



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

IDALÉCIO PACÍFICO DA SILVA

**EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM ABELHAS (*Apis mellifera* L.)
UTILIZADAS NA POLINIZAÇÃO DO MELÃO (*Cucumis melo* L.)**

**MOSSORÓ – RN
2015**

IDALÉCIO PACÍFICO DA SILVA

**EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM ABELHAS (*Apis mellifera* L.)
UTILIZADAS NA POLINIZAÇÃO DO MELÃO (*Cucumis melo* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Departamento de Ciência Animal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientator: Dr. Benito Soto-Blanco

**Mossoró/RN
2015**

Catálogo na Fonte

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRSA - BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Silva, Idálcio Pacífico da.

Exposição a pesticidas em abelhas *Apis mellifera* L. utilizadas na polinização do melão *Cucumis melo* L. / Idálcio Pacífico da Silva. - Mossoró, 2015.

117f: il.

1. Abelhas. 2. *Cucumis melo* L. 3. Contaminação ambiental. 4. Inseticidas. 5. Herbicidas. I. Título

RN/UFRSA/BCOT/390

CDD 638.1 S586e

IDALÉCIO PACÍFICO DA SILVA

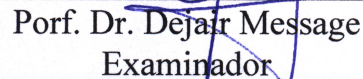
**EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM ABELHAS (*Apis mellifera* L.)
UTILIZADAS NA POLINIZAÇÃO DO MELÃO (*Cucumis melo* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Departamento de Ciência Animal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

APROVADA EM: 27/02/2015



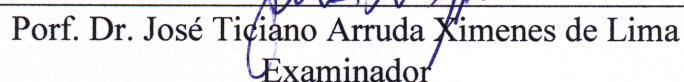
Dr. Benito Soto-Blanco
Presidente e Orientador



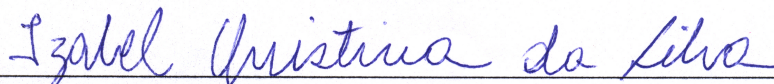
Prof. Dr. Dejar Message
Examinador



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva
Examinador



Prof. Dr. José Ticiano Arruda Ximenes de Lima
Examinador



Prof. Dr.^a Izabel Christina da Silva
Examinador

AGRADECIMENTOS

À Deus, que através de sua grandiosa generosidade, permitiu a realização deste trabalho.

Aos meus pais Ivaldo Pacifico da Silva e Brasilina Maria da Silva, que me ensinaram os valores da vida, deram-me todo o apoio, atenção, carinho e amor.

Aos meus irmãos Iaponira, Ivanecio e Junior. Sempre em meus pensamentos, eles representam a importância e o valor dos laços familiares, que guardo comigo.

Ao Professor Dr. Benito Soto-Blanco, pela oportunidade de tê-lo como orientador, pelos ensinamentos compartilhados desde a graduação, contribuindo com ensinamentos valiosos para minha formação profissional. Ainda pela amizade e por ter demonstrado tanto empenho e competência na construção de nossos projetos.

À Taciana, que me ajudou neste e em outros projetos, além de toda atenção, carinho, paciência e amor.

Aos meus tios Edivaldo e Maria (titia), que participaram ativamente desta caminhada dando mais coragem, força e incentivo à minha formação acadêmica.

Aos amigos Francisco Canindé e Wesley Adson pelo apoio, companheirismo e amizade durante o curso.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pelos valiosos ensinamentos repassados. Em especial Patrício Maracajá, Jael Soares, Jean Berg, Carlos Iberê.

A Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao laboratório de Toxicologia da UFMG e ao LANAGRO de São Leopoldo que permitiram a preparação das amostras e a realização das análises. Em especial ao Professor Benito, a Professora Marília Martins, ao Fabiano, a Heloisa e o Mailson, que me ajudaram essa etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos demais Professores, Colegas do Doutorado, e Funcionários da UFERSA, que de uma forma ou de outra, participaram deste percurso, com apoio, companheirismo e amizade.

Obrigado.

A minha família, que é o alicerce da minha vida.
Meus pais Ivanaldo Pacífico da Silva e Brasilina
Maria da Silva, minha filha Iasmin Pacífico D. da
Silva e meus irmãos Iaponira Pacífico, Ivanécio
Pacífico e Ivanaldo Júnior.

DEDICO.

“SÃO AS PEQUENAS COISAS QUE
DIVIDEM OS HOMENS...”

EDIVALDO LÚCIO DA SILVA

RESUMO

SILVA, Idalécio Pacífico da. **Exposição a pesticidas em abelhas (*Apis mellifera* L.) utilizadas na polinização do melão (*Cucumis melo* L.)**. 2015. 105f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, Brasil, 2015.

Os polinizadores estão entre os componentes essenciais para o funcionamento dos ecossistemas em geral, pois é essencial para a reprodução e manutenção da diversidade de espécies de plantas e provê alimentos para humanos e animais, influenciando, também, o aspecto quantitativo e qualitativo da produção. Atualmente, a densidade populacional de muitos polinizadores está sendo reduzida a níveis que podem comprometer os serviços de polinização. O declínio das populações de abelhas (*Apis mellifera* L.) tem impactado na produção agrícola mundial e tem um impacto claro sobre a produção de alimentos e da economia. Uma das causas prováveis para este declínio é o uso indiscriminado de agrotóxicos. Desta forma, fez-se estudo comparativo dos níveis de exposição aos pesticidas entre as abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas) que são usadas para polinizar plantações de melão, as abelhas *Apis mellifera* L.(africanizadas) mantidas na caatinga, e as abelhas jandaíra (*Melipona subnitida*) mantidas na caatinga. Para isso, amostras de mel foram coletadas de 23 colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* utilizadas para polinizar plantações de melão, 20 colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* que forrageiam de na caatinga e 10 colônias de *Melipona subnitida* que forrageiam na caatinga. O nível de exposição aos pesticidas foi determinado medindo os níveis residuais de 152 compostos no mel, utilizando uma técnica de análise de multiresíduos no sistema UFLC-MS. As amostras de mel estudadas apresentaram 19 pesticidas diferentes, 13 dos quais estavam presentes no mel de abelhas polinizadoras das plantações de melão. Os níveis de alguns compostos foram suficientemente elevados para promover efeitos adversos em abelhas. Assim, a polinização das culturas oferece um grande risco de toxicidade para as abelhas que pode contribuir para o colapso da colônia.

Palavras-chave: contaminação ambiental, inseticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, análise multiresíduos, mel.

ABSTRACT

SILVA, Idalécio Pacífico da. **Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera* L.) pollinating melon crops**. 2015. 105f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, Brasil, 2015.

Pollinators are among the essential components for the functioning of ecosystems in general, because it is essential for the reproduction and maintenance of the diversity of plant species and provide food for humans and animals, also influencing the qualitative aspect of the production. Currently, the population density of many pollinators are being reduced to levels that can impair pollination services. The decline of honeybee Africanized (*Apis mellifera* L.) populations impacts global agricultural production and has a clear impact on both food production and the economy. One of the probable causes for this decline is the indiscriminate use of pesticides. Thus, there was comparative levels of exposure to pesticides among bees (*Apis mellifera* L.) that are used to pollinate melon crops, bees (*Apis mellifera* L.) kept in the bush, and Jandaira bees (*Melipona subnitida*) kept in the bush. To do this, honey samples were collected from 23 colonies of *Apis mellifera* used to pollinate melon plantations, 20 colonies of *Apis mellifera* foraging forest and 10 colonies of *Melipona subnitida* foraging in the forest. The level of exposure to pesticides was determined by measuring the residual levels of 152 compounds in honey using a multiresidue analysis technique in UFLC-MS system. Honey samples from the present study contained 19 different pesticides, 13 of which were present in honey from bees pollinating melon crops. The levels of some compounds were sufficiently high to promote adverse effects in the bees. Thus, crop pollination offers a great toxicological risk to bees that may contribute to colony collapse.

Keywords: environmental contamination, insecticides, acaricides, herbicides, fungicides, nematicides, multiresidue analysis, honey.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição média do mel maduro de abelha (<i>Apis mellifera</i> L).	16
Tabela2. Evolução das Exportações Brasileiras de Mel por Região entre 2002 e 2007 (em toneladas).	19
Tabela 3. Evolução das Exportações Brasileiras de Mel por Região entre 2008 e 2012 (em toneladas).	20
Tabela 4. Frequência média de abelhas melíferas ((<i>Apis mellifera</i> L.) retornando do campo na entrada das colmeias ao longo do dia.	24
Tabela 5. Agrotóxicos utilizados pelas empresas produtoras de melão para combater a mosca-branca na Zona Homogênea Mossoroense, em porcentagem. Mossoró-RN, 2008.	26
Tabela 6. Agrotóxicos utilizados pelas empresas produtoras de melão para combater a mosca-minadora na Zona Homogênea Mossoroense, em porcentagem. Mossoró-RN, 2008.	27
Tabela 7. Agrotóxicos utilizados pelas empresas produtoras de melão para combater fungos na Zona Homogênea de Mossoró-RN, 2008.	28
Tabela 8. Toxicidade dos agrotóxicosdivididos em quatro classes toxicológicas.	30
Tabela 9. Limites máximos de resíduos de agrotóxicos do subprograma de monitoramento de controle de resíduos e contaminantes em mel (PNCRC/2014).	34

CAPÍTULO II

Tabela 1. Pesticidas pesquisados nas amostras de mel.	76
Tabela 2. Pesticidas (em ppb) detectados no mel de abelhas (<i>A. Mellifera</i> L.) usadas polinizar plantações de melão.	83
Tabela 3. Pesticidas (em ppb) detectados no mel de abelhas (<i>A. Mellifera</i> L.) que forrageiam na floresta (<i>caatinga</i>).	84
Tabela 4. Pesticidas (em ppb) detectados no mel de abelhas sem ferrão (<i>M. subnitida</i>) que forrageiam na floresta (<i>caatinga</i>).	84
Tabela 5. Número de amostras com pesticidas detectados no mel de abelhas (<i>A. mellifera</i>) polinizando lavouras de melão ou de forrageamento na floresta (<i>caatinga</i>) e de abelhas sem ferrão (<i>M. subnitida</i>) que forrageam na floresta.	86
Tabela 6. As concentrações de pesticidas detectados (em ppb) em mel de abelhas (<i>A. Mellifera</i> L) polinizando lavouras de melão ou de forrageamento na floresta (<i>caatinga</i>) e de abelhas sem ferrão (<i>M. subnitida</i>) forrageamento na floresta. Os dados são apresentados como a media $\pm$ SEM.	87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 2. Abelha africanizada (*Apis mellifera* L.). 14

Figura 3. *Melipona subnitida* Ducke(jandaíra). 15

CAPÍTULO II

Figura 1. Mapa do local das coletas de amostras de mel. 73

Figura 2. Colmeias de abelhas (*Apis mellifera* L) utilizadas na polinização do melão. 74

Figura.3. Coleta de amostras de mel para análise de pesticidas. 74

Figura. 4. Amostras de mel apresentando sobrenadante após a centrifugação. 75

Figura. 5. Tubos de propileno com os extratos e cartuchos com floril e sulfato de magnésio para filtração das amostras. 75

Figura. 6. Sistema de Cromatografia líquida (UFLC) (Shimadzu LC20 ADXR). 80

Figura. 7. Espectrômetro de massa triplo quad 5500. 81

ABREVIATURAS

AChE – Acetilcolinesterase.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

APPCC/ HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle)

BNB – Banco do Nordeste

BPA – Boas Práticas Agrícolas

CCD – Desordem de Colápsio da Colônia (*Colony Collapse Disorder*)

CE - Ceará

DDT – Diclorodifeniltricloetano.

EC (European Commission)

EPPO - Organização Europeia e do Mediterrâneo para Proteção das Plantas

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization*).

FVO - do inglês *Food Veterinary Office*

g - grama

GABA - Ácido Gama Aminobutírico.

GC - Cromatografia Gasosa (Gas Chromatography).

HA - Hectare

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*).

IBGE – Instituto Brasileiro de geografia e estatística

ICPBR - Comissão Internacional das Relações Abelha-Planta

IN – INSTRUÇÃO NORMATIVA

KG – Quilograma

KM - Quilômetro

LC - Cromatografia Líquida (Liquid Chromatography).

LLE - Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*).

LMR - Limites Máximos de Resíduos.

mm - Miligrama

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

MS - Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry).

MRM – Monitoramento Múltiplo de Resíduos

nAChR -Receptor nicotínico de acetilcolina

OECD - Organização para Cooperação e o Desenvolvimento Econômico

PER - resposta da extensão da Probócide

PPB – Parte por bilhão

PPM – Parte por milhão

PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes.

QuEChERS – Em português significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro

RN – Rio Grande do Norte

RT - tempo residual

T – Tonelada

UFCL – Cromatografia líquida ultra rápida (*ultra fast Liquid Chromatography*).

µg. - Micrograma

ng. – Nanograma

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1 CAPÍTULO I – ASPECTOS GERAIS DA POLINIZAÇÃO E OS EFEITOS DOS PESTICIDAS SOBRE AS ABELHAS.	19
1.1 ATIVIDADE APÍCOLA.....	20
1.1.1 Histórico.....	20
1.1.2 O mel.....	22
1.1.3 Mercado do Mel Brasileiro.....	24
1.2 IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS PARA POLINIZAÇÃO.....	27
1.2.1 Polinização do Melão.....	29
1.2.2 Manejo Fitossanitário do Melão.....	31
1.3 PESTICIDAS/AGROTÓXICOS.....	36
1.3.1 EFEITO DOS PESTICIDAS EM ABELHAS.....	38
1.3.1.1 Inseticidas Organoclorados.....	39
1.3.1.2 Inseticidas Organofosforados e Carbamatos.....	40
1.3.1.3 Inseticidas Piretróides	42
1.3.1.4 Noenicotenóides e Fenilpirazol.....	44
1.3.1.5 Desordem do Colapso da Colônia (CCD)	47
1.3.2. TESTE DE AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	50
1.3.3 LEGISLAÇÃO E LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS (LMRS).....	52
1.3.4 ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICO EM MEL.....	54
1.3.4.1 Preparo das Amostras	55
1.3.4.2 Cromatografia.....	56
1.3.4.3 Espectrometria de Massas (MS).....	57
1.3.4.4 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) .	58
1.3.5 FATORES RELACIONADOS À TOXICIDADE DOS PESTICIDAS NAS ABELHAS.....	59
1.8 REFERÊNCIAS.....	63
2 CAPÍTULO 2 – EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM ABELHAS (<i>Apis mellifera</i> L.) UTILIZADAS NA POLINIZAÇÃO DO MELÃO (<i>Cucumis melo</i> L.)	85
2.1 RESUMO.....	86
2.2 INTRODUÇÃO.....	87
2.3 OBJETIVO.....	88

2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.4.1 Produtos Químicos e Materiais.....	88
2.4.2 Amostras.....	89
2.4.3 Preparação das Amostras.....	90
2.4.4 Condições Cromatográficas.....	96
2.4.5 Condições de Espectrometria de Massas.....	97
2.4.6 Análise Estatística.....	99
2.5 RESULTADOS.....	100
2.6 DISCUSSÃO.....	105
2.7 CONCLUSÕES.....	110
2.8 REFERÊNCIAS.....	111

INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos que surgiram a milhares de anos a partir de vespas que alteraram sua dieta alimentar, de insetos e ácaros, para o néctar e o pólen como fonte de nutrientes. Como consequência, esses insetos criaram uma estreita relação com plantas que produzem flores e frutos, onde sua função principal é fecundar as flores, fazendo assim a polinização das colheitas agrícolas e das espécies nativas, perpetuando o mundo vegetal em troca do néctar como alimento (SOUZA, 2007a).

Aproximadamente 35% das lavouras são dependentes de polinizadores para a reprodução sexual (KLEIN et al., 2007). O valor global de polinização foi estimado em € 153.000.000.000 em 2005 (GALLAI et al., 2009) e as abelhas (*Apis mellifera*) são os polinizadores economicamente mais valiosos para a agricultura (KLEIN et al., 2007; POTTS et al., 2010). Deste modo, a criação de abelhas melíferas próxima a algumas culturas proporciona melhores resultados na produção agrícola, como por exemplo: melão e da maçã, sendo também de grande importância para a produção de sementes nas matas nativas (SOUZA, 2007b).

Durante o processo de polinização, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados por estas trabalhadoras e ficam retidos nos pelos superficiais de seu corpo ou são inalados e aderidos ao seu aparelho respiratório (Winston, 1987). Culturas agrícolas polinizadas pelas abelhas, como o meloeiro, se utilizam grandes quantidades de agrotóxicos para o controle de diversos tipos de pragas e doenças (GUIMARÃES, et al., 2005). Por esta razão, além de representar um momento de alto risco de exposição para as abelhas, a polinização de culturas possibilita que o mel, por exemplo, possa ser usados como bioindicador de possível contaminação regional (RISSATO, 2006).

Os pesticidas podem contaminar o meio ambiente, ocasionando efeitos à saúde dos seres vivos e problemas associados com a presença de resíduos de agrotóxicos em

alimentos (RICE, et al., 2007; KHALILI-ZANJANI, et al., 2008). Atualmente, com o aumento do uso indiscriminado dos pesticidas, começou-se a avaliar o real efeito desses compostos sobre as abelhas polinizadoras, principalmente a espécie *Apis mellifera* (Johansen, 1977).

A queda nas populações de polinizadores vem afetando a produção mundial agrícola, com impactos tanto na produção de alimentos quanto na economia (POTTS et al., 2010; LEVER et al., 2014). Uma das causas prováveis para o declínio das populações de polinizadores, incluindo as abelhas, é o uso indiscriminado de agrotóxicos (KLEIN et al., 2007; POTTS et al., 2010; NAKASU et al., 2014). As abelhas de maneira individual podem ser expostas a pesticidas diretamente através do contato corporal, ou indiretamente pelo consumo de resíduos de pesticidas no néctar e pólen das flores (RORTAIS et al., 2005). Além disso, toda uma colônia pode ser exposta a pesticidas, através da coleta e transporte de pólen contaminado, por abelhas forrageiras (VILLA et al., 2000).

Os pesticidas podem matar as abelhas, quando em doses suficientemente altas. No entanto, doses de pesticidas que não causam a morte imediata, muitas vezes têm outros efeitos deletérios e podem interferir com as capacidades cognitivas e o comportamento das abelhas. As potenciais consequências negativas incluem déficits na aprendizagem, na orientação e nas habilidades de coleta de alimentos; as abelhas afetadas podem, portanto, ter uma reduzida capacidade de coleta de alimentos e de navegação na volta à colmeia (RORTAIS et al., 2005; DESNEUX et al., 2007; GODFRAY et al., 2014). Além disso, alguns pesticidas podem reduzir a resistência da abelha a patógenos (ALAUX et al., 2010; AUFAUVRE et al., 2012; PETTIS et al., 2012; WU et al., 2012; DI PRISCO et al., 2013).

CAPÍTULO I

ASPECTOS GERAIS DA POLINIZAÇÃO E OS EFEITOS DOS PESTICIDAS SOBRE AS ABELHAS

1. ATIVIDADE APÍCOLA

1.1 Histórico

Durante o processo evolutivo, surgiram várias espécies de abelhas e atualmente conhece-se mais de 20 mil espécies das quais apenas 2% são sociais e fornecem produtos tais como o mel, uma rica fonte de alimento para o homem. Entre as espécies produtoras de mel, as abelhas do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas. A espécie *Apis mellifera* é generalista e destaca-se por ser de fácil manejo, alocação, eficiência e produção de produtos com alto valor agregado (SOUZA, 2007a; CARVALHO, 2006).

As abelhas pertencem ao reino Animalia, à classe Insecta, à ordem Himenóptera. As abelhas da espécie *A. mellifera* encontradas no Brasil (Figura 1) são conhecidas como “africanizadas”, por serem híbridas, resultado do cruzamento de variedades europeias com a subespécie *Apis mellifera scutellata* (SILVEIRA, 2012).



Fonte: Google/ imagens

Figura. 1. Abelha africanizada (*Apis mellifera* L.).

Com o surgimento da apicultura racional no século XIX, os produtos da colmeia puderam ser explorados sem prejuízos maiores para as abelhas. No Brasil, a atividade

apícola se iniciou com enxames trazidos pelos imigrantes durante a colonização. Contudo, somente com o cruzamento entre duas populações, produzindo um híbrido (abelha africanizada - *Apis mellifera* L.), em meados de 1956, é que se deu a revolução da apicultura no país. O que era uma tradição quase exclusiva das regiões Sul e Sudeste, passou a ser praticada também nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (SOUZA, 2007a).

Dentre as abelhas sociais, cerca de 400 espécies não possuem ferrão funcional e estão reunidas num grupo denominado Meliponínios. Os Meliponínios ou abelhas indígenas sem ferrão, didaticamente, se dividem em dois subgrupos: o grupo *Melipona* e o grupo *Trigona*. As meliponas são abelhas grandes (chegam a medir 1,5 cm), comumente chamadas de uruçú (que na língua tupi significa: ira=abelha; açu=grande), jandaíra, abelha mel-de-pau, abelha pé-de-pau, uruçuzinha, jandaíra amarela. A maioria das espécies constroem a entrada dos ninhos usando barro e própolis, mistura denominada geoprópolis (CARVALHO-ZILSE et al., 2012).

Além da visita às flores e dos benefícios no incremento nos serviços da polinização, os meliponíneos apresentam produtos e subprodutos bastante valorizados economicamente, tais como, mel, pólen, própolis e geoprópolis. Estes são os principais atrativos mais valorativos para a sua criação racional e manejo. Ainda, estas abelhas podem atuar como bioindicadoras da qualidade ambiental (PALAZUELOS BALLIVIÁN, 2008).

Melipona subnitida Ducke (jandaíra) (Figura 2) é uma espécie endêmica da caatinga (MARTINS, 2002) e uma das mais indicadas para a criação racional com fins lucrativos. No entanto, o número de colônias silvestres dessa espécie (CRUZ et al., 2004) e de outras espécies de meliponíneos encontram-se em processo acelerado de

desaparecimento, provocado principalmente pela perda de habitats e desmatamento de florestas nativas, ambiente preferencial dessas espécies (LOPES et al., 2005).



Fonte:google/imagens

Figura 2. *Melipona subnitida* Ducke(jandaíra)

1.2 O mel

O mel, principal produto apícola, é uma substância viscosa e aromática produzida pelas abelhas a partir do néctar recolhido de flores e processado pelas enzimas digestivas desses insetos. É armazenado em favos de suas colméias para servir-lhes de alimento durante o inverno. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais estão diretamente relacionadas com a fonte floral que o originou e com a espécie que o produziu (HERRERA et al., 2005; SOUZA, 2007a).

A Instrução Normativa (IN) nº 11, de 20 de outubro de 2000, do Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil denomina o Mel, como o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam,

combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

Apesar do mel ser basicamente uma solução saturada de açúcares e água (como apresentado na Tabela 1), outros componentes tais como ácidos orgânicos (ácidos glucômico, oxálico, cítrico, maléico, fórmico, láctico entre outros), minerais (cálcio, ferro, manganês, magnésio, fósforo, potássio, sódio entre outros) e vitaminas conferem ao mel um alto grau de complexidade (TILHE, 2003; IOANNIDOU et al., 2005).

Tabela 1. Composição média do mel maduro de abelha (*Apis mellifera* L.).

Componentes	Média(%)
Água	17
Glicose	34
Frutose	40
Sacarose	2
Minerais	1
Outros elementos	6
Total	100

Fonte: SOUZA (2007a).

O mel pode ser utilizado como alimento, adoçante e para fins terapêuticos (apiterapia). Estimula a resistência física, é levemente sedativo (combate a insônia), digestivo e laxativo, anti-séptico e antianêmico. Em aplicação tópica, minimiza a formação de cicatrizes em feridas e queimaduras devido a alterações na produção de colágeno e a propriedades antimicrobianas, além de ser excelente hidratante para a pele.

É utilizado também em afecções do trato respiratório, como expectorante (SOUZA, 2007a).

No Brasil, de maneira geral, o consumo de mel como alimento ainda é incipiente (aproximadamente 300g/habitante/ano), principalmente comparado a países como os Estados Unidos e os da Comunidade Européia e África, que podem chegar a mais de 1.000g/habitante/ano (SEBRAE, 2005).

A qualidade do mel pode ser avaliada por aspectos relacionados aos parâmetros físico-químicos, ao grau de maturação e às fontes de adulteração. Os parâmetros e as metodologias de análise físico-químicas para o controle de qualidade do mel de abelhas estão bem definidos de acordo com Instrução Normativa Nº 11 pelo MAPA (BRASIL, 2000). Neste sentido, a determinação de resíduo de contaminantes seja estes antibióticos ou agrotóxicos (PNCRC, 2014), adquiriram um maior nível de importância por estarem diretamente ligados aos riscos à saúde humana, à saúde das abelhas e à comercialização do mel (BRASIL, 2014).

1.3 Mercado do mel brasileiro

Ao se avaliar a produção de mel em sistemas apícolas no Brasil, é possível observar o quanto essa atividade vem crescendo. Nos últimos 40 anos, a produção deste setor progrediu mais de 10 vezes, passando de 4.129 t no ano de 1974 para 41.604 t no ano de 2012 (SEBRAE, 2014).

Esse crescimento se deve ao grande potencial para a atividade apícola no Brasil, principalmente em decorrência da extraordinária diversidade de flores, do clima favorável e da enorme vantagem em se trabalhar com a abelha africanizada. Esta variedade é muito mais produtiva e tolerante a inimigos naturais e a doenças como, por exemplo, a Varroatose. Esta doença é causada pelo ácaro *Varroa jacobsoni* ou *Varroa*

destructor, que suga o sangue das abelhas desde a fase de larva até a adulta prejudicando a produtividade da colônia (SEBRAE, 2005; SOUZA, 2007a; CARNEIRO et al., 2007).

Em 2001, a abertura do mercado internacional para o mel brasileiro, ocorreu após a suspensão das importações por países da Comunidade Europeia do mel produzido na China devido à presença de altos índices de resíduos de antibióticos, dando início a consolidação da boa fase do negócio apícola no Brasil (SILVA, 2007; SOUZA, 2007a).

Com a entrada do mel brasileiro no mercado internacional, 80% da produção nacional era exportada, sendo que os maiores compradores eram os países europeus. A apicultura vivia um grande momento de mobilização e crescimento. Entretanto, no ano de 2006 uma missão sanitária do *Food and Veterinary Office* da União Européia (UE) verificou que o sistema brasileiro de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal não era equivalente aos requisitos sanitários da UE. Esse fato levou ao embargo do mel brasileiro, que antes do bloqueio gerava uma receita de US\$ 15 milhões para o setor apícola nacional. Apesar do embargo, as exportações de mel em 2006 superaram os resultados do ano anterior, aumentando 23,3% em valor e 1,1% em peso (Tabela 2), graças aos EUA que absorveram 75% das exportações. Entretanto, em dezembro do mesmo ano, as exportações caíram quase 52% em valor e mais de 60% em peso em relação ao mesmo período de 2005 (SILVA, 2007).

Após dois anos de embargo (março/2006 a março/2008), a UE aprovou o Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Brasil, e o setor apícola nacional ainda se adequou às novas exigências, como implantação de boas práticas, do Sistema HACCP/APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), Unidades de

Extração (Casa do Mel) bem como o registro das unidades de processamento junto ao Ministério da Agricultura (SEBRAE, 2005; SOUZA, 2007a).

Tabela 2. Evolução das Exportações Brasileiras de Mel por Região entre 2002 e 2007 (em toneladas).

Regiões	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Nordeste	2.706,9	5.597,1	4.255,1	4.884,9	5.253,2	4 055,0
Sudeste	6.290,7	7.171,8	9.172,0	6.374,4	4.964,2	4.719,6
Sul	3.645,1	6.503,1	7.609,5	3.185,1	4.384,3	4.131,2
Demais regiões	0,6	1,8	0,5	3,5	0,2	1,5
Brasil	12.643,4	9.273,8	21.037,1	14.448,0	14.601,9	12.907,3

Fonte:BNB (2013).

No entanto, entre 2009 e 2013 a exportação de mel decresceu aproximadamente 38%, sendo os anos de queda representados por perdas de enxame nas regiões produtoras. Estas perdas eram fruto principalmente de secas, como a ocorrida em 2012, que fez com que o Nordeste brasileiro, que desde 2009 ocupava o posto de maior região exportadora, reduzisse 52% da produção e 25% das exportações, dando o lugar de principal exportador à região sul, como visto na Tabela 3 (BNB, 2013; SEBRAE, 2014).

Tabela 3. Evolução das Exportações Brasileiras de Mel por Região entre 2008 e 2012 (em toneladas).

Regiões	2008	2009	2010	2011	2012
Nordeste	5.600,1	10.203,5	7.360,8	9.674,3	4.629,3
Sudeste	5.956,2	7.229,2	5.738,8	6.264,4	5.572,5
Sul	6.675,0	8.496,2	5.393,1	6.094,7	6.430,6

Demais regiões	40,0	58,3	139,4	3 65,1	75,1
Brasil	18.271,3	25.987,2	18.632,1	22.398,6	16.707,4

Fonte:BNB (2013).

2.IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS PARA POLINIZAÇÃO

As abelhas oferecem um serviço muito importante para agricultura e para o meio ambiente que é a polinização, pois são os agentes polinizadores mais adaptados à visita das flores das Angiospermas. Este processo representa um contato íntimo do animal com a planta, sendo, portanto, um momento importante para ambos, pois baseia-se em um sistema de dependência recíproca, onde as plantas fornecem o alimento para as abelhas, principalmente pólen e néctar, e em troca recebem os benefícios da transferência de pólen (PROCTOR et al., 1996; SOUZA, 2007b).

Aproximadamente 35% das lavouras são dependentes de polinizadores para a reprodução sexual (KLEIN et al., 2007). O valor global de polinização foi estimado em € 153.000.000.000 em 2005 (GALLAI et al., 2009) e as abelhas (*Apis mellifera*) são os polinizadores economicamente mais valiosos para a agricultura (KLEIN et al., 2007; POTTS et al., 2010).

A cada dia, de 10.000 a 50.000 abelhas operárias da mesma colônia fazem uma média de 10 viagens de até 6 km de distância da colmeia, nas áreas que cercam seu habitat, recolhendo o néctar, a água e o pólen das flores (SOUZA, 2007b). Deste modo, a criação de abelhas melíferas próxima a algumas culturas proporciona melhores resultados na produção agrícola. Isto ocorre pelo fato das abelhas realizarem o transporte dos grãos de pólen de uma flor a outra, proporcionando a fertilização necessária para a frutificação. Este trabalho é imprescindível para a produção e

obtenção de frutos de aproximadamente 35% das lavouras (KLEIN et al., 2007), como por exemplo do melão e da maçã, sendo também de grande importância para a produção de sementes nas matas nativas (SOUZA, 2007b).

No entanto, durante este processo, diversos microorganismos, produtos químicos e partículas suspensas no ar são interceptados por estas trabalhadoras e ficam retidos nos pelos superficiais de seu corpo ou são inalados e aderidos ao seu aparelho respiratório (RISSATO, et al., 2006). Além disso, o aparecimento de alta mortalidade de abelhas, quando o produto é bastante tóxico (LD50 baixa) e/ou presença de resíduos em seus corpos ou em produtos da colmeia, no caso dessas substâncias não serem altamente perigosas para esses insetos, também pode ser indicativo de poluição ambiental (SADEGHI et al., 2012). Portanto, as abelhas e seus produtos podem ser usados como bioindicadores para monitoramento de impacto ambiental causado por fatores biológicos, químicos e físicos, tais como: parasitas, contaminações industriais ou pesticidas (RISSATO et al., 2006).

Os estudos que abordam as exigências para a polinização de culturas no Brasil (tais como espécies polinizadoras, localização e formas de criação) e seus déficits ainda são escassos, e os dados disponíveis se concentram em um número reduzido de culturas (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004). Além disso, pouca atenção é dada ao impacto negativo dos defensivos agrícolas sobre os agentes polinizadores, principalmente em áreas cultivadas. Os trabalhos com pesticidas, na literatura brasileira, apresentam sua eficiência no controle de pragas ou, mais recentemente, em técnicas e práticas menos agressivas ao meio ambiente, mas sem investigações específicas relacionadas aos polinizadores. A literatura internacional, por sua vez, já traz um pouco mais informações (PINHEIRO e FREITAS, 2010).

Devido a estes fatores e ao uso indiscriminado de pesticidas, a população de abelhas polinizadoras tem sido reduzida, o que vem afetando a produção mundial agrícola e impactando tanto a produção de alimentos quanto a economia (POTTS et al., 2010; LEVER et al., 2014).

2.1 Polinização do melão

O melão (*Cucumis melo* L.) é uma das espécies olerícolas de maior expressão econômica no Brasil, em especial na região Nordeste. Nas últimas duas décadas, o agronegócio do melão no Brasil se expandiu e, em 2009, o melão passou a ser a principal fruta fresca nacional em quantidade e valor de exportação, sendo o segundo maior exportador mundial em valores, com US\$ 122 milhões, para uma produção de 190 mil toneladas exportadas. Os principais importadores do melão brasileiro foram a Europa, os Estados Unidos e os demais países do Mercosul (IBGE, 2012).

Em 2010, foram produzidos no país aproximadamente 500 mil t/ano, sendo esta produção concentrada na região Nordeste e classificando-se como o décimo segundo produtor mundial dessa olerácea. No mesmo ano, destacaram-se como maiores produtores os Estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco, que contribuíram com cerca de 93,3% da produção nacional. Em 2012, o Estado do Rio Grande do Norte, o maior produtor e exportador, produziu 260.782 toneladas de melão (FAO, 2012; IBGE, 2014).

Certamente, as condições edafoclimáticas, as tecnologias adaptadas, a mão-de-obra disponível e o mercado interno e externo capazes de absorver toda a produção são os principais motivos da expansão desta cultura no Nordeste. Sobre as condições edafoclimáticas, a disponibilidade de luz, é um fator relevante para o meloeiro, o ideal está entre 2000 a 3000 horas/ano. No que se refere à umidade relativa do ar, o ótimo

está na faixa entre 65 a 75% (SILVA et al., 2002). Portanto, temperaturas elevadas, associadas à alta luminosidade e baixa umidade, proporcionam condições climáticas adequadas para a boa produtividade na região (CRISÓSTOMO et al., 2002).

Além disso, a produtividade do melão depende da eficiência de polinização, normalmente realizada por abelhas. SOUSA et al. (2012) avaliaram o comportamento de pastejo das abelhas melíferas africanizadas em flores de melão amarelo, em áreas de cultivo comercial localizadas no município de Acaraú, CE. Estes autores verificaram que a maior frequência das abelhas nas flores do meloeiro ocorreu durante as primeiras horas da manhã - entre 05:00 h e 07:00 h (Tabela 4), com marcante preferência para a coleta de pólen. As coletoras de néctar apresentaram-se em pequeno número logo no início do dia, aumentando lentamente até ocorrer um equilíbrio com coletoras de pólen entre os horários de 09:00 h e 11:00 h. Os horários com maior frequência de abelhas coletoras de néctar foi entre 11:00 h e 13:00 h. Já no final da tarde (17:00 h), foi registrada a menor quantidade de abelhas em atividade de coleta.

Tabela 4. Frequência média de abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) retornando do campo na entrada das colmeias ao longo do dia.

Horários	Total de coletoras	Coletoras de pólen	Coletoras de néctar
05:00	111,6 ± 12,3 a	104,3 ± 10,4a	7,3 ± 4,3d
07:00	113,5 ± 11,7a	83,8 ± 7,5b	28,7 ± 5,0c
09:00	78,4 ± 7,1b	37,5 ± 5,5c	40,9 ± 4,7b
11:00	60,0 ± 5,7c	2,5 ± 2,4d	57,5 ± 6,5a
13:00	43,3 ± 6,5d	0,5 ± 0,7d	42,8 ± 7,1b
15:00	40,0 ± 5,2d	0,2 ± 0,4d	39,8 ± 5,4b
17:00	21,2 ± 4,2e	0,0 ± 0,0d	21,2 ± 4,2c

^{a,b,c,d,e} Valores seguidos pelas mesmas letras na coluna não diferem a $P < 0,05$
Fonte: SOUSA et al. (2012).

1.2.2 Manejo fitossanitário do melão

Para GUIMARÃES et al. (2005), o manejo fitossanitário merece atenção especial, pois o meloeiro é atacado por patógenos em praticamente todas as suas fases fenológicas, razão pelo qual se utilizam grandes quantidades de agrotóxicos para o controle de diversos tipos de pragas e doenças. Estima-se que sejam feitas 15 aplicações de agrotóxicos, em média, durante o ciclo do meloeiro, correspondendo a uma aplicação a cada quatro dias. Além disso, dependendo do histórico da área, da época do ano em que se fez o plantio e de outros fatores ambientais, o número de aplicações pode ser ainda maior. Na produção comercial de melão, é possível afirmar que o manejo de doenças e pragas é um fator determinante em todo o período de produção, equivalendo a 30,68% dos custos de 1 ha de melão cultivado (OLIVEIRA, 2008). Assim, o uso de agrotóxicos na cultura do meloeiro é prática comum entre todos os produtores (ALMEIDA, 2001; NUNES et al., 2006).

Além disso, ressalta-se que a aplicação é realizada, em geral, de forma preventiva, antecipando-se aos possíveis danos econômicos gerados, principalmente, pela mosca-branca, mosca-mineradora e por fungos. Desta forma, ao longo do ciclo, os produtores associam diversos princípios ativos, numa espécie de coquetel de agrotóxicos, formados principalmente por inseticidas e fungicidas. Assim, o uso intensivo de tais produtos, empobrece a biodiversidade benéfica (inimigos naturais), tendo ainda como consequência, o surgimento da resistência das espécies-alvo das substâncias químicas utilizadas (OLIVEIRA, 2008).

Além de contaminar o ambiente, a aplicação dos praguicidas pode afetar diretamente a saúde do trabalhador rural, e os frutos podem apresentar altos índices de

resíduos de agroquímicos, colocando em risco a saúde do consumidor (GUIMARÃES et al., 2005). Outra consequência negativa se refere à comercialização, pois existe uma tendência de que a exportação de frutos seja comprometida em função das restrições impostas pelo mercado externo, sobretudo o europeu, que tem apresentado uma tendência irreversível de consumir produtos cada vez menos contaminados com princípios ativos de agrotóxicos (OLIVEIRA, 2008; OLIVEIRA et al., 2005).

OLIVEIRA (2008) realizou uma pesquisa com produtores de melão na Região de Mossoró-RN, a que chamou de Zona Homogênea Mossoroense, e listou uma gama de compostos utilizados nas culturas de melão. Os compostos estão distribuídos em princípios ativos e grupos químicos, e merecem destaque os grupos piretróides e neonicotinóides (conforme apresentados nas Tabelas 5, 6, 7). Com relação à classe toxicológica, 36,4% dos produtores mencionaram que utilizam produtos da classe I (extremamente tóxico) e 9,1% citaram produtos da classe II (altamente tóxico). Segundo os mesmos autores, todos os produtos citados eram registrados e liberados pelo MAPA para a cultura do melão.

Vale ressaltar que emprego inadequado de defensivos químicos visando controlar doenças ou pragas, além de elevar os custos de produção da cultura e prejudicar o ambiente, pode tornar os frutos impróprios para a comercialização, devido ao elevado nível de resíduos tóxicos que podem permanecer neles (MENEZES et al., 2000).

Tabela 5. Agrotóxicos utilizados pelas empresas produtoras de melão para combater a mosca-branca na Zona Homogênea Mossoroense, em porcentagem. Mossoró-RN, 2008.

Ingrediente ativo / grupo químico	Classe	Classe toxicológica	%
Acetamiprido (neonicotinóide)	Inseticida	III	81,8
Imidacloprido (neonicotinóide)	Inseticida	IV	72,7
Tiametoxam (neonicotinóide)	Inseticida	III	36,4
Piriproxifem (éter piridiloxipropílico)	Inseticida	I	36,4
Tiacloprido (neonicotinóide)	Inseticida	III	27,3
Beta-ciflutrina (piretróide)	Inseticida	II	9,1
Espiromesifeno (cetoenol)	Acaricida/Inseticida	III	9,1
Bifentrina (piretróide)	Acaricida/Inseticida	III	9,1
Buprofezina (tiadiazinona)	Inseticida	IV	9,1
Clotianidina (neonicotinóide)	Inseticida	III	9,1
Espiromesifeno (cetoenol)	Acaricida/Inseticida	III	9,1
Lambda-cialotrina (piretróide)	Inseticida	III	9,1
Deltametrina (piretróide)	Inseticida	III	9,1
Cloridrato de cartape (tiocarbamato)	Fungicida/Inseticida	III	9,1
Abamectina (avermectina)	Acaricida/Inseticida/Nematicida	III	9,1

Fonte: OLIVEIRA (2008)

Tabela 6. Agrotóxicos utilizados pelas empresas produtoras de melão para combater a mosca-minadora na Zona Homogênea Mossoroense, em porcentagem. Mossoró-RN, 2008.

Ingrediente ativo / grupo químico	Classe	Classe toxicológica	%
Ciromazina (triazinamina)	Inseticida	IV	66,7
Abamectina (avermectina)	Acaricida/Inseticida/Nematicida	III	58,3
Cloridrato de cartape (tiocarbamato)	Fungicida/Inseticida	III	58,3
Imidacloprido (neonicotinóide)	Inseticida	IV	25,0
Deltametrina (piretróide)	Inseticida	III	16,7
Lambda-cialotrina (piretróide)	Inseticida	III	16,7
Piriproxifem (éter piridiloxipropílico)	Inseticida	I	8,3
Abamectina (avermectina)	Acaricida/Inseticida/Nematicida	III	8,3
Clorfenapir (pirazol)	Acaricida/Inseticida	III	8,3
deltametrina (piretróide)	Inseticida	III	8,3
Lambda-cialotrina (piretróide)	Inseticida	III	8,3
Deltametrina (piretróide)	Inseticida	III	8,3
Abamectina (avermectina)	Acaricida/Inseticida/Nematicida	III	8,3
Acetamiprido (neonicotinóide)	Inseticida	III	8,3

Fonte: OLIVEIRA (2008)

Tabela 7. Agrotóxicos utilizados pelas empresas produtoras de melão para combater fungos na Zona Homogênea de Mossoró-RN, 2008.

Ingrediente ativo / grupo químico	Classe	Classe toxicológica	%
Enxofre	Fungicidas/Acaricidas	IV	100,0
Azoxistrobina (estrobilurina)	Fungicidas	IV	62,5
Triflumizol (imidazol)	Fungicidas	IV	62,5
Imibenconazol (triazol)	Fungicidas	II	50,0
Difenoconazol (triazol)	Fungicidas	I	37,5
Trifloxistrobina (estrobilurina)/ Tebuconazol (triazol)	Fungicidas	III	37,5
Procimidona (dicarboximida)	Fungicidas	II	25,0
Iprodiona (dicarboximida)	Fungicidas	IV	25,0
Pirimetanil (anilinopirimidina)	Fungicidas	III	25,0
Tiofanato-metílico (benzimidazol)	Fungicidas	IV	25,0
Ciproconazol (triazol)	Fungicidas	III	25,0
Fluquinconazol (triazol)	Fungicidas	III	12,5
Flutriafol (triazol)	Fungicidas	II	12,5
Folpete (dicarboximida)	Fungicidas	IV	12,5
Boscalida (anilida) / Cresoxim-metílico (estrobilurina)	Fungicidas	III	12,5
Metiram (ditiocarbamato)/Piraclostrobina (estrobilurina)	Fungicidas	III	12,5
Miclobutanil (triazol)	Fungicidas	III	12,5
Piraclostrobina (estrobilurina)	Fungicidas	II	12,5
Tebuconazol (triazol)	Fungicidas	I	12,5
Triflumizol (imidazol)	Fungicidas	IV	12,5

Fonte: OLIVEIRA (2008)

1.3 PESTICIDAS/AGROTÓXICOS

No Brasil, pela Lei Federal nº 7.802 /89 (BRASIL, 1989) regulamentada por meio do Decreto 98.816, no seu Artigo 2º, Inciso I, define-se o termo agrotóxico como sendo: “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

Estes compostos apresentam ações na fisiologia dos organismos vivos e normalmente são utilizados para impedir a ação ou destruir, direta ou indiretamente, formas de vida animal ou vegetal prejudiciais, como ervas daninhas, roedores, fungos, ácaros e insetos (MELO et al., 2002). Logo, o uso de agrotóxicos é essencial para prevenir ou reduzir perdas na agricultura, melhorando, assim, a produção, e para que sejam obtidos produtos com qualidade, que satisfaçam os consumidores e garantam seu comércio (KMELLÁR et al., 2008).

O Decreto nº 4074/02 (BRASIL, 2002) e a Lei Federal nº 7802/89 (BRASIL, 1989) estabelecem aos produtores, importadores ou exportadores de agrotóxicos o registro desses produtos junto ao Ministério do Meio Ambiente. No que se refere ao resíduo de agrotóxicos, cabe aos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde e do Meio Ambiente, no âmbito de suas respectivas áreas de competências: as informações requerentes para registro e reavaliação de registro, estabelecer as exigências mínimas de riscos apresentados, estabelecer o limite máximo de resíduo

(LMR) e intervalo de segurança, rótulos e bulas. Além disto, também estão em suas competências a validação de metodologias de análise para determinação de resíduos de agrotóxicos e afins, em produtos de origem vegetal, animal, na água e no solo.

Apesar do termo ‘agrotóxico’ ser definido por lei, os termos praguicidas, pesticidas, produtos fitossanitários e defensivos agrícolas são também utilizados; no entanto, o termo ‘agrotóxico’ coloca em evidência a toxicidade desses produtos ao meio ambiente e à saúde humana (SAMPAIO e GUERRA, 1998). No Brasil, as formulações de agrotóxicos são obrigadas a apresentar, no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade. Os agrotóxicos estão divididos em quatro classes toxicológicas, como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Toxicidade dos agrotóxicos divididos em quatro classes toxicológicas.

Classe	Toxicidade	Cor
I	Extremamente tóxico	Vermelha
II	Altamente tóxico	Amarela
III	Mediamente tóxico	Azul
IV	Pouco tóxico	Verde

Fonte: ANVISA (2014).

Os agrotóxicos são agrupados de acordo com o tipo de praga a ser controlada, como: inseticidas, usados para matar insetos que infestam a lavoura; herbicidas, para matar as plantas invasoras ou ervas daninhas; fungicidas, usados para matar os fungos; acaricidas, para matar os ácaros; moluscocidas, para matar lesmas, caracóis e caramujos (CIATI e OLIVEIRA, 2005).

Atualmente existem mais de 800 compostos, pertencentes a cerca de 100 classes químicas diferentes, registrados como ingredientes ativos de produtos comercializados

como agrotóxicos no mundo todo. Se forem incluídos metabólitos destes compostos no cálculo, o número supera 1500 substâncias. A aplicação de agrotóxicos aumentou em 50% no mundo, desde 1950 (KOVALCZUK et al., 2008; CAJKA et al., 2008). No Brasil, o consumo anual de agrotóxicos é superior a 300 mil toneladas de produtos formulados. Expresso em ingredientes ativos, isto representa mais de 130 mil toneladas de consumo anual destes componentes químicos. Vale ressaltar que, nos últimos quarenta anos, o consumo de agrotóxicos aumentou 700%, enquanto a área agrícola aumentou apenas 78% (SPADOTTO et al., 2004).

1.3.1 EFEITO DOS PESTICIDAS EM ABELHAS

O uso incorreto dos pesticidas pode contaminar o meio ambiente, ocasionando efeitos adversos à saúde dos seres vivos e problemas associados com a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos (RICE et al., 2007; KHALILI-ZANJANI et al., 2008). Os primeiros estudos avaliaram o modo de ação de inseticidas, sem levar em consideração o impacto que estes poderiam ocasionar sobre organismos não alvos, como, por exemplo, as abelhas (CASIDA e QUISTAD, 1998). Entretanto, com o passar dos anos, ocorreu o aumento do uso indiscriminado dos inseticidas. A partir desse momento, começou-se a avaliar o real efeito dos defensivos sobre as abelhas polinizadoras, em sua grande maioria a espécie *A. mellifera* (JOHANSEN, 1977).

A contaminação das abelhas por pesticidas ocorre, geralmente, na coleta de néctar e pólen, e pode atingir em maior ou menor extensão a colônia. Ainda em menor proporção, partículas suspensas no ar são interceptadas por estas trabalhadoras e ficam retidos nos pelos superficiais de seu corpo ou são inalados e aderidas em seu aparelho respiratório (JAY, 1986; RISSATO et al., 2006; BONZINI et al., 2011). O envenenamento de abelhas por pesticidas é um problema que ocorre em todo mundo

(JOHANSEN et al., 1983), devido ao fato das abelhas possuírem grande valor como polinizadores de muitas culturas (MAYER e LUNDEN, 1999).

Além dos efeitos de toxicidade aguda, que leva à morte das abelhas, os inseticidas podem, também, provocar alterações comportamentais nos indivíduos, que ao longo do tempo acarretará sérios prejuízos na manutenção da colônia. Em algumas circunstâncias, o efeito de inseticidas nas abelhas pode não ser imediatamente notado, sendo necessárias avaliações empregando doses subletais, para que seja possível observar sua influência na sobrevivência, fisiologia e comportamento (MEDRZYCHI et al., 2003).

Alguns fatores envolvendo a aplicação de pesticidas podem afetar potencialmente as abelhas polinizadoras, como o estágio de crescimento da planta, a toxicidade do princípio ativo, a atividade residual, o tipo de aplicação, a temperatura e a distância da área tratada (FREITAS e PINHEIRO, 2010).

Os inseticidas podem afetar as abelhas pelo contato, pela ingestão e por meio da fumigação. Os efeitos tóxicos também estão intimamente ligados às concentrações administradas, o tempo de exposição, dentre outras características (MALASPINA, 1979). Esses compostos podem causar a morte e alterações fisiológicas como, por exemplo, a diminuição da longevidade das abelhas ocasionada pela exposição a baixas doses de inseticidas (MALASPINA et al., 2008; PINHEIRO e FREITAS, 2010).

1.3.1.1 Inseticidas organoclorados

Inseticidas organoclorados são aqueles que incluem os derivados clorados de difenil etano, hexaclorobenzeno, hexaclorocicloexano, ciclodienos e hidrocarbonetos clorados. Atuam em canais de sódio e potássio dos neurônios, alterando o fluxo normal de entrada e saída desses íons, o que afeta a transmissão dos impulsos. O DDT

(diclorodifenilcloreto) é a substância química mais conhecida, utilizada e estudada durante o século XX. Seu uso intensivo na agricultura ocorreu por cerca de trinta anos, e a América de Sul é considerada o continente que mais fez uso do DDT. Em 1985, a comercialização, o uso e a distribuição de DDT e de outros organoclorados para uso agropecuário foram proibidos em todo território brasileiro (D'AMATO et al., 2002).

MALASPINA e STORT (1983) estudaram o efeito do DDT (1%) aplicado topicamente em *A. mellifera* africanizada, *A. mellifera ligustica*, *Scaptotrigona postica* e *Melipona quadrifasciata*, todas recém-emergidas. Estes autores concluíram que as espécies nativas foram mais tolerantes que as espécies exóticas, e que o inseticida lidano se mostrou mais tóxico para as abelhas africanizadas em comparação com o DDT, causando 100% de mortalidade após quatro horas de aplicação. Já MACIEIRA e HEBLING-BERALDO (1989) testaram a toxicidade de treze inseticidas (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides) sobre *Trigona spinipes* e verificaram que o heptacloro foi o mais tóxico, aumentando a taxa respiratória das operárias, seguido por paralisia e morte. Comparando esses resultados com outros dados na literatura, os autores concluíram que *T. spinipes* foi mais sensível a esses inseticidas que *A. mellifera*.

1.3.1.2 Inseticidas organofosforados e carbamatos

Os organofosforados e carbamatos representam um número significativo (> 200) de princípios ativos quimicamente diferentes e encontram-se entre as principais causas de intoxicação aguda de humanos e animais. As principais razões para isto são a alta toxicidade de alguns representantes, a facilidade de aquisição de produtos registrados para uso agrícola, veterinário ou doméstico contendo estas substâncias e a ineficiência

da fiscalização da comercialização de agrotóxicos de uso proibido ou restrito (XAVIER et al., 2007).

Organofosforados são compostos fosforados derivados do ácido fosfórico ou pirofosfórico; tiofosforados, derivados do ácido tionofosfórico ou ditionofosfórico; ou clorofosforados, quando possuem átomos de cloro em sua molécula. Já os carbamatos são derivados do ácido carbâmico ou do ácido N-metilcarbâmico (AMARAL, 1998; HEINZOW e ANDERSEN, 2006). Ambas as classes são inibidores da enzima colinesterase, ou agentes anticolinesterásicos. São capazes de inibir ou inativar a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), uma das enzimas mais importantes e necessárias ao pleno funcionamento do sistema nervoso de humanos e demais vertebrados e dos insetos, resultando em um aumento da atividade da acetilcolina (NELSON et al., 2001; DELL'OMO et al., 2003; HEINZOW e ANDERSEN, 2006). Os principais sintomas de intoxicação por esses compostos são tremores, convulsões e, finalmente, colapso do sistema nervoso central (CASIDA e QUISTAD, 1998).

PINTO e MIGUEL (2008), após observarem relatos de mortalidade de abelhas na ordem de 70% no vale do Jataí, em Santa Catarina, realizaram estudos para verificar a presença de resíduos de inseticidas em abelhas mortas. Assim, verificaram que algumas das amostras apresentavam representantes de organofosforados e carbamatos.

MORAES et al. (2000) avaliaram a toxicidade aguda da malationa sobre *Scaptotrigona tubiba*, verificando que essa molécula foi menos tóxica quando aplicada diretamente sobre a abelha em comparação ao contato contínuo com resíduo. Verificaram, também, que a espécie é mais susceptível que *Trigona spinipes* e *A. mellifera*, mas é mais tolerante que *Nanotrigona testaceicornis* e *Tetragonisca angustula*.

CARVALHO et al. (2009) avaliaram a toxicidade de inseticidas/acaricidas utilizados na cultura de cítricos para *A. mellifera* africanizada. Estes autores observaram que o organofosforado metidationa, quando aplicado por pulverização, provocou distúrbios motores durante as primeiras horas da intoxicação, causando mortalidade de 68% das operárias após uma hora de contaminação e de 100% após nove horas. Quando oferecido junto à dieta, sintomas semelhantes foram observados, com 100% de mortalidade após quinze horas de contaminação. Em ensaio de contaminação por resíduos em superfícies, esse organofosforado provocou a morte de 76% das abelhas após quatro horas e 100% de morte após seis horas.

Em outro estudo, BAPTISTA et al. (2009) verificaram a toxicidade de outros inseticidas empregados na citricultura sobre *A. mellifera* africanizada. Independente do modo de exposição, os autores observaram que o acefato foi extremamente tóxico, causando a mortalidade de 100% das abelhas após vinte horas do fornecimento de dieta contaminada e/ou contato com resíduos em superfície. Quando este composto foi pulverizado diretamente sobre as abelhas, a mesma taxa de mortalidade foi observada quarenta horas após.

Em estudo comparativo de avaliação toxicológica, o inseticida metamidofós foi altamente tóxico para *Melipona quadrifasciata* e moderadamente tóxico para *A. mellifera* (DEL SARTO, 2009). Nesse caso, a espécie exótica foi 56 vezes mais tolerante ao metamidofós quando a exposição ocorreu por via oral e cinco vezes quando foi por aplicação tópica, quando comparada com a espécie nativa *M. quadrifasciata*.

1.3.1.3 Inseticidas piretróides

Historicamente, piretróides naturais eram extraídos das flores de crisântemo que contêm ésteres ceto-alcoólicos, derivados dos ácidos crisantêmico e piretróico, com

atividade inseticida, denominados piretrinas, cinetrinas e jamolinas. A lipofilicidade dos piretróides lhes permite a rápida penetração pelas áreas não tegumentadas de muitos insetos e paralisam o sistema nervoso destes animais. Estes compostos atuam no sistema nervoso central e periférico, especificamente nos canais de sódio e potássio presentes no axônio dos neurônios. Uma característica importante desse grupo de inseticidas é o efeito *knock down*, caracterizado pela rápida despolarização da membrana do axônio e provocado por aquelas moléculas que possuem o radical ciano em sua estrutura (SODERLUND e BLOOMQUIST, 1989).

Os piretróides são uma das classes de inseticidas mais utilizadas atualmente e são essenciais no controle de vetores de doenças em regiões de clima tropical (NEAL et al., 2010). Segundo HEINZOW e ANDERSEN (2006), são empregados frequentemente em combinação com piperonil butóxido e n-octil bicicloheptano dicarboxamida, compostos que exercem efeito sinérgico aos piretróides, aumentando sua toxicidade por meio da inibição de enzimas, podendo chegar à completa destruição das mesmas.

Este amplo grupo de compostos também tem sido avaliado quanto ao impacto negativo sobre as abelhas polinizadoras. CARVALHO et al. (2009) observaram que o inseticida deltametrina promoveu elevadas taxas de mortalidade quando pulverizado sobre *A. mellifera*, provocando o efeito *knock down*. Além disso, também demonstrou-se bastante tóxico quando ingerido e/ou em contato com resíduos sobre superfícies.

DEL SARTO (2009) concluiu que a deltametrina foi altamente tóxica para *A. mellifera* e *M. quadrifasciata*, sendo *A. mellifera* aproximadamente dez vezes mais tolerante quando esse piretróide foi administrado via oral do que por contato. Da mesma forma, MORAES et al. (2000) verificaram que a abelha *S. tubiba* é extremamente sensível à deltametrina. VANDAME et al. (1995) e VANDAME e BELZUNCES (1998) verificaram que dosagens subletais de deltametrina provocaram efeitos adversos sobre

abelhas, como alteração no voo de retorno à colônia e hipotermia. Ainda, THOMAZONI et al. (2007) concluíram que bifentrina é altamente tóxica para *A. mellifera*, ocasionando 100% de mortalidade.

1.3.1.4 Neonicotinóides e fenilpirazol

Os inseticidas neonicotinóides e fenilpirazol diferem dos inseticidas clássicos, pois apresentam ação sistêmica na planta (TRAPP e PUSSEMIER, 1991), e podem ser detectados no pólen e néctar durante todo o período de floração (CUTLER e SCOTT-EMPLASTRO, 2007). Como consequência, as abelhas podem sofrer uma exposição crônica a eles ao longo de grandes períodos de tempo após a aplicação (FERREIRA, 2010).

Estes pesticidas são amplamente utilizados na vegetação e em plantas ornamentais, algumas das quais são comercialmente polinizadas por abelhas (QUARLES, 2008). A aplicação de inseticidas neonicotinóides às plantas é conhecida por resultar na concentração residual de pesticida no néctar e pólen das flores, mesmo quando é utilizado apenas para o tratamento de sementes (SCHMUCK et al., 2001; BONMATIN et al., 2003; RORTAIS et al., 2005). Além disso, as gotas de gutação do meloeiro tratado com imidacloprido podem conter elevadas concentrações deste composto (até 37 µg/ml) (HOFFMANN e CASTLE, 2012).

Os neonicotinóides possuem um grande destaque graças à sua eficiência no combate de insetos-pragas, devido ao seu espectro de ação, sistemicidade, relativa baixa toxicidade aos mamíferos e versatilidade de aplicação. Podem ser aplicados como tratamento de sementes e do solo, e diretamente sobre a folhagem da planta (NAUEN e BRETSCHNEIDER, 2002). Os inseticidas neonicotinóides atuam como agonistas do

receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) de uma maneira semelhante como a nicotina, mas com muito mais potência e seletividade para os receptores de insetos do que em mamíferos (TOMIZAWA e CASIDA, 2008).

A DL50 da exposição oral aguda para imidacloprido em abelhas foi estimada em 3,7-40,9 ng por abelha, ou 0,14-1,57 ppm no alimento (SCHMUCK et al., 2001), e a LD50 da exposição oral aguda de tiametoxam em abelhas foi estimada em 5,0 ng/abelha (GODFRAY et al., 2014). Contudo, as abelhas são muito mais sensíveis à exposição crônica ao imidacloprido; a taxa de sobrevivência foi reduzida em abelhas que ingeriram uma dose cumulativa de 0,01 ng/abelha por 8 dias (SUCHAIL et al., 2001).

O imidacloprido pode reduzir a resistência das abelhas a patógenos (ALAUX et al., 2010; PETTIS et al., 2012). Doses tão baixas quanto 5 ppb dadas para as abelhas misturadas ao xarope de sacarose aumentaram o número de esporos por abelha do patógeno intestinal *Nosema* (PETTIS et al., 2012). Além dos seus efeitos imunossupressores, o imidacloprido também promove distúrbios comportamentais. As abelhas que ingeriram 50 ppb de imidacloprido na sua alimentação não viajaram tão longe e passaram mais tempo perto das fontes de alimento (TEETERS et al., 2012). Além disso, este composto reduziu a memória olfatória de abelhas, na dose de 12 ng por abelha (DECOURTYE et al., 2004, 2005). Ainda, as abelhas *Apis cerana* alimentadas com néctar contendo 34 ppb de imidacloprido apresentaram redução no combate a um inseto predador, e aqueles alimentados com 17 ppb ou 34 ppb coletaram um volume menor de néctar (TAN et al., 2014).

Estudos bioquímicos realizados por HASHIMOTO et al. (2003) demonstraram que o tiametoxam afeta a atividade de algumas carboxilesterases de *Apis mellifera*, podendo inibir mais de 60% suas atividades independente de intoxicação por aplicação tópica ou ingestão. RUVOLO-TAKASUSUKI et al. (2009) verificaram que a inibição

dessas enzimas não é exclusiva em adultos. Em larvas expostas aos resíduos de tiametoxam no alimento, foi verificada uma redução de 25% da atividade dessas enzimas. Tal efeito inibitório desse neonicotinóide foi também verificado por CARVALHO (2010).

Com intuito de verificar a toxicidade de inseticidas empregados na citricultura sobre as abelhas africanizadas, CARVALHO et al. (2009) concluíram que o inseticida tiametoxam é extremamente tóxico, provocando 71% de mortalidade após uma hora da pulverização sobre as abelhas, e 100% após nove horas. Quando fornecido junto ao alimento, a taxa de mortalidade é de 46% uma hora após o fornecimento, e de 99% após 24 horas. Em contato com resíduos de tiametoxam, a mortalidade das abelhas chegou a 100% nove horas após o início dos ensaios. Da mesma maneira, THOMAZONI et al. (2007) concluíram que tiametoxam não foi seletivo a adultos de *A. mellifera*.

CARVALHO et al. (2009) observaram que operárias adultas de *A. mellifera* em contato com os inseticidas tiametoxam e metidationa, por vias oral e tópica, manifestaram distúrbios de coordenação motora, incapacidade de voo e prostração após as primeiras horas. Além disso, os pesticidas neonicotinóides podem reduzir a resposta imune a patógenos. De fato, a exposição das abelhas com doses subletais do inseticida imidacloprido pode afetar os mecanismos de defesa das abelhas, tornando-as mais susceptíveis ao microsporídeo *Nosema ceranae*, o qual provoca uma doença severa, conhecida como nosebose (ALAUX et al., 2010).

Já os fenilpirazoles, incluindo fipronil, possuem ação inseticida e herbicida, e atuam como antagonista dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), bloqueando o fluxo de íons de cloreto, levando a hiperexcitação e morte (GUNASEKARA et al., 2007). Como alguns neonicotinóides, o fipronil possui amplo

espectro de ação e versatilidade de aplicação, podendo ser empregado para o tratamento de sementes, aplicação no solo, foliar e em iscas (COLE et al., 1993).

CRUZ (2007) e CRUZ et al. (2010) estudaram os efeitos de doses subletais de fipronil em *A. mellifera* e observaram que esse inseticida promove alterações no nível ultraestrutural em ventrículos, túbulos de Malpighi e glândulas de seda. Em outro estudo, SOUZA (2009) verificou que doses subletais de fipronil podem afetar a capacidade de aprendizado, memória e locomoção de *A. mellifera*, além de aumentar a expressão das proteínas Fos, relacionada à resposta de estresse celular. De forma similar, PEREIRA (2010) conclui que o reflexo de extensão da probóscide e a atividade de locomoção de abelhas africanizadas foram afetados após a administração tópica de doses subletais de acetamiprido, tiametoxam e fipronil.

FERREIRA (2010) observou mortalidade de 100% em operárias de *S. postica* intoxicados com doses subletais de fipronil por 14 dias. As avaliações morfológicas mostraram que esse inseticida pode causar alterações nos túbulos de Malpighi, aumento na porção apical das microvilosidades, dilatações das cisternas dos retículos endoplasmáticos rugosos, presença de vesículas e acúmulo de polirribossomos no citoplasma. No corpo gorduroso, foram observados aumento da coalescência, depósitos lipídicos e proteicos nos vacúolos e nos trofócitos.

1.3.1.5 Desordem de colapso da colônia (CCD)

O uso indiscriminado e irresponsável de agrotóxicos pode provocar danos irreparáveis sobre a fauna de polinizadores, com destaque para as abelhas. Tal situação já é evidenciada pelos constantes relatos de queda da densidade de abelhas em várias partes do mundo (NEUMANN e CARRECK, 2010). Recentemente, o fenômeno denominado, em inglês, *Colony Collapse Disorder* (CCD), ocorrido inicialmente nos

Estados Unidos, onde apicultores chegaram a perder 90% de suas colmeias, reforçou a importância da manutenção das abelhas nos ecossistemas (STOKSTAD, 2007).

A CCD caracteriza-se por perda repentina da população de abelhas adultas, pouca ou nenhuma abelha adulta morta dentro ou fora da colmeia, e presença de crias operculadas e de pequenos aglomerados de abelhas jovens, podendo ser observada a presença da abelha rainha. Geralmente, colônias afetadas não apresentam evidências de traça da cera e frequentemente contêm reservas de alimentos que não são saqueadas (MESSAGE et al., 2012).

Atualmente, as opiniões predominantes sugerem que a causa da CCD é multifatorial, incluindo infestação patogénica, práticas apícolas (incluindo desnutrição) e exposição a pesticidas em geral (HIGES et al., 2008; VANENGELSDORP et al., 2009; ALAUX et al., 2010; WILLIAMS et al., 2010; DI PRISCO et al., 2011; VIDAUX et al., 2011; USDA, 2014). Contudo, mesmo não tendo sido elucidado tal fenómeno, diversas hipóteses colocam os inseticidas intimamente ligados com esses desaparecimentos na Alemanha, França, Suíça e Península Ibérica. Mais recentemente, LU et al. (2012) concluíram que a exposição sub-letal de inseticida neonicotinóide é provavelmente a principal responsável pela ocorrência de CCD. Além disto, na Espanha o colapso de colônia foi atribuído ao microsporídio *Nosema ceranae* (HIGES et al., 2009).

No Brasil, principalmente na região Sudeste, o desaparecimento das abelhas começa a ser motivo de preocupação. Em 2008, foram relatados dois casos de perdas repentinas de colônias fortes com as mesmas características observadas pelos pesquisadores americanos. As colmeias estavam repletas de mel, pólen e tinham crias; uma delas tinha abelhas e uma rainha. Não foram observados saques e nem traça da cera nos favos durante dois meses após a ocorrência. Na região destes casos citados, existem

muitas plantações (cana-de-açúcar e eucalipto) que utilizam fipronil e neonicotinóides, podendo, por tanto, na maior parte dos casos, terem relação com uso indiscriminado de inseticidas (MESSAGE et al., 2010).

Há relatos de que a CCD ocorre predominantemente na temporada de inverno. Portanto, é provável que a temperatura de inverno altere a gravidade da CCD associada com a exposição de dose sub-letal dos neonicotinóides. De fato, um estudo realizado durante um inverno mais frio, relatou 100% de mortalidade de colônias apresentando CCD e tratadas com 0,1 ng/abelha/dia de imidacloprid (LU et al., 2012). Esta dose é sete vezes menor que a utilizada por LU et al. (2014), que também observou maior gravidade da CCD no inverno. Assim, a modificação do efeito sub-letal de neonicotinóide agravada pelo inverno pode ser significativa, e não deve ser esquecida na avaliação da epidemiologia da CCD.

Vários trabalhos sugerem que o aumento da mortalidade de colônias de abelhas melíferas por CCD é devido à redução da resistência para patógenos comuns, tais como *Nosema*, causada por exposições de neonicotinóides (VANENGELSDORP et al., 2009; ALAUX et al., 2010; VIDAU et al., 2011; PETTIS et al., 2012). No entanto, esta hipótese foi recentemente contestada, pois exposições sub-letais crônicas de neonicotinóides, não comprometeram a resistência imunológica das abelhas para a infecção do patógeno *Nosema*. Da mesma forma não houve diferença significativa no grau de infecção do ácaro *Varroa* em colônias tratadas, também, com doses sub-letais de neonicotinóides (LU et al., 2014). Além disso, uma recente reanálise de dados genômicos gerados a partir de *pools* de RNA de colônias com CCD também excluiu a associação da infecção pelo iridovírus e CCD (TOKARZ et al., 2011).

É importante ressaltar que uma das observações que definem os sintomas de colônias com CCD é o vazio de colmeias. A ausência de abelhas mortas nas colônias

tratadas com neonicotinóides é notável e coerente com sintomas de CCD. Por outro lado, as infecções por patógenos são doenças comuns e graves encontrados em abelhas que muitas vezes levam à morte da colônia, e as características dos enxames após a morte são muito diferentes daqueles que sofreram de CCD (ANDERSON e MEDIO, 2008; LU et al., 2012).

Estudos recentes sobre a ligação da CCD com exposição aos neonicotinóides parecem estar ganhando força (MAINI et al., 2010; PAREJA et al., 2011; LU et al., 2012; FAROOQUI, 2013; MATSUMOTO, 2013; LU et al., 2014). Os constantes acontecimentos envolvendo esses compostos têm levado a um novo controle regulatório por autoridades competentes. Neste aspecto, recentemente a Comissão Europeia (CE) banuiu, por dois anos, três neonicotinóides (clotianidina, imidacloprido e tiametoxam). A decisão foi motivada por um estudo realizado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos que associava os pesticidas com inúmeros riscos para a saúde das abelhas (ERICKSON, 2012). No Brasil, o IBAMA desautorizou a aplicação por pulverização aérea, dos agrotóxicos que contenham o ingrediente ativo Imidacloprido, Tiametoxam, Clotianidina ou Fipronil. Esta agência também estabeleceu o processo de reavaliação ambiental dos agrotóxicos. Durante esse processo, as empresas terão que anexar às embalagens dos produtos a seguinte frase de advertência: “Este produto é tóxico para abelhas. A aplicação aérea não é permitida”. (BRASIL, 2009).

1.3.2 Teste de avaliação toxicológica

Os estudos de avaliação do impacto dos defensivos agrícolas são mais realizados sobre as abelhas melíferas africanizadas, isto devido à sua importância econômico-ecológica. Entretanto, alguns estudos toxicológicos com espécies de abelhas nativas também estão em fase de desenvolvimento. Segundo NOCELLI et al. (2012), já foram

realizados ensaios de avaliação da toxicidade no Brasil para as diversas fases de desenvolvimento de *A. mellifera* africanizada e para algumas espécies de abelhas nativas.

Uma das técnicas de avaliação consiste em estudar a ação dos produtos fitossanitários sobre os processos biológicos, como, por exemplo, o voo de retorno das abelhas à colmeia, o qual envolve mecanismos de visão, orientação, além da integridade locomotora (VANDAME et al., 1995; EL HASSANI et al., 2008). Dessa maneira, é esperado que intoxicações com baixas doses, de 6 mil a 100 mil vezes inferiores, possam induzir efeitos idênticos àqueles por uma exposição aguda (SUCHAIL et al., 2000, 2001). Os efeitos subletais são imprevisíveis e de natureza bastante variável, dificultando, assim, sua avaliação e diagnóstico. Assim, não provocam a morte imediata e nem há indícios graves de intoxicação imediata, porém comprometem a viabilidade, a sobrevivência e a população da colmeia (DEVILLERS, 2002; DESNEUX et al., 2007; PINHEIRO e FREITAS, 2010).

Outro mecanismo de estudo verifica o efeito sinérgico de diversas moléculas, principalmente entre inseticidas piretroides e fungicidas inibidores da síntese de ergosterol em abelhas *A. mellifera* (COLIN e BELZUNCES, 1992; PILLING e JEPSON, 1993). Nessas situações, o efeito inseticida deltametrina foi potencializado pelo fungicida triazol, isto porque esses compostos são potentes inibidores do citocromo P450, enzima em grande parte responsável pela detoxificação de xenobióticos em diversos organismos, inclusive nos insetos (FEYEREISEN, 1999).

Atualmente, as avaliações de risco dos inseticidas às abelhas são realizadas de acordo com as diretrizes mundiais, elaboradas e publicadas pela Organização para Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD), Organização Europeia e do Mediterrâneo para Proteção das Plantas (EPPO) e pela Comissão Internacional das

Relações Abelha-Planta (ICPBR). Nesse sentido, pesquisadores brasileiros estão desenvolvendo, também, diversos trabalhos de avaliação da toxicidade dos defensivos agrícolas sobre as abelhas, empregando técnicas de análises fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e comportamentais (NOCELLI et al., 2012).

1.3.3 Legislação e limites máximos de resíduos (LMRs)

As drogas e compostos químicos aos quais os animais são expostos podem deixar resíduos perigosos à saúde humana e animal. Mesmo aqueles reconhecidos como potencialmente nocivos, somente permitem tal condição, quando ultrapassam o valor de concentração conhecido como limite de tolerância, limite de segurança ou limite máximo de resíduo (LMR), que o alimento pode conter, sem prejuízo da integridade orgânica de seres humanos e animais (BRASIL, 1999).

Estes limites são determinados em centros de comprovada idoneidade científica, a partir de apurados estudos toxicológicos, de curto e médio prazos, realizados por renomados pesquisadores, em animais de laboratórios, microorganismos e genomas celulares. Após a conclusão destes estudos, organizações internacionais envolvidas com a saúde pública analisam os resultados e, posteriormente, recomendam os LMRs dos diferentes compostos aprovados, à consideração dos países membros do *Codex Alimentarius* - Programa das Nações Unidas Sobre Harmonização de Normas Alimentares, gerenciado pela FAO/WHO (BRASIL, 1999).

No Brasil o governo realiza o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em mel por meio do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), desenvolvido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão do Ministério da Saúde, é responsável pela fiscalização do produto final nos pontos de venda direta ao

consumidor. O PNCRC (BRASIL, 2014) para produtos de origem animal estabelece os agrotóxicos e seus respectivos LMRs a serem monitorados no mel brasileiro (Tabela 5), que pode ser considerado muito reduzido frente à grande quantidade de compostos disponíveis no mercado. A União Europeia desenvolve um dos melhores, senão o melhor, programa de monitoramento de resíduos de agrotóxicos do mundo (EC, 2014).

Tabela 9. Limites máximos de resíduos de agrotóxicos do subprograma de monitoramento de controle de resíduos e contaminantes em mel (PNCRC/2014).

Grupo	Agrotóxico	LMR (µg/Kg)
Organoclorados	Aldrin	10
	Alfa-Endosulfan	10
	4,4-DDE	10
	4,4-DDD	10
	4,4 DDT	10
	Dodecacloro	10
	Endrin	10
	Tetradifona	20
	Vinclozolina	20
	Heptacloro	10
	Alfa-HCH	10
	Beta-HCH	10
	Gama-HCH	10
Carbamatos	Carbofuran	50
	Carbaril	20
	Captana	50

Continuação da Tabela 9.

Grupo	Agrotóxico	LMR (µg/Kg)
Piretróides	Permetrina	20
	Ciflutrina	20
	Fenpropatrina	10
	Deltametrina	20
	Amitraz	200
Organofosforados	Clorpirifós	20
	Dimetoato	20
	Dissulfoton	10
	Pirimifós-Metil	50
	Parationa	20
	Fenamifós	10
	Terbufós	10
	Profenofós	20

Fonte: PNCRC (BRASIL, 2014).

1.3.4. ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MEL

A análise de resíduos de agrotóxicos desempenha um importante papel para a estimativa da exposição do homem e do meio ambiente aos agrotóxicos, bem como para monitorar o comportamento dos produtores rurais quanto à adequação as Boas Práticas Agrícolas (BPA), facilitando as decisões regulatórias e comerciais, e ainda fortalecendo a confiança do consumidor com relação à segurança alimentar (OLIVEIRA, 2011).

Devido à complexidade da matriz e aos baixos níveis de concentração em que os agrotóxicos são encontrados, as interferências são problemas freqüentes que devem ser considerados (OLIVEIRA, 2011). A preparação das amostras é uma importante etapa da análise para a obtenção de resultados confiáveis (RIAL-OTERO et al., 2007). Portanto,

a necessidade de pesquisar a presença de contaminantes em mel vem conduzindo à pesquisa de metodologias mais adequadas à especificidade da matriz (RISSATO et al., 2007; KUJAWSKI e NAMIÉŚNIK, 2008; PITTELLA, 2009; ALMEIDA, 2010; BARGAŃSKA et al., 2014).

As análises de resíduos de agrotóxicos envolvem duas etapas: 1) a extração dos analitos de interesse da matriz, que pode ou não ser acompanhada por uma etapa posterior de purificação, dependendo das características da matriz e do tipo de extração utilizada; 2) a determinação qualitativa e quantitativa, que frequentemente é realizada empregando técnicas cromatográficas (OLIVEIRA, 2011).

1.3.4.1 Preparo da amostra

O objetivo principal do preparo da amostra é promover o fracionamento e o enriquecimento da mesma, com todos os analitos de interesse, deixando-os o mais livre possível das interferências provenientes dos componentes da matriz, que certamente estarão no extrato. Assim sendo, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico. Para uma metodologia ser de aplicação viável, é necessário considerar os custos das análises, incluindo reagentes, equipamento, mão de obra e restrições ambientais (OBANA et al., 1999).

Os métodos multirresíduos tornaram-se mais populares nos últimos anos, porque eles podem ser usados para determinação de uma ampla variedade de compostos em um único processo analítico. A técnica de extração mais difundida para isolar uma ampla gama de pesticidas é o método QuEChERS (que significa rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro) (ANASTASSIADES et al., 2003).

Atualmente, os métodos multirresíduos mais comumente utilizados para as análises de agrotóxicos envolvem uma extração inicial com acetona, acetonitrila, ou acetato de etila, a partir da qual os analitos de interesse são transferidos para uma camada orgânica, deixando na fase aquosa os co-extrativos indesejáveis, mas também alguns pesticidas altamente polares (ANASTASSIADES et al., 2003; MOL et al., 2008; GOULART et al., 2008; LEDOUX, 2011). Em amostras de mel, a extração líquido-líquido, usando acetato de etila, apresentou melhores respostas cromatográficas (RISSATO et al., 2006; PITTELLA, 2009).

1.3.4.2 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Foi desenvolvida e usada pelo botânico Tswett em 1903 para separar pigmentos de plantas, daí a denominação cromatografia. O termo é usado para qualquer técnica de separação que empregue o requisito essencial da separação cromatográfica que é a existência de uma fase móvel e de uma fase estacionária (ALMEIDA, 2010).

Várias metodologias utilizadas para a determinação de resíduos de agrotóxicos são baseadas em métodos cromatográficos, técnicas utilizadas para a separação dos componentes de uma mistura. Usualmente é realizada por cromatografia gasosa (GC, do inglês “*gás chromatography*”) com diferentes detectores e cromatografia líquida (LC, do inglês “*liquid chromatography*”) acoplada a detectores como UV-Vis ou fluorescência. Modernamente empregam-se técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas (MS, do inglês “*mass spectrometry*”), formando as metodologia de GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS e LC-MS/MS (PITTELLA, 2009; OLIVEIRA, 2011).

Há alguns anos, a GC era a técnica mais empregada para a análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ANASTASSIADES et al., 2003; HIRAHARA et al., 2005). Entretanto, nos últimos anos com o advento de agrotóxicos mais polares, os quais apresentam menor persistência e toxicidade ao meio ambiente, quando comparados aos apolares, a GC não é capaz de analisar um grande número destes compostos devido a sua alta polaridade. Isto implica no uso de técnicas alternativas (LEDOUX, 2011).

Inventada há mais de um século, a LC aplica-se à análise de uma enorme gama de compostos, principalmente polares e/ou não-voláteis e/ou termicamente estáveis, para os quais as condições de operação da GC não são adequadas, o que constitui cerca 80% dos compostos sintéticos e naturais. No caso da análise de agrotóxicos, citam-se, principalmente carbamatos e triazinas, e seus metabolitos e produtos de degradação. Além de vários campos da ciência e da análise química, é usada para a análise de uma enorme faixa de compostos orgânicos, desde pequenas moléculas como metabólitos e peptídeos, até moléculas grandes como as biomoléculas, por exemplo, as proteínas (NIESSEN, 2006; LEDOUX, 2011; OLIVEIRA, 2011).

A LC é um método largamente utilizado em mel para uma avaliação relativamente rápida e económica, sobre a presença de contaminantes pesticidas (PITTELLA, 2009; ALMEIDA, 2010; BARGAŃSKA et al., 2014).

1.3.4.3 Espectrometria de massas (MS)

A sensibilidade inigualável, os limites de detecção cada vez mais baixos, a velocidade de execução e a ampla diversidade de aplicações são algumas das características que levaram a espectrometria de massas a uma posição de destaque entre os métodos analíticos. Entre as inúmeras aplicações da técnica podemos citar o controle

de poluição ambiental, a garantia da qualidade e segurança dos alimentos, a ciência forense e a química de produtos naturais, mas há muitas outras. Assim, esta técnica fornece informações valiosas para profissionais de diversas áreas, como químicos, biólogos, farmacêuticos, físicos, astrônomos etc (RISSATO et al., 2006; EKMAN et al., 2009; PiTTELLA, 2009; OLIVEIRA, 2011; BARGAÑSKA et al., 2014).

Na espectrometria de massas, átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados na fonte, e a razão massa-carga (m/z) de cada íon é determinada pelo analisador. Os íons atingem o detector gerando sinais elétricos que são registrados na forma de um espectro de massas. Quase todas as substâncias podem ser analisadas por MS, já que existem diversos tipos de fontes de ionização, analisadores de massas e detectores (EKMAN et al., 2009).

1.3.4.4 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

A LC é muito efetiva na separação dos analitos, enquanto que a espectrometria de massas em “*tandem*” permite a sua identificação e/ou confirmação em concentrações da ordem de $\mu\text{g/L}$ ou ng/L (OLIVEIRA, 2011). Recentemente, a LC tem sido associada com diferentes tipos de analisadores de massas para determinar resíduos de pesticidas em baixos níveis e/ou para elucidar as suas estruturas em solução aquosa e amostras ambientais, bem como em alimentos de origem vegetal, animal e alimentos para bebês (LEDOUX, 2011; OLIVEIRA, 2011).

A técnica, desta forma, se mostra efetiva na análise de agrotóxicos em níveis baixos de concentração, mesmo na presença de interferentes. Outra vantagem desta técnica de fragmentação é a obtenção de sinais mais limpos, melhorando a razão sinal/ruído e diminuindo, portanto, os limites de detecção e quantificação (GARRIDO-

FRENICH et al., 2005). DEMOLINER et al. (2010) e LEDOUX (2011) reportaram que um grande número de agrotóxicos podem ser analisados por ambas as técnicas GC-MS e LC-MS. No entanto, atualmente, métodos baseados em LC-MS têm demonstrado ser capazes de cobrir um escopo mais amplo que aqueles baseados em GC-MS.

1.3.5 FATORES RELACIONADOS À TOXICIDADE DOS PESTICIDAS NAS ABELHAS

O tempo residual (RT) de pesticidas não sistêmicos na cultura-alvo exerce grande influencia sobre as abelhas polinizadoras. JOHANSEN e MAYER (1990) estabeleceram um parâmetro para garantir segurança das abelhas nas aplicações, sem comprometer a eficácia contra as pragas, doenças e ervas daninha na cultura-alvo. Trata-se do tempo de degradação residual do pesticida que causa até 25% (RT25) ou 40% (RT40) na mortalidade de abelhas expostas a estes resíduos. Seguindo este critério, os inseticidas de RT25 de 2 horas ou menos oferecem mínimo risco para as abelhas, desde que não aplicados quando elas estejam em forrageamento intensivo, enquanto que para inseticidas com RT25 de até 8 horas, o ideal é que as aplicações sejam feitas durante o crepúsculo ou à noite. Os inseticidas que têm RT25 maior que 8 horas não oferecem segurança, podendo afetar drasticamente a atividade de forrageamento das abelhas operárias. Assim estes produtos não devem ser aplicados sobre a cultura-alvo em pleno florescimento, mas bem antes desta fase e durante adiantado crepúsculo ou madrugada, antes das abelhas começarem a atividade de forrageamento (JOHANSEN e MAYER, 1990).

Outro fator que exerce grande influencia é o tamanho da área pulverizada num determinado período de tempo. JOHANSEN e MAYER (1990) verificaram uma mortalidade acentuada numa área de 80ha de macieiras, tratadas com um inseticida, e

que foi significativamente maior do que numa área de 0,8ha. Neste aspecto, em áreas de menor extensão e que utilizam a mão-de-obra familiar o impacto negativo sobre as abelhas é reduzido, pois o ritmo de manejo é mais lento, não havendo pulverização na sua plenitude, num único decurso de tempo (PINHEIRO e FREITAS, 2010).

Fatores ambientais, como a umidade relativa e a temperatura do ar, também alteram o potencial de toxicidade de um ingrediente ativo. Assim, um inseticida que oferece relativa segurança para abelhas pode tornar-se muito tóxico, dependendo da temperatura do ar durante um período específico (PINHEIRO e FREITAS, 2010). Neste sentido, pesticidas aplicados durante períodos frios oferecem um maior risco residual. Tal fato foi observado em um estudo realizado durante um inverno mais frio, no qual apresentou 100% de mortalidade em colônias com CCD, tratadas com 0,1 ng/abelha/dia de imidacloprido (LU et al., 2012). Em outro estudo, as baixas temperaturas do inverno modulou severamente a CCD associada a dose sub-letal de neonicotinóides (LU et al., 2014). Da mesma forma, os riscos residuais dos inseticidas carbofuran, clorpirifós e acefato, cresceram vertiginosamente quando pulverizados com temperaturas baixas (10°C) (JOHANSEN e MAYER, 1990).

Por outro lado, em altas temperaturas, os efeitos imediatos de inseticidas em abelhas podem ser mais evidentes, em função da mais rápida quebra do ingrediente ativo tóxico devido à ação da luz, temperatura e do metabolismo da planta, serem elevados em regiões de baixa latitude (HOOVEN et al., 2013). Em regiões com temperaturas elevadas, as abelhas de colônias muito populosas se aglomeram na entrada da colmeia, a fim de reduzir a temperatura interna das mesmas; movimentando suas asas de forma a direcionar uma corrente de ar para o interior da colmeia. Deste modo a deriva de inseticidas, aplicado naquele momento, pode atingir a colônia (CUNHA, 2008). No Nordeste brasileiro, isto pode ocorrer com frequência, pois os grandes

produtores de melão (*Cucumis melo* L.) fazem aplicações noturnas com produtos de maior toxicidade, o que aumenta o impacto sobre as colônias de *A. mellifera* usadas para polinização da cultura (PINHEIRO e FREITAS, 2010).

Com relação ao estágio de florescimento das culturas-alvo, na fase mais atrativa, quando as abelhas estão em intensa atividade de forrageamento, as pulverizações diurnas com inseticidas de alto risco para as abelhas devem ser evitadas. Assim, o ideal é que as aplicações sejam feitas à noite, muito cedo da manhã ou adiantado crepúsculo, quando as abelhas não estiverem forrageando (JAY, 1986). De um modo geral, pode-se classificar como seguras as aplicações feitas em adiantado crepúsculo/noite, de nível intermediário aquelas realizadas da meia noite ao raiar do sol e perigosas as pulverizações feitas logo cedo da manhã (HOOVEN et al., 2013). O conhecimento do período de tempo que cada cultura, em regiões específicas, permanece com suas flores abertas e a definição dos picos para coleta de pólen e néctar são de extrema importância, a fim de se evitar aplicações de pesticidas nesses períodos críticos de visita das abelhas (CHAMBÓ, et al., 2010; SOUSA et al., 2012). No caso da atividade de coleta das *A. mellifera* na cultura do melão, por exemplo, esta se concentra no período da manhã, com atividade mais intensa a coleta de pólen, que ocorre logo após o surgimento dos primeiros raios solares e com maior atividade nas flores (SOUSA et al., 2012).

A deriva nas aplicações de agrotóxicos é considerada um dos maiores problemas da agricultura. Segundo CUNHA (2008), a deriva pode alcançar a distância horizontal de 38,3 m para gotas de 40 µm, em velocidade do vento de 5 m/s e altura de lançamento de 0,8 m. Essa distância pode ser muito superior se, durante a trajetória, a gota tiver seu diâmetro diminuído pelo processo de evaporação, como ocorre em altas temperaturas mesmo sob a ação de ventos relativamente fracos. Uma das soluções encontradas para reduzir esse problema é o estabelecimento das chamadas zonas de segurança (SNOO,

1999). Trata-se de uma faixa de vegetação que não pode receber a aplicação de agrotóxico para proteger uma determinada área sensível como, por exemplo, um curso de água. A extensão dessa faixa, no entanto, é variável e depende das condições das aplicações (CUNHA, 2008).

A distância entre as colmeias e a plantação é outro fator de extrema importância. Quanto mais próximo das culturas as colônias de abelhas são instaladas, maior o risco de intoxicação, o que ocorre por meio da deriva nas correntes de vento. Além disso, quando a cultura-alvo é a única em pleno florescimento na área tratada, a atratividade exercida pelas suas flores sobrepuja até mesmo grandes distâncias, em torno de até 4,5 ou 6km. Estas considerações conduzem ao fato da perda de alternativa de plantas forrageiras como fonte de néctar e pólen pode agravar o efeito dos pesticidas sobre as abelhas (SOUSA, 2003).

A alimentação artificial é o suprimento alimentar que substitui o pólen e néctar para as abelhas. Esse manejo deve ser realizado a fim de reduzir o impacto dos pesticidas sobre a atividade de forrageamento de *A. mellifera* (JOHANSEN e MAYER 1990). Esta prática pode, perfeitamente, ser utilizada em campos de melão que dependam essencialmente das abelhas para aumentar a produtividade e qualidade da colheita (PINHEIRO e FREITAS, 2010).

REFERÊNCIAS

AILOUANE, Y.; LAMBIN, M.; ARMENGAUD, C.; EL HASSANI A.; GARY V. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior, *Environ. Toxicol. Chem.* v. 28, p.113–122, 2009.

ALAU, 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.

ALMEIDA, C.A.S. de. **Uso de agrotóxicos na cultura do melão (*Cucumis melo* L.) no município de Baraúna/RN: um estudo de caso.**Dissertação.UERN, 2001, 95p.

ALMEIDA, C. M. V. de B. **Deteção De Contaminantes no Mel.** (Dissertação) Mestrado em Segurança Alimentar. Universidade Técnica De Lisboa Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, 2010.

AMARAL, D. A. **Intoxicações por agrotóxicos: diagnóstico e tratamento.** Florianópolis: CIT/SC; 1998. 25 p.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/ partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA. **Agrotóxicos e toxicologia.** Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias>. [acesso 04/04/20014].

AUFAUVRE, J.; BIRON, D.G.; VIDAU, C. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports*, v.2, p.326, 2012.

AUPINEL, P.; FORTINI, D.; DUFOUR, H.; TASÉI, J.N.; MICHAUD, B. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, v.58, p.107-111, 2005.

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

BARGAŃSKA, Ž.; ŠLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Determination of Pesticide Residues in Honeybees using Modified QUEChERS Sample Work-Up and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v.19, p. 2911-2924, 2014.

BNB, 2013. **Efeitos da seca de 2012 sobre a apicultura nordestina**. Informe Rural Etene. Banco do Nordeste do Brasil S/A. Informe Rural, ano VII, n.2, 2013.

BONMATIN, J. M.; MOINEAU, I.; CHARVET, R.; FLECHE, C.; COLIN, M. E.; BENGSCHE, E. R. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. **Analytical Chemistry**, v.75, p. 2027-2033, 2003.

BONZINI, S.; TREMOLADA, P.; BERNARDINELLI I.; COLOMBO M; VIGHI M. Predicting pesticide fate in the hive (part 1):experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax. **Apidologie** (2011) 42:378–390. 2011.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. **Decreto nº 7802**, de 11 de Julho de 1989. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 Jul, 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa nº 42**, DE 20 de dezembro de 1999. Diário Oficial da União, Brasília. anexo 1., p.01-02. Dez, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11**. Diário Oficial da União, seção 1, p.16-17, 2000.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. **Decreto nº 4074**, de 04 de Janeiro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 Jan, 2002.

BRASIL, A.M.S.; OLIVEIRA, K.C.; ARAÚJO NETO, P.L.; VASCONCELOS, A.F. Custos do cultivo do melão amarelo na safra 2006/2007: um estudo de caso na empresa Santa Júlia Agro Comercial Exportadora de Frutas Tropicais LTDA. **In:** CONGRESSO BRASILEIRO DE CUSTOS, XIV, 2007, João Pessoa-PB, Anais... João Pessoa-PB: Associação Brasileira de Custos, 2007, 15p.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Instrução Normativa nº 17**, de 01/05/2009. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/intranet/download/arquivos/cdoc/biblioteca/resenha/2012/julho/Res2012-07-19DOUICMBio.pdf>>.[Acesso em 26 nov 2014]. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Monografias de Agrotóxicos**.Disponívelem:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d68e2100474596eb9f0cdf3fbc4c6735/p03.pdf?MOD=AJPERES> [Acesso em: 05 nov 2014].

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11**. Diário Oficial da União, seção 1, p.9-10, 2014.

CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J.; LACINA, O.; MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S. J. Rapid analysis of multiple pesticide in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry,. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, n. 2, p. 281-294, 2008.

CARNEIRO F.E. et al. Changes in the reproductive ability of the mite Varroa destructor (ANDERSON and TRUEMAN) in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v.36, n.6, p.949-952, 2007.

CARVALHO, S. M. **Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros a operárias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae).** Dissertação. Stephan Malfitano Carvalho - Lavras : UFLA, 2006. 72 p.

CARVALHO, S. M. **Honeybee *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) enzymes as possible biomarkers for the assessment of environmental contamination with pesticide.** Tese (Doutorado) - Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2010.

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

CARVALHO-ZILSE, G. A.; VILAS BOAS, H. C.; COSTA, K. B.; NUNES-SILVA, C. G.; SOUZA, M. T.; FERNANDES, R. S. **Meliponicultura na Amazônia** / Gislene Almeida. --- Manaus : [s.n.], 2012. 50 p.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? ***Annual Review of Entomology***, Palo Alto, v. 43, p. 1-16, 1998.

CHAMBÓ, E. D.; GARCIA, R. C.; OLIVEIRA, N. T. E. de; DUARTE-JÚNIOR, J. B. Aplicação de inseticida e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera* L.) no girassol (*Helianthus annuus* L.). ***Rev. Bras. de Agroecologia***, v. 5, p. 37-42, 2010.

CIATI, R.; OLIVEIRA, M. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Administração – SENAR. Regional do Estado de São Paulo. **Trabalhador na aplicação de agrotóxicos: Manual de aplicação de agrotóxicos com pulverizador costal**, São Paulo. 2005, 40 p.

COLE, L.; NICHOLSON, R.; CASIDA, J. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, v. 46, n. 1, p. 47-54, 1993.

COLIN, M. E.; BELZUNCES, L. P. Evidence of synergy between Prochloraz and Deltamethrin in *Apis mellifera* L.: a convenient biological approach. ***Pesticide Science***, v.36, p.115-119, 1992.

CRISÓSTOMO, L.A.; SANTOS, A.A.; RAIJ, B.V.; FARIA, C.M.B.; SILVA, D.J.; FERNANDES, F.A.M.; SANTOS, F.J.S.; CRISÓSTOMO, J.R.; FREITAS, J.A.D.; HOLANDA, J.S.; CARDOSO, J.W.; COSTA, N. D. (Circular técnica). **Adubação, Irrigação, Híbridos e Práticas Culturais para o Meloeiro no Nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 21p.

CRUZ, D. de O. B. M.; FREITAS, L. A. da SILVA, E. M. S. da SILVA & I.G.A. Bomfim. Adaptação e comportamento de pastejo da abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) em ambiente protegido. ***Acta Sci.*** 26: 293-298, 2004.

CRUZ, A. S. **Estudos sobre efeitos toxicológicos na morfologia de órgãos de larvas de operárias de *Apis mellifera***. 2007. Monografia (Graduação) - Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2007.

CRUZ, A. S.; ZACARIN, E. C.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. ***Cell Biology and Toxicology***, Dordrecht, v.26, n. 2, p. 165-176, 2010.

CUNHA, J. P. A. R. Simulação da deriva de agrotóxicos em diferentes condições de pulverização. ***Ciência e Agrotecnologia***, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1616-1621, 2008.

CUTLER, G.C.; SCOTT-DUPREE, C. D. Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. ***Journal of Economic Entomology***, v. 100, p. 765-772, 2007.

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

DECOURTYE, A.; ARMENGAUD, C.; RENOU, M.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, S.; GAUTHIER, M.; PHAM-DELÈGUE, M-H. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 78, p. 83-92, 2004.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENEQUE, E.; MENACH, K. L.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 48, p. 242-250, 2005.

DEL SARTO, M. C. L. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 2009. Tese de Doutorado. Viçosa, Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 64p.

DELL'OMO, G.; PLESKACHEVA, M. G.; WOLFER, D. P.; LIPP, H. P.; SHORE, R. F. Comparative Effects of Exposure to an Organophosphate Pesticide on Locomotor Activity of Laboratory Mice and Five Species of Wild Rodents. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 70, p. 138-145, 2003.

DEMOLINER, A.; CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; GONÇALVES, F. F.; CLEMENTIN, R. M.; MILANI, M. R.; PRIMEL, E. G. Development and Validation of a Method using SPE and LC-ESI-MS-MS for the Determination of Multiple Classes of Pesticides and Metabolites in Water Samples. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 8, p. 1424-1433, 2010.

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

DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In:DEVILLERS, J.; PHAM-DELEGUE, M. H. (Ed.). Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. London:Taylor& Francis, p.56-66, 2002.

DI PRISCO, G.; PENNACCHIO, F.; EMILIO, C.; BONCRISTIANI, H.; EVANS, J.D.; AND CHEN, Y. P. *Varroa destructor*, an effective vector of Israeli Acute Paralysis Virus in the honey bee *Apis mellifera*. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 151-155, 2011.

DI PRISCO, G.; CAVALIERE, V.; ANNOSCIA, D. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 110, p. 18466–18471, 2013.

EC (European Commission). Directorate General for Health & Consumers. Pesticides EU-MRLs: updated on 12/11/2014. Disponível em: <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>. Acesso em:14/11/2014.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. **Mass Spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications**. 3 ed. Jhon Wiley & Sons, 2009. 388 p.

EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GARY, V.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archive of Environmental Contaminant Toxicology**, v. 54, p. 653-661, 2008.

ERICKSON B. E. Europe bans three neonicotinoids. **Chemical Engineering News**, v. 91, v. 18, p. 11, 2012.

FAROOQUI, T. A potential link among biogenic aminesbased pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis.- **Neurochemistry International**, v.62, n.1, p. 122-136, 2013.

FAO. Trade. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>> Acesso em: 04/11/2014, 2012.

FERREIRA, R. A. C. **Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidea) tratadas com fipronil e ácido bórico.** Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 73p, 2010.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, Stanford, v. 44, p. 507-533, 1999.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J.N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis*, v.14, p. 282-298, 2010.

GARRIDO-FRENICH, A.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, I.; ARREBOLA, F. J.; MARTINEZ VIDAL, J. L. Potentiality of Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry in Vanguard and Rearguard Methods of Pesticide Residues in Vegetables. *Analytical Chemistry*, v. 77, p. 4640-4648, 2005.

GODFRAY, H. C. J.; BLACQUIÈRE, T.; FIELD, L. M.; HAILS, R. S.; PETROKOFISKY, G.; POTTS, S. G.; RAINE, N. E.; VANBERGEN, A.J.; MCLEAN, A. R. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 281, artigo 20140558, 2014.

GOULART, S. M.; de QUEIROS, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; de QUEIROS, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta*, v. 75, p. 1320-1323, 2008.

GUIMARÃES, J. A.; AZEVEDO, F. R. de; BRAGA SOBRINHO, R.; MESQUITA, A. L. M. **Recomendações para o Manejo das Principais Pragas do Meloeiro na Região**

do Semi-Árido Nordeste. Fortaleza: Circular técnica. Embrapa Agroindústria Tropical, 2005.

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

HIGES M., MARTIN-HERNANDEZ R., BOTIAS C., BAILON E. G., GONZALEZ-PORTO A., BARRIOS L., DEL NOZAL M. J., BERNAL J. L., JIMENEZ J. J., PALENCIA P. G., MEANA A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology**, 10: 2659-2669, 2008.

HASHIMOTO, J.H.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; TOLEDO, V. A. A. Evaluation of the use of the inhibition esterases activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticida Thiamethoxam pesticida residues. **Sociobiology**. v.42, n.3, p. 693-699, 2003.

HEINZOW, B.; ANDERSEN, H. R. Biocides and Pesticides. In: DUFFUS, J. H.; WORTH, H. G. J. (Ed). **Fundamental Toxicology**. Londres: The Royal Society of Chemistry, 2006. Cap. 22. p.291-302.

HERRERA, A.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; CONCHELLO, P.; BAYARRI, S.; LAZARO, R.; YAGUE, C.; ARINO, A.; **Anal. Bioanal. Chem.** p. 381, 695, 2005.

HIGES, M; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R; GARRIDO-BAILÓN, E; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MEANA, A; DEL NOZAL, M. J.; MAYO, R.; BERNAL J. L.. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. **Environmental Microbiology**, (2):110-3, 2009.

HIRAHARA, Y.; KIMURA, M.; INOUE, T.; UCHIKAWA, S.; OTANI, S.; HAGANUMA, A.; MATSUMOTO, N.; HIRATA, A.; MARUYAMA, S.; TIZUKA, T.; UKYO, M.; OTA, M.; HIROSE, H.; SUZUKI, S.; UCHIDA, Y. Validation of multiresidue screening methods for the determination of 186 pesticides in 11

agricultural products using gas chromatography. *Journal of Health Science*, v. 51, n. 5, p. 617-627, 2005.

HOFFMANN, E. J.; CASTLE, S.J. Imidacloprid in melon guttation fluid: a potential mode of exposure for pest and beneficial organisms. *Journal of Economic Entomology*, v. 105, p. 67-71, 2012.

HOOVEN, L.; SAGILI, R.; JOHANSEN, E. **How to reduce bee poisoning from pesticides**. PNW (Pacific Northwest Extension) 591, Oregon State University, Corvallis. 26p. 2006.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em <www.sidra.ibge.gov.br> [Acesso em 07/04/2014].

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em <www.sidra.ibge.gov.br> [Acesso em 11/11/2014].

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CONTRERA, F. A. L.; KLEINERT, A. M. P. A meliponicultura e a Iniciativa Brasileira dos Polinizadores. *In: Congresso Brasileiro de Apicultura*, 15., e Congresso Brasileiro de Meliponicultura, 1. 2004, Natal-RN. Anais, 2004.

IOANNIDOU, M. D.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; STRATIS, J. A. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, v. 65, p. 92 -97, 2005.

JAY, S.C. Spatial management of honeybees on crops. *Annual Reviews of Entomology*, v.31, p. 49-65, 1986.

JOHANSEN, C. A. Pesticides and pollinators. *Annual Review of Entomology*, v.22, p.177-192, 1977.

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F. **Pollinator protection: a bee and pesticide**. Cheshire: WicwasPr, 1990. 212 p.

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F.; EVES, J. D.; KIOUS, C. W. Pesticides and bees. *Environmental Entomology*, v. 12, p. 1513-1518, 1983.

KHALILI-ZANJANI, M. R.; YAMINI, Y.; YAZDANFAR, N.; SHARIATI, S. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 606, n. 2, p. 202-208, 2008.

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

KOVALCZUK, T.; LACINA, O.; JECH, M.; POUSTKA, J.; HAJŠLOVÁ, J. Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Additives and Contaminants*, v. 25, n. 4, p. 444-457, 2008.

KUJAWSKI, M.W.; NAMIÉŚNIK, J. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues, *Trends in Analytical Chemistry*, V.27, n.9, p. 785-793. 2008.

LANDGRAF, M.; BEHRENS, J. H.; BARCELLOS, M. N.; FREWER, L. J.; NUNES, T. P.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Consumer purchase habits and views on food safety: A Brazilian study. *Food Control*, v. 21, p. 963-969, 2010.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 1021-1036, 2011.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. *Agriculturas* v.2, p. 7-9, 2005.

LU, C., WARCHOL, K. M.; CALLAHAN, R. A. In situ replication of honeybee colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology*, v.65, n.1, p. 99-106, 2012.

LU, C., WARCHOL, K. M.; CALLAHAN, R. A. Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology*, v. 67, n.1, p. 125-130, 2014.

MACIEIRA, O. J. D.; HEBLING-BERALDO, M. J. A. Laboratory toxicity of insecticides to workers of *Trigonaspis* (F., 1793) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Apicultural Research*, v. 28, n. 1, p. 3-6, 1989.

MAINI, S.; MEDRZYCKI, P.; PORRINI, C. The puzzle of honey bee losses: a brief review.- *Bulletin of Insectology*, v.63, n.1,p. 153-160, 2010.

MALASPINA, O. **Estudo genético da resistência ao DDT e relação com outros caracteres em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae).** Rio Claro, 1979. 81p. Dissertação – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

MALASPINA, O.; STORT, A. C. DDT tolerance of africanized bees, italian bees (*Apis mellifera linguistica*) and their F1 hybrids (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, v. 56, n. 1, p. 74-79, 1983.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. **In:** CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 27.; e MELIPONICULTURA, 3.; Belo Horizonte, 2008. Anais... Belo Horizonte, 2008.

MARGNI, M.; ROSSIER, D.; CRETZAZ, P.; JOLLIET, O. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 93, p. 379-392, 2002.

MARTINS, C.F. **Diversity of the bee fauna of the Brazilian caatinga**, p.131-134. In P.G. Kevan & V.L. Imperatriz-Fonseca (eds.), Pollinating bees – the conservation link between agriculture and nature. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 313p. 2002.

MATSUMOTO T., 2013.- Reduction in homing flights in the honey bee *Apis Mellifera* after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides.- **Bulletin of Insectology**, v.66, n.1, p. 1-9.

MAYER, D.F.; LUNDEN, J.D. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachilerotundata* and *Nomiamelanderi*. **Journal of Apicultural Research**, v. 38, p. 191-197, 1999.

MEDRZYCHI, P.; MONTANARI, R.; BORTOLOTTI, L.; SABATINI, A.G.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory test. **Bulletin of Insectology**, v.56, n. 1, p. 59-62, 2003.

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

MENEZES, J. B.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MAIA, C. E.; ANDRADE, G. G.; ALMEIDA, J. H. S.; VIANA, F. M. P. **Características do melão para exportação**. In: ALVES, R. E. (Org.) Melão. Pós-colheita. Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p.10-22. (Frutas do Brasil, 10)

MENTEN, J. O. Liderança em Tecnologia Fitossanitária. **Revista Agroanalysis**, v.29, n.4, 2009.

MENTEN, J. O.; SAMPAIO, I A.; MOREIRA, H.; FLÔRES, D. E.; MENTEN, M. O **setor de defensivos agrícolas no Brasil**. 2010 Agrolink. <<http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/NoticiaDetalhe.aspx?CodNoticia=114571>. Acesso 11/11/2014.

MESSAGE, D.; SILVA, I. C.; DE JONG, D.; SIMÕES, Z. L. P.; TEIXEIRA, E. W. CCD (Colony Collapse Disorder) ocorre em abelhas *Apis mellifera* (africanizadas)? Um relato de caso. In: X Congresso Ibero-latinoamericano de Apicultura, Natal. 2010.

MESSAGE, D. ; TEIXEIRA, E. W. ; JONG, D. . Situação da Sanidade das Abelhas no Brasil. In: IMPERATRIZ-FONSECA, VL; CANHOS, DAL; ALVES, DA & SARAIVA, AM. (Org.). **Polinizadores no Brasil - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. 1ed.São Paulo/SP: EDUSP, 2012, v. , p. 237-256.

MOL, H. G. J.; PLAZA-BOLANOS, P.; ZOMER, P.; De RIJK, T. C.; STOLKER, A. A. M.; MULDER, P. P. J. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 9450-9459, 2008.

MORAES, S.S.; BAUTISTA, A. R. L.; VIANA, B.F. Avaliação da toxicidade aguda (DL50 e CL50) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de contato. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 29, n. 1, p. 31-37, 2000.

NAUEN, R.; BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook*, v. 13, p. 241-245, 2002.

NEAL A, P., YUAN Y., ATCHISON, W. D. Allethrin differentially modulates voltage-gated calcium channel. *Toxicological Sciences*, v. 116, n. 2, p. 604-613, 2010.

NELSON, L.S.; PERRONE, J.; DEROOS, F.; STORK, C.; HOFFMAN, R. S. Aldicarb poisoning by an illicit rodenticide imported into the United States: Tres Pasitos. *Journal of Toxicology*, v. 39, n. 5, p. 447-52, 2001.

NEUMANN, P. CARRECK, N. L. Honey Bee Colony Losses. *Journal of Apicultural Research*, v.49,n.1,p.1-6, 2010.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry**. 3 ed. Nova York: Taylor & Francis Group, 2006. 543 p.

NOCELLI, R. C. F. ; MALASPINA, O. ; CARVALHO, S. M. ; LOURENCO, C. T. ; ROAT, T. C. ; PEREIRA, A. M. ; SILVA ZACARIN, E. C. M. . As Abelhas e os Defensivos Agrícolas. In: Vera Lucia Imperatriz-Fonseca, Dora Ann Lange Canhos, Denise de Araujo Alves e Antonio Mauro Saraiva. (Org.). **Polinizadores no Brasil contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: EDUSP, 2012, v. , p.257 -269.

NUNES, E. M.; FILIPPI, E. E.; GODEIRO, K. F. Agronegócio, Estado e Meio Ambiente na Economia Potiguar: uma visão crítica. **In:** Encontro da ANPPAS. 2006. Brasília-DF. Anais, 2006.

OBANA, H.; AKUTSU, K.; OKIHASHI, M.; KAKIMOTO, S.; HORI, S. Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using a high capacity absorbent polymer for water. **The Analyst**, v. 124, p. 1159-1165, 1999.

OLIVEIRA, A. M. de; GURGEL, A. F.; LIMA, L. C. R. de. Diagnóstico do agronegócio do Melão (*Cucumis melo* L) produzido em Mossoró/RN. Estudo de caso em 3 empresas produtoras. **Holos**, Natal-RN, v. 01, p. 27-36, 2005.

OLIVEIRA A. M. **Aspectos Técnicos e Ambientais da Produção de Melão na Zona Homogênea Mossoroense, Com Ênfase ao Controle da Mosca-Branca e da Mosca-Minadora**. Dissertação. Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA. 2008.

OLIVEIRA, F. A. da S. **Validação de um método multirresíduos e multiclassas para determinação e quantificação de 140 resíduos de agrotóxicos em leite através da técnica LC-MS/MS**. Dissertação. Belo Horizonte Escola de Veterinária – UFMG, 2011.

EPPO. Guideline on test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees. **Bulletin OEPP/EPPOBulletin**, v. 22, p. 203-216, 1992.

Palazuelos Ballivian JMP. **Abelhas nativas sem ferrão** - Mýg. São Leopoldo, Oikos, 2008.

PAREJA, L.; COLAZZO, M.; PEREZ-PARADA, A.; NIELL, S.; CARRASCO-LETELIER L.; BSEIL, 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.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. Tese (Doutorado) - Zoologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2010.

PETTIS, J.; VANENGELSDORP, D.; JOHNSON, J.; DIVELY, G. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen Nosema. *Naturwissenschaften*, v. 99, p. 153-158, 2012.

PILLING, E. D.; JEPSON, P. C. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pest Management Science*, v. 39, p.293-297, 1993.

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

PINTO, M.R.; MIGUEL, W. Intoxicação de *Apis mellifera* por organofosforado na região do Vale do Itajaí – SC. In: Anais do Conbravet 2008. <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1080-2.pdf>>. (Acesso em 26/01/2009). 2008.

PIRO, R.; MUTINELLI, F. The EU legislation for honey residue control. *Apiacta*, n. 38, p. 15 – 20, 2003.

PITTELLA, C. M. **Determinação De Resíduo De Pesticidas Em Mel De Abelha (Apis sp) por Cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massa.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

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

QUARLES, W. **Pesticides and honey bee colony collapse disorder**, IPM Practitioner v.30, p. 1-10, 2008.

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.

RICE, P. J.; ARTHUR, E. L.; BAREFOOT, A. C. Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 14, p. 5367-5373, 2007.

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

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

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M-P.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, v. 36, p. 71-83, 2005.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; LOPES, D. A.; TOLEDO, V. A. A.; HASHIMOTO, J. H. Avaliação da utilização de larvas de abelhas africanizadas

(*Apis mellifera*) como bioindicadores na presença de resíduos de Thiamethoxan. **Click Ciência**, n. 17, p. 1-10, 2009.

SADEGHI A., MOZAFARI A.,BAHMANI R., SHOKRI K. Use of honeybees as bio-indicators of environmental pollution in the kurdistan province of iran. **Journal of Apicultural Science**, Vol. 56 No. 2 2012

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

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

SEBRAE, Cooperação. **Diagnóstico Mercadológico Projeto Apis – Sergipe**. Dezembro, 2005.

SEBRAE, 2014. **Oportunidades para o mercado de mel**. Resposta Técnica. AGRONEGÓCIO.<http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Estudos%20e%20Pesquisas/2014_06_06_RT_Agroneg%C3%B3cio_Oportunidades_para_o_mercado_de_mel.pdf. [Acesso 11/11/2014].

SILVA, R. A. (Ed.). Boletim Técnico. **Dicas & Notícias & Informações apícolas**. Ano I. n. 18. Fevereiro, 2007.

SILVA, H. R.; COSTA, N. D.; CARRIJO, O. A. Exigências de clima e solo e épocas de plantio. **In: SILVA, H.R.; COSTA, N.D. Melão: Produção e aspectos técnicos**. Brasília: EMBRAPA, p. 23-28, 2002.

SILVEIRA, D. C. da. **Avaliação da agressividade de abelhas *Apis mellifera* L. africanizadas no Sertão da Paraíba**. Dissertação - Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande. UFCG. Pombal, 2012.

SNOO, G. R. Unsprayed field margins: effects on environment, biodiversity and agricultural practice. *Landscape and Urban Planning*, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 151-160, 1999.

SODERLUND, D.; BLOOMQUIST, J. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, v. 34, n.1, p. 77-96, 1989.

SOUSA, R. M. **Polinização do meloeiro (*Cucumis melo* L.) por abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.): requerimentos da cultura e manejo das colônias.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. 119p, 2003.

SOUSA, R. M.; AGUIAR, O. de S.; FREITAS, B. M.; MARACAJÁ, P. B.; ANDRADE, C. B. C. M. Comportamento de pastejo das abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em flores de melão amarelo (*Cucumis melo* L.). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v.7, n.1, p. 233-238, 2012.

SOUZA, D. C. (Org.). **Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural.** 2ª ed. Brasília: Sebrae, 2007a. 186 p.

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

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) por meio de análises morfológicas e comportamentais.** Dissertação (Mestrado) - Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2009.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDREA, M.M. **Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações.** Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29p.

STOKSTAD, E. Genomics - Puzzling decline of US bees linked to virus from Australia. *Science*, v. 317, n. 5843, p. 1304-1305, 2007

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L.P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19, p. 1901-1905, 2000.

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, p. 2482-2486, 2001.

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

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

THOMAZONI, D.; FORTUNATO, R. P.; KODAMA, C.; CARBONARI, V.; ALVES JR., V. V.; FONECA, P. R. B.; SORIA, M. F.; DEGRANDE, P. E. Seletividade de inseticidas sobre adultos de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae). In: VI Congresso Brasileiro de Algodão, Uberlândia. Anais. 2007. p. CD-ROM.

THOMPSON, H. M. Behavioral effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment, *Exotoxicol.* v.12, p. 317–330, 2003.

THOMPSON, H. M. Risk assessment for honey bees and pesticides — recent developments and “new issues.” *Pest Management Science*, v.66, p.1157–1162, 2010.

THREE-CARTRIDGE. Solid-Phase Extraction–Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, v. 89, n. 3, p. 740-771, 2006.

TILHE, R. A. C. **Análise de resíduos de pesticidas organoclorados em mel de abelhas proveniente de áreas críticas**, 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

TOKARZ, R.; FIRTH, C.; STREET, C.; COX-FOSTER, D. L.; LIPKIN, W. I. Lack of evidence for an association between iridovirus and colony collapse disorder. ***PLoS ONE***, v. 6, n. 6, 2011.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. ***Accounts of Chemical Research***, v. 42, p. 260-269, 2008.

TRAPP, S.; PUSSEMIER, L. Model calculations and measurements of uptake and translocation of carbamates by bean plants. ***Chemosphere***, v.22, p. 327-339, 1991.

USDA. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2014.- **Report on the national stakeholders conference on honey bee health.**- [online] URL: www.usda.gov/documents/ReportHoneyBeeHealth.pdf, [acesso em 13 de novembro de 2014].

VANDAME, R.; MELED, M.; COLIN, M.E.; BELZUNCES, L.P. Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. ***Environmental Toxicology Chemistry***, v. 14, p. 855-860, 1995.

VANDAME, R.; BELZUNCES, L.P. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. ***Neuroscience Letters***, v.17, n. 251, p. 57-60, 1998.

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

VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUES, B.; BRUNET, J. L.; TEXIER, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; ALAOUI, H. E.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC F. - Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*.- ***PLoS ONE***, v.6, n.6, :e21550, 2011.

WILLIAMS G. R., TARPY D. R., VANENGELSDORP D., CHAUZAT M. P., COX-FOSTER D. L., DELAPLANE K. S., NEUMANN P., PETTIS J. S., ROGERS R. E. L., SHUTLER D. Colony collapse disorder in context.- **Bioessays**, 32: 845-846, 2010.

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

WU, J.Y.; SMART, M.D.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W.S. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. ***Journal of Invertebrate Pathology***, v.109, p. 326–329, 2012.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA H. S. Toxicologia do praguicida aldicarb (“chumbinho”): aspectos gerais, clínicos e terapêuticos em cães e gatos. ***Ciência Rural***, v. 37, n. 4, p. 1206-1211, 2007.

CAPÍTULO II

EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM ABELHAS (*Apis mellifera* L.) UTILIZADAS NA POLINIZAÇÃO DO MELÃO (*Cucumis melo* L.)

2. EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM ABELHAS (*Apis mellifera* L.) UTILIZADAS NA POLINIZAÇÃO DO MELÃO (*Cucumis melo* L.).

2.1 RESUMO

O declínio das populações de abelhas (*Apis mellifera* L.) tem afetado a produção agrícola mundial e tem um impacto claro sobre a produção de alimentos e a economia. Uma das causas prováveis para este declínio é o uso indiscriminado de agrotóxicos. O objetivo do presente estudo foi comparar os níveis de exposição aos pesticidas entre as abelhas (*Apis mellifera* L.) que são usadas para polinizar plantações de melão, as abelhas mantidas na caatinga, e as abelhas jandaíra (*Melipona subnitida* L.) mantidas na caatinga. Para isso, amostras de mel foram coletadas de 23 colônias de *Apis mellifera* utilizadas para polinizar plantações de melão, 20 colônias de *Apis mellifera* que forrageiam de floresta e 10 colônias de *Melipona subnitida* que forrageiam na floresta. O nível de exposição aos pesticidas foi determinado medindo os níveis residuais de 152 compostos no mel, utilizando uma técnica de análise de multiresíduos no sistema UPLC-MS. As amostras de mel estudadas apresentaram 19 tipos de pesticidas diferentes, 13 dos quais estavam presentes no mel de abelhas polinizadoras das plantações de melão. Os níveis de alguns compostos eram suficientemente elevados para promover efeitos adversos em abelhas. Assim, a polinização das culturas oferece um grande risco de toxicidade para as abelhas que poderia contribuir para o declínio da população de abelhas na colônia.

Palavras-chave: contaminação ambiental, abelhas, inseticidas, agrotóxicos, análise multiresíduos, mel

2.2 INTRODUÇÃO

A polinização da flor por animais é fundamental para a agricultura; aproximadamente 35% das lavouras são dependentes de polinizadores para a reprodução sexual (KLEIN et al., 2007). O valor global de polinização, em 2005, foi estimado em € 153.000.000.000 (GALLAI et al., 2009). As abelhas (*Apis mellifera* L.) são os polinizadores economicamente mais valiosos para a agricultura (KLEIN et al., 2007; POTTS et al., 2010). No entanto, a recente queda nas populações de polinizadores vem afetando a produção mundial agrícola, com impactos tanto na produção de alimentos quanto na economia (POTTS et al., 2010; LEVER et al., 2014). Uma das causas prováveis para o declínio das populações de polinizadores, incluindo as abelhas, é o uso indiscriminado de agrotóxicos (KLEIN et al., 2007; POTTS et al., 2010; NAKASU et al., 2014).

As abelhas de maneira individual podem ser expostas a pesticidas diretamente através do contato corporal ou indiretamente pelo consumo de resíduos de pesticidas no néctar e pólen das flores (RORTAIS et al., 2005). Além disso, toda uma colônia pode ser exposta a pesticidas, através da coleta e transporte de pólen contaminado, por abelhas forrageiras (VILLA et al., 2000). As abelhas que se alimentam de culturas de melão também podem ser expostas a pesticidas via fluido de gutação, um exsudato da seiva do xilema eliminado através hidatódios da folha (THOMPSON, 2010; HOFFMANN e CASTLE, 2012).

Os pesticidas podem matar as abelhas, quando em doses suficientemente altas. No entanto, doses de pesticidas que não causam a morte imediata, muitas vezes têm outros efeitos deletérios e podem interferir com as capacidades cognitivas e o comportamento das abelhas. As potenciais consequências negativas incluem déficits na aprendizagem, na orientação e nas habilidades de coleta de alimentos; as abelhas

afetadas podem, portanto, ter uma reduzida capacidade de coleta de alimentos e de navegação na volta à colmeia (RORTAIS et al., 2005;. DESNEUX et al., 2007;. GODFRAY et al., 2014.). Além disso, alguns pesticidas podem reduzir a resistência da abelha a patógenos (ALAUX et al., 2010;AUFAUVRE et al., 2012;. PETTIS et al., 2012;WU et al., 2012;DI PRISCO et al., 2013).

2.3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi determinar os níveis de exposição aos pesticidas entre as abelhas *A. mellifera* L. que são usadas para polinizar plantações de melão e comparar os níveis de exposição às abelhas *A. mellifera* L. que forrageiam na floresta (caatinga) e abelhas jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (tribo Meliponini da família Apidae), que forrageiam na floresta (caatinga).

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Produtos químicos e materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A acetonitrila e o ácido acético glacial de grau LC-MS, foram fornecidos pela Merck (Darmstad, Alemanha). O metanol foi obtido da Baker (Xalostoc, México). O reagente sulfato de magnésio anidro (pureza $\geq 97\%$) foi adquirido de Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), e o acetato de sódio anidro e o acetato de amônio (pureza $\geq 98\%$) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O ácido fórmico foi comprado de Tedia (Ohio, EUA). Água ultrapura foi gerada utilizando um sistema Milli-Q da Millipore (Milford, MA, EUA). Todos os padrões utilizados foram de elevado grau de pureza ($> 98,0\%$) e foram adquiridos da Riedel-de Haën (Selze, Alemanha) ou Sigma-Aldrich. As soluções de

estoque individuais foram preparadas a 1.000 ng L⁻¹ em acetonitrila ou metanol e armazenada a -20±2°C. As soluções do trabalho foram preparadas como diluições apropriadas das soluções de estoque.

2.4.2 Amostras

Todas as colônias eram criadas na Zona homogênea mossoroense, que abrange os municípios de Mossoró e Baraúnas, Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. Estas colônias não eram submetidas a qualquer tipo de manejo sanitário, tampouco nutricional.

A coleta das amostras de mel de abelhas utilizadas na polinização do melão foi realizada em área de cultivo comercial (Figura 1.) no período de outubro de 2013.

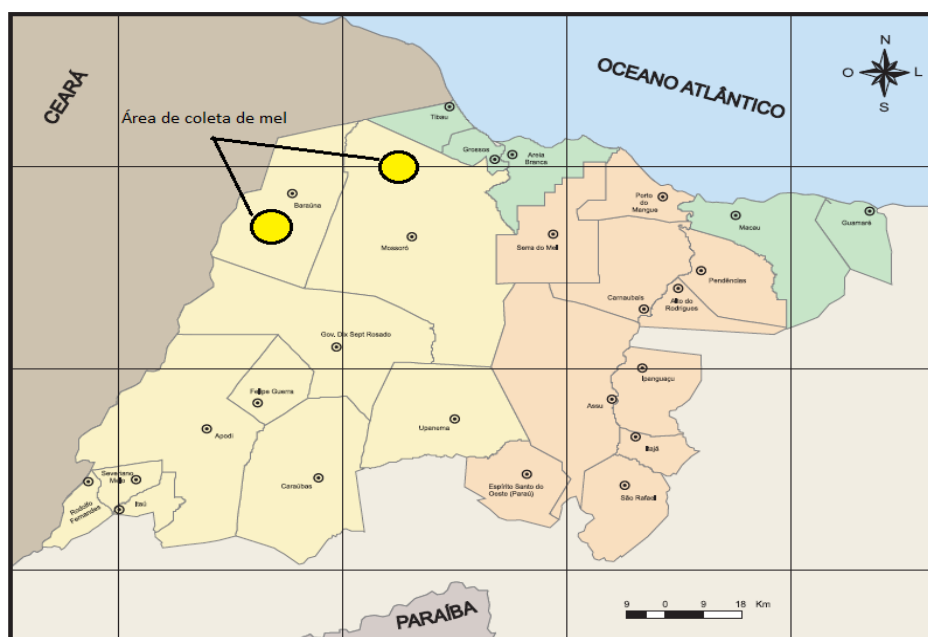


Figura 1. Mapa do local das coletas de amostras de mel.

As amostras de mel foram coletadas diretamente de 23 colônias de abelhas (*Apis mellifera* L.) utilizadas para polinizar plantações de melão (Figuras 2 e 3), 20 colônias de abelhas (*A. mellifera* L.) que forrageiam na floresta (caatinga), e 10 colônias

de abelhas sem ferrão (*Melipona subnitida* Ducke) que forrageiam na floresta (caatinga). As amostras de mel proveniente de abelhas que forrageiam na Caatinga foram coletadas numa distância mínima de 8 km de áreas de cultura de melão.

Todas as amostras foram estocadas em geladeira a 10 °C e armazenadas até o momento da extração.

A abelha jandaíra foi usada para comparação porque foi determinado anteriormente que colônias mantidas na região do estudo não recolhiam o pólen do meloeiro (MAIA-SILVA, 2013).



Figura 2. Colmeias de abelhas (*Apis mellifera*) utilizadas na polinização do melão.



Figura 3. Coleta de amostras de mel para análise de pesticidas.

2.4.3 Preparação das amostras

A extração e a remoção de interferentes das amostras (Rissato et al., 2006; Pittella, 2009) foram realizadas como se segue. Amostras de mel (10,0 g) foram transferidas para tubos de centrífuga de polipropileno (50 mL) com 10,0 mL de água deionizada. Então, 10,0 mL de acetato de etila foram adicionados, e os tubos foram agitados a 3000 rpm durante um minuto. Os tubos foram então centrifugado a 4 °C, 2700 x *g*, durante 9 minutos (Figura 4).

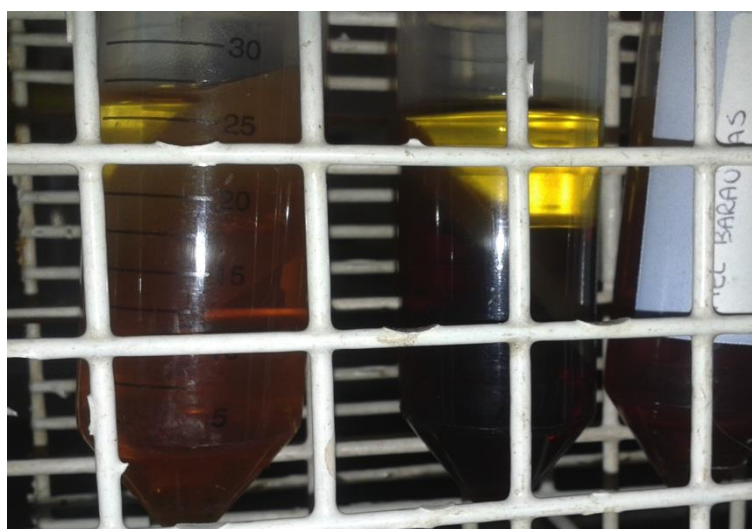


Figura4. Amostras de mel apresentando sobrenadante após a centrifugação.

O sobrenadante foi transferido para tubos limpos de centrífuga de polipropileno (50 mL) e em seguida foi repetida a extração mais três vezes com 5,0 mL de acetato de etila. Os extratos de acetato de etila (25 mL) foram filtrados utilizando Florisil (1 g) seguido por sulfato de magnésio (4,0 g)(Figura5).



Figura5. Tubos de propileno com os extratos e cartuchos com floril e sulfato de magnésio para filtração das amostras.

Os extratos foram secos, novamente suspensos em 1,0 mL de acetonitrila, transferidos para *vials* de cromatografia e analisados utilizando o sistema UPLC-MS/MS. O nível de exposição a pesticida foi determinado medindo os níveis de pesticidas residuais de 152 compostos de diversas classes, no mel (Tabela 1). Todos os pesticidas identificados foram avaliados por UPLC-MS, utilizando uma técnica de análise de multiresíduos.

Tabela 1. Pesticidas pesquisados nas amostras de mel.

Pesticidas	Uso*	Grupo químico	Fórmula molecular
2,4-D (2,4-ácido diclorofenóxiacético)	H	Ácido fenoxi	$C_8H_6Cl_2O_3$
2,4-DB (4-(2,4-ácido diclorofenoxi butírico)	H	Ácido fenoxi	$C_{10}H_{10}Cl_2O_3$
2,4,5-T (2,4,5-ácido triclorofenoxi acetico)	H	Ácido fenoxi	$C_8H_5Cl_3O_3$
3-hidroxicarbofurano	I	Carbamato	$C_{12}H_{15}NO_4$
Acefato	I	Organofosforado	$C_4H_{10}NO_3PS$
Acetamiprido	I	Neonicotinóide	$C_{10}H_{11}ClN_4$
Aldicarbe	I	Carbamato	$C_7H_{14}N_2O_2S$
Aldicarbe sulfona (metabolite)	I	Carbamato	$C_7H_{14}N_2O_4S$
Aldicarbe sulfóxido	I	Carbamato	$C_7H_{14}N_2O_3S$

(metabolite)			
Amitraz	A/I	Amidine	C ₁₉ H ₂₃ N ₃
Aramita	A	Sulfite ester	C ₁₅ H ₂₃ ClO ₄ S
Azinfós-etil	A/I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂
Azinfós-metil	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂
Azoxistrobina	F	Strobilurin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅
Barban	H	Carbamato	C ₁₁ H ₉ Cl ₂ NO ₂
Benalaxil	H	Acilalanina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃
Benfuracarbe	I/N	Carbamato	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S
Benomil	F	Benzimidazol	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
Bentazon	H	Diazina	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S
BF 500-3 (metabolito piraclastrobina)	F	Strobilurina	C ₁₈ H ₁₆ Cl N ₃ O ₃
Bifentrina	A/I	Piretroide	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂
Boscalida	F	Anilide	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O
Carbaril	I	Carbamato	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂
Carbendazim	F	Benzimidazol	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂
Carbofurano	I	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
Carbossulfano	I	Carbamato	C ₂₀ H ₃₂ N ₂ O ₃ S
Clorbufan	H	Carbamato	C ₁₁ H ₁₀ ClNO ₂
Clorfenvinfós	A/I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P
Cloroxuron	H	Uréia	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₂ O ₂
Clorpirifós	A/I	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Clorpirifós metil	A/I	Organofosforado	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS
Cinidon-etílico	H	Dicarboximida	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ NO ₄
Ciazofamida	F	Imidazol	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₄ O ₂ S
Cimoxanil	F	Cianoacetamideoximo	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃
Ciproconazol	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O
Ciprodinil	F	Anilinopirimidina	C ₁₄ H ₁₅ N ₃
Ciromazina	I	Triazina	C ₆ H ₁₀ N ₆
Deltametrina	I/F	Piretroide	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Di-alato	A/H	Carbamato	C ₁₀ H ₁₇ Cl ₂ NOS
Diazinona	A/I/N	Organofosforado	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS
Diclorprop	N	Ácido Carboxílico	C ₉ H ₈ Cl ₂ O ₃
Diclorvós	I	Organofosforado	C ₄ H ₇ C ₁₂ O ₄ P
Difenoconazol	F	Triazol	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
Diiflubenzuron	I	Benzolureia	C ₁₄ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₂
Dimetoato	I	Organofosforado	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂
Dinocap	A/F	Dinitrofenol	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆
Dinoseb	H	Dinitrofenol	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆
Dinoterb	H	Dinitrofenol	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₅
Dissulfotona	A/I	Organofosforado	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₃
Dissulfotona sulfona (metabolite)	A/I	Organofosforado	C ₈ H ₁₉ O ₄ PS ₃
Dissulfotona sulfóxido (metabolite)	A/I	Organofosforado	C ₈ H ₁₉ O ₃ PS ₃
Etiona	A/I	Organofosforado	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄
Etofumesato	H	Benzofuran	C ₁₃ H ₁₈ O ₅ S
Etoprofós	I/N	Organofosforado	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂
Ettoxissulfurom	H	Sulfoniluréia	C ₁₅ H ₁₈ N ₄ O ₇ S

Etrinfós	A/I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ OPS
Fenamidona	F	Imidazolinone	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS
Fenamifós	N	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS
Fenamifós sulfona (metabolite)	N	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₂ NO ₅ PS
Fenamifós sulfóxido (metabolite)	N	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₂ NO ₄ PS
Fenarimol	F	Pirimidina	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O
Fenexamida	F	Hidroxianilida	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂
Fenpropimorfe	F	Morfoline	C ₂₀ H ₃₃ NO
Fentiona	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂
Fentiona sulfóxido (metabolite)	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₅ O ₄ PS ₂
Fipronil	I	Pirazol	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS
Fipronil sulfona	I	Pirazol	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ O ₂ S
Fluasifope-p-butílico	H	Ariloxifenoxipropionato	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄
Fludioxonil	F	Fenilpirrol	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂
Flumetrina	I	Piretroide	C ₂₈ H ₂₂ Cl ₂ FNO ₃
Fluquinconazol	F	Triazol	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O
Fluroxipir	H	Auxin	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃
Flutriafol	F	Triazol	C ₁₆ H ₁₃ F ₂ N ₃ O
Foransulfurom	H	Sulfonluréia	C ₁₇ H ₂₀ N ₆ O ₇ S.
Furatiocarbe	I	Carbamato	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₅ S
Hexaconazol	F	Triazol	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O
Hexitiazoxi	A	Tiazolidinecarboxamida	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₂ O ₂ S
Imazalil	F	Imidazol	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O
Imidacloprido	I	Neonicotinóide	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Indoxacarbe	I	Oxadiazina	C ₂₂ H ₁₇ ClF ₃ N ₃ O ₇
Iprodiona	F	Carboxamida	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃
Iprovalicarbe	F	Carbamato	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃
Isoproturon	H	Uréia	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O
Isoxaflutole	H	Ciclopropilisoxazol	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄ S.
Kresoxim-metil	F	Strobilurin	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄
Linuron	H	Uréia	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂
Malationa	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Metalaxil	F	Benzenoide	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄
Metazaclor	H	Cloroacetanilida	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O
Meticonazol	F	Triazol	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O
Metamidofós	I	Organofosforado	C ₂ H ₈ NO ₂ PS
Metidationa	I	Organofosforado	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃
Metidationa OA	I	Organofosforado	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃
Metomil	I	Carbamato	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S
Metissulfutom-metil (metabolite)	H	Sulfoniluréia	C ₁₄ H ₁₅ N ₅ O ₆ S
Mevinfós	A/I	Organofosforado	C ₇ H ₁₃ O ₆ P
Monocrotofós	I	Organofosforado	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P
Monolinuron	H	Uréia	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂
Miclobutanil	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄
Ometoato	I	Organofosforado	C ₅ H ₁₂ NO ₄ PS
Oxamil	I	Carbamato	C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
Oxassulfuron	H	Sulfoniluréia	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₆ S
Oxifluorfem	H	Nitropfenil ester	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ NO ₄

Paraoxon	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P
Parationa etílica	A/I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS
Penconazol	F	Triazol	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃
Pencicuron	F	Feniluréia	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O
Pendimetalina	H	Dinitroanilina	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄
Phentoato	A/I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂
Phorato	A/I/N	Organofosforado	C ₇ H ₁₇ O ₂ PS ₃
Phorato sulfóxido (metabolite)	A/I/N	Organofosforado	C ₇ H ₁₇ O ₃ PS ₃
Phosalona	A/I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂
Phosmete	A/I	Organofosforado	C ₁₁ H ₁₂ NO ₄ PS ₂
Picolinafen	H	Anilide	C ₁₉ H ₁₂ F ₄ N ₂ O ₂
Pirimicarbe	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂
Pirimifós etil	A/I	Organofosforado	C ₁₃ H ₂₄ N ₃ O ₃ PS
Pirimifós metil	A/I	Organofosforado	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS
Procloraz	F	Imidazol	C ₁₅ H ₁₆ Cl ₃ N ₃ O ₂
Profenofós	I	Organofosforado	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS
Propargito	H	Sulfite ester	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S
Profam	H	Carbamato	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂
Propiconazol	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂
Propoxur	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃
Propizamida	H	Benzimidazol	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO
Prossulfuron	H	Sulfoniluréia	C ₁₅ H ₁₆ F ₃ N ₅ O ₄ S
Pimetrozina	I	Triazina	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O
Piraclostrobina	F	Strobilurina	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄
Pirazofós	F	Organofosforado	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS
Piridaben	I	Não classificado	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS
Piridato	H	Piridazina	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂ O ₂ S
Pirimetanol	F	Anilino pirimidina	C ₁₂ H ₁₃ N ₃
Quinalfós	A/I	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃ PS
Spiroxamine	F	Morfolina	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂
Sulfotep	I	Organofosforado	C ₈ H ₂₀ O ₅ P ₂ S ₂
Tebuconazol	F	Triazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O
Tebufozoxida	I	Dimetilbenzohidrazida	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂
TEPP (tetraetil pirofosfato)	A/I	Organofosforado	C ₈ H ₂₀ O ₇ P ₂
Tiacloprido	I	Neonicotinóide	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S
Tiametoxam	I	Neonicotinóide	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S
Tifensulfurom metil	H	Sulfoniluréia	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₆ S ₂
Tiiodicarbe	I	Carbamato	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₄ S ₃
Tiofanato-metil	F	Benzimidazol	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂
Tiabendazol	F	Benzimidazol	C ₁₀ H ₇ N ₃ S
Tolilfluanida	F	Fenilsulfamida	C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂
Triadimefon	F	Triazol	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂
Triadimenol	F	Triazol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂
Triassulfurom	H	Sulfoniluréia	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₅ S
Triazofós	I/A/N	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS
Triclorfon	I	Organofosforado	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P
Tridemorfe	F	Morfolina	C ₁₉ H ₃₉ NO
Trifloxistrobina	F	Strobilurina	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄
Triforine	F/I	Piperazina	C ₁₀ H ₁₄ Cl ₆ N ₄ O ₂

*I: Inseticida; A: Acaricida; H: Herbicida; F: Fungicida; N: Nematicida.

2.4.4 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema UFLC (Shimadzu LC20 ADXR) (Figura6) equipado com uma bomba binária (Shimadzu LC20ADXR), um amostrador automático (Shimadzu SIL20ACXR) e um forno de coluna (Shimadzu CTO20AC). As separações foram conseguidas usando uma coluna Shim-pack XR-ODSII (2,0 x 100 mm, tamanho de partícula 2,2 µm; Shimadzu). Os experimentos foram realizados usando uma coluna Synergi Fusion-RP (2,0 x 50 mm, tamanho de partícula 2,5 µm; Phenomenex). A separação cromatográfica foi efetuada com uma fase móvel que consiste em acetato de amônio (10 mmol/L) acidificado com 0,01% de ácido fórmico (fase A) e metanol (fase B), a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/minuto. O programa de eluição gradiente foi o seguinte: A (50%) : B (50%) (6 min), A (20%) : B (80%) (5 min), A (10%) : B (90%) (4 min), A (50%) : B (50%) (0,5 min), e A (50%) : B (50%) (2,5 min). O tempo total da corrida cromatográfica foi de 13 minutos. O volume de injeção da amostra foi de 5 µL, e a temperatura da coluna foi mantida a 60 °C.



Figura 6. Sistema de Cromatografia líquida (UFLC) (Shimadzu LC20 ADXR).

2.4.5 Condições de espectrometria de massa

A análise por espectrometria de massa foi realizada usando um espectrômetro de massa triplo quad 5500 (Applied Biosystems, MDS SCIEX, Ontário, Canadá) (Figura 7). O instrumento foi operado utilizando uma fonte de ionização por eletro spray (ESI) em ambos os modos de íons positivos e negativos. As definições do aparelho, aquisição de dados e processamento de dados foram controlados pelo programa de software Analyst (versão 1.5.1, Applied Biosystems). A fonte de parâmetros foi otimizada do seguinte modo: tensão de pulverização de íon, 5,5 kV para ESI (+) e 4,5 kV para ESI (-); cortina de gás, de 20 psi; gás de colisão, 8 psi; gás nebulizador e gases auxiliares, 30 psi; temperatura da fonte de íons, a 500 °C.



Figura 7. Espectrômetro de massa triplo quad 5500.

As curvas de calibração foram realizadas utilizando acetonitrila como solvente para padronizar os resultados de recuperação e simplificar o experimento. Os níveis de calibração foram do seguinte modo: 5,0, 7,5, 10,0, 25,0, 50,0, 75,0 e 100 $\mu\text{g/kg}$; esta sequência foi injetada de forma aleatória, em sextuplicata ($n=6$). Todas as soluções foram preparadas de forma independente. Para fins de quantificação e identificação simultâneos, foram utilizados dois ou três transições MRM para cada substância para evitar falsos negativos em níveis residuais de pesticidas. Os picos foram distribuídos uniformemente ao longo da janela cromatográfica e foram resolvidos de forma simétrica. Os dados cromatográficos foram analisados utilizando o programa Analyst (Versão 1.5.1, Applied Biosystems). O modelo para a curva de regressão para cada composto foi selecionado por meio da aplicação de um teste homocedasticidade. O ajuste da significância e qualidade do modelo de regressão empregados foram avaliados através do teste de falta de ajuste. O limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) para todos os pesticidas ensaiados foram de 5,0 ppb e 10,0 ppb, respectivamente.

2.4.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente usando o programa R (versão 3.0.3) (R Development Core Team, 2008) com o pacote "agricolae". As frequências de amostras positivas para resíduos de pesticidas foram comparadas pelo teste exato de Fisher. A média, mediana, desvio-padrão, erro-padrão e as concentrações da gama de pesticidas foram calculados utilizando todas as amostras analisadas, mesmo aqueles com concentrações indetectáveis. Para os compostos que não foram detectados (abaixo do LOD), a concentração utilizado para análise estatística foi metade do LOD (2,5 ppb). Para os compostos que foram detectados (acima da LOD), mas não foram quantificados (abaixo do LOD), a concentração utilizado para análise estatística foi a média do LOD e o LOQ (7,5 ppb) (LAMBERT et al., 2013). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi avaliada por meio do teste de Bartlett. As concentrações foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. O nível de significância estatística foi estabelecido como $P < 0,05$.

2.5 RESULTADOS

Um total de 19 tipos de pesticidas foi encontrado nas amostras de mel testadas. Treze compostos foram encontrados no mel de abelhas usadas para polinizar plantações de melão (Tabela 2), seis compostos foram encontrados no mel de abelhas que forrageiam em área de Caatinga (Tabela 3), e quatro compostos foram encontrados no mel de abelhas jandaíra que se alimentam em área de Caatinga (Tabela 4).

Tabela 2. Pesticidas (em ppb) detectados no mel de abelhas (*A. mellifera*) usadas para polinizar plantações de melão.

Produtos	Amostras positivas	Mínimo	Máximo	Mediana	SD
Acetamiprido	6	< LOD	32.3	2.50	8.23
Aldicarbe sulfóxido	1	< LOD	32.8	2.50	6.32
Carbaril	23	41.9	418.9	114.1	87.5
Carbofurano	3	< LOD	>LOD, <LOQ	2.50	1.72
Clorpirifós	23	14.3	32.4	20.4	6.01
Etiona	1	< LOD	13.3	2.50	2.24
Fosalona	1	< LOD	>LOD, <LOQ	2.50	1.04
Furatiocarbe	19	< LOD	>LOD, <LOQ	7.50	1.94
Imidacloprido	7	< LOD	106.0	2.50	38.8
Paraoxon	21	< LOD	59.6	7.50	17.0
Parationa-etílica	23	118.4	2912.1	645.0	914.3
Sulfotep	5	< LOD	11.1	2.50	2.95
Tiametoxam	8	< LOD	19.1	2.50	5.44

* Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ), Desvio padrão (SD).

Tabela 3. Pesticidas (em ppb) detectados no mel de abelhas (*A. mellifera*) que forrageiam na floresta (*caatinga*).

Produtos	Amostras positivas	Mínimo	Máximo	Mediana	SD
Azoxistrobina	6	< LOD	60.0	2.50	13.5
Bifentrina	5	< LOD	>LOD, <LOQ	2.50	2.22
Dimetoato	4	< LOD	11.0	2.50	2.76
Iprodiona	2	< LOD	>LOD, <LOQ	2.50	1.54
Miclobutanil	4	< LOD	27.0	2.50	6.42
Tiofanato-metílico	8	< LOD	33.0	2.50	11.4

* Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ), Desvio padrão (SD).

Tabela 4. Pesticidas (em ppb) detectados no mel de abelhas sem ferrão (*M. subnitida*) que forrageiam na floresta (*caatinga*).

Produtos	Amostras positivas	Mínimo	Máximo	Mediana	SD
Bifentrina	1	< LOD	>LOD, <LOQ	2.50	1.58
Dimetoato	3	< LOD	14.0	2.50	3.89
Iprodione	1	< LOD	10.0	2.50	2.37
Miclobutanil	2	< LOD	>LOD, <LOQ	2.50	2.11

* Limite de detecção (LOD), Limite de quantificação (LOQ), Desvio padrão (SD).

O número de pesticidas detectados nas amostras de mel foi maior ($P < 0,0001$) para as abelhas (*A.mellifera*) que polinizam as culturas de melão do que para as abelhas (*A.mellifera*) e as abelhas jandaíra que se alimentam na floresta. O número de amostras positivas para cada pesticida está apresentado na Tabela 5. O mel de abelhas polinizadoras do melão apresentou maior frequência de amostras positivas para acetamiprido, carbaril, clorpirifós, furatiocarbe, imidacloprido, paraoxon, paration-etil, sulfotep e tiametoxam. O mel de abelhas que forrageiam na floresta apresentou maiores frequências de amostras positivas de azoxistrobina, bifentrina, miclobutanil e tiofanato-metila. O dimetoato mostrou frequências mais altas em mel de abelhas (*A.mellifera*) e abelhas jandaíra que forrageiam na floresta do que as abelhas polinizadoras de plantações de melão.

As concentrações de pesticidas detectados nas amostras de mel são apresentadas na Tabela 6. O mel das abelhas usadas para polinizar plantações de melão apresentou as maiores ($P < 0,05$) concentrações de carbaril, clorpirifós, imidacloprido, paraoxon, paration-etil, fosadona, sulfotep e tiametoxam. A concentração de tiofanato-metil foi maior ($P < 0,05$) no mel de abelhas que se alimentam na floresta. A concentração de dimetoato em mel de abelhas jandaíra foi maior do que o mel de abelhas que polinizam as culturas de melão, mas não foi significativamente diferente do mel de abelhas que se alimentam na floresta.

Tabela 5. Número de amostras com pesticidas detectados no mel de abelhas (*A. mellifera*) polinizando lavouras de melão ou de forrageamento na floresta (*caatinga*) e de abelhas sem ferrão (*M. subnitida*) que forrageam na floresta.

Produtos	Melão (n=23)	Floresta (n=20)	<i>M. subnitida</i> (n=10)	<i>P</i> ¹
Acetamiprido	6 (26.1%)	0	0	0.0148
Aldicarbe sulfóxido	1 (4.3%)	0	0	n.s.
Azoxistrobina	0	6 (30%)	0	0.0022
Bifentrina	0	5 (25%)	1 (10%)	0.0243
Carbaril	23 (100%)	0	0	<0.0001
Carbofurano	3 (13.0%)	0	0	n.s.
Clorprifós	23 (100%)	0	0	<0.0001
Dimetoato	0	4 (20%)	3 (30%)	0.0139
Etiona	1 (4.3%)	0	0	n.s.
Fosalona	1 (4.3%)	0	0	n.s.
Furatiocarbe	19 (82.6%)	0	0	<0.0001
Imidacloprido	7 (30.4%)	0	0	0.0052
Iprodiona	0	2 (10%)	1 (10%)	n.s.
Miclobutanil	0	4 (20%)	2 (20%)	0.0463
Paraoxon	21 (91.3%)	0	0	<0.0001
Parationa-etílica	23 (100%)	0	0	<0.0001
Sulfotep	5 (21.7%)	0	0	0.0389
Tiametoxam	8 (34.8%)	0	0	0.0017
Tiopanato-metúico	0	8 (40%)	0	0.0004

¹ Fisher test
n.s.: *P* > 0.05

Tabela 6. As concentrações de pesticidas detectados (em ppb) em mel de abelhas (*A. mellifera*) polinizando lavouras de melão ou de forrageamento na floresta (*caatinga*) e de abelhas sem ferrão (*M. subnitida*) forrageamento na floresta. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM

Produtos	Melão (n=23)	Floresta (n=20)	<i>M. subnitida</i> (n=10)	<i>P</i> ¹
Acetamiprido	5.87 $\pm$ 1.72	2.50 $\pm$ 0	2.50 $\pm$ 0	0.0134
Aldicarbe sulfóxido	3.82 $\pm$ 1.32	2.50 $\pm$ 0	2.50 $\pm$ 0	n.s.
Azoxistrobina	2.50 $\pm$ 0	8.32 $\pm$ 3.03	2.50 $\pm$ 0	0.0043
Bifentrina	2.50 $\pm$ 0	3.75 $\pm$ 0.50	3.00 $\pm$ 0.50	0.0377
Carbaril	139.1 $\pm$ 18.3 ^a	2.50 $\pm$ 0 ^b	2.50 $\pm$ 0 ^b	<0.0001
Carbofurano	3.15 $\pm$ 0.36	2.50 $\pm$ 0	2.50 $\pm$ 0	n.s.
Clorpirifós	21.8 $\pm$ 1.25 ^a	2.50 $\pm$ 0 ^b	2.50 $\pm$ 0 ^b	<0.0001
Dimetoato	2.50 $\pm$ 0 ^a	3.80 $\pm$ 0.62 ^{a,b}	4.65 $\pm$ 1.23 ^b	0.0368
Etiona	2.97 $\pm$ 0.47	2.50 $\pm$ 0	2.50 $\pm$ 0	n.s.
Furatiocarbe	6.63 $\pm$ 0.40 ^a	2.50 $\pm$ 0 ^b	2.50 $\pm$ 0 ^b	<0.0001
Imidacloprido	26.8 $\pm$ 8.10 ^a	2.50 $\pm$ 0 ^b	2.50 $\pm$ 0 ^b	0.0059
Iprodiona	2.50 $\pm$ 0	3.00 $\pm$.34	3.25 $\pm$ 0.75	n.s.
Miclobutanil	2.50 $\pm$ 0	5.12 $\pm$ 1.44	3.50 $\pm$ 0.67	n.s.
Paraoxon	18.5 $\pm$ 3.55 ^a	2.50 $\pm$ 0 ^b	2.50 $\pm$ 0 ^b	<0.0001
Parationa-etílica	880.0 $\pm$ 190.7 ^a	2.50 $\pm$ 0 ^b	2.50 $\pm$ 0 ^b	<0.0001
Phosalona	2.72 $\pm$ 0.22	2.50 $\pm$ 0	2.50 $\pm$ 0	n.s.
Sulfotep	3.98 $\pm$ 0.62 ^a	2.50 $\pm$ 0 ^b	2.50 $\pm$ 0 ^b	0.0295
Tiametoxam	6.04 $\pm$ 1.3 ^a	2.50 $\pm$ 0 ^b	2.50 $\pm$ 0 ^b	0.0025
Tiofanato-metil	2.50 $\pm$ 0 ^a	10.2 $\pm$ 2.56 ^b	2.500 ^a	0.0005

¹Kruskal-Wallis test

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os valores (Student-Newman-Keuls test) n.s.: *P* > 0.05

2.6 DISCUSSÃO

Nas amostras de mel de abelhas que forrageiam nas plantações de melão foram detectados treze tipos de pesticidas diferentes. Estas amostras foram coletadas em Mossoró e Baraúna, municípios integrantes de uma área conhecida como Zona Homogênea Mossoroense. Esta área concentra grande produção de melão e passou a ser conhecida como uma das áreas de modernização intensa na região Nordeste (TORRES e MOUTINHO, 2002). Contudo, o uso intensivo de agrotóxicos é realizado com frequência pelos produtores de melão daquelas regiões, com aplicações realizadas ao longo do ciclo e associando diversos princípios ativos, numa espécie de coquetel de agrotóxicos, formados principalmente por inseticidas e fungicidas (OLIVEIRA, 2008).

Apesar do uso intensivo de agrotóxicos, a polinização por abelhas nas plantações de melão é prática bastante comum entre os produtores. Isto se deve a eficiente atividade polinizadora da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) na cultura do melão, assegurando altos índices de produtividade (SOUSA et al., 2009). No entanto, tal manejo, representa um risco de exposição a agrotóxico para as abelhas polinizadoras, principalmente quando a cultura alvo é a única em pleno florescimento na área tratada, como ocorre no período de escassez de chuvas, época que ocorre o cultivo do melão. Deste modo, a ausência de diversidade de pólen e néctar aumenta a atratividade das abelhas pela cultura e pode agravar o efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas e contribuir para o declínio desses polinizadores nessas áreas (SOUSA, 2003).

Dos 19 compostos encontrados nas amostras de mel em nosso estudo, sete (clorpirifós, dimetoato, etiona, paraoxona, parationa, fosalone e sulfotep) pertencem ao grupo químico organofosforado, e quatro (aldicarbe, carbaril, carbofurano e furatiocarbe) são carbamatos. Todos estes compostos foram encontrados no mel de abelhas que polinizam as culturas de melão. Ambos os grupos inseticidas

organofosforados e carbamatos são conhecidos por inibir a acetilcolinesterase, enzima que hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina (SULTATOS, 2005). As abelhas são conhecidas por serem muito sensíveis, mesmo a uma única exposição aos inseticidas carbamatos (AKCA et al., 2009; HARDSTONE e SCOTT, 2010) e organofosforados (ABROL e ANDOTRA, 2003; HARDSTONE e SCOTT, 2010), o que resulta em alta mortalidade em até 24 horas após a exposição.

De fato, as doses letais para 50%(DL50) para exposição tópica de dimetoato, clorpirifós e carbaril em abelhas foram determinados como 22,4 , 35,4 e 42,8 ng por abelha (ABROL e ANDOTRA, 2003), o que corresponde a aproximadamente a 862, 1.362 e 1.646 ppb em alimentos, respectivamente. Estes valores são maiores do que as concentrações encontradas nas amostras de mel durante o estudo; assim, o mel não pode promover a intoxicação aguda em abelhas. No entanto, doses sub-letais podem provocar mudanças comportamentais em abelhas. Por exemplo, a frequência de visitas a um alimentador de abelhas aumentou quando tratadas topicamente com 50 ng de parationa por abelha, mas na dose de 10 ng por abelha, a frequência inicialmente diminuiu e depois aumentou (GUEZ et al., 2005). Assim, os níveis residuais de alguns inseticidas organofosforados e carbamatos podem afetar o comportamento alimentar de abelhas usadas para polinizar melão.

Os inseticidas neonicotinóides imidacloprido, acetamiprido e tiametoxam foram encontrados no mel das abelhas que polinizaram culturas de melão. A aplicação de inseticidas neonicotinóides às plantas é conhecida por gerar concentrações residuais dos pesticida no néctar e pólen das flores, mesmo quando é utilizado apenas para o tratamento de sementes (SCHMUCK et al., 2001; BONMATIN et al., 2003; RORTAIS et al., 2005). Além disso, as gotas de gutação dos meloeiros tratados com imidacloprido podem conter elevadas concentrações deste composto (até 37 µg/ml) (HOFFMANN e

CASTLE, 2012). Os inseticidas neonicotinóides atuam como agonistas do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) de uma maneira semelhante à nicotina, mas com muito mais potência e seletividade para os receptores de insetos do que em mamíferos (TOMIZAWA e CASIDA, 2008).

A DL50 da exposição oral aguda para imidacloprido em abelhas foi estimada em 3,7 a 40,9 ng/abelha, ou 0,14 a 1,57 ppm no alimento (SCHMUCK et al., 2001), e a LD50 da exposição oral aguda de tiametoxam em abelhas foi estimada em 5,0 ng/abelha (GODFRAY et al., 2014). Contudo, as abelhas são muito mais sensíveis à exposição crônica ao imidacloprido. Taxas de sobrevivência reduzidas foram observadas em abelhas que ingeriram uma dose cumulativa de 0,01 ng/abelha por 8 dias (SUCHAIL et al., 2001).

O imidacloprido pode reduzir a resistência das abelhas a patógenos (ALAUX et al., 2010; PETTIS et al., 2012). Doses tão baixas quanto 5 ppb administradas para as abelhas misturadas ao xarope de sacarose aumentaram o número de esporos por abelha do patógeno intestinal *Nosema* (PETTIS et al., 2012). Além dos efeitos imunossupressores, imidacloprido também promove distúrbios comportamentais. As abelhas que ingeriram 50 ppb de imidacloprido na sua alimentação voaram menores distâncias e passaram mais tempo perto das fontes de alimento (TEETERS et al., 2012). Além disso, este composto reduziu a memória olfativa de abelhas, na dose de 12 ng por abelha (DECOURTYE et al., 2004, 2005). Em outro estudo, abelhas *Apis cerana* alimentadas com néctar com 34 ppb de imidacloprido apresentaram redução da evasão a inseto predador, e aqueles alimentados com 17 ppb ou 34 ppb coletaram um volume menor de néctar (TAN et al., 2014). Como o mel das abelhas usadas para polinizar melão apresentaram até 106,0 ppb de imidacloprido, essas abelhas podem apresentar mudanças de comportamento de forrageamento e imunossupressão. Além disso, o

imidacloprido residual pode persistir no mel contaminado por vários meses, aumentando ainda mais o risco para estas abelhas (RORTAIS et al., 2005).

Em nosso estudo, o piretróide bifentrina foi encontrado no mel de abelhas *A. mellifera* e abelhas jandaíra que se alimentaram na floresta. Os piretróides, incluindo bifentrina, são conhecidos por diminuir a excitabilidade neuronal de neurônios no cérebro das abelhas, diminuindo as correntes de sódio (ZHOU et al., 2011). As abelhas são muito sensíveis à bifentrina, e a exposição pode ser letal (QUALLS et al., 2010). Além disso, foi relatado que a bifentrina afeta negativamente as abelhas, reduzindo a fecundidade e o crescimento, prolongando as fases imaturas de vida (DAI et al., 2010). Em nosso estudo, a concentração de bifentrina no mel foi muito baixa (inferior a 5 ppb); no entanto, a sua presença no mel é indicativo de contaminação do meio ambiente após o uso inadequado como inseticida.

Quatro dos compostos detectados no mel de abelhas que se alimentavam na floresta atuam como fungicidas: azoxistrobina (estrobilurina), iprodiona (carboxamida), miclobutanil (triazol) e tiofanato (benzimidazol). A iprodiona foi descrita como não tóxico para as abelhas *A. mellifera* e *Osmia lignaria* (uma espécie de abelha solitária) após contato direto e exposição oral (LADURNER et al., 2005), mas as sensibilidades das abelhas para a azoxistrobina, o miclobutanil e o tiofanato são atualmente desconhecidas. No entanto, os fungicidas podem afetar abelhas indiretamente através da redução das populações de fungos que são benéficos para as abelhas. Estes fungos convertem o pólen armazenado por fermentação em alimento para larvas, conhecidas como pão da abelha (YODER et al., 2013).

A concentração de carbaril, clorpirifos e parationa-etílica em algumas amostras de mel que polinizavam as plantações de melão, em nosso estudo, foram 139,1, 21,8 e 880,0 ppb respectivamente. Estes valores são maiores que o limite máximo de resíduo

(20 ppb), estabelecido no Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes que este alimento pode ter, sem prejudicar a integridade orgânica de seres humano e animais (BRASIL, 2014). Isto implica em consequência negativa para comercialização, pois existe uma tendência de que a exportação do mel seja comprometida em função as restrições impostas pelo mercado externo, sobretudo o europeu, que tem apresentado um controle muito rígido frente a contaminantes (SILVA, 2007).

Além disso, uma exposição prolongada a doses relativamente baixas de um ou mais agrotóxicos, pode ser considerado como uma condição potencialmente associada à etiologia do câncer, por sua possível atuação na alteração do DNA de uma célula e/ou estimulando a célula alterada a se dividir (WÜNSCH-FILHO e KOIFMAN, 2003). Pode-se destacar alguns estudos no Brasil relacionados a distúrbios reprodutivos (GIBSON e KOIFMAN, 2008), a alterações psiquiátricas (PIRES et al., 2005), a efeitos neurotóxicos/teratogênicos (MEYER, et al., 2004) e ao câncer (CHRISMAN et al., 2009). Isto tem determinado uma tendência irreversível de consumir produtos cada vez menos contaminados com princípios ativos de agrotóxicos.

Neste sentido, a determinação de resíduos de agrotóxicos adquiriu um maior nível de importância por estarem diretamente ligados aos riscos à saúde humana (BRASIL, 2014). Assim, a presença de resíduos no mel analisado além de revelar o controle de qualidade do mesmo para o consumo humano, também serviu como indicador de possível poluição ambiental nas proximidades das áreas de intensa produção de melão, onde se localizavam os apiários. O potencial do mel como bioindicador foi demonstrado com *Apis mellifera* L. em reserva ecológica a 3km de uma extensa área de horticultura (RISSATO et al., 2006).

2.7 CONCLUSÕES

As amostras de mel do presente estudo apresentaram 19 pesticidas diferentes, 13 dos quais estavam presentes no mel das abelhas que polinizavam culturas de melão. Os níveis de alguns compostos eram suficientemente elevados para provocar efeitos adversos nas abelhas. Assim, a polinização das culturas pode oferecer um grande risco de toxicidade para as abelhas e poderia contribuir para colapso das colônias.

A determinação de resíduo de pesticidas no mel de abelhas criadas na região do estudo deve ser realizada por representar um excelente indicador da poluição ambiental e estar diretamente ligada à saúde humana, à saúde das abelhas e à comercialização do mel.

2.8 REFERÊNCIAS

- ABROL, D. P.; ANDOTRA, R.S. Relative toxicity of some insecticides to *Apis mellifera* L. ***Journal of Asia-Pacific Entomology***, v.6, p. 235-237, 2003.
- AKCA, I.; TUNCER, C.; GULER, A.; SARUHAN, I. Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae). ***Journal of Animal and Veterinary Advances***, v.8, p. 436-440, 2009
- ALAUX, C.; BRUNET, J. L.; DUSSAUBAT, C. Interactions between *Nosema microspores* and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). ***Environmental Microbiology***, v. 12, p. 774-782, 2010.
- AUFAUVRE. J.; BIRON, D.G.; VIDAU, C. et al. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. ***Scientific Reports***, v.2, p. 326, 2012.
- BONMATIN, J. M.; MOINEAU, I.; CHARVET, R.; FLECHE, C.; COLIN, M. E.; BENGSCHE, E. R. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. ***Analytical Chemistry***, v.75, p. 2027-2033, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. ***Instrução Normativa nº 11***. Diário Oficial da União, seção 1, p.9-10, 07 de maio de 2014.
- CHRISMAN J de R, KOIFMAN S, SARCINELLI P.N, MOREIRA J.C, KOIFMAN R.J, MEYER A. Pesticide sales and adult male cancer mortality in Brazil. ***Int J Hyg Environ Health***. May; v.212, p. 310-321, 2009.
- DAI, P-L.; WANG, Q.; SUN, J-H.; LIU, F.; WANG, X.; WU, Y-Y.; ZHOU, T. Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee *Apis mellifera ligustica*. ***Environmental Toxicology and Chemistry***, v. 29, p. 644–649, 2010.

DECOURTYE, A.; ARMENGAUD, C.; RENOU, M.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, S.; GAUTHIER, M.; PHAM-DELÈGUE, M-H. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, v. 78, p. 83–92, 2004.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; MENACH, K. L.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. ***Archives of Environmental Contamination and Toxicology***, v. 48, p. 242–250, 2005.

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

DI PRISCO, G.; CAVALIERE, V.; ANNOSCIA, D. et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 110, p. 18466–18471, 2013

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

GIBSON, G.; KOIFMAN, S. Consumo de agrotóxicos e distribuição temporal da proporção de nascimentos masculinos no estado do Paraná, Brasil. ***Revista Panameña de Salud Pública***, v. 24, p. 240-247, 2008.

GODFRAY, H. C. J.; BLACQUIÈRE, T.; FIELD, L. M.; HAILS, R. S.; PETROKOFKY, G.; POTTS, S. G.; RAINE, N. E.; VANBERGEN, A.J.; MCLEAN, A. R. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. ***Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences***, v. 281, artigo 20140558, 2014.

GUEZ, D.; ZHANG, S-W.; SRINIVASAN, M. Methyl parathion modifies foraging behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology*, v. 14, p. 431–437, 2005.

HARDSTONE, M. C.; SCOTT, J. G. Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Management Science*, v. 66, p. 1171–1180, 2010.

HOFFMANN, E. J.; CASTLE, S. J. Imidacloprid in melon guttation fluid: a potential mode of exposure for pest and beneficial organisms. *Journal of Economic Entomology*, v. 105, p. 67-71, 2012.

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

LADURNER, E.; BOSCH, J.; KEMP, W. P.; MAINI, S. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. *Apidologie*, v. 36, p. 449-460, 2005.

LAMBERT, O.; PIROUX, M.; PUYO, S. et al. Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France. *PLoS One*, v. 8, e67007, 2013.

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

MAIA-SILVA, C. **Adaptações comportamentais de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) às condições ambientais do semiárido brasileiro.** Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MEYER, A.; SEIDLER, F. J.; ALDRIDGE, J. E.; TATE, C. A.; COUSINS, M. M.; SLOTKIN, T. A. Critical periods for chlorpyrifos-induced developmental neurotoxicity: alterations in adenylyl cyclase signaling in adult rat brain regions after gestational or neonatal exposure. *Environmental Health Perspectives*, v.112, p. 295-301, 2004.

NAKASU, E. Y. T, WILLIAMSON, S. M.; EDWARDS, M. G.; FITCHES, E. C.; GATEHOUSE, J. A.; WRIGHT, G. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Novel biopesticide based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. ***Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences***, v. 281, 20140619, 2014.

OLIVEIRA A. M. **Aspectos Técnicos e Ambientais da Produção de Melão na Zona Homogênea Mossoroense, Com Ênfase ao Controle da Mosca-Branca e da Mosca-Minadora**. Dissertação. Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA. 2008.

PETTIS, J.; VANENGELSDORP, D.; JOHNSON, J.; DVELY, G. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. ***Naturwissenschaften***, v.99, p. 153–158, 2012.

PIRES, D.; CALDAS, E.; RECENA, M. C. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. ***Cadernos de Saúde Pública***, v. 21, p.598-605, 2005.

PITTELLA, C.M. **Determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas (*Apis* sp) por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas**. PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, 2009.

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

QUALLS, W.A.; XUE, R-D.; ZHONG, H. Impact of bifenthrin on honeybees and *Culex quinquefasciatus*. ***Journal of the American Mosquito Control Association***, v.26, p. 223–225, 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM.**R: A language and environment for statistical computing**.2008.

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

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M-P.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees . *Apidologie*, v. 36, p. 71-83, 2005.

SILVA, R. A. (Ed.). Boletim Técnico. **Dicas & Notícias & Informações apícolas**. Ano I. n. 18. Fevereiro, 2007.

SOUSA, R. M. **Polinização do meloeiro (Cucumis melo L.) por abelhas melíferas (Apis mellifera L.): requerimentos da cultura e manejo das colônias**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. 119p, 2003.

SOUSA, R. M., AGUIAR, O. DE S., FREITAS, B. M., SILVEIRA NETO, A. A. DA., PEREIRA, T. f. C. Requerimentos de polinização do meloeiro (Cucumis melo L.) no município de Acaraú – CE - Brasil. *Caatinga*, v.22, n.1, p.238-242, 2009.

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

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, p. 2482–2486, 2001.

SULTATOS, L. G. Interactions of organophosphorus and carbamate compounds with cholinesterases. In: *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds* (ed Gupta RC), p. 209–218. **Academic Press**, Burlington, 2005.

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

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

THOMPSON, H. M. Risk assessment for honey bees and pesticides — recent developments and “new issues.” *Pest Management Science*, v.66, p. 1157–1162, 2010.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death. *Accounts of Chemical Research*, v.42, p. 260–269, 2008.

TORRES, A.C.B.A.; MOUTINHO, L.M.G. **A caracterização do cluster de melão de Mossoró-Baraúna-RN.** João Pessoa-PB: UFPB, Série texto para discussão. 2002, 20p.

VILLA, S.; VIGHI, M.; FINIZIO, A.; BOLCHI SERINI, G. Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology*, v.9, p. 287–297, 2000.

WU, J. Y.; SMART, M. D.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 109, p. 326–329, 2012

WÜNSCH-FILHO, V.; KOIFMAN, S. Tumores malignos Relacionados com o trabalho. In: MENDES, R. **Patologia do Trabalho.** São Paulo: Atheneu, 2003.

YODER, J. A.; JAJACK, A. J.; ROSSELOT, A. E.; SMITH, T. J.; YERKE, M. C.; SAMMATARO, D. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v.76, p. 587–600, 2013.

ZHOU, T.; ZHOU, W.; WANG, Q.; DAI, P-L.; LIU, F.; ZHANG, Y-L.; SUN, J-H. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 100, p. 35–40, 2011.