrícola, principalmente, a manutenção da biodiversidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A localização geográfica dos apiários selecionados para a pesquisa está disposta na Figura 12.

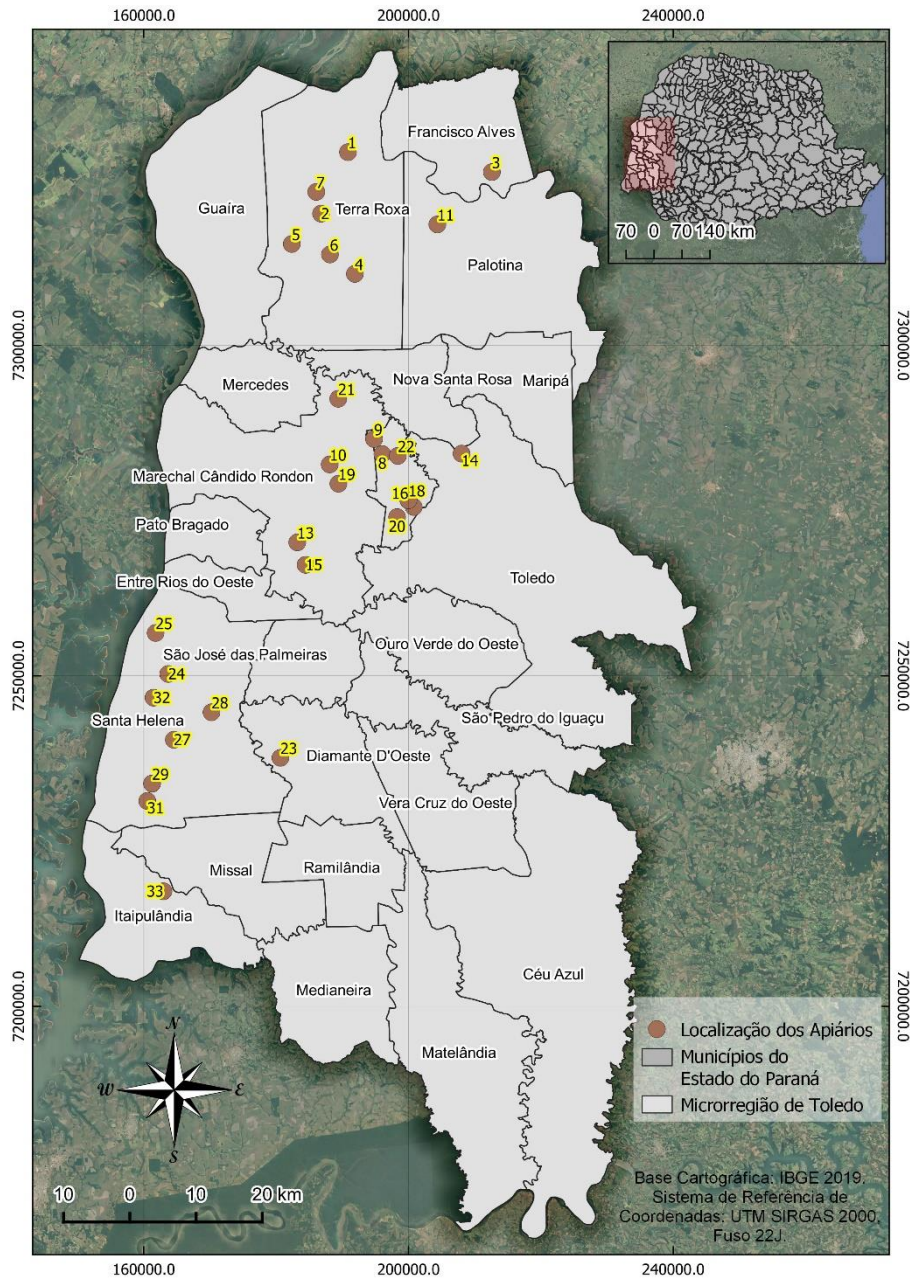


Figura 12. Localização geográfica da região de estudo.

4.2 Coleta, preservação e organização das amostras

As amostras de mel foram coletadas no mês de dezembro de 2019 pelos apicultores, donos das propriedades. Assim, foi instruído aos participantes o procedimento de coleta, no qual foram fornecidos dois frascos esterilizados e lacrados. No momento da coleta, foi recomendado que eles higienizassem as mãos e não entrassem em contato com o mel coletado, a não ser com o uso devido de luvas de látex. Foram coletados aproximadamente 70 mL de cada apiário, devidamente identificados e georreferenciados, perfazendo um total de 41 amostras, separadas em 3 grupos selecionados por região (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade de amostras recebida de cada região

Localização	Número de amostras
GRUPO 1	07
GRUPO 2	23
GRUPO 3	11

Após a coleta, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente e enviadas ao Laboratório de Análises de Biosistemas Agrícolas (LABA) – Unioeste – Campus Cascavel – Setor de Engenharia Agrícola, para posterior extração e quantificação dos pesticidas selecionados.

Algumas amostras receberam uma identificação extra, nos casos em que os apicultores coletaram em apiários localizados em regiões distintas. Assim, além da numeração sequencial, foi adicionada uma identificação com letras alfabéticas, por exemplo, 1 a; 1 b, assim, consecutivamente. Amostras localizadas na mesma região, ou seja, na mesma propriedade, mas em apiários diferentes, foram transformadas em uma amostra (amostra composta). Realizada por meio de homogeneização com auxílio de bastão de vidro em bécheres de 250 mL, devidamente higienizados e esterilizados.

Os pesticidas selecionados para extração e identificação foram o imidacloprido e o fipronil, visto que são os maiores responsáveis pela morte das abelhas. Além disso, são muito utilizados nas regiões pesquisadas nas culturas agrícolas. O imidacloprido é utilizado no tratamento de sementes e em sistemas de pulverização de várias culturas. Dentre elas, algodão, arroz, feijão, milho, trigo, tomate, melão, soja, café. Dos pesticidas à base de imidacloprido, mais utilizados nas regiões selecionadas, cita-se, como nome comercial: Imidacloprid, Imidacloprid Nortox, Cropstar, Galeão, Imidacloprid 600FS, Galil SC, Picus, Gaucho FS, Connect e Premier Plus. O Fipronil também é muito utilizado na região, em

culturas como a batata, no plantio de cana-de-açúcar, em acácia e acácia negra, algodão, amendoim, araucária, arroz, cevada, duboisia, eucalipto, girassol, feijão, milho, paricá, pastagens, populus, seringueira, sorgo, soja, teca e trigo. Dentre os pesticidas à base de fipronil mais utilizados na região, cita-se, como nome comercial: Fipronil, Fipronil 80wg Gharda, Fipronil Nortox, Regent 20GR, Belure e Belure Top, Regent DUO, Standak e Standak Top (ADAPAR, 2020).

4.3 Higienização de vidrarias e instrumentos laboratoriais

Para o processo de extração das amostras de mel, todas as pipetas automáticas utilizadas foram devidamente calibradas em balança analítica. As ponteiras correspondentes foram retiradas de pacotes devidamente lacrados e não foram reutilizadas.

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com água e sabão sob água corrente, passadas três vezes em água destilada por osmose reversa. Em seguida, foram enxaguadas com etanol 99,5%, metanol grau HPLC e hexano grau HPLC, por duas vezes. As vidrarias não volumétricas foram então deixadas em uma mufla por 4 horas a 350°C. Já as vidrarias volumétricas, foram secas em temperatura ambiente. Esse procedimento de limpeza é fundamental para minimizar a presença de interferentes.

4.4 Processo analítico – Extração das amostras

O método de extração selecionado foi SPE, que é a extração por fase sólida. Segundo Rial-Otero (2007), o método SPE é um procedimento de separação que utiliza uma fase sólida ou líquida sob um suporte sólido para isolar um determinado analito de uma solução. A SPE é fundamentada na afinidade preferencial dos solutos desejáveis e indesejáveis por um material sólido, um sólido revestido com um filme líquido ou que apresente cargas superficiais. A SPE pode ser usada nas etapas de concentração e "clean up" de uma amostra antes da análise cromatográfica ou outros métodos analíticos para quantificar os analitos presentes. A fase sólida adsorvente deve ser condicionada e ativada com um solvente apropriado para que os analitos sejam efetivamente separados da fase líquida.

Em balança analítica, foi pesado aproximadamente 1 g de cada amostra de mel em tubos de ensaio devidamente higienizados e identificados. Em seguida, as amostras foram diluídas com 3 mL de água Mili-Q e homogeneizadas em um vortex. Posterior a isso, os cartuchos foram condicionados para a extração dessa solução.

A metodologia de extração foi adaptada de Costa (2014) e está ilustrada no fluxograma da Figura 13.

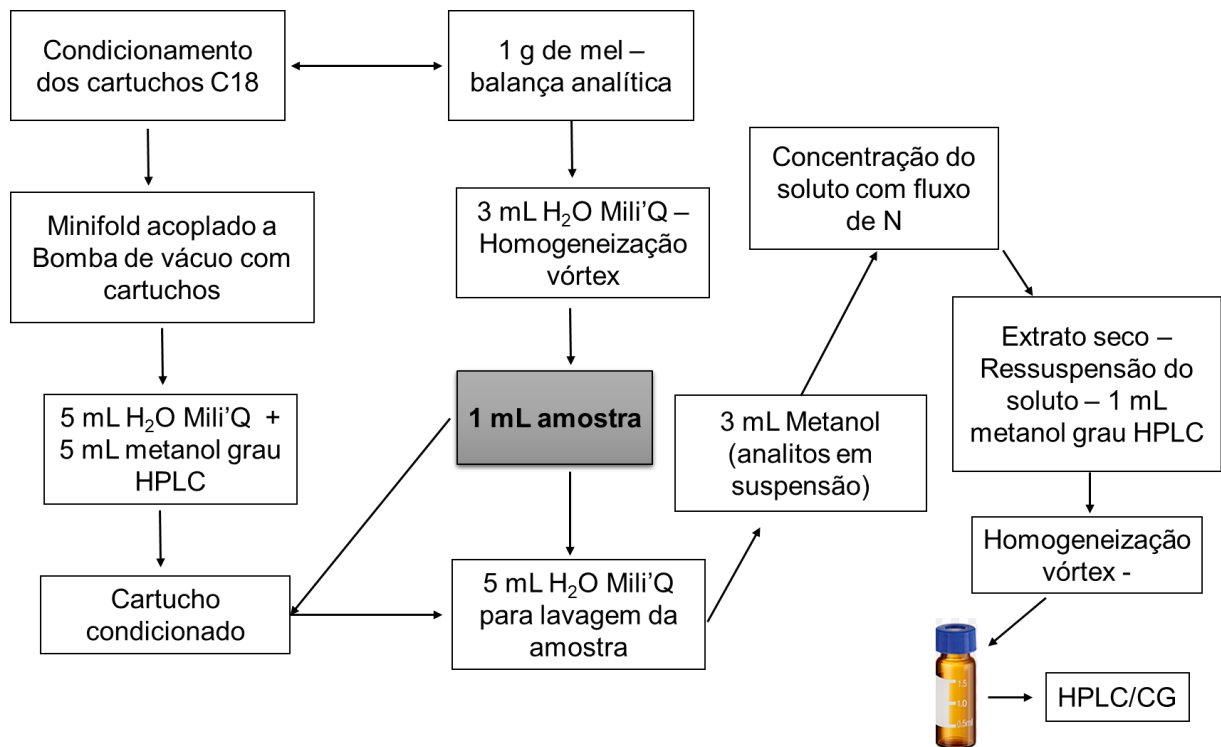


Figura 13. Fluxograma do processo de extração para os compostos imidacloprido e fipronil.

O condicionamento dos cartuchos SPE C18 1000 mg/6 mL foi realizado em um minifold (Figura 25 a) acoplado a uma bomba de vácuo. Assim, iniciou-se adicionando 5 mL de metanol grau HPLC, acionando a bomba (Figura 25 b). A passagem do solvente foi realizada por gotejamento leve, sem permitir a secagem do adsorvente. Em seguida, o procedimento foi repetido com 5 mL de água Milli-Q, sob as mesmas condições. Após, os cartuchos foram carregados com 1 mL da solução da amostra e lavados com 5 mL de água Milli-Q, sempre nas mesmas condições. Essas etapas foram realizadas permitindo-se a completa secagem do adsorvente, por meio da abertura total dos dispositivos do minifold. Essa solução do condicionamento final dos cartuchos foi descartada.

Os extratos foram, então, eluídos com 3 mL de metanol grau HPLC, por gotejamento leve e coletados em tubos de ensaio (Figura 14 b). Posterior à primeira etapa de extração, os analitos foram concentrados sob fluxo de nitrogênio (Figura 14 c) no equipamento TurboVap® LV (Figura 14 d), sob temperatura de 40°C, até a completa evaporação do solvente (aproximadamente 45 minutos). Em seguida, os analitos foram ressuspensionados adicionando-se 1 mL de metanol grau HPLC e transferidos para vials de cromatografia, devidamente numerados e lacrados. Então, foram armazenados em um congelador até o momento da determinação cromatográfica via HPLC (imidacloprido) ou CG (fipronil).

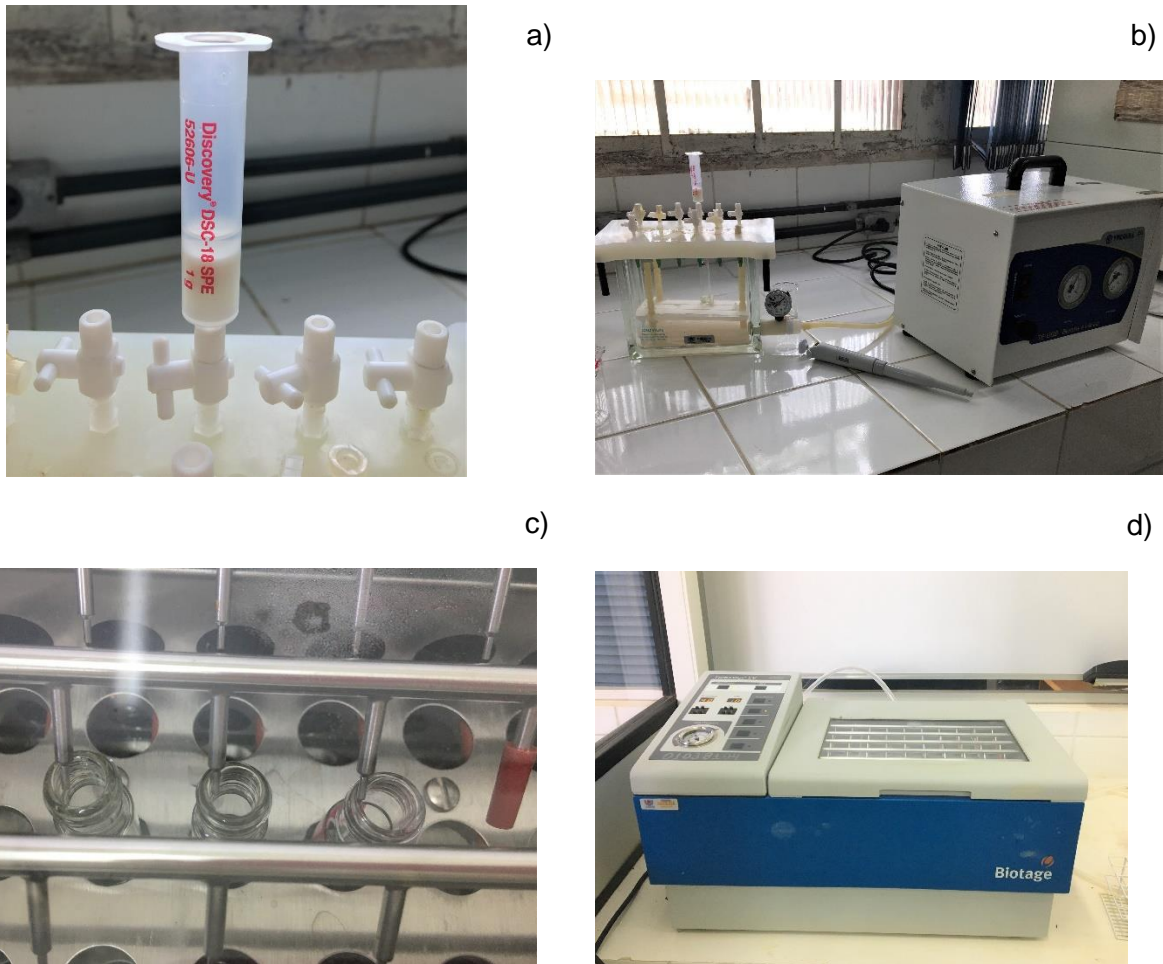


Figura 14. Processo de extração das amostras. a) Cartucho acoplado ao minifold – Início do condicionamento; b) eluição das amostras – coleta no tubo de ensaio; c) eluidos no processo de secagem forçada com nitrogênio; d) TurboVap® LV.

4.4.1 Determinação de Imidacloprido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Cromatografia é uma técnica utilizada para a separação dos componentes de uma mistura. A separação cromatográfica é fundamentada na distribuição dos componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Essa separação procede das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel devido às diferentes interações com a fase estacionária. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) são técnicas tradicionalmente utilizadas nas análises de resíduos de pesticidas. Suas resoluções são excelentes, sendo possível analisar várias substâncias em uma mesma amostra. Para a determinação de resíduos de pesticidas em mel, são utilizadas técnicas de HPLC em fase reversa, usando colunas do tipo C18 ou octadecilsilano. A cromatografia em fase reversa com detector ultravioleta-visível (UV-Vis) é a técnica mais comum de detecção de analitos, em que a fase normal usa água como solvente básico. Normalmente, o componente mais polar elui mais depressa que o componente menos polar (MARIA DA SILVA *et al.*, 2014).

O método foi implantado no equipamento utilizando-se um padrão de imidacloprid adquirido da Sigma-Aldrich, lote BCBZ3018, CAS NUMBER 138261-41-3, contendo 100 mg com 99,99% de pureza. Foi determinada uma solução estoque de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$, uma solução-mãe de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e seis níveis de calibração, conforme recomendações do INMETRO (2007). O solvente selecionado para a determinação do imidacloprido foi o metanol adquirido da Sigma-Aldrich, lote # SHBC9819V, CAS NUMBER 67-56-1, grau HPLC com 99,99% de pureza.

A solução estoque foi preparada pesando-se 8,0 mg do padrão de Imidacloprido em uma balança analítica (Shimadzu® - precisão de quatro casas decimais). O soluto foi dissolvido em 10 mL de metanol. A partir dessa solução, foi preparada a solução-mãe, na qual foram preparados os seis níveis, todos diluídos em metanol, com as seguintes concentrações (0,05; 0,1; 0,15; 0,25, 0,5 e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A detecção de Imidacloprido, nas amostras de mel, e os parâmetros para a implementação e validação do método foram analisados em sistema cromatográfico, utilizando um HPLC - Shimadzu®; (Figura 15 a). É equipado com amostrador automático (SIL-20A), localizado no Laboratório de Análises Agroambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (LAABA-UNIOESTE). A coluna cromatográfica utilizada foi a Kromasil C18, $5 \mu\text{m}$, $150 \times 4,6 \text{ mm}$ da marca AkzoNobel (Figura 15 b). Os parâmetros cromatográficos do método foram detector UV (SPD-20A), comprimento de onda 270 nm, modo de eluição isocrático, fase móvel Água-acetonitrila (70:30 v/v), fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de injeção $30 \mu\text{L}$, temperatura de aquecimento da coluna 25°C e tempo de corrida 8 min.

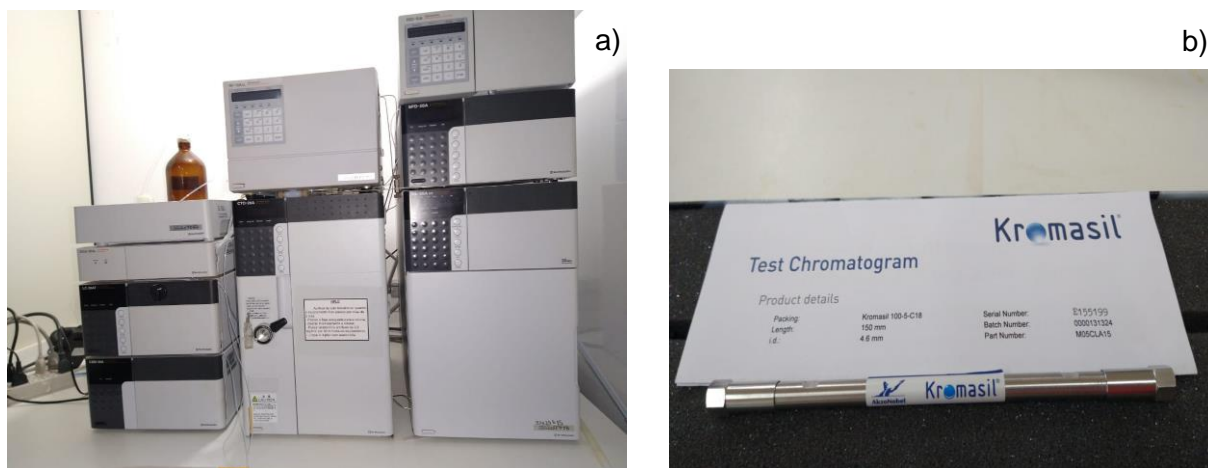


Figura 15. Equipamentos para determinação de Imidacloprido em mel: a) HPLC (Shimadzu); b) Coluna cromatográfica Kromasil.

A fim de se atestar a confiabilidade do método, alguns dos parâmetros de validação de metodologias, seguindo as recomendações da *In House Validation*, descritas por Ribani *et al.* (2004) e Ribeiro *et al.* (2008), foram desenvolvidas, a saber, seletividade, linearidade, limites de detecção, quantificação e recuperação.

A seletividade foi realizada em triplicata, comparando-se uma matriz com adição do

analito de imidacloprido na concentração de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e uma matriz sem a adição do padrão. O resultado do cromatógrafo foi avaliado considerando-se os tempos característicos de retenção do pico, sendo observado que não há sinal do analito (imidacloprido) na matriz sem adição do padrão.

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 está exposta na Equação 1 (INMETRO, 2007).

$$y = ax + b \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

y - resposta medida (absorbância, altura ou área do pico);

x - concentração;

a - inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

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

A linearidade, por meio da determinação da curva analítica, levou em consideração o coeficiente de correlação linear, que deve ser superior ou igual a $R^2 \geq 0,99$ como indicador do modelo matemático. Foram, então, preparadas soluções com seis níveis (0,05; 0,1; 0,15; 0,25, 0,5 e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) em três triplicatas injetadas em ordem crescente (INMETRO, 2007; ANVISA, 2017).

O Limite de Detecção (LD) foi determinado pelo método visual, que consiste em injetar soluções de concentração crescente, até o aparecimento de um sinal analítico visível. Para o Limite de Quantificação (LQ), foi considerada a menor concentração do ponto da curva analítica, logo que amostras com concentrações inferiores a esse valor não poderiam ser quantificadas por evadirem da linearidade do método.

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

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

Em que:

Concentração média experimental - obtida por meio da equação de linearidade ($y = 83703 x - 1212,4$);

Concentração teórica - concentração conhecida e selecionada para a recuperação ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Conforme a Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999),

os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos de pesticidas ficam 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 $\pm 15\%$.

4.4.2 Determinação de Fipronil por Cromatografia Gasosa com detecto de captura de elétrons – (CG-ECD)

O método foi implantado no equipamento utilizando-se um padrão de fipronil (Sigma-Aldrich), lote BCBW9282, CAS NUMBER 120068-37-3, contendo 100 mg com 97% de pureza. Foi determinada uma solução estoque de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$, uma solução-mãe de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e seis níveis de calibração, conforme recomendações do INMETRO (2007). O solvente selecionado para a determinação do fipronil foi o metanol (Sigma-Aldrich) lote # SHBC9819V, CAS NUMBER 67-56-1, grau HPLC com 99,99% de pureza.

A solução estoque foi preparada pesando-se 8,0 mg do padrão de fipronil em uma balança analítica (Shimadzu® - precisão de quatro casas decimais). O soluto foi dissolvido em 10 mL de metanol. A partir dessa solução, foi preparada a solução-mãe, na qual foram preparados os seis níveis, todos diluídos em metanol, com as seguintes concentrações (0,05; 0,1; 0,15; 0,25, 0,5 e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A detecção de fipronil, unida aos parâmetros para a implementação e validação parcial do método, foi analisada por Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons - GC-ECD (Shimadzu GC-2010; Figura 16 a), equipado com amostrador automático (AOC 20i). O volume de injeção foi 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 dyphenyl e 95% de dimethyl polysiloxane Rtx® Restek (Figura 16 b) (comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,25 mm e espessura do filme: $0,25 \mu\text{m}$).



b)

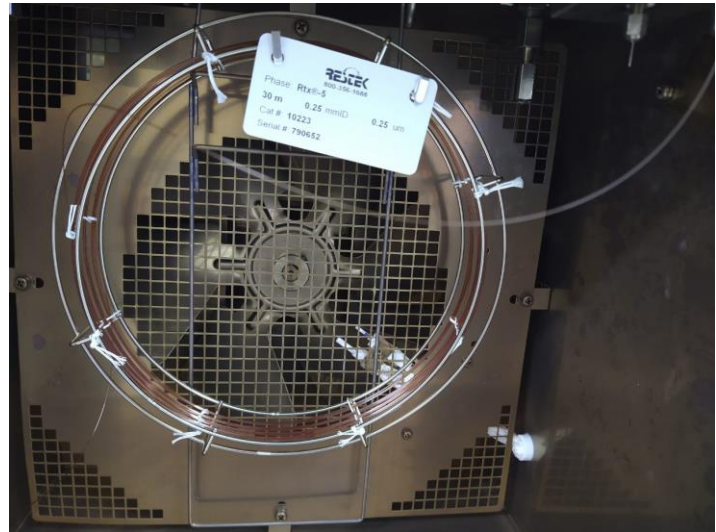


Figura 16. Equipamentos para determinação de fipronil em mel: a) GC-ECD (Shimadzu GC-2010; b) Coluna capilar dimethyl polysiloxane Rtx® Restek.

A utilização de detector de captura de elétrons requer atenção na etapa de extração e concentração das amostras. A etapa de “clean-up” ou limpeza das amostras para análises de resíduos de pesticidas é muito importante devido à presença de compostos com alto peso molecular que podem contaminar os sistemas cromatográficos quando é utilizado esse tipo de detector. Os interferentes tornam a interpretação dos cromatogramas difícil por causa dos picos sobrepostos (RISSATO, 2004).

Os demais parâmetros cromatográficos do método para a determinação de fipronil estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 Condições cromatográficas para detecção de fipronil em mel

Injetor	Temperatura (°C)	260
	Modo de Injeção	<i>Splitless</i>
	Tempo de Amostragem (min)	2,0
	Razão de split	1:10
	Gás de arraste	Hélio
	Modo de controle de fluxo	Pressão
	Fluxo na coluna (mL min ⁻¹)	0,92
Coluna	Temperatura (°C)	100
	Programação da Temperatura	100 °C por 1 min; 15 °C min ⁻¹ até 230 °C; 2 °C min ⁻¹ até 256 °C por 2 min; 20 °C min ⁻¹ 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 ⁻¹)	20
	Corrente	0.3

A fim de se atestar a confiabilidade do método, alguns dos parâmetros de validação de metodologias, seguindo as recomendações da *In House Validation*, descritas por Ribani *et al.* (2004) e Ribeiro *et al.* (2008), foram desenvolvidas, as quais são seletividade, linearidade, limites de detecção, quantificação e recuperação.

A seletividade foi realizada em triplicatas, comparando-se uma matriz com adição do analito padrão de fipronil (4 µg mL⁻¹) e uma matriz sem a adição do padrão. O cromatograma foi avaliado considerando-se o tempo de retenção do pico, sendo observado sinal do analito na matriz com adição de padrão e a ausência de pico na matriz sem adição do 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 relaciona as duas variáveis área do pico e a concentração da substância a ser quantificada, conforme mencionado anteriormente na Equação 1 (INMETRO, 2007). Para a equação da reta da linearidade, foi levado em consideração o coeficiente de correlação linear ($R^2 \geq 0,99$) como indicador do modelo matemático. Isso sendo que seu valor deve ser igual ou superior a 0,99. Para se obter o coeficiente de determinação, foram preparadas soluções com seis níveis (0,05; 0,1; 0,15; 0,25, 0,5 e 1,0 µg mL⁻¹) em triplicatas injetadas em ordem crescente (INMETRO, 2007; ANVISA, 2017).

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 (pico). O limite de quantificação (LQ) foi considerada 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 de uma solução padrão de fipronil de concentração conhecida ($4 \mu\text{g L}^{-1}$), submetidos ao processo de extração em fase sólida, com os resultados que serão obtidos com a mesma solução padrão não extraída. O cálculo realizado para a determinação da recuperação seguiu as recomendações da ANVISA (2017) e está minuciado na Equação 2, mencionada anteriormente.

Conforme o Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999), os intervalos aceitáveis de recuperação para análises de resíduos de pesticidas ficam 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 $\pm 15\%$.

4.5 Espacialização das amostras, uso e ocupação das áreas de forrageamento das abelhas *Apis mellifera* nas regiões selecionadas

Para a distribuição espacial das amostras em relação à concentração de imidacloprido e fipronil, nas regiões de forrageamento utilizadas pelas abelhas, foi aplicada a interpolação de dados pelo método IDW (Inverse Distance Weighted) a partir das coordenadas geográficas dos apiários amostrados.

O uso e ocupação do solo foi obtido por meio da classificação supervisionada de imagens, com intuito de diferenciar áreas agrícolas das demais. Para tal, foi realizada uma análise temporal de NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) da região entre as datas 15/02/2019 e 15/03/2019, utilizando, como ferramenta, a plataforma de processamento em nuvem Google Earth Engine, com imagens Sentinel 2 para se obter a mediana de NDVI desse período. Posteriormente, utilizando o software Qgis 3.16, foram distribuídas 342 amostras de treinamento (Figura 17), selecionando duas classes, 1 – Agricultura e 2 – Demais classes. Para a classificação supervisionada, foi utilizado o algoritmo Random Forest por meio de script em linguagem python.

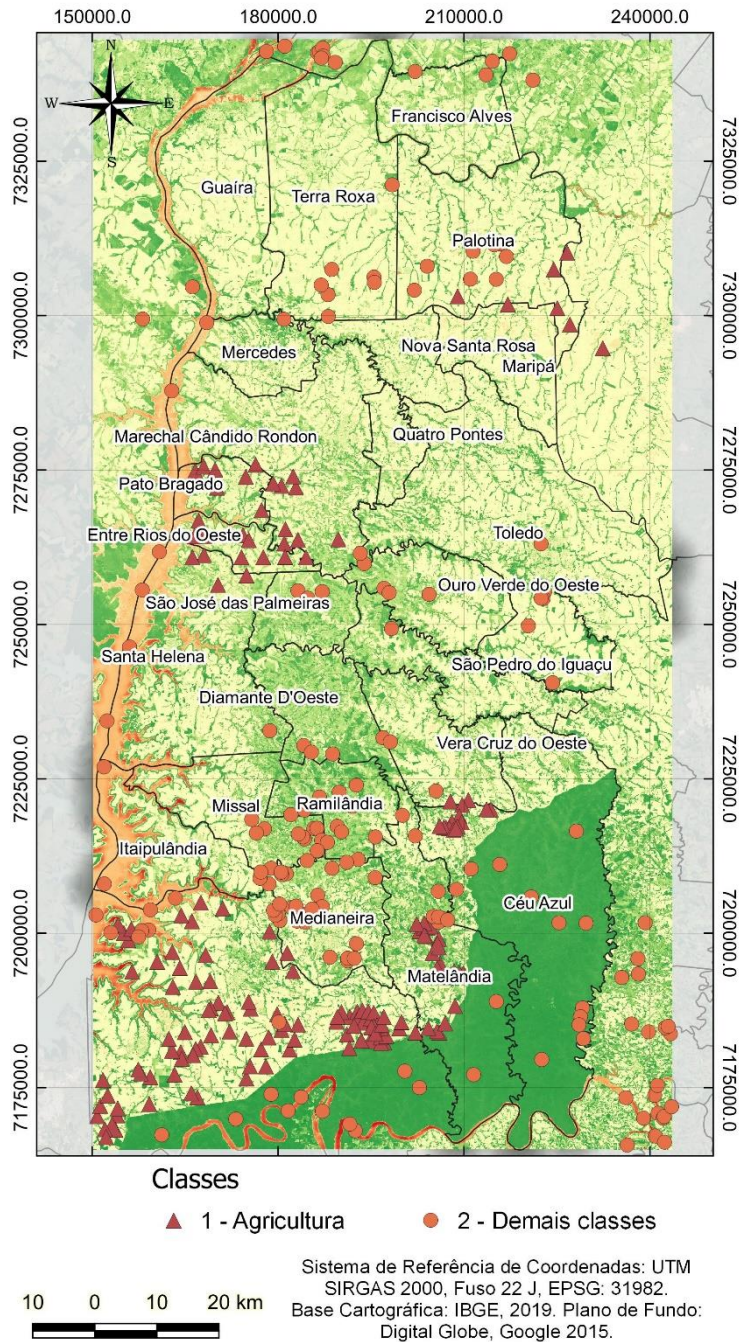


Figura 17. Distribuição de amostras de treinamento na área de estudo.

A fim de avaliar a qualidade da classificação do uso e ocupação do solo realizada, foi impugnado o teste de acurácia. Foram, então, distribuídos 298 pontos aleatórios em toda a área de estudo (Figura 18) e verificado, com base na imagem disponibilizada pela Google de um metro de resolução espacial, as classes correspondentes. Essas imagens foram utilizadas como verdade de campo. Após esse processo, os pontos foram convertidos em Pixeis Raster para utilizar o complemento Semi-Automatic Classification Plugin, que é o teste de acurácia. Por meio dele, foram obtidos os parâmetros Índice Kappa (K), Exatidão Global (EG), Acurácia do Produtor (AP) e Acurácia do Usuário (AU).

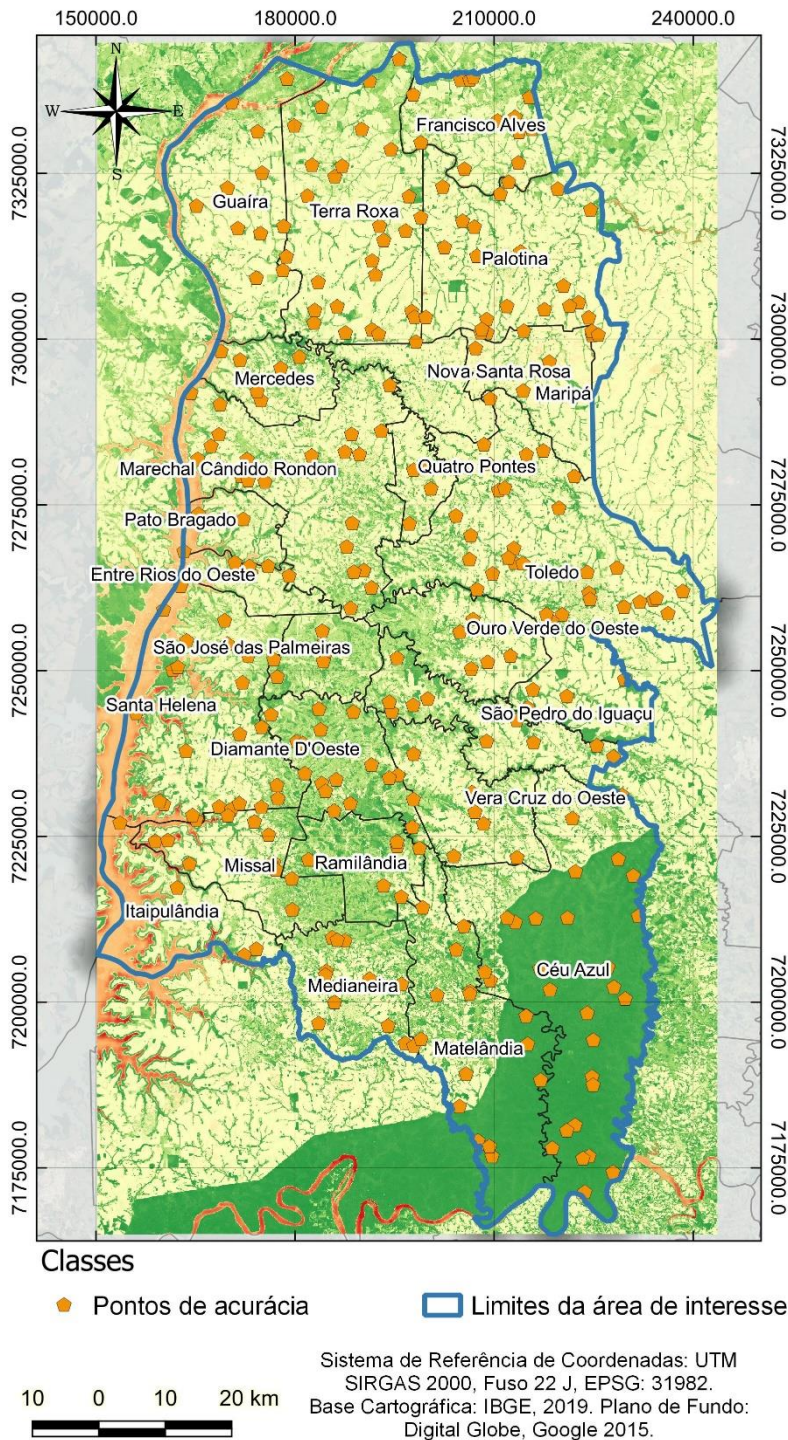


Figura 18. Distribuição de pontos para o teste de acurácia.

O índice Kappa (K) e a Exatidão global (EG) utilizam os valores da matriz de erro para a determinação de seus índices, que são utilizados como parâmetro para verificar a concordância das classes com a tomada por verdade de campo. Os valores de desempenho do índice Kappa estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Classificação do índice Kappa

Índice Kappa	Desempenho
$k < 0$	Péssimo
$0 < k \leq 0,2$	Ruim
$0,2 < k \leq 0,4$	Razoável
$0,4 < k \leq 0,6$	Bom
$0,6 < k \leq 0,8$	Muito Bom
$0,8 < k \leq 1,0$	Excelente

A AP e AU foram determinados utilizando as metodologias propostas por Almeida (2014) e Brito (2008) por meio das Equações 3 e 4.

$$AP = (Pc/Pcl) * 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que:

AP - Acurácia do Produtor (porcentagem de uma classe corretamente classificada);

Pc - Pontos classificados corretamente;

Pcl - Total de pontos classificados como parte da classe analisada.

$$AU = (Pc/Pac) * 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que:

AU - Acurácia do Usuário (porcentagem de pixels corretamente atribuídos a uma classe);

Pc - Pontos classificados corretamente;

Pac - Pontos atribuídos à classe pelo usuário.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *In house validation* para detecção de imidacloprido em mel por HPLC

Os parâmetros selecionados para a validação cromatográfica de imidacloprido em mel foram satisfatórios. A seletividade apresentou resultados adequados, não havendo interferência de resíduos no cromatograma (Figura 19). Observou-se, conforme recomendado para esse teste, a presença do analito de interesse quando adicionado o padrão de imidacloprido $4 \mu\text{g L}^{-1}$, como nota-se na Figura 19 a. O tempo de retenção do imidacloprido foi de 4,794 min (Figura 19 a), com simetria satisfatória no formato do pico. Quando não foi adicionado o padrão de imidacloprido, não houve a detecção do analito de interesse, apenas a presença dos picos de metanol e da solução da fase móvel água-acetonitrila (70:30 v/v), entre os tempos 1 e 3 min (Figura 19 b).

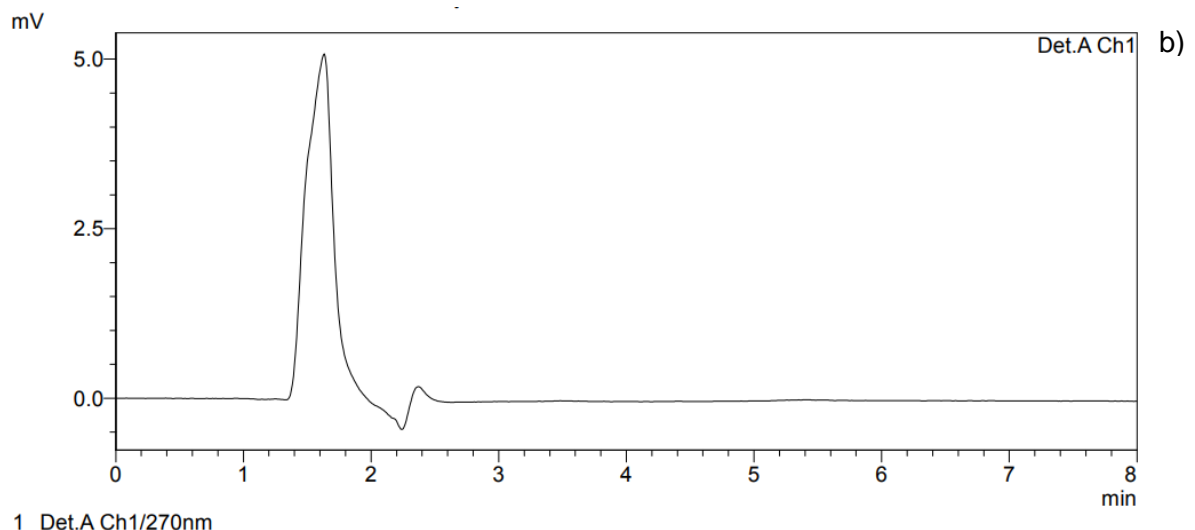
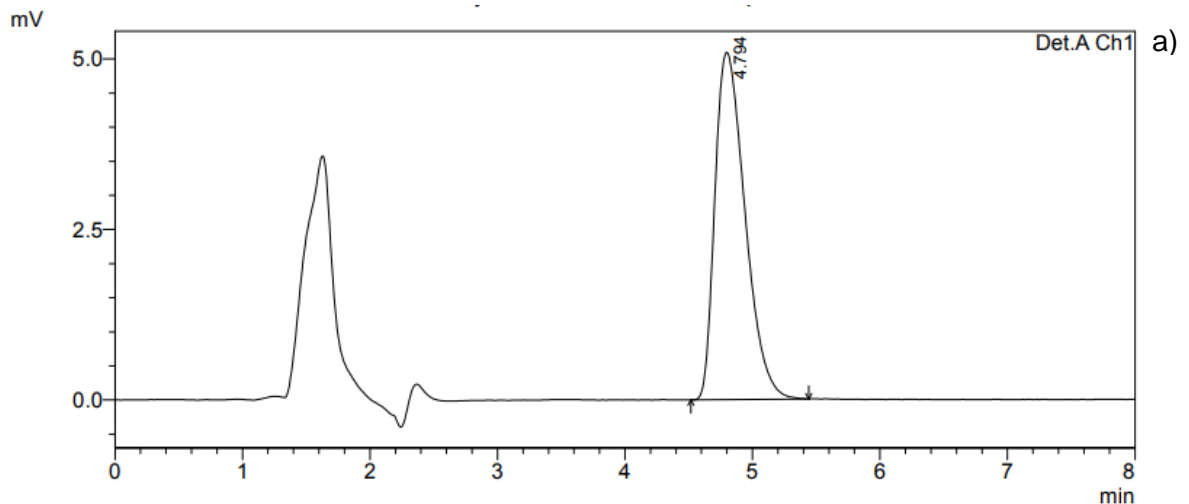


Figura 19. Seletividade do método implantado em HPLC. a) Cromatograma com a adição padrão do analito de interesse - imidacloprido; b) Cromatograma sem o analito de interesse, pico do solvente metanol.

A seletividade é um dos parâmetros mais importantes para iniciar um processo de validação, pois garante a eficiência e eficácia da metodologia, bem como do equipamento utilizado para detecção. No mel, Valverde *et al.* (2018) utilizaram amostras em branco de três origens diferentes comparando os resultados de amostras com adição de padrão de neonicotinoides. Na cromatografia utilizada, não foi observada interferência nos tempos de retenção dos analitos em nenhuma das situações; mesmo fato ocorrido na pesquisa realizada por Jovanov *et al.* (2015).

A linearidade do método apresentou coeficiente de determinação $R^2 = 0,998$, considerado altamente satisfatório segundo recomendações da ANVISA (2017), que define um coeficiente de determinação igual ou superior 0,99. Nas pesquisas realizadas por Pareja *et al.* (2011); Irungu, Raina e Torto (2016); Valverde *et al.* (2018) e Silva e Faria (2020), os coeficientes de determinação apresentaram-se satisfatórios, alcançando valores de R^2 0,99. A curva analítica do imidacloprido que expressa a equação da reta e sua linearidade está apresentada na Figura 20. É por meio da linearidade, da equação da reta, que foi obtida a real concentração de imidacloprido nas amostras de mel extraídas.

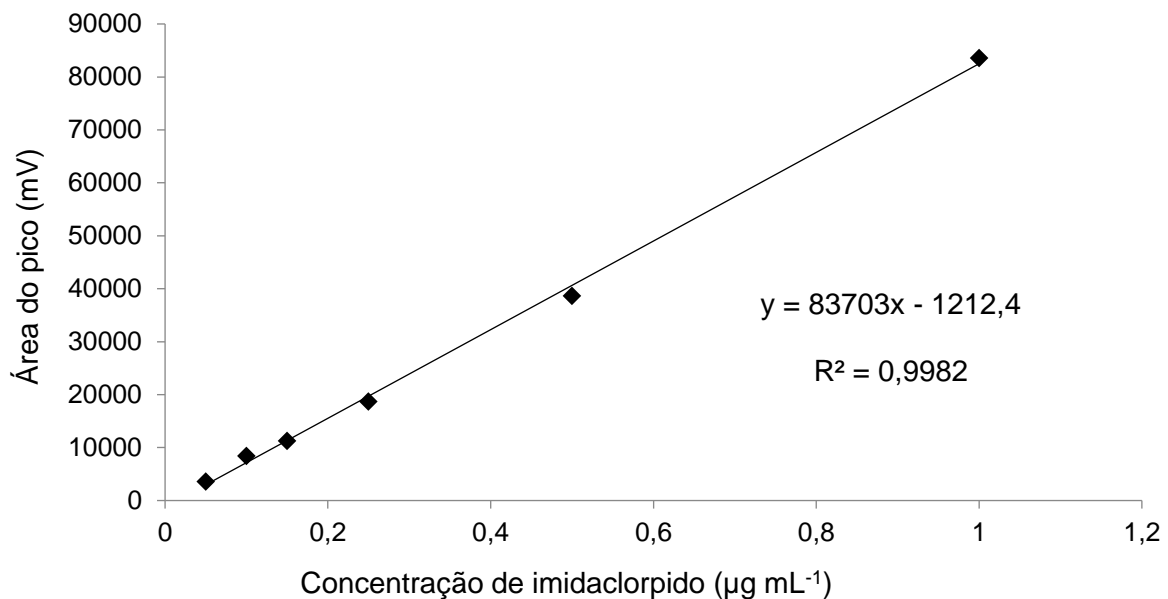


Figura 20. Linearidade do método de detecção de imidacloprido em mel por HPLC.

O limite de detecção (LD), encontrado para imidacloprido, foi de $0,007 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de quantificação $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses limites são menores que os encontrados por Fidente *et al.* (2005) no desenvolvimento de método para a quantificação de quatro neonicotinoides em mel por LC-MS, que foram de aproximadamente $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o LD e $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o LQ na determinação do imidacloprido em extrato de mel.

Para a taxa de recuperação, obteve-se o valor de 92,28%, considerado ideal segundo recomendações da ANVISA (2017) e GARP(1999), que determinam, como intervalos aceitáveis, para análise de resíduos, variações de 70 a 120%, com precisão de $\pm 20\%$ (GARP, 1999). As

taxas de recuperação encontradas por outros pesquisadores variam muito (IRUNGU, RAINA e TORTO, 2016, com 80,65%; PAREJA *et al.*, 2011, com 98%; SILVA e FARIA, 2020, variando de acordo com a técnica de extração, de 70 a 100%), o que está diretamente ligado à cromatografia escolhida como técnica analítica, afinal, cada equipamento apresenta uma sensibilidade diferente.

5.1.1 Detecção e quantificação de imidacloprido nas amostras de mel das regiões pesquisadas

A detecção e quantificação de imidacloprido nas amostras de mel das regiões de interesse estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de imidacloprido nas amostras de mel das regiões pesquisadas

Número da Amostra	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Localização
3	0,640	GRUPO 1
4	0,455	
11	0,192	GRUPO 2
12	0,181	
15	0,153	
17	0,521	
18 a	0,041	
18 b	0,101	
18 c	0,057	
22	0,054	GRUPO 3
24 b	1,273	
25	0,038	
26	0,070	
27 a	0,701	
27 b	0,068	
29	0,630	
30	0,252	
31	0,111	
32	2,570	

Conforme observado na Tabela 5, das 7 amostras pesquisadas do Grupo 1, apenas 2

apresentaram concentrações de imidacloprido; as demais não foram detectadas pelo método selecionado. Nas 23 amostras do Grupo 2, 8 apresentaram concentrações de imidacloprido; as demais também não foram detectáveis pelo método. Já das 11 amostras do Grupo 3, 9 apresentaram concentrações de imidacloprido, sendo elas, com as maiores concentrações, representadas pela amostra 24 b com $1,273 \mu\text{g mL}^{-1}$ – apiário, localizado próximo à Reserva do Parque de Itaipu, seguida da amostra 32 com $2,570 \mu\text{g mL}^{-1}$ com apiário localizado em Itaipulândia. As menores concentrações foram de $0,038 \mu\text{g mL}^{-1}$ correspondente à amostra 25 do Grupo 3, com apiário localizado na linha Guarani, seguida de outro na linha Sanga Leão (Quatro Pontes), representado pela amostra 18 a, com concentração de $0,041 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Em termos de representatividade, os 3 Grupos perfizeram um total de 41,34% das amostras contaminadas por imidacloprido. O Grupo 1 representou 4,88%, seguido do Grupo 2 com 19,51% e o Grupo 3 com a maior expressão em termos de amostras quantificadas, 21,95%.

5.2 *In house validation* para detecção de Fipronil em mel por CG-ECD

Os parâmetros selecionados para a validação cromatográfica do fipronil em mel foram satisfatórios. A seletividade apresentou resultados adequados, não havendo interferência de resíduos no cromatograma (Figura 21). Observou-se, conforme recomendado para esse teste, a presença do analito de interesse quando adicionado o padrão de fipronil ($4 \mu\text{g L}^{-1}$), Figura 21 a. O tempo de retenção do fipronil foi de 14,883 min (Figura 21 a), com simetria satisfatória no formato do pico. Quando não foi adicionado o padrão de fipronil, não houve a detecção do analito de interesse (Figura 21 b).

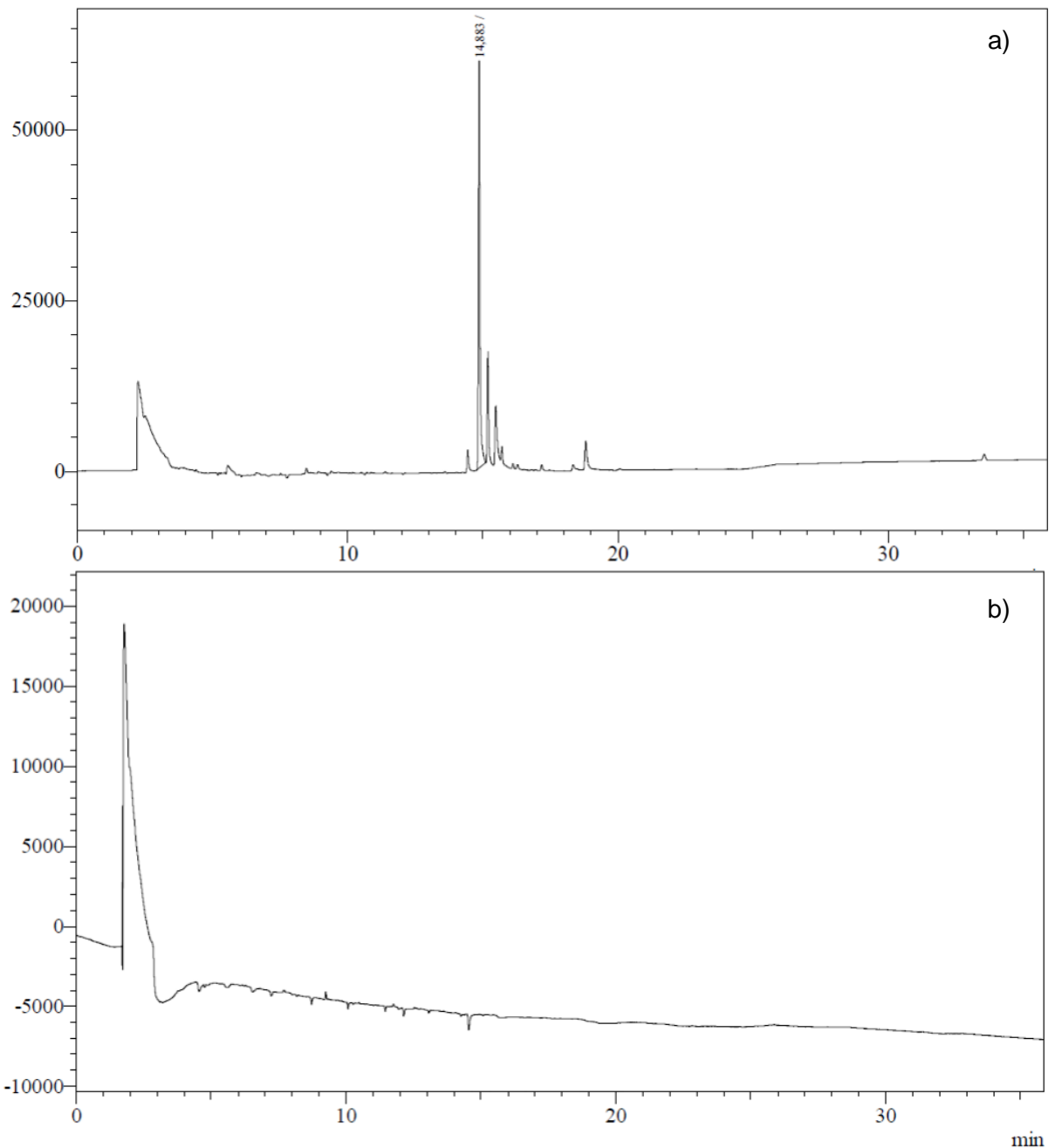


Figura 21. Seletividade do método implantado em CG-ECD. a) Cromatograma com a adição padrão do analito de interesse – fipronil; b) Cromatograma sem o analito de interesse, pico do solvente metanol.

A linearidade do método apresentou coeficiente de determinação R^2 0,9994, considerado altamente satisfatório segundo recomendações da ANVISA (2017), que define um coeficiente de determinação igual ou superior 0,99. A curva analítica do fipronil que expressa a equação da reta e sua linearidade está apresentada na Figura 22. É por meio da linearidade, da equação da reta, que foi obtida a real concentração de fipronil nas amostras de mel extraídas.

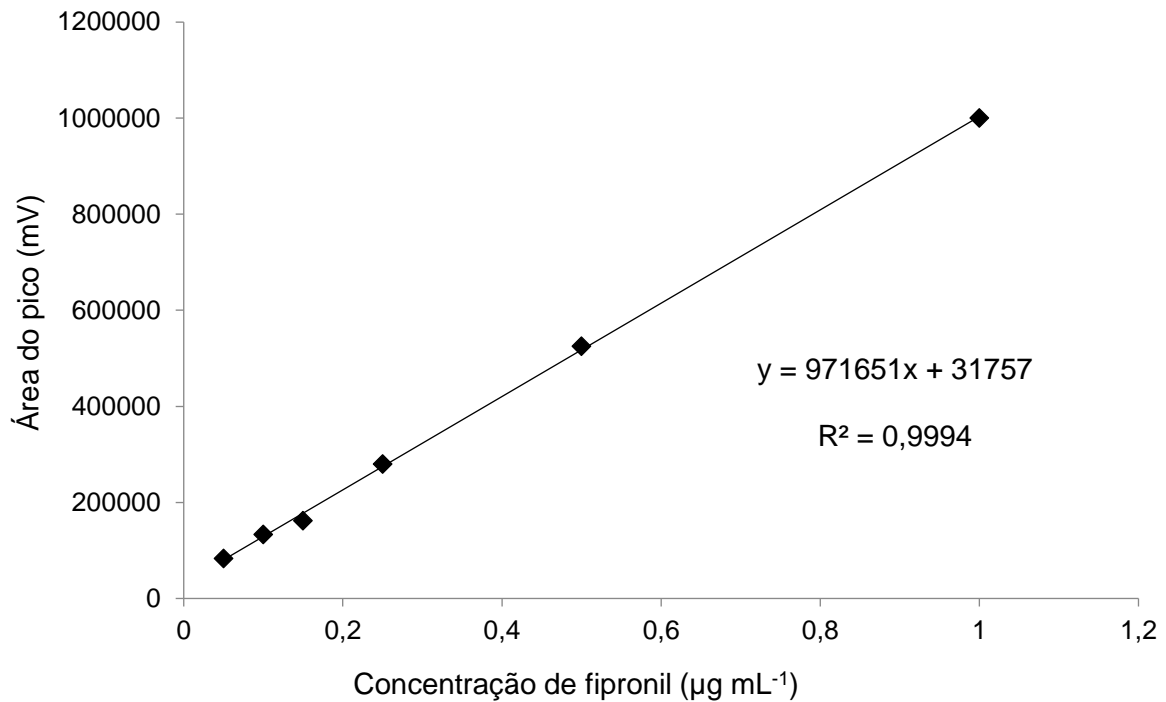


Figura 22. Linearidade do método de detecção de fipronil em mel por CG-ECD.

O limite de detecção (LD), encontrado para fipronil, foi de $0,003 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de quantificação $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a taxa de recuperação, obteve-se o valor de 118,32%, considerado ideal segundo recomendações da ANVISA (2017) e GARP(1999), que determinam, como intervalos aceitáveis para análise de resíduos, variações de 70 a 120%, com precisão de $\pm 20\%$ (GARP, 1999).

Alguns autores também trabalharam com validação metodológica de fipronil em mel, como García-Chao *et al.* (2010), que propuseram o desenvolvimento de um método analítico para determinar resíduos de fipronil, seus metabólitos e imidacloprido em amostras de mel e pólen por cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem. Os parâmetros de validação foram todos satisfatórios. A recuperação para o fipronil nas amostras de mel foi de 95%, menor do que a encontrada neste estudo, assim como nas validações realizadas por Irungu, Raina e Torto (2016) e Rafique *et al.* (2018). Os coeficientes de correlação foram todos superiores a 0,99 e os LD ficaram entre $0,41$ e $2,33 \text{ ng g}^{-1}$ com LQ entre $0,83$ e $4,83 \text{ ng g}^{-1}$. Já Zheng *et al.* (2018), validaram um método para a determinação de fipronil e outros compostos em mel, usando LC-MS/MS. O coeficiente de correlação alcançado foi $\geq 0,99$; os valores de recuperação variaram de 62,06 – 108,32%, próximos ao alcançados nesta pesquisa; o LD foi de $0,0004 \text{ mg kg}^{-1}$ e LQ = $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$, menores quando comparados a este estudo. Isso pode ser justificado pelo fato do tipo de cromatografia selecionada, LC-MS/MS, que é mais sensível do que o CG-ECD.

5.2.1 Detecção e quantificação de fipronil nas amostras de mel das regiões pesquisadas

A detecção e quantificação de fipronil nas amostras de mel das regiões selecionadas estão descritas na Tabela 6 e 7.

Tabela 6. Concentração de fipronil nas amostras de mel dos Grupos 1 e 2

Número da Amostra	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Localização
1	0,0609	
2	0,0587	
3	0,0531	
4	0,0752	GRUPO 1
5	0,0512	
6	0,0758	
7	0,0778	
10	0,0429	
11	0,0344	
12	0,0533	
13	0,0678	
14	0,0816	
15	0,0480	
16	0,0587	
17	0,0535	
18 a	0,0602	
18 b	0,0621	GRUPO 2
18 c	0,0696	
18 d	0,0576	
19	0,0490	
20 a	0,0546	
20 b	0,0463	
20 c	0,0594	
21	0,0678	
22	0,0540	
23 a	0,0454	
23 b	0,0605	

Tabela 7. Concentração de fipronil nas amostras de mel do Grupo 3

Número da Amostra	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Localização
24 a	0,0365	
24 b	0,0548	
25	0,0505	
26	0,0536	
27 a	0,0542	GRUPO 3
27 b	0,0618	
28	0,0518	
31	0,0594	
32	0,0585	

Conforme observado na Tabela 6, todas as amostras pesquisadas do Grupo 1 apresentaram concentrações de fipronil. Nas 23 amostras recebidas do Grupo 2, 20 apresentaram concentrações de fipronil; as demais não foram detectáveis pelo método. Já das 11 amostras do Grupo 3 (Tabela 7), 9 apresentaram concentrações de fipronil; nas demais, não foram detectadas concentrações pelo método proposto. As maiores concentrações foram encontradas no Grupo 2 e 1, respectivamente. Estão representadas pelas amostras 14 com $0,0816 \mu\text{g mL}^{-1}$, apiário localizado no distrito de Margarida, seguida da amostra 7, com $0,0778 \mu\text{g mL}^{-1}$, com apiário localizado na zona rural. As menores concentrações foram de $0,0344 \mu\text{g mL}^{-1}$, correspondente à amostra 11 do Grupo 2, com apiário localizado na linha Peroba, seguida da amostra 24 a, do Grupo 3, com concentração de $0,0365 \mu\text{g mL}^{-1}$ (apiário localizado em Diamante do Oeste).

Em termos de representatividade, os 3 grupos perfizeram um total de 87,8% das amostras contaminadas por fipronil. O Grupo 2 obteve a maior representatividade, com 48,8% das amostras quantificadas, seguido do Grupo 3, com 21,9%, e o Grupo 1, com 17,1%.

5.3 Espacialização das concentrações de imidacloprido e fipronil nos méis pesquisados e uso do solo da microrregião de Toledo - Paraná

A espacialização das concentrações de imidacloprido e fipronil, para avaliar o grau de contaminação presente na microrregião de estudo, está disposta na Figura 23.

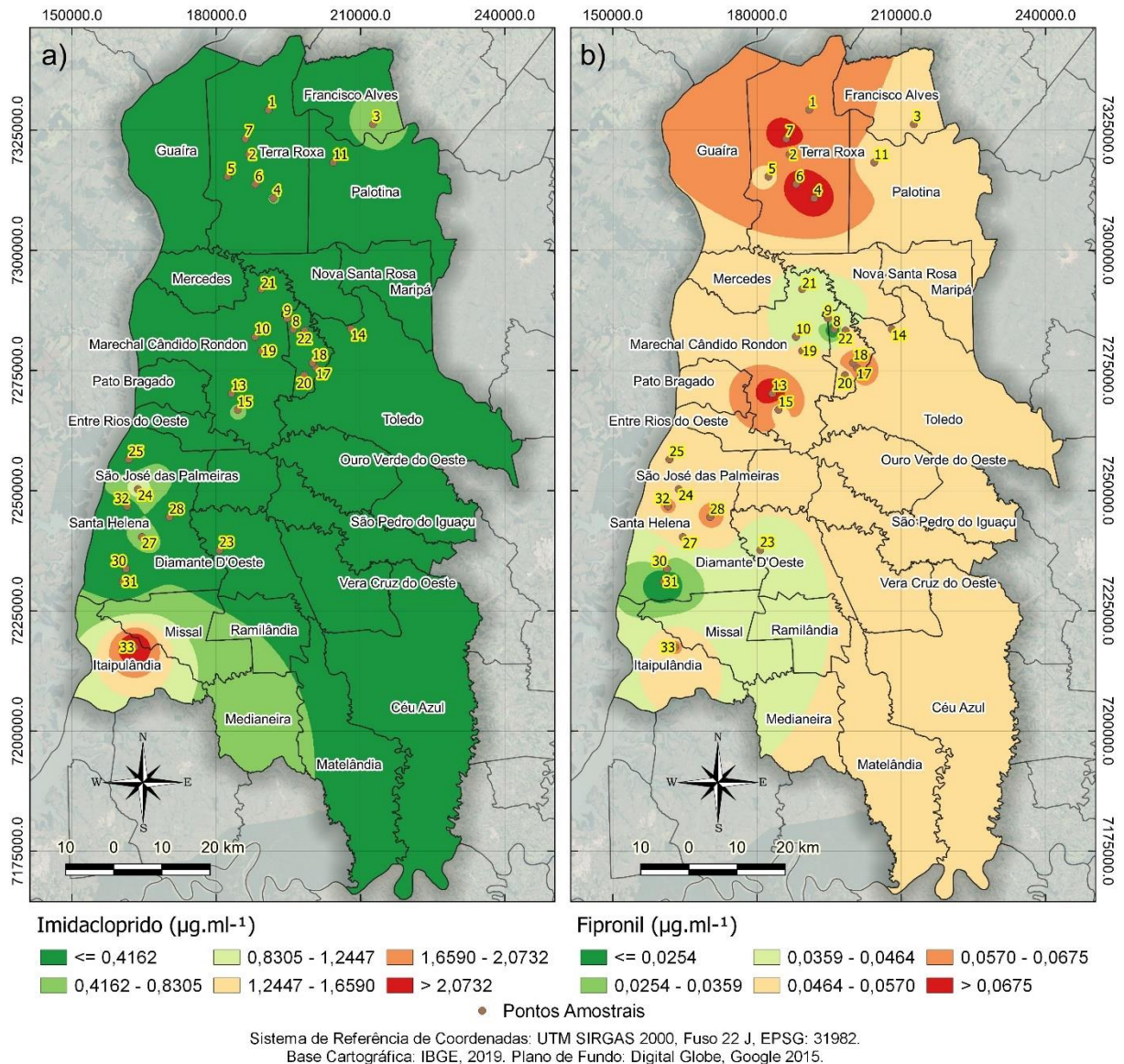


Figura 23. Disposição geográfica das concentrações de imidacloprido e fipronil na microrregião de estudo: a) Imidacloprido; b) Fipronil.

Fica notável, avaliando a Figura 23, a discrepância na distribuição das concentrações dos contaminantes imidacloprido e fipronil. De modo geral, conforme observado anteriormente, temos uma maior porcentagem de amostras detectadas por fipronil (87,8%) do que por imidacloprido (41,34%). Contudo, as maiores concentrações foram de imidacloprido, com valores ultrapassando $2,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 23 a); isso pode estar ligado ao uso desses princípios ativos nas regiões de estudo. Segundo dados fornecidos pela ADAPAR (Agência de Defesa Agropecuária do Paraná), no ano de 2019, foram comercializados, nas regiões de interesse, 41.313,14 kg de imidacloprido para as mais diversas culturas cultivadas, tendo como destaque a soja e milho. Quanto ao fipronil, 2.281 kg foram vendidos do composto nas regiões pesquisadas, também para várias culturas, das quais se destaca a soja.

De forma geral, na área de abrangência do Grupo 1, que corresponde ao município de Terra Roxa e seus arredores, bem como ao Grupo 2, abrangendo o município de Marechal

Cândido Rondon e áreas adjacentes, encontram-se baixas concentrações de imidacloprido ($\leq 0,4162 \mu\text{g mL}^{-1}$), assim, determinada pela pesquisa. Apenas a região de Itaipulândia e sudoeste de Missal (amostra 32 – Figura 23 a), pertencentes ao município de Santa Helena (APISA), apresentaram concentrações importantes do composto, ultrapassando valores maiores que $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esse dado pode ser justificado pelas informações cedidas pela ADAPAR, nas quais se nota que, dentre as áreas abrangentes, a APISA, no ano de 2019, em relação à utilização de imidacloprido em maior escala, ficou representada por Itaipulândia com 13.185,43 kg comercializados, seguida de Missal, com 5.619,33 kg de imidacloprido vendidos para diversas culturas. Se compararmos esses dados aos LMR(s) fornecidos pela UE e pela FAO, as concentrações de imidacloprido para todas as regiões de estudo, mesmo as consideradas baixas para esta pesquisa, são superiores às permitidas no mel ($0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$). Assim, poderíamos mencionar que o mel estaria contaminado por imidacloprido e impróprio para o consumo. Contudo, como não podemos usar dados de regiões distintas como referência, com condições climáticas e florísticas completamente diferentes do Brasil, afirmar que o mel em estudo está contaminado por imidacloprido seria imprudente. Logo, como não temos no Brasil uma legislação vigente que controle ou que impunha LMR para esse composto, quaisquer concentrações encontradas podem servir de alerta para os órgãos responsáveis. Afinal, estamos enfrentando não só no Brasil problemas com declínio nas colônias de abelhas de *Apis mellifera*. Isso compromete não apenas a qualidade do mel, mas também a fundamental importância da polinização para a agricultura e demais sistemas, que é realizada por elas.

Avaliando a distribuição das concentrações de fipronil nos méis das regiões de estudo, nota-se que apenas as áreas sudoeste de Santa Helena, os arredores de Diamante D'Oeste, Ramilândia, Missal, Medianeira, algumas regiões de Itaipulândia, que participam do Grupo 3, e a região nordeste de Marechal Cândido Rondon, abrangendo o sul de Quatro Pontes, pertencentes ao Grupo 2, encontram-se com as menores concentrações do composto ($\leq 0,0254 - 0,0359 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 23 b). Nas demais regiões de interesse, foram encontradas concentrações de média à alta de fipronil, determinadas para este estudo, ultrapassando valores de $0,0675 \mu\text{g mL}^{-1}$. Vale destacar as regiões de Terra Roxa e Guaíra, pertencentes ao Grupo 1, e o sudoeste de Marechal Cândido Rondon (Grupo 2), com as maiores concentrações, como destacado no mapa (Figura 23 b). Essa representatividade das áreas destacadas no mapa está profundamente ligada à utilização de fipronil nas culturas cultivadas. Segundo dados relatados pela ADAPAR, Terra Roxa foi o local com maior venda de fipronil: 1.253 kg foram registrados no ano de 2019. Na mesma região, abrangendo o Grupo 1, Guaíra também se destacou quanto ao consumo de fipronil; em 2019, 569 kg foram comercializados. Já referente ao Grupo 2, em Marechal Cândido Rondon foram vendidos 864 kg de fipronil; a maior notoriedade na utilização foi na cultura da soja. De igual forma, se compararmos com o LMR fornecido pela UE ($0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$) e com o permitido pela FAO ($0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$), podemos afirmar que todas as amostras, mesmo aquelas com as menores concentrações, estão

contaminadas por fipronil, tornando os méis impróprios para o consumo. Todavia, vale a mesma justificativa mencionada anteriormente para o imidacloprido. Infelizmente, não temos, no Brasil, um LMR preconizado para esse composto, o que impossibilita um diagnóstico preciso sobre a real situação da qualidade do mel comercializado na região.

A ADAPAR infere, ainda, em termos de utilização de fipronil e imidacloprido, especificamente nas regiões de estudo, outras culturas além de soja e milho para ambos os compostos. Fipronil também é aplicado nas culturas de feijão, trigo, cana-de-açúcar, eucalipto e pastagens. Já o imidacloprido, também é usado nas culturas de trigo, fumo, alface, feijão, couve, pepino, repolho, brócolis, couve-flor, tomate, café, uva e banana. Essa informação nos permite afirmar que, mesmo sendo usados em menores quantidades para essas culturas, também representam uma via de exposição para as abelhas que fazem a visitação dessas espécies em épocas de floração. Colabora, assim, para a real situação encontrada nas regiões estudadas do fipronil; por exemplo, apenas 5 amostras não foram quantificadas pelo método proposto, o que nos permitiu observar uma maior dissipação nas regiões de estudo. Isso nos leva a crer que pode ter relação com o número de culturas em que ele é utilizado, aumentando as chances de contato por visitação das abelhas com o ingrediente ativo.

Vale ressaltar, para ambos os casos, que foram registrados, no ano de 2019, alguns casos mencionados por apicultores das regiões de estudo, perdas de colmeias de *Apis mellifera*, o que comprometeu acentuadamente a produtividade e a qualidade do mel para a comercialização; tal fato pode estar diretamente ligado à utilização de imidacloprido e fipronil nas culturas de soja e milho na microregião de estudo. Esse fato também foi alvo de inúmeras reportagens e edições em vias públicas, a fim de servir como alerta para os agricultores quanto ao uso abusivo de defensivos agrícolas, evidenciados principalmente nas épocas de safra e safrinha de soja e milho, que são os principais veículos de renda dos cultivadores desses grãos. Infelizmente, a avaliação de pesticidas específicos no mel não é contemplada nas análises físico-químicas exigidas para a comercialização; isso porque não temos legismente uma ampla variedade de agrotóxicos com LMR(s) preconizados e também porque o estabelecimento desse requisito é, de certa forma, de alto custo para a elaboração e de difícil desenvolvimento, em muitos casos. Nesse ponto, entra a importância do avanço das pesquisas científicas envolvendo o uso de pesticidas com as inúmeras matrizes que eles envolvem em todo esse processo, com o propósito de alcance do mínimo de sustentabilidade para todo o ecossistema envolvido. Afinal, como no caso do presente estudo, o declínio de colônias de abelhas não afeta apenas economicamente os apicultores e a qualidade do mel que consumimos, mas também a agricultura e todas as plantas que dependem das abelhas para a polinização, ou seja, perde-se o equilíbrio de todo o ecossistema englobado nesse sentido.

Encontrar doses de fipronil no mel nos leva a crer que a exposição das abelhas a esse pesticida ocorreu também em doses subletais, visto que, se tivessem expostas a concentrações maiores do que elas suportam, causariam alta letalidade. Tal fato é afirmado

por Trapp; Pussemier (1991), os quais reiteram que a exposição direta dos polinizadores a doses superiores ou iguais a LD₅₀ de fipronil, durante a pulverização, pode resultar em sua morte imediata, devido à alta toxicidade do ingrediente ativo. Além dos efeitos agudos, a comprovada ação sistêmica do fipronil faz com que cultivos tratados, durante o plantio ou fora do período de floração, apresentem resíduos desse inseticida ou de seus metabólitos no pólen e néctar. Como consequência, as abelhas polinizadoras podem degustar a exposição crônica a esse inseticida. Elas coletam recursos contaminados com doses subletais e os armazenam nas colmeias, afetando o desenvolvimento, sobrevivência das colônias em longo prazo e a qualidade do mel produzido (JOHNSON *et al.*, 2010). Mesmo não causando o declínio de colônia de modo imediato, por assim dizer, em doses subletais, o fipronil pode afetar a percepção gustativa e o aprendizado olfativo das abelhas, que são funções essenciais no forrageamento desses insetos (EL HASSANI *et al.*, 2005).

Quanto ao imidacloprido, a presença de maiores concentrações no mel pode estar relacionada ao sistema de intoxicação e formação de metabólitos, conforme mencionado por Suchail, Debrauwer & Belzunces (2003). Após a exposição oral ao imidacloprido, a relação dose-mortalidade apresenta-se em um perfil multifásico, contemplando fases ascendentes e descendentes. A cinética da mortalidade é adiada conforme as doses aumentam. Nota-se que os sintomas de neurotoxicidade aparecem rapidamente, enquanto a mortalidade ocorre 4 horas após a intoxicação aguda e é prolongada por mais de 96 horas. Assim, o imidacloprido tem uma ação prolongada ou retardada, mas os sintomas são sempre imediatos. Alguns metabólitos do imidacloprido são considerados altamente tóxicos, visto que causam os mesmos sintomas, nos mesmos níveis de toxicidade. Contudo, há uma discrepância entre a cinética da mortalidade e os sintomas de neurotoxicidade. Isso pode acontecer devido ao fato de que ambas, combinadas, geram uma ação conjunta de baixas quantidades de metabólitos tóxicos e do próprio imidacloprido. Ou seja, os sintomas neurotóxicos iniciais podem ser desencadeados pelo imidacloprido, enquanto a mortalidade pode ser induzida por seus metabólitos tóxicos, fato também confirmado por Faucon *et al.* (2005). Ou seja, o tempo de exposição amplifica a toxicidade do imidacloprido, o que torna esse composto ainda mais crítico para as abelhas. Assim como o fipronil, o imidacloprido encontrado no mel pode estar presente devido à exposição crônica das abelhas ao composto, a doses menores que o LD₅₀, durante a utilização via foliar, tronco, solo e/ou semeadura de sementes.

Quanto à classificação do uso do solo, a acurácia apresentou resultados satisfatórios; o índice Kappa obtido para a classificação foi de 0,899, atendendo a classe excelente proposta por Landis (1977). A AP foi de 97,17%, superior à exigida pelo método (92,99%); a AU foi de 92,17% e o EG, de 94,98%. A correlação das concentrações de imidacloprido e fipronil com o uso e ocupação do solo, quanto a áreas agricultáveis, das zonas de estudo com as regiões de forrageamento das abelhas *Apis mellifera*, está disposta na Figura 24.

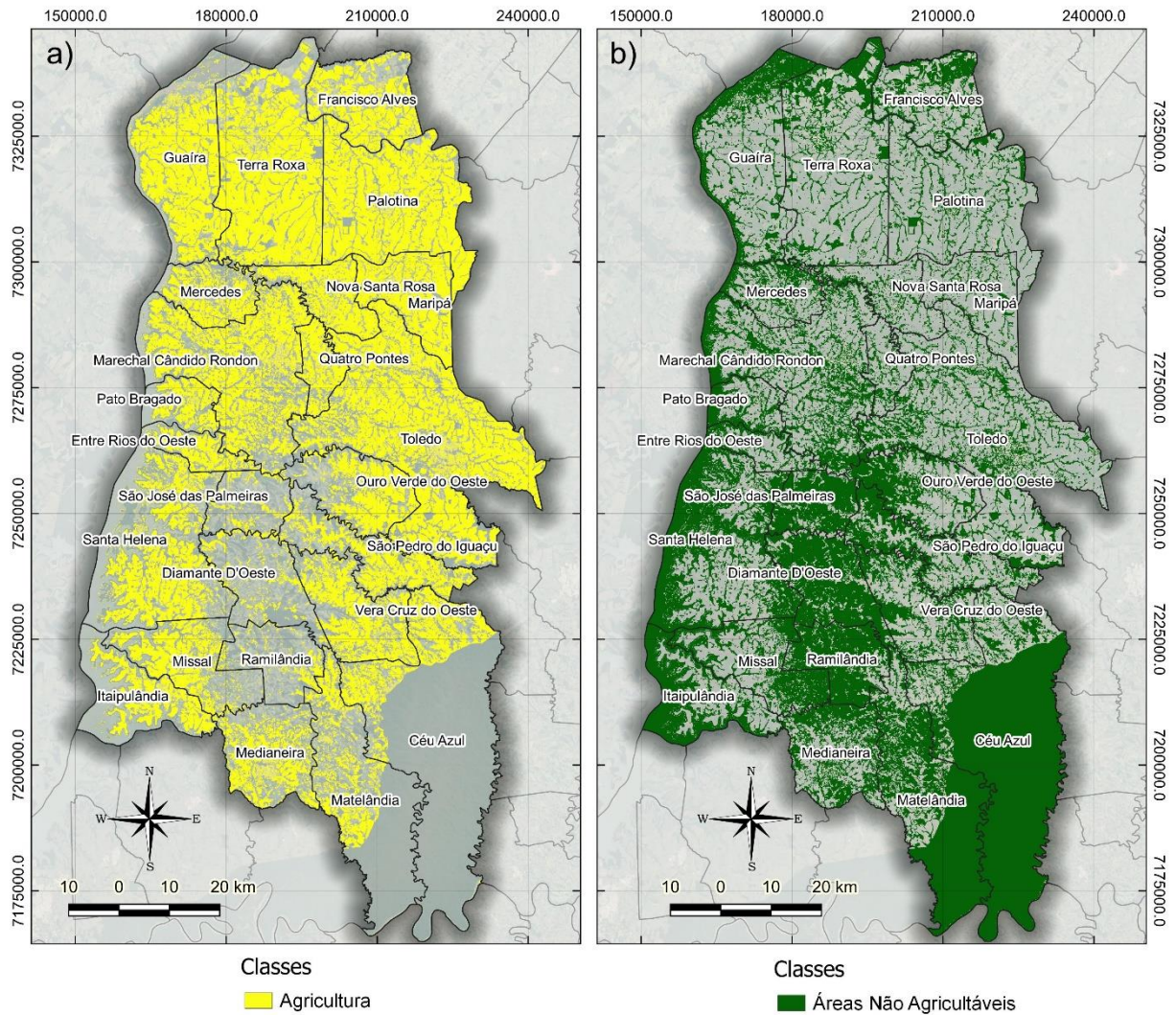


Figura 24. Uso e ocupação do solo das regiões de forrageamento das abelhas na microregião de Toledo - Paraná: a) Agricultura; b) Áreas não agricultáveis.

De forma geral, nota-se, pela Figura 24, que as regiões abrangentes aos apiários coletados nas regiões estudadas apresentam atividade agrícola volumosa, com representatividade de 49,83% da área total (Figura 24 a); já o território não agricultável, abrangeu 50,18% (Figura 24 b). Tomando por base os Grupos selecionados, destaca-se o Grupo 1 com a maior porcentagem de área agrícola - 70,96%, seguida do 2, com 56,99% e 3, com 41,32%.

Em termos de contaminação por fipronil, por exemplo, o Grupo 1 obteve a maior representatividade das amostras e das concentrações encontradas no mel, em que todas as amostras apresentaram o composto, em maiores concentrações. A amostra com a maior concentração ficou representada por um apiário localizado na Reserva de Itaipu, em Margarida (Grupo 2), seguida de um apiário localizado na zona rural de Terra Roxa, no qual o apicultor também faz o plantio de soja e milho na propriedade. Assim, podemos afirmar que pode haver relação das concentrações encontradas com o uso do solo nas regiões, visto que é um inseticida de amplo espectro, podendo ser utilizado no solo, aplicação foliar, sementes e água de irrigação.

Pouco mais da metade da área de forrageamento das abelhas na região pertencente ao Grupo 2 encontra-se com terras agricultáveis, o que também nos permite afirmar a relação do uso e ocupação com a situação encontrada nas amostras pesquisadas. De um total de 23 amostras, 20 apresentaram concentrações de fipronil, que variaram de baixa a alta, determinadas pela pesquisa. Mesmo o Grupo 3 representando a menor porcentagem de uso agrícola da região de estudo, também teve representatividade nas concentrações de fipronil nos méis pesquisados; das 11 amostras, 9 foram detectadas com o composto.

Em relação ao imidacloprido, merece destaque, mesmo com a menor porcentagem de área agricultável, o Grupo 3, conforme fica evidente na Figura 24 a. Das 11 amostras recebidas, 9 foram detectadas com o composto e com as maiores concentrações. A maior concentração foi localizada em um apiário em Itaipulândia, no qual, nas áreas adjacentes, a menos de 2 km, contém culturas cultivadas de soja e milho. Esse dado nos permite admitir que as abelhas podem ter tido contato com o composto das mais variadas formas, visto que elas forrageiam em raios de cerca de 3 km da colmeia, em busca de alimento, como mencionando por Balayiannis; Balayiannis (2008). Outra amostra que se destacou, quanto à concentração de imidacloprido, foi a de um apiário situado na Reserva de Itaipu. Nas áreas de forrageamento das abelhas, não há, segundo informações cedidas pelo proprietário, atividade agrícola.

Segundo dados obtidos pelo IBGE, a agricultura paranaense é responsável por cerca de um quarto da produção de grãos do Brasil. Fatores como clima e solo, nas várias regiões do estado, têm possibilitado uma grande diversificação agrícola. Além disso, o desempenho da agricultura no estado está estreitamente relacionado ao crescimento do cooperativismo, que congrega atualmente mais de 40% dos produtores rurais e 56% da produção agropecuária de todo o estado. Dentre a produção agrícola com maior destaque para o Paraná, entram o milho e a soja. No ano de 2019, representaram 32.795.402 de toneladas produzidas; dessas, 16.547.408 toneladas de milho e 16.247.994 toneladas de soja. Em termos de área colhida, juntos, somam 8.033.708 de hectares, 2.591.347 ha de milho e 5.442.361 ha de soja.

Direcionando o uso da terra com a utilização de defensivos agrícolas, sabemos que, na microregião de estudo, o processo de plantio do milho (safra) acontece entre final de agosto até o mês de outubro, com semeadura da safrinha nos meses de janeiro a março. Já o plantio da soja, acontece de agosto a novembro e há ainda produtores que iniciaram com safrinha de soja, na qual a semeadura ocorre de janeiro a fevereiro. O mel é colhido praticamente o ano todo, mas apresenta uma grande safra, que ocorre dependendo da florada e do índice de chuvas, de setembro a março. De março a agosto, os apicultores realizam o manejo dos apiários e das abelhas.

Uma das formas de utilização em larga escala do imidacloprido é via semeadura de sementes, principalmente no milho. Dos 80 a 98% do ingrediente ativo, revestido nas sementes, que não são absorvidos pela cultura, por volta de 2% são perdidos como poeira durante a semeadura (TAPPARO *et al.*, 2012). O material particulado liberado pela máquina

de perfuração, durante a semeadura do milho, representa um mecanismo significativo de difusão ambiental de inseticidas. As abelhas, que voam sobre o campo de semeadura e se aproximam da nuvem de emissão da máquina de perfuração, podem interceptar as partículas suspensas que estão contaminadas. O consequente efeito letal agudo, evidenciado durante semeadura em campo, pode ser um influenciador dos fenômenos de perda de colônias relatados por apicultores na primavera e associados à semeadura de milho (TAPPARO *et al.*, 2012). Unido a isso, pode-se inferir que existe certa persistência e acúmulo de resíduos neonicotinoides no solo ao longo de um ou mais ciclos anuais de sucessão de culturas (BOTÍAS *et al.*, 2015). O fipronil também vem sendo muito usado no revestimento de sementes, assim, pode ser acometido pelos mesmos processos acima mencionados. Além disso, ele é considerado um inseticida preventivo de pulverização foliar ou aplicação nos sulcos da terra antes que as sementes sejam semeadas. Tudo porque, assim como o imidacloprido, é um defensivo de ordem sistêmica, então, pode ser usado preventivamente, antes mesmo que a planta surja (SIMON-DELSO *et al.*, 2015).

As amostras para desenvolvimento da pesquisa foram coletadas no mês de dezembro de 2019, em meio à safra anual de colheita de mel. Uma das formas mais comercializadas de fipronil na microregião de estudo é por meio do revestimento de sementes de soja; já o imidacloprido, é vendido expressivamente para revestimento de sementes de milho e para pulverização, como no caso do controle da cigarrinha. Então, se relacionarmos o uso dos defensivos com a época de semeadura do milho e soja, podemos afirmar que as concentrações encontradas no mel podem estar ligadas à nuvem de emissão da máquina de perfuração e são remanescentes desse processo, inferindo uma contaminação crônica de ambos os compostos. Logicamente, como mencionado anteriormente, o uso de fipronil e imidacloprido não é exclusivo para revestimento, então, as abelhas podem ter entrado em contato com as partículas desses compostos por dispersão via aerossol, durante a pulverização, por exemplo.

Tendo em vista o pressuposto, podemos afirmar que houve relação entre as concentrações de fipronil e imidacloprido encontradas no mel, com o uso da terra nas regiões de forrageamento das abelhas, visto que, na macrorregião de estudo, é basicamente a agricultura a forma de subsistência das famílias. Em termos de representatividade das concentrações, todas as amostras, em que foi detectada a presença dos compostos, encontraram-se acima dos LMR(s) preconizados pela EU e pela FAO. Assim, se levássemos em consideração esse ponto, mencionar que o mel estaria contaminado por fipronil e imidacloprido e impróprio para o consumo seria correto. Contudo, não temos legislação que limite as concentrações no Brasil. Então, podemos afirmar, apenas, que os méis pesquisados apresentaram concentrações dos compostos e merecem ser levados em consideração quando se pensa em qualidade do mel ou produção de mel orgânico. Não apenas por isso, deve-se apontar também a importância das abelhas para todo o ecossistema, inclusive para a agricultura. Elas são responsáveis por mais de 90% da polinização das espécies de plantas

e desses, por mais de 72% da polinização agrícola. Dessa forma, se não alcançarmos um equilíbrio no uso de pesticidas, respeitando a extensão de forrageamento das abelhas, vamos não apenas comprometer a atividade apícola, quanto à produtividade e qualidade do mel, mas também haverá um declínio de colônias de abelhas, o que ocasionará um colapso ambiental, afetando todo o sistema de polinização e sustentabilidade do ecossistema envolvido.

6 CONCLUSÃO

As concentrações encontradas de imidacloprido e fipronil nas amostras dos méis pesquisados nos 3 Grupos selecionados excederam todas, mesmo aquelas que foram consideradas baixas para a pesquisa, os LMR(s) permitidos pela EU e pela FAO. Isso já nos serve de alerta, mesmo que não tenhamos no Brasil uma legislação que controle as quantidades desses compostos no mel. Entrelaçado a isso, ainda, há a importância das abelhas para o equilíbrio do ecossistema, bem como a utilização em larga escala de pesticidas de medida despreocupada e, muitas vezes, de modos inapropriados, desrespeitando o receituário agrônomo.

Dados como esse, também, buscam a conscientização dos agricultores e autoridades, quanto a encontrar uma alternativa que diminua o impacto sobre as abelhas. Afinal, sem abelhas, não conseguiríamos atender à demanda populacional por alimentos e não apenas o mel, mas a agricultura fracassaria sem os serviços de polinização. E, ainda, como demonstrado pela pesquisa, em vários pontos de coleta, os apiários, ficavam a menos de 3 km de plantação de culturas agrícolas, distância considerada de forrageamento das abelhas. Vale pontuar que, mesmo não tendo relatos significativos de perdas de colônias de *Apis mellifera* nas regiões, a qualidade e a produtividade do mel são, sem dúvida, afetadas pela utilização de fipronil e imidacloprido na macrorregião de estudo.

Por fim, não se trata de proibir a utilização de pesticidas ou de impedir o avanço da agricultura na região para garantir a vida das abelhas ou da apicultura, mas de encontrar um equilíbrio que não reverbere em prejuízos irreversíveis ao ecossistema como um todo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEMEL - **Associação Brasileira de Exportadores de Mel**. Disponível em: <http://brazilletsbee.com.br/abemel.aspx>. Acesso em: 09 abr. 2020.

ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. **Agrotóxicos – inseticidas**. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br>. Acesso: 04 nov. 2019.

ALAUX, C.; BRUNET, J-L.; DUSSAUBAT, C.; MONDET, F.; TCHAMITCHAN, S.; COUSIN, M.; BRILLARD, J.; BALDY, A.; BELZUNCES, L. P.; LE CONTE, Y. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 774-782, 2010.

ALIOUANE, Y.; EL HASSANI, A. K.; GARY, V.; ARMENGAUD, C.; LAMBIN, H.; GAUTHIER, M. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 113-122, 2009.

ALMEIDA, A. S. de *et al.* Classificação orientada a objeto de imagens de sensoriamento remoto em estudos epidemiológicos sobre leishmaniose visceral em área urbana. **Cad Saude Publica**, v. 30, n. 8, p. 1639-53, 2014.

ALVES, D. A. A importância da paisagem agrícola no serviço de polinização das abelhas. *In: Agricultura e Polinizadores*. Chaper: 03. Organizador: Associação Brasileira de Estudos das Abelhas - A.B.E.L.H.A. 2015. p 32-43.

AMARO, P. A nomenclatura, a composição, os tipos de formulação, a classificação e a aplicação dos pesticidas. *In: AMARO, P. A proteção integrada*. Lisboa: ISA/Press, 2003. 446p.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v.63, p. 549-562, 1998.

ANSARI, A.; ALI, A.; ASIF, M.; SHAMSUZZAMAN. Review: biologically active pyrazole derivatives. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 16-41, 2017.

ANVISA - Agência Nacional de vigilância Sanitária. **Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Documento de base para discussão regulatória. Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia – GEARE; Gerência Geral de Alimentos – GGALI**. Brasília, 2018.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 1740, de 30/06/16 (DOU de 04/07/16) RESOLUÇÃO-RE Nº 2.114, de 1/8/2019 (DOU de 5/8/2019)**.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice monográfico I13 – imidacloprido**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/I13+%E2%80%93+Imidacloprido/9d08c7e5-8979-4ee9-b76c-1092899514d7>. Acesso: 10 jun. 2020.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Agricultura – Secretaria de Defesa Agropecuária – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). **Instrução Normativa Nº11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000, 33p.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos**. 2003.

ARMENGAUD, C.; CAUSSE, N.; AÏT-OUBAH, J.; GINOLHAC, A.; GAUTHIER, M. Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain. (Short communication). **Brain Research**, v.859, p.390-393, 2000.

BALAYIANNIS, G.; BALAYIANNIS, P. Bee Honey as an Environmental Bioindicator of Pesticides' Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 462-470, 2008.

BANDINI, T. B.; SPISSO, B. F. Risco sanitário do mel no Brasil em relação a novas ameaças: resíduos e contaminantes químicos emergentes. **Vigilância sanitária em debate: sociedade, ciência e tecnologia**, v. 5, n. 1, p. 116-126, 2017.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o ambiente**. Editora UFV – Viçosa, 2004.

BELIEN, T.; KELLERS, J.; HEYLEN, K.; KEULEMANS, W.; BILLEN, J.; ARCKENS, G.; HUYBRECHTS, R.; GOBIN, B. Effects of sublethal doses of crop protection agents on honey bee (*Apis mellifera*) global colony vitality and its potential link with aberrant foraging activity. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 74, n. 1, p. 245-253, 2009.

BEN-SHAHAR, Y.; LEUNG, H. T.; PAK, W. L.; SOKOLOWSKI, M. B.; ROBINSON, G. E. cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the foraging gene in honeybee division of labor. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 2507-2715, 2003.

BERNADOU, A.; DE´MARES, F.; COURET-FAUVEL, T.; SANDOZ, J. C.; GAUTHIER, M. Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 1099-1106, 2009.

BERNHARDT, E.S.; ROSI, E. J.; GESSNER, M. O. Synthetic chemicals as agents of global change. **Frontiers in Ecology and Environment**, v. 15, n. 2, p. 84-90, 2017.

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, 2013.

BIDDINGER, D.J., RAJOTTE, E.G. Integrated pest and pollinator management-adding a new dimension to an accepted paradigm. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 204-209, 2015.

BOBÉ, A.; MEALLIER, P.; COOPER, J-F.; COSTE, C. M. Kinetics and Mechanisms of Abiotic Degradation of Fipronil (Hydrolysis and Photolysis). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 2834–2839, 1998.

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

BORDEREAU-DUBOIS, B.; LIST, O.; CALAS-LIST, D.; MARQUES, O.; COMMUNAL, P. Y.; THANY, S. H.; LAPIED, B. Transmembrane potential polarization, calcium influx and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nAChR to the neonicotinoid insecticides. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, p. 326-339, 2012.

BOTÍAS, C.; DAVID, A.; HORWOOD, J.; ABDUL-SADA, A.; NICHOLLS, E.; HILL, E.; GOULSON, D. Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for

bees. **Environmental Science and Technology**, v. 49, p. 12731-12740, 2015.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360. **Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados.** 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 50. **Programas de Controle de Resíduos em Carne (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2006.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 30 de março de 2007. **Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Eqüina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2007.** 2007.

BRITO, A. de. **Acurácia e precisão do mapeamento da flora nativa e dos reflorestamentos de Minas Gerais.** Orientador: José Marcio de Mello. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

BURKLE, L. A.; MARLIN, J. C.; KNIGHT, T. M. Plant–pollinator interactions over 120 years: loss of species, co-occurrence, and function. **Science**, v. 339, p. 1611-15, 2013.

CAMPOS, G. **Melato no mel e sua determinação através de diferentes metodologias.** Orientador: . 1998. 178f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

CARNEIRO, F. F. *et al.* **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012. 98p.

CASIDA, J. E. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.7, p. 2923-2931, 2011.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 99-117, 2013.

CASTILHOS, D. **Desaparecimento e morte de abelhas no Brasil, registrados no aplicativo BEE ALERT.** 2018. 163f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

CASTRO-VAZQUEZ, L., DIÁZMAROTO, M. C. e REZCOELLO, S. P. Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 4809-4813, 2006.

CHAGNON, M.; KREUTZWEISER, D.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; VAN DER SLUIJS, J. P. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 119-134, 2015.

CHAUZAT, M-P.; CARPENTIER, P.; MARTEL, A-C.; BOUGEARD, S'P.; COUGOULE, N.; PORTA, P.; LACHAIZE, J.; MADEC, F.; AUBERT, M.; FAUCON, J-P. Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. **Environmental Entomology**, v.38, n. 3, p. 514-523, 2009.

CHOUHDARY, A.; SHARMA, D. C. Pesticide Residues in Honey Samples from Himachal Pradesh (India). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 417-422, 2008.

CIDASC - **Companhia Integrada de Desenvolvimento de Santa Catarina 2019 – Secretaria de Estado da Agricultura, da Pesca e do Desenvolvimento Rural**. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2019/12/09/cidasc-defende-restricao-a-agrotoxico-que-mata-abelhas-em-reuniao-nacional/>. Acesso: 13 mai. 2020.

COLIN, M. E.; BONMATIN, J. M.; MOINEAU, I.; GAIMON, BRUN, S.; VERMANDERE, J. P. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Archive of Environmental Contamination Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 387-395, 2004.

Comissão Europeia (European Commission - EC): **Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market and Repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC**. OJ L 309/1, 24.11. 2009. p. 1-50.

CONTE, Y. L.; ELLIS, M.; RITTER, W. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 353-363, 2010.

CONNOLLY, C.N. The risk of insecticides to pollinating insects. Commun. **Integrative Biology**, v.6, n.5, p. e25074, 2013.

COOFAMEL – **Cooperativa Agrofamiliar Solidária dos Apicultores da Costa Oeste do Paraná. A Coofmel**. Disponível em: <http://www.coofamel.com.br>. Acesso: 16 dez. 2019.

COSTA, N. R. **Determinação de fipronil e imidacloprido em mel utilizando cromatografia gasosa e líquida**. 2014. 85f. Dissertação (Mestrado em Química) –Universidade de Brasília, Brasília -DF, 2014.

COUVILLON, M. J.; RATNIEKS, F. L. W. Environmental consultancy: dancing bee bioindicators to evaluate landscape health. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 44, p. 1-8, 2015.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P. L.; BRIESE, T.; HORNIG, H.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; VANENGELSDORP, D.; KALKSTEIN, A. L.; DRYSDALE, U. M.; HUI, J.; ZHAI, J.; CUI, L.; HUTCHISON, S. K.; SIMONS, J. F.; EGHOLM, M.; PETTIS, J. S.; LIPKIN, W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1983.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELEGUE, M. H. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera*) are differentially affected by imidaclopride according to the season. **Pest Management. Science**, v. 59, n. 3, p. 269-278, 2003.

DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pesticides Science**, v. 8, n. 6, p. 651-660, 1977.

EL HASSANI, A. K.; DACHER, H.; GAUTHIER, H.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 1, p. 30-39, 2005.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agropecuária

do Meio-Norte Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Sistemas de produção – Produção de mel**. Edição: Ricardo Costa Rodrigues de Camargo. EMBRAPA Meio-Norte. 1º ed. 2002. 138p. ISSN 0104-866X

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Doenças e inimigos naturais das abelhas**. Documento 103. Teresina, Piauí. 1º edição. 2004. 26p.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Mel características e propriedades**. Camargo e t al. EMBRAPA Meio-Norte. 1º edição. Documento 150. 2006. 28p. ISSN 0 104-866X

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **ABC da agricultura familiar – Criação de abelhas (apicultura)**. 1º edição. Embrapa Informação Tecnológica; Embrapa Meio-Norte. – Brasília, DF. 2007. 113p.

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus spp.* and solitary bees). **EFSA Journal**, v. 11, n. (7):3295, p. 1-268, 2013.

EVANS, J.D.; SPIVAK, M. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.103, p.S62-S72, 2010.

FAUCON, J-P.; AURIÈRES, C.; DRAJNUDEL, P.; MATHIEU, L.; RIBIÈRE, M.; MARTEL, A-C.; ZAGGANE, S.; CHAUZAT, M-P.; AUBERT, M. F. A. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honeybee (*Apis mellifera*) colonies. **Pest Management Science**, v. 61, p. 111-125, 2005.

FIDENTE, P.; SECCIA, S.; VANNI, F. Analysis Of Nicotinoid Insecticides Residues in Honey by Solid Matrix Partition Clean-up and Liquid Chromatography-electrospray Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1094, n.1-2, p.175-8, 2005.

FISHEL, F. M.; ELLIS, J.; MC AVOY, G. **Pesticide Labeling: Protection of Pollinators**1 (UF/IFAS Extension). 2017.

FRANCIS, R. M.; NIELSEN, S. L.; KRYGER, P. Varroa–virus interaction in collapsing honey bee colonies. **PLoS One**, v. 8, 2013.

FUSTERO, S.; SÁNCHEZ-ROSELLO, M.; BARRIO, P.; SIMÓN-FUENTES, A. From 2000 to Mid-2010: A Fruitful Decade for the Synthesis of Pyrazoles. **Chemical Reviews**, v. 11, n. 111, p. 6984-7034, 2011.

GALLAI, N.; SALLES, J. M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economy**, v. 68, p. 810-21, 2009.

GARCÍA-CHAO, M.; AGRUÑA, 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., n. 672, p. 107-113, 2010.

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos** (apostila). 1999.

GAZZONI, D. L. Impacto da agricultura sobre a população e a diversidade de polinizadores, e formas de mitigação de seus efeitos. *In: Agricultura e Polinizadores. Organizador: Associação Brasileira de Estudos das Abelhas - A.B.E.L.H.A.* Chapter 5. 2015. p. 54-70.

GHISI, N. C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; DE ALMEIDA, M. I. M.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.180, n. 1, p.589-599, 2011.

GIBBONS, D.; MORRISEY, 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, n. 1, p. 103-118, 2014.

GIERER, F.; VAUGHAN, S.; SLATER, M.; THOMPSON, H. M.; ELMORE, J. S.; GIRLING, R. D. A review of the factors that influence pesticide residues in pollen and nectar: Future research requirements for optimising the estimation of pollinator exposure. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 236-247, 2019.

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.

GIROLAMI, V.; MAZZON, L.; SQUARTINI, A.; MORI, N.; MARZARO, M.; BERNARDO, A. D.; GUNASEKARA, A. S.; TRUONG, T.; GOH, K. S.; SPURLOCK, F.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189-199, 2009.

GIROLAMI, V.; MARZARO, M.; VIVAN, L.; MAZZON, L.; GREATTI, M.; GIORIO, C.; MARTON, D.; TAPPARO, A. Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. **Journal of Applied Entomology**, v. 136, p. 17-26, 2011.

GOULSON, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 977-987, 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, n. 6229, p.1255957, 2015.

GREGORC, A.; ELLIS, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pestic. Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 2, p. 200-207, 2011.

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.

HATJINA, F.; PAPAETHIMIOU, C.; CHARISTOS, L.; DOGAROGLU, T.; BOUGA, M.; EMMANOUIL, C.; ARNOLD, G. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. **Apidologie**, v. 44, p. 467-480, 2013.

HENRY, M.; CERRUTTI, N.; AUPINEL, P.; DECOURTYE, A.; GAYRARD, M.; ODOUX, J-F.; PISSARD, A.; RÜGER, C.; BRETAGNOLLE, V. Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. **Proceedings of the Royal Society B – Biological Science**, v. 282, n. artigo 20152110, 2015.

HICKMAN JUNIOR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Integrated principles of Zoology**. 15. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2010.

HLADIK, M. L.; KOLPIN, D. W. First national-scale reconnaissance of neonicotinoid insecticides in streams across the USA. **Environmental Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 12-20, 2015.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório de comercialização de agrotóxicos. Publicada 2016 e revisada em 2021**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso: 18 ago. 2021.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **PPM (Pesquisa da Pecuária Municipal) (2018)**, disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/tabelas>. Acesso: 20 nov. 2019.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) – **Área, produção e produtividade dos principais produtos agrícolas do Paraná: 1986-2019**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/tabelas>. Acesso: 18 ago. 2021.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, L. A Iniciativa Brasileira de Polinizadores e os avanços para a compreensão do papel dos polinizadores como produtores de serviços ambientais. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 100-106, 2007.

INÊS DA SILVA, C.; FREITAS, B. M. O papel dos polinizadores na produção agrícola no Brasil. *In: Agricultura e Polinizadores*. Chaper:1. Organizador: Associação Brasileira de Estudos das Abelhas - A.B.E.L.H.A. São Paulo: 2015. p. 9-18.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE COMBATE AO CÂNCER. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos**. 2015. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abril_2015.pdf . Acesso: 13 mai. 2020.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos** – Documento: DOQ-CGCRE-008 Revisão 02 – JUNHO/2007.

IRUNGU, J.; RAINA, S.; TORTO, B. Determination of pesticide residues in honey: a preliminary study from two of Africa's largest honey producers. **International Journal of Food Contamination**, v. 3, p. 3-14, 2016.

JESCHKE, P.; NAUEN, R. Neonicotinoids - from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science**, v. 64, n. 11, p. 1084-1098, 2008.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; ELBERT, A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2897-2908, 2011.

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

JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, M. Pesticides and honey bee toxicity – USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312-331, 2010.

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.

- KAPLAN, K. **Fact sheet: survey of bee losses during winter of 2012/2013**. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/is/br/beelosses/index.htm>. Acesso: 18 abr. 2020.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, p. 159-174, 1977.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier Ltda, 1996.
- LONG, E. Y.; KRUPKE, C. H. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. **Nature Communications**, v. 7, n. 11629, p. 1-12, 2016.
- LUCA, P. A. D.; VALLEJO-MARÍN, M. What's the 'buzz' about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, p. 429-435, 2013.
- MARIA DA SILVA, F.; COELHO, D. C.; MACHADO, A. V.; COSTA, R. O. Detecção de Resíduos de Agrotóxicos no Mel de Abelha. **Acta apícola brasileira**, v. 2, n. 2, p. 17-27, 2014.
- MAYER, D. F.; LUNDEN, J. D. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. **Journal of Apicultural Research**, v. 3, p.191-197, 1999.
- MEDRZYCKI, P.; MONTANARI, R.; BORTOLOTTI, L.; SABATINI, A. G.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of imidacloprid administered in sublethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, v. 56, p.59-62, 2003.
- MENEZES, C. A relação da agricultura com a atividade de criação de abelhas. *In*: NETO, A. V.; MENEZES, C. *et al.* **Desafios e recomendações para o manejo e transporte de polinizadores**. 2018.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Baltimore: John Hopkins University Press, 2000. Disponível em: <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Beekeeping/ThepBees-of-the-World.pdf>. Acesso: 15 nov. 2020.
- MIRANDA, J. E.; NAVICKIENE, H. M. D.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; DE BORTOLI, S. A.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Apidologie**, v. 34, n. 4, p. 409-415, 2003.
- MORAES, F. J. **Caracterização físico-química e palinológica de amostras de mel de abelha africanizada dos municípios de Santa Helena e Terra Roxa (PR)**. 2012. 50f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2012.
- MORAIS, M. M.; DE 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: Editora da Universidade de São Paulo, 2012. p. 203-236.
- MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010.
- NARAHASHI, T.; ZHAO, X.; IKEDA, T.; SALGADO, V. L.; YEH, J. Z. Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 2, p. 149-152, 2010.

- NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses (Review). **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2010.
- NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.
- OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees?. **PLoS Biology**, v. 5, n. 6, p. e168, 2007.
- OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals?. **Oikos**, v. 120, p. 321-26, 2011.
- OLIVEIRA, A. **Abelhas – espécies sem ferrão e com ferrão**. Fontes: Embrapa, USP. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/cursos-criacao-de-abelhas/artigos/abelhas-especies-sem-ferrao-e-com-ferrao>. Acesso: 02 mar. 2020.
- PAGE, J. R. R. E.; PENG, C. Y. S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 4, p. 695-711, 2001.
- PALMER, M. J.; MOFFAT, C.; SARANZEWA, N. HARVEY, J.; WRIGHT, G. A.; CONNOLLY, C. N. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. **Nature Communications**, v. 4, n. artigo 1634, 2013.
- PARA - Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos 2016. **Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Gerência-Geral de Toxicologia. Brasília, 22 de setembro de 2016. Copyright© 2016. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- 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. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 3844-3858, 2011.
- PEDRO, J. **Deteção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.
- PEI, Z.; YITONG, L.; BAOFENG L.; GAN, J. J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, v.57, p.1691-1696, 2004.
- PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 125f. Tese - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F. (Org.). **É veneno ou é remédio?** Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.
- PETTIS, J. S.; COLLINS, A. M.; WILBANKS, R.; FELDLAUFER, M. F. Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 35, n. 6, p. 605-610, 2004.
- PETTIS, J. S.; VAN ENGELSDORP, D.; JOHNSON, J.; DIVELY, G. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. **Naturwissenschaften (The Science of Nature)**, v. 99, n. 2, p. 153-158, 2012.
- PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil:

há casos de CCD?. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 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. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68-102, 2015.

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

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, 2018.

RATNIEKS, F. L. W.; CARRECK, N. L. Clarity on honey bee collapse?. **Science**, v. 327, n. 5962, p. 152-153, 2010.

REETZ, J.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M.; WALLNER, K. Neonicotinoid insecticides translocated in guttated droplets of seed-treated maize and wheat: a threat to honeybees?. **Apidologie**, v. 42, n. 5, p. 596-606, 2011.

RENZI, M. T.; Amichot, M.; Pauron, D.; Tchamitchian, S.; BruneT, J-L.; Kretzschmar, A.; Maini, S.; Belzunces, L. P.; Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 205-213, 2016.

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

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; KNOLL, F. R. N.; APON, B. M. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, 1048, p.153-159, 2004.

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

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

RIBEIRO F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RODRIGUES, E. A. G.; DURSO, E. D.; ROCHA JUNIOR, W. F. O potencial para Indicação Geográfica do mel na costa oeste do Paraná: estudo de caso da cooperativa COOFAMEL. **VII Seminário Internacional sobre o desenvolvimento regional** – Rio Grande do Sul, Brasil. Programa de pós-graduação Desenvolvimento Regional: mestrado e doutorado. Universidade de Santa Cruz do Sul. Setembro de 2015. p. 1-20.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; DORNE, J-L.; MAIS, S. J.; SPERANDIO, G.; STREISSL, F.; SZENTES, C.; VERDONCK, F. Risk assessment of pesticides and other stressors in bees:

Principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. **Science of the Total Environment**, v. 587-588, p. 524-537, 2017.

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

RUFINO, V. C. **Investigação do Mecanismo de Formação de Pirazol e Água a Partir de Pirazol-4-ol em Solução de Metanol: Uma Análise Teórica**. 2018. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Curso de Bacharelado em Química, Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2018.

SABBAG, O. J.; NICODEMO, D. Viabilidade econômica para produção de mel em propriedade familiar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p. 94-101, 2011.

SAIBT, N. **Determinação multirresíduo de agrotóxicos em abelha e pólen apícola empregando método QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. 2017. 95f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

SCHEINER, R.; PAGE, R. E.; ERBER, J. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 35, p. 133-142, 2004.

SCHULZ, D. J.; ROBINSON, G. E. Octopamine influences division of labor in honeybee colonies. **Journal of Comparative Physiology**, v. A 187, p. 53-61, 2001.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). O salto do mel. **SEBRAE Agronegócios**, v. 3, p. 10-11, 2006.

SÍGOLO, É. A. **O processo de Indicação Geográfica na região oeste do Paraná: um estudo de caso na cooperativa de mel – COOFAMEL**. 2019. 105f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Agronegócio) - Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Agronegócio, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2019.

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, C. M. M. S. & FAY, E. F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2004.

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.; 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, n. 1, p. 5-34, 2015.

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

- STEVENS, S.; JENKINS, P. Heavy costs: weighing the value of neonicotinoid insecticides in agriculture. *In: Center for food safety*. 2014.
- SUBRAMANIAM, R.; HEBBAR, H. U.; RASTOGI, N. K. Processing of Honey: A Review. **Internacional Journal of Food Properties**, v.10, n.1, p. 127-143, 2007.
- SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 2482-2486, 2001.
- SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, v. 60, p. 291-296, 2003.
- SURYANARAYANAN, S.; KLEINMAN, D. L. Beekeepers' collective resistance and the politics of pesticide regulation in France and the United States. **Political Power and Social Theory**, v. 27, p. 89-122, 2014.
- TAPPARO, A.; GIORIO, C.; MARZARO, M.; MARTON D.; SOLDÀ, L.; GIROLAMI, V. Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated sedes. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 1564-1568, 2011.
- TAPPARO, A.; MARTON, D.; GIORIO, C.; ZANELLA, A.; SOLDÀ, L.; MARZARO, M.; VIVAN, L.; GIROLAMI, V. Assessment of the Environmental Exposure of Honeybees to Particulate Matter Containing Neonicotinoid Insecticides Coming from Corn Coated Seeds. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 2592-2599, 2012.
- TEETERS, B. S.; JOHNSON, R. M.; ELLIS, M. D.; SIEGFRIED, B. D. Using videotracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). **Environmental and Toxicology Chemistry**, v. 31, p. 1349-1354, 2012.
- TINGLE, C. C. D.; ROTHER, C. F.; DEWHURST, C. F.; LAUER, S.; KING, W. J. Fipronil: Environmental Fate, Ecotoxicology and Human Health Concerns. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 176, p.1-66, 2003.
- TRAPP, S.; PUSSEMIER, L. Model calculations and measurements of uptake and translocation of carbamates by bean plants. **Chemosphere**, v. 22, n. 3, p. 327-339, 1991.
- TSIPI, D.; BOTITSI, H.; ECONOMOU, A. **Mass spectrometry for the analysis of pesticides residues and their metabolites**. Canadá: John Wiley & Sons, 2015.
- 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.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Fipronil Pesticide fact sheet**. EPA 737-F-96-005. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. Acesso em: 10 mar. 2020.
- VALVERDE, S.; IBÁÑEZ, M.; BERNALA, J. L.; NOZALA, M. J.; HERNÁNDEZ, F.; BERNA, J. Development and validation of ultra high performance-liquid chromatography–tandem mass spectrometry based methods for the determination of neonicotinoid insecticides in honey. **Food Chemistry**, v. 266, p. 215-222, 2018.
- VANBERGEN, A. J. and INSECT POLLINATORS INITIATIVE. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 11, n. 5, p. 251-259, 2013.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6481, 2009.

VARGAS, T. **Avaliação da qualidade de mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná**. 2006. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

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, n. artigo e49472, 2012.

WALLNER, K. Varroacides and their residues in bee products. **Apidologie**, v. 30, p. 235-248, 1999.

WOOD, T.; GOULSON, D. The environmental risks of neonicotinoids pesticides: a review of the evidence post-2013. Paris: **Greenpeace France**, p. 7-8. 87, 2017.

WILDMAN, M.; OTT, S. R.; BURROWS, M. GABA-like immunoreactivity in nonspiking interneurons of the locust metathoracic ganglion. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 23, p. 3651-3659, 2002.

ZHENG, W.; PARK, J-A.; EL-ATY, A. M. ABD.; KIM, S-K.; CHO, S-H.; CHOI, J-M.; YI, H.; CHO, S-M.; RAMADAN, A.; JEONG, J. H.; SHIM, 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 B**, v. 1072, p. 60-69, 2018.