

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ASSOCIADOS DOS INSETICIDAS FIPRONIL E
IMIDACLOPRIDO SOBRE A MORTALIDADE DA ABELHA NATIVA**
Melipona scutellaris (LATREILLE, 1811)

LETICIA MARIANO DA COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente do Campus de Araras, Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Araras
2015

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ASSOCIADOS DOS INSETICIDAS FIPRONIL E
IMIDACLOPRIDO SOBRE A MORTALIDADE DA ABELHA NATIVA
Melipona scutellaris (LATREILLE, 1811)**

LETICIA MARIANO DA COSTA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ROBERTA CORNÉLIO FERREIRA NOCELLI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Agricultura e Ambiente do
Campus de Araras, Universidade Federal de
São Carlos, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Agricultura e
Ambiente.

Araras
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C837a Costa, Leticia Mariano da
Avaliação dos efeitos associados dos inseticidas
fipronil e imidacloprido sobre a mortalidade da
abelha nativa *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811)
/ Leticia Mariano da Costa. -- São Carlos : UFSCar,
2015.
72 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. Polinizadores. 2. Neonicotinóide. 3.
Fenilpirazol. 4. Associação. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Leticia Mariano da Costa, realizada em 22/05/2015:

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
UFSCar

Prof. Dr. Osmar Malaspina
Unesp

Prof. Dr. Andriago Monroe Pereira
EUROFINS

A meus pais, Wilma e Waldemar, meus maiores exemplos de união, respeito e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus;

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pela lição de otimismo e determinação;

À minha irmã, Larissa, pela amizade e generosidade, pelo companheirismo em todos os momentos;

À Profa. Dra. Roberta, pela disposição em me orientar, por todo apoio e pelos conselhos sempre úteis quando eu estava em dúvida de qual caminho seguir;

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pelo auxílio durante toda minha pesquisa;

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo e pelo suporte financeiro à pesquisa realizada;

A todos do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), principalmente Tatiane e Rodrigo, por todo auxílio, disponibilidade e amizade;

Às minhas avós (*in memoriam*), que me deixaram dois grandes exemplos de mulheres fortes e dedicadas, e pelo carinho e bondade imensuráveis;

Aos meus avôs, exemplos de caráter, trabalho e dedicação à família;

Aos meus familiares, pelo apoio e por todos os momentos especiais que pudemos compartilhar;

À Ritinha (*in memoriam*), minha babá e primeira professora, que me incentivou no gosto pelo aprendizado;

Aos meus amigos de infância (Thamires, Renata, Cecília e Estevão), de graduação (em especial Jéssica e Luciana), de pós-graduação (em especial Carina) e de república (em especial Patrícia, Paula, Jéssica, Camila, Cristiane, Bruna, Márcia e Nathália) por compartilharem comigo tantos momentos alegres, de trabalho e esforço, dos quais jamais me esquecerei e levarei a amizade por toda vida;

Aos professores do Centro de Ciências Agrárias que contribuíram para que eu tivesse uma formação de qualidade;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com esse trabalho.

*“No mesmo instante em que recebemos pedras
em nosso caminho, flores estão sendo
plantadas mais longe. Quem desiste não as
vê.”*

William Shakespeare

Resumo Geral

As abelhas são insetos sociais de fundamental importância ao meio ambiente já que são responsáveis pela polinização de mais de 70% das culturas agrícolas existentes no mundo. O Brasil é o país com maior número de espécies descritas, com representantes da maioria das famílias. Entre os representantes da família Apidae, está a espécie *Melipona scutellaris*, conhecida popularmente como “uruçu” ou “uruçu do nordeste”, abelha de fácil manejo e muito bem adaptada ao clima do estado de São Paulo. Porém, devido à intensa utilização de agrotóxicos, as abelhas nativas vêm sofrendo as consequências, já que, embora não sejam o alvo de inseticidas, são altamente vulneráveis à contaminação. Entre os inseticidas desenvolvidos na década de 90, o fipronil e os neonicotinóides têm sido apontados como as principais substâncias envolvidas nos colapsos, tendo sido suspensos em 2013 na União Europeia por dois anos para melhor avaliação. Esses inseticidas muitas vezes são utilizados simultaneamente, e por isso as abelhas podem ser expostas a ambas as moléculas. Devido a tal fato, o objetivo desse trabalho foi estabelecer o tempo letal médio (TL₅₀) dos inseticidas fipronil e imidacloprido de forma isolada e de forma combinada sobre as abelhas forrageiras de *M. scutellaris*. Para isso, obteve-se a DL₅₀ e CL₅₀ apenas do imidacloprido, conforme as normas da OECD, já que para o fipronil esses valores foram estabelecidos por Lourenço et al. (2012a, 2012b). A DL₅₀ do imidacloprido obtida foi 2,41 ng i.a./abelha, para 24 horas e 1,29 ng i.a./abelha, para 48 horas. O valor de CL₅₀ desta mesma substância encontrado foi 2,01 ng i.a./μL dieta, para 24 horas e 0,81 ng i.a./μL dieta, para 48 horas. Esses dados indicam que a espécie *M. scutellaris* é mais sensível ao inseticida imidacloprido que *A. mellifera* africanizada. A partir desses valores, obtivemos a TL₅₀ baseada na contaminação tópica e oral dos inseticidas fipronil e imidacloprido e também dessas substâncias agindo juntas. Os resultados apresentaram que o fipronil possui TL₅₀ maior que o imidacloprido. Quando agiram de forma combinada a TL₅₀ apresentou valores intermediários entre a TL₅₀ do fipronil e do imidacloprido, isolados. Então, de acordo com os valores obtidos, não ocorreu sinergismo e sim uma diminuição da toxicidade apresentada pelo imidacloprido.

Palavras-chave: polinizadores, neonicotinóide, fenilpirazol, associação.

General Abstract

Bees are social insects of fundamental importance to the environment, because they are responsible for pollinating more than 70% of existing agricultural crops in the world. Brazil is the country with the highest number of described species, with representatives of most families. Among representatives of the Apidae family, is the *Melipona scutellaris* specie, commonly known as "uruçu" or "uruçu do Nordeste", it is easy to handling and very well adapted to the climate of the state of São Paulo. However, due to the intensive use of pesticides, native bees are suffering the consequences, because, although they are not the target of insecticides, are highly vulnerable to contamination. Among the insecticides developed in the 90s, the neonicotinoids and fipronil have been identified as the main substances involved in collapse, and were suspended in 2013 in the European Union for two years for best evaluation. These insecticides are often used simultaneously, so bees can be contaminated with both molecules. Due to this fact, the aim of this study was determine the median lethal time (LT₅₀) of fipronil and imidacloprid insecticides separately and synergistically on forage bees of *M. scutellaris*. For this, was obtained only the LD₅₀ and LC₅₀ of imidacloprid, according to the rules of the OECD, because values of fipronil were established by Lourenço et al. (2012a, 2012b). The LD₅₀ of imidacloprid obtained was 2.41 ng a.i. / bee (24 hours) and 1.29 ng a.i./ bee (48 hours). The LC₅₀ value found was 2.01 ng a.i./µL diet (24 hours) and 0.81 ng a.i./µL diet (48 hours). These data indicate that *M. scutellaris* specie is more sensitive to the insecticide imidacloprid that *A. mellifera* africanized. From these values, was obtained the LT₅₀ based on topical and oral contamination of fipronil and imidacloprid insecticides and also these substances acting together. The results showed that fipronil has LT₅₀ greater than imidacloprid. When acted in combination to LT₅₀ presented intermediate values between the LT₅₀ fipronil and imidacloprid, isolated. Then, according to the values obtained, there was not synergy, but a decrease in the toxicity of imidacloprid.

Key-words: pollinators, neonicotinoid, phenylpyrazol, association.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. OBJETIVO GERAL	14
3. CAPÍTULO 1	15
4. CAPÍTULO 2	29
5. CAPÍTULO 3	40
7. DISCUSSÃO GERAL	63
8. CONCLUSÕES GERAIS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. Introdução Geral

As abelhas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera, assim como as vespas e as formigas. Esta ordem é muito importante para a conservação da biodiversidade, já que abriga o maior número de polinizadores (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Acredita-se que o surgimento e a proliferação das abelhas estejam relacionados com o aparecimento das angiospermas (IMPERATRIZ-FONSECA, RAMALHO e KLEINERT-GIOVANNINI, 1993). Os polinizadores fornecem um serviço essencial ao ecossistema uma vez que é primordial para a reprodução sexuada das plantas e, na sua ausência, a manutenção da variabilidade genética entre os vegetais pode diminuir drasticamente. Também beneficiam a sociedade de diversas maneiras, por exemplo, através do seu papel na produção de alimento (EARDLEY et al., 2006) e no fornecimento, por algumas espécies, de produtos como o mel.

Nos ecossistemas mundiais, estima-se que 40% dos polinizadores existentes sejam abelhas (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2012). Baseados no catálogo Moure (MOURE, URBAN e MELO, 2007), Freitas et al. (2009) estimaram que mais de 15.000 espécies de abelhas estão na região Neotropical.

A predominância das abelhas como polinizadores pode ser atribuída ao fato de que são, obrigatoriamente, dependentes de flores, já que tanto as larvas quanto os adultos se alimentam de produtos de origem floral (GORDÓN, ATLÁNTICO e ORNOSA, 2014).

As abelhas podem apresentar comportamento solitário, parassocial, subsocial e eussocial (MICHENER, 1974). Aquelas que apresentam comportamento eussocial são caracterizadas com sobreposição de gerações, existência de castas definidas e divisão do trabalho, onde o nível mais complexo é encontrado nas espécies da família Apidae (CAMPOS et al, 1987).

No Brasil, dentre as famílias existentes de abelhas, a Apidae é a mais numerosa. Nessa família destaca-se a espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811), abelha sem ferrão e eussocial, conhecida popularmente como “uruçu” ou “uruçu do nordeste” (NOGUEIRA-NETO, 1997; KERR et al, 2001; IMPERATRIZ-FONSECA e SANTOS, 2014). Esta espécie é endêmica do Nordeste brasileiro, sendo adaptada as condições ecológicas e climáticas do Estado de São Paulo (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIANA, 2014). A *M. scutellaris* é considerada bioindicador de qualidade ambiental pelo fato de que, na Mata Atlântica, é encontrada apenas em lugares onde os níveis de perturbação são baixos (RAMALHO e BATISTA, 2005). Porém, as populações dessa espécie estão sendo reduzidas, tanto em

número quanto na dimensão da área de distribuição original, devido a ações antrópicas, tais como o desmatamento, a intensificação de atividades agrícolas e também às mudanças climáticas (GIANNINI et al., 2010). Por isso, a *M. scutellaris*, e outras três espécies de abelhas nativas, além de outros animais, estão na lista de espécies ameaçadas de extinção (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - ICMBio, 2015).

As operárias de *M. scutellaris* medem entre 10 e 12 milímetros, possuem corpo robusto e cabeça de coloração marrom e preta, o vértice é marrom-amarelado com muitos pelos amarelo-ruivos e dourados (Figura 1). O clipeo é levemente convexo, o tórax é preto no dorso com densos pelos amarelo-dourados e o ventre possui uma penugem fina de cor cinza. O abdômen tem seu dorso preto com uma borda cinza-amarelada bem clara sobre o bordo posterior dos cinco segmentos (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIANA, 2014).

Figura 1 - Indivíduos da colmeia de *M. scutellaris*.



Fonte: WebBee, 2014.

Segundo Almeida (1974) as preferências florais da abelha *M. scutellaris* são por espécies nativas: *Spondias mombin* (cajá), *Andira nítida* (angilim), *Bowdichia virgiloides* (sucupira), *Hymenaea martiana* (jatobá), *Byrsonima sericea* (murici), *Tabebuia avellanadae* (pau d'arco roxo), *Tabebuia chrysotricha* (pau d'arco amarelo), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Eschweilera luschnathii* (embiriba), *Bombax gracilipes* (mumguba), *Bixa orellana* (urucum) (WEBBEE, 2014).

No Brasil, as abelhas sem ferrão são responsáveis pela polinização de 40% a 90% das espécies arbóreas, dependendo do ecossistema considerado (KERR et al., 2001). Além disso, os meliponíneos apresentam benefícios econômicos, auxiliam na reconstituição de florestas tropicais e conservação dos remanescentes, podem atuar como bioindicadoras da qualidade ambiental e são fundamentais nos processos ecossistêmicos em que estão envolvidas (IMPERATRIZ-FONSECA, CONTRERA e KLEINERT, 2004; BALLIVIÁN, 2008).

Porém, ainda existem poucos estudos sobre os efeitos dos inseticidas nas abelhas brasileiras e por isso há dificuldades em conservar esses insetos. Além disso, ocorre a diminuição das fontes de alimento e locais de nidificação devido ao desmatamento, a ocupação intensiva das terras e, principalmente, a utilização excessiva e/ou incorreta de agrotóxicos, que podem contribuir para a redução das populações (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2014).

Desde 2006 verifica-se uma acentuada queda no número de colônias manejadas de *Apis mellifera* nos Estados Unidos (NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS SERVICE - NASS, 2008). O número de colônias domesticadas na Europa caiu de 21 milhões, em 1970, para cerca de 15,5 milhões, em 2007 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 2010).

Esse declínio na população de abelhas é conhecido como Desordem do Colapso de Colônia (do inglês *Colony Collapse Disorder* - CCD). O fenômeno é caracterizado pelo desaparecimento de grande quantidade de abelhas de uma colônia, sendo que esses insetos não são encontrados mortos em locais próximos às colmeias (JOHNSON, 2010). As possíveis causas desse desaparecimento são: doenças associadas a parasitas, como o microsporídio *Nosema* spp; mudanças climáticas; formas de manejo; déficit nutricional e a utilização de agrotóxicos, podendo haver combinações entre esses fatores (JOHNSON, 2010; CASTILHO, 2012).

No Brasil, a maior preocupação é em relação aos inseticidas. Entre 2008 e 2010 foi verificada a perda de aproximadamente 5 mil colmeias de abelhas africanizadas na região central do Estado de São Paulo (MALASPINA et al., 2010).

Ainda não há dados sobre o CCD nem sobre a mortalidade relacionada à exposição aos inseticidas em relação às abelhas nativas devido a pouca quantidade de meliponários e não há sistema de monitoramento das colônias nos ambientes naturais (NOCELLI, informação pessoal).

A conservação das abelhas e também de outros polinizadores é preocupante, uma vez que são consideradas essenciais para a manutenção da biodiversidade via polinização (SANTOS, 2010). A redução drástica da diversidade de abelhas sem ferrão tende a implicar diretamente na extinção de espécies vegetais nativas importantes para o ecossistema, podendo ocasionar desequilíbrio em diversos habitats (ROUBIK, 1989).

Os agrotóxicos, tais como inseticidas sintéticos, são caracterizados como os principais responsáveis pela redução da população dos insetos polinizadores, principalmente as abelhas (POTTS et al., 2010). Isso se deve ao fato de que as abelhas, embora não sejam o alvo desses

agentes tóxicos, fazem o forrageamento nas áreas agrícolas pulverizadas, e por isso, são muito vulneráveis à contaminação (IBAMA, 2012), além de ocorrer a deriva dos agrotóxicos, ou seja, o agrotóxico é desviado para fora da área do cultivo que se pretende atingir, devido a alguns fatores como vento e método de aplicação, podendo contaminar o ambiente próximo a área pulverizada (AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ – ADAPAR, 2013).

Os inseticidas podem afetar as abelhas principalmente por três formas: contato (durante o forrageamento, com partículas de inseticidas que ficaram depositadas nas flores), ingestão (através do pólen e néctar contaminados por meio do uso de inseticidas sistêmicos, que é absorvido pelo tecido vegetal) e fumigação (partículas suspensas de inseticidas que foram aplicados na área agrícola) e, seus efeitos podem ser a longo prazo, como danos no funcionamento da colônia e diminuição da longevidade dos indivíduos, ou mesmo a morte devido à toxicidade aguda (MALASPINA et al., 2008; IBAMA, 2012).

A medida utilizada para avaliar a toxicidade de agrotóxicos e outras substâncias químicas é a dose letal média (DL_{50}) e a concentração letal média (CL_{50}) (BARBOSA, 2004). A DL_{50} representa a quantidade (dose única) da substância necessária para matar 50% dos animais testados nas condições experimentais utilizadas. A CL_{50} representa a concentração da substância necessária para matar 50% da população experimental em um determinado espaço de tempo (BARBOSA, 2004). É importante também considerar os valores abaixo da DL_{50} e CL_{50} , chamadas doses ou concentrações subletais, que não causam a morte imediata, mas causam alterações na população experimental. Como exemplo de efeitos subletais em abelhas tem-se as alterações comportamentais, de aprendizagem e de orientação que podem ter efeitos a longo prazo sobre a população (LEWIS, THOMPSON e SMAGGHE, 2007). Vários estudos (BYRNE et al., 2013; PETTIS et al., 2013; SCHOLER e KRISCHIK, 2014) demonstram que resíduos de tais substâncias químicas podem ser encontrados no pólen e néctar em doses ou concentrações subletais.

Outra forma de avaliar a toxicidade do inseticida é através do tempo letal médio (TL_{50}), que é o tempo necessário para ocasionar a mortalidade de 50% da população experimental após a aplicação ou ingestão de uma determinada dose.

Os inseticidas são administrados tópicamente ou oralmente para representar os diferentes tipos de exposição que ocorrem no campo e a mortalidade é registrada a cada 24 horas após a exposição. A toxicidade tópica ocorre devido à absorção através do tegumento da abelha. A toxicidade oral ocorre por meio da ingestão de pólen e néctar contaminados pelo inseticida,

causando alterações no trato digestório, podendo até mesmo paralisá-lo (ARMENGAUD, LAMBIN e GAUTHIER, 2002).

As abelhas também são sensíveis à exposição a diferentes grupos de produtos químicos. Isso porque esses insetos podem visitar determinada cultura que recebeu diversas aplicações seguidas umas às outras de diferentes tipos de inseticidas, os agrotóxicos podem ter sido aplicados concomitantemente, ou ainda as abelhas podem visitar mais de uma cultura que foi pulverizada por inseticidas de grupos distintos.

Muitos agrotóxicos são compostos por vários ingredientes ativos, dessa forma, é possível que ocorra diferença na toxicidade dos componentes. No entanto, há poucos estudos que avaliam os riscos da utilização dessas combinações de substâncias (THOMPSON et al., 2014).

Em alguns trabalhos os resultados obtidos entre misturas de ingredientes ativos mostram que ocorreu aumento de toxicidade (IWASA et al., 2004; JOHNSON et al., 2013). Outros apresentam poucos efeitos tóxicos (MOORES et al., 2012; MIN et al., 2014; THOMPSON et al., 2014). Dessa forma, verifica-se que nem todas as misturas de inseticidas causam efeitos sinérgicos nas abelhas, mesmo que as substâncias utilizadas isoladamente sejam muito tóxicas para esses polinizadores.

Embora em países desenvolvidos os estudos para estabelecer os efeitos dos inseticidas no comportamento das abelhas ocorram cada vez com mais frequência, no Brasil os efeitos das doses subletais e também dos inseticidas em ação conjunta têm sido pouco estudados, principalmente quando se trata de abelhas nativas. Espécies de abelhas nativas devem, portanto, ser alvo de estudos sobre o impacto de agrotóxicos, não só por causa da sua importância econômica e ecológica, mas também por serem vulneráveis a estes compostos (TOMÉ et al., 2012).

2. Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade dos inseticidas fipronil e imidacloprido para a abelha brasileira *Melipona scutellaris*.

Objetivos específicos

1- Estabelecer a dose letal média (DL₅₀) e a concentração letal média (CL₅₀) do imidacloprido para as abelhas forrageiras de *M. scutellaris*.

2- Avaliar a taxa de mortalidade em 24 horas de abelhas forrageiras *Melipona scutellaris* sob efeito de doses subletais dos inseticidas fipronil e imidacloprido de forma isolada e associada.

3- Estabelecer o tempo letal médio (TL₅₀) dos inseticidas fipronil e imidacloprido de forma isolada e associada sobre as abelhas forrageiras de *M. scutellaris*.

3. Capítulo 1

Inseticidas de última geração e seus impactos sobre as abelhas: uma revisão

L. M. da COSTA; R. C. F. NOCELLI

Resumo

As abelhas dependem das flores para sua sobrevivência e esta relação funciona nos dois sentidos: ao mesmo tempo em que as abelhas se beneficiam visitando as flores e colhendo seu alimento, as flores se beneficiam da visita, através da polinização, produzindo melhores frutos. Porém, atividades antrópicas vêm impondo mudanças ao ambiente, acarretando a redução da abundância e diversidade de abelhas. Uma dessas atividades é a utilização de agrotóxicos, que se intensificou a partir da Segunda Guerra Mundial, trazendo muitos benefícios ao setor agrícola. Porém estas moléculas matam não somente os organismos-alvo, mas também insetos benéficos ao homem, como as abelhas. Vários estudos vêm demonstrando que os inseticidas neonicotinóides e os fenilpirazóis causam efeitos adversos nas abelhas. Devido ao uso em larga escala desses inseticidas, a preocupação com o impacto sobre as abelhas vem aumentando, pois sem elas o processo de polinização pode ser prejudicado, com impactos ambientais, econômicos e sociais extremos. Dessa forma, compreender a ação desses inseticidas nas abelhas e propor manejos mais compatíveis com a conservação são importantes.

Palavras-chave: serviços ecossistêmicos, polinização, neonicotinóides, fenilpirazol.

1. Introdução

Os agroecossistemas são majoritariamente dependentes da polinização por abelhas. Esses insetos são responsáveis pela polinização de mais de 70% das culturas agrícolas existentes no mundo (FAO, 2005). As culturas que não são dependentes de polinizadores também são beneficiadas quando há polinização por abelhas, já que ocorre uma produção com melhor qualidade e menor quantidade de frutos defeituosos (KLEIN et al., 2007). A produção de frutos está na base da cadeia alimentar, sendo de fundamental importância para o equilíbrio dos ecossistemas (IMPERATRIZ-FONSECA e NUNES-SILVA, 2010).

Nos últimos 50 anos vem ocorrendo um aumento na produtividade agrícola devido a intensificação da agricultura, o uso de fertilizantes e de agrotóxicos e a irrigação. Porém, essas práticas contribuem com a diminuição da saúde humana e ambiental e também da manutenção da biodiversidade (IBAMA, 2012). O Brasil vem se destacando como sendo o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, superando inclusive os Estados Unidos. Em 2011 houve um aumento de 16,3% das vendas desses produtos no Brasil, o que corresponde a 8,5

bilhões de dólares, sendo a classe dos inseticidas a maior representante das vendas de agrotóxicos (2,94 bilhões de dólares) (FERREIRA et al., 2012).

Desde 2006 verifica-se uma acentuada queda no número de colônias manejadas de *Apis mellifera* nos Estados Unidos (NASS, 2008). O número de colônias domesticadas de *Apis mellifera* na Europa caiu de 21 milhões em 1970, para cerca de 15,5 milhões, em 2007 (FAO, 2010). Segundo Chauzat et al. (2006), resíduos do neonicotinóide imidacloprido variando de 1,1 a 5,7 µg/Kg foram detectados no pólen coletado em colônias de *Apis mellifera* na França, em 2002.

As abelhas, embora não sendo insetos-alvo dos inseticidas, acabam sofrendo as consequências das aplicações desse tipo de agrotóxico. Em altas concentrações, os inseticidas causam a morte das abelhas e em baixas concentrações desencadeiam alterações comportamentais. Por isso este trabalho teve como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica sobre os impactos dos inseticidas de última geração, como os neonicotinóides e fenilpirazóis, em abelhas.

1.1. Importância das abelhas para produção agrícola

A agricultura nos países em desenvolvimento representa mais de dois terços da agricultura mundial e é 50% mais dependente da polinização em comparação à agricultura dos países desenvolvidos (AIZEN et al., 2008). Em 1961 a área cultivada nos países em desenvolvimento era 38% maior do que nos países desenvolvidos, mas esta diferença passou para 130% em 2006 (IMPERATRIZ-FONSECA e NUNES-SILVA, 2010).

Estima-se que 84% das culturas da União Europeia dependam, pelo menos em parte, da polinização por insetos (WILLIAMS, 1994). Klein et al. (2007) utilizaram dados de 200 países e concluíram que, das culturas globais mais importantes, 87 dependem da polinização por animais, enquanto apenas 28 não dependem. Nesse mesmo estudo, foram identificadas 57 espécies, principalmente de abelhas, que não são apenas visitantes florais, mas também polinizadores para 107 culturas globais de uso direto pelos humanos. As abelhas, principalmente *Apis mellifera*, são os polinizadores economicamente mais importantes da monocultura em todo o mundo (MCGREGOR, 1976; WATANABE, 1994), sendo capazes de aumentar a produção dos cultivos polinizados por animais em até 96% (POTTS et al., 2010). A FAO (2005) considera que pouco mais de 100 espécies de cultivos proporcionam 90% do fornecimento de alimentos para 146 países. Destes 100 cultivos, 71 são polinizados por abelhas (quase todas silvestres). A polinização insuficiente causa escassez na produção de frutas. A melancia, por exemplo, quando há mais intervenções de polinizadores, adquire cor mais escura e sabor mais intenso (FAO, 2005).

Devido ao fato de uma proporção considerável da dieta humana depender direta ou indiretamente da polinização por abelhas, é de grande importância a questão da perda de polinizadores (KLEIN et al., 2007; AIZEN et al., 2008). Quando as abelhas selvagens não visitam os campos agrícolas, o gerenciamento de colmeias é muitas vezes a única solução para que os agricultores consigam garantir a polinização das culturas (KLEIN et al., 2007).

O valor monetário da polinização por animais está diretamente relacionado às taxas de dependência dos polinizadores estimadas para cada cultivo. O valor dos serviços da polinização na América do Sul é de 11,6 bilhões de euros por ano (POTTS et al., 2010). Gallai et al. (2009) realizaram um estudo com as 100 principais culturas listadas pela FAO, utilizadas diretamente na alimentação humana, para quantificar a perda econômica devido ao declínio dos polinizadores. Os resultados mostraram que o valor econômico total da polinização em todo o mundo foi de 153 bilhões de euros, o que representou 9,5% do valor da produção agrícola mundial utilizada na alimentação humana, em 2005. Observaram também que os vegetais e as frutas são as culturas mais dependentes dos polinizadores e que o valor da produção de uma tonelada das culturas que não dependem de polinização por insetos é em média de 151 euros, enquanto que aquelas dependentes de um polinizador tem um valor em média de 761 euros.

Considerando o aumento da área cultivada e da dependência da agricultura dos serviços de polinização e o valor desse serviço, é necessário tornar as paisagens agrícolas capazes de manter os polinizadores (IMPERATRIZ-FONSECA e NUNES-SILVA, 2010).

1.2. Histórico do uso dos inseticidas na agricultura

As substâncias químicas têm sido utilizadas desde a Antiguidade Clássica como forma de controlar ou eliminar os problemas devido aos ataques de pragas e doenças nas plantas cultivadas e nos animais de criação (ALVES-FILHO, 2000). Produtos químicos, como o arsênio, e compostos orgânicos naturais, como a piretrina que é extraída das flores de crisântemos (*Chrysanthemum sp*), eram utilizados como inseticidas pelos gregos, romanos e chineses há mais de 2.000 anos. Alguns povos do deserto utilizavam pó de piretro e feixes de flores de crisântemo como repelentes de moscas e mosquitos para proteger os cereais dos insetos (PASCHOAL, 1979; GUERRA e SAMPAIO, 1991). A nicotina, derivada do tabaco, e a rotenona, extraída de raízes do timbó (*Derris sp*) já eram conhecidas por suas propriedades inseticidas há muitos anos (ALVES-FILHO, 2000).

No final do século XIX e início do século XX ocorreu um grande avanço no emprego de compostos químicos de ação inseticida para proteger as plantas contra doenças e pragas. Esses produtos eram constituídos por compostos inorgânicos e orgânicos e pertenceram à

primeira geração dos agrotóxicos (GUERRA e SAMPAIO, 1991). Em 1932 foi comercializado, com o nome de Lethane 384, o primeiro inseticida desenvolvido de compostos orgânicos à base de tiocianato. Esse agrotóxico já pertence à segunda geração (GUERRA e SAMPAIO, 1991), juntamente aos organoclorados e os organofosforados (FARIA, 2009).

Foi a partir da Segunda Guerra Mundial que se iniciou mais fortemente a era dos produtos químicos sintéticos para o controle de pragas devido ao desenvolvimento da indústria de síntese química (ALVES-FILHO, 2000; FARIA, 2009).

O grande marco revolucionário nas tecnologias empregadas para o controle de pragas aconteceu devido à utilização do inseticida orgânico DDT (dicloro difenil tricloroetano) sintetizado pela primeira vez por Otto Ziedler em 1873 (PASCHOAL, 1979). Nas décadas de 1950 a 1970, os inseticidas de origem natural foram substituídos por produtos que se mostraram mais potentes e mais específicos (SANTOS et al., 2007).

Já em 1962 a americana Rachel Carson publicou o livro *Silent Spring* (Primavera Silenciosa) denunciando os problemas decorrentes do uso exacerbado de substâncias tóxicas, principalmente o DDT, no combate às pragas (ALVES-FILHO, 2000). Devido à alta toxicidade desses compostos ao homem e ao ambiente, tais produtos foram banidos ou tiveram seu uso restrito, sendo que a partir da década de 60 começaram a surgir novos produtos chamados de terceira geração, caracterizados por serem menos tóxicos aos seres humanos (GUERRA e SAMPAIO, 1991; ALVES-FILHO, 2000).

1.3. Inseticidas de última geração

Apesar do grande número de inseticidas disponíveis no mercado, houve a necessidade de sintetizar novos compostos já que alguns insetos desenvolveram resistência aos agrotóxicos e por isso passaram a ser menos efetivos. Colaborando com este fato ainda surgiram novos insetos-praga que precisaram ser controlados com outros produtos, além da alta toxicidade apresentada pelos inseticidas químicos tradicionais (BARBOSA, 2004). Por isso, há poucos anos novos compostos, os chamados inseticidas de última geração, foram introduzidos no mercado, como os feromônios, os inseticidas biológicos e os fisiológicos.

Feromônios são substâncias químicas pertencentes ao grupo dos semioquímicos, que medeiam interações intraespecíficas. O feromônio é o principal elemento utilizado para a comunicação dos insetos. Possui fórmula química simples, é biodegradável e é empregado em pequenas quantidades (VILELA, 1992). Os principais tipos de feromônios são: alarme (sinaliza perigo e ameaça), dispersão (que mantém um espaço mínimo para sobrevivência), agregação (mantém as sociedades de insetos) e sexuais (para atração do sexo oposto)

(GALLO et al., 2002a). A utilização de feromônios visando o controle de pragas tem se desenvolvido seguindo, geralmente, dois caminhos principais: monitoramento populacional de pragas para detectar o início da população do inseto a fim de que se defina a época adequada de controle; e o controle pela captura massal que consiste na captura dos insetos machos utilizando-se grande número de armadilhas adesivas para reduzir o nível populacional ou o controle pelo confundimento que consiste no emprego de altas doses de feromônio para desorientar e confundir o inseto impedindo o acasalamento (GALLO et al., 2002a). Fernandes et al. (2001) utilizaram o feromônio de agregação do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis*, para atração dos adultos na entressafra da cultura de algodão. Esses insetos foram atraídos imediatamente após a aplicação do feromônio, sendo capturados por mais 14 dias. Michereff et al. (2000) relataram o uso de diferentes formulações de feromônio e de armadilhas para captura da traçada-crucífera, *Plutella xylostella*, em repolho, indicando que tais métodos são promissores para o monitoramento desses insetos.

Outro inseticida de última geração são os chamados bioinseticidas ou inseticidas biológicos. Esses bioinseticidas agem através de microrganismos, entomopatógenos, que causam doenças nos insetos. Na maioria dos casos, o efeito se dá devido à presença de toxinas específicas que têm sua ação no interior do inseto-alvo (OLIVEIRA-FILHO, 2008). Os principais microrganismos relacionados ao controle microbiano de insetos são fungos, bactérias e vírus (GAZZONI, 2012). Os fungos geralmente penetram nos insetos através do tegumento. Na hemolinfa do inseto o fungo se multiplica e logo se forma uma massa hifal considerável. O inseto morre e, assim, com o esgotamento dos nutrientes, se houver condições favoráveis, o fungo emerge, exteriorizando suas hifas e forma uma massa branca na superfície do inseto morto (LAZZARINI, 2005). As principais espécies de fungo de interesse são: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, *Nomuraea rileyi*, entre outros (GAZZONI, 2012). As bactérias entomopatogênicas potencialmente aplicadas no controle microbiano de insetos possuem como principais características: alta virulência, elevada capacidade invasora e produção de toxinas, causando toxemias nos insetos-alvo. Apresentando tais características, na categoria de bactérias esporulantes, destacam-se os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (COSTA et al., 2009). Os vírus são parasitas celulares obrigatórios que penetram nos insetos por via oral. Aqueles que causam doenças em insetos são bastante específicos, sendo, entre os principais grupos de entomopatógenos, os mais seguros em relação a possíveis efeitos sobre o homem ou outros animais não alvo. Os principais grupos são os vírus de poliedrose nuclear (VPN), poliedrose citoplasmática (VPC) e de grandulose (VG), conhecidos como Baculovirus (GAZZONI, 2012). O AgNPV (Vírus da

Poliedrose Nuclear da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis*) é bastante pesquisado e aplicado no Brasil chegando a atingir 1,5 milhões de hectares de soja (ALMEIDA e BATISTA-FILHO, 2001).

Os inseticidas fisiológicos, diferentemente dos biológicos e dos feromônios, podem atuar como reguladores de crescimento ou agir no sistema nervoso. Os inseticidas do grupo dos reguladores de crescimento exercem sua ação tóxica em formas imaturas (larvas e ninfas), principalmente durante a ecdise. Os principais representantes são as benzoilfeniluréias (REYNOLDS, 1987; CASIDA e QUISTAD, 1998). Os inseticidas neurotóxicos têm como principal alvo de ação o sistema nervoso e apresentam alta eficácia e rapidez para o controle de pragas. As classes mais importantes de inseticidas neurotóxicos são os piretróides (agem na transmissão axônica), fenilpirazóis e neonicotinóides (GALLO et al., 2002b). Os inseticidas piretróides surgiram na década de 1960 e são bastante conhecidos pelo seu efeito de choque (“know-down”) quase instantâneo nos insetos (GALLO et al., 2002b).

O grupo químico fenilpirazol possui como principal representante o fipronil. Esse inseticida foi introduzido no mercado em 1990. É eficaz contra insetos resistentes ou tolerantes a piretróides, organofosforados e carbamatos (WARE e WHITACRE, 2004). Os fenilpirazóis bloqueiam canais de cloro na membrana neuronal agindo sobre o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), dessa forma não há inibição normal do impulso nervoso causando hiperexcitação, paralisia e morte do inseto (CONNELY, 2001; NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC, 2009).

Os neonicotinóides foram sintetizados a partir da molécula de nicotina, sendo o imidacloprido um dos maiores representantes dessa classe. Esse inseticida foi o primeiro neonicotinóide lançado no mercado em 1991 e tornou-se um dos inseticidas mais vendidos em 1999 (MAIENFISCH et al., 2001; GUEDES et al., 2008). Os neonicotinóides imitam o neurotransmissor excitatório acetilcolina e competem com ele pelos seus receptores nicotínicos existentes na membrana pós-sináptica. No entanto, ao contrário da acetilcolina, ele não é degradado pela acetilcolinesterase, levando a hiperexcitação. Os sintomas resultantes da intoxicação são tremores, convulsões e, eventualmente, colapso do sistema nervoso central e morte (FARIA, 2009; NPIC, 2010).

1.4. Fipronil e imidacloprido: impactos sobre as abelhas

As abelhas podem entrar em contato com os inseticidas por três modos: contato direto, ingestão e absorção via sistema respiratório e, seus efeitos podem ser a longo prazo, com danos no funcionamento da colônia e diminuição da longevidade dos indivíduos, ou mesmo a morte devido a toxicidade aguda (MALASPINA et al., 2008). Dentre os vários grupos

químicos de inseticidas existentes, dois vem se destacando devido aos seus efeitos sobre as abelhas: os fenilpirazóis e os neonicotinóides.

Segundo Chauzat et al. (2011), o fipronil é altamente tóxico para as abelhas e já foi apontado como uma possível causa da mortalidade aguda desses insetos, por isso tem sido dada uma atenção especial a esse inseticida e seus resíduos, pois ainda há pouca informação disponível sobre os níveis de fipronil e seus metabólitos para abelhas em campo. El Hassani et al. (2005) avaliaram o efeito de doses subletais desse inseticida no comportamento da *Apis mellifera* e relataram que a menor dose de fipronil (0,5 ng/abelha aplicado topicamente) prejudicou o aprendizado olfativo dessas abelhas, porém a atividade motora não foi prejudicada, sugerindo que há uma vulnerabilidade específica dos processos de memória olfativa das abelhas quando submetidas a doses subletais desse ingrediente ativo.

Jacob et al. (2013), Lourenço et al. (2012a; 2012b) e Pereira (2010), estudando a toxicidade do fipronil nas espécies de abelhas *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) e *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), respectivamente, concluíram que esse inseticida é altamente tóxico para as abelhas.

Estudo realizado por Blacquièrre et al. (2012), que apresentaram vários dados disponíveis na literatura, concluíram que os inseticidas neonicotinóides também são extremamente tóxicos para as abelhas, tanto em doses letais quanto em doses subletais. Tomé et al. (2012) realizaram estudo sobre os efeitos da ingestão de imidacloprido nos estágios de desenvolvimento da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier, 1836) e concluíram que o inseticida afetou negativamente o desenvolvimento dos corpos pedunculados no cérebro e prejudicou o comportamento das operárias adultas recém-emergidas.

Segundo Bortolli et al. (2003), doses subletais de imidacloprido causam efeitos sobre o comportamento de forrageamento, alterando e dificultando o seu retorno à colônia. Esses resultados são semelhantes aos de outro estudo, realizado com imidacloprido, em que foram verificadas redução da mobilidade e da capacidade de comunicação das abelhas prejudicando suas atividades sociais e dificultando o retorno à colônia (DECOURTYE et al., 2004). Yang et al. (2012) realizaram um estudo com larvas de abelhas expostas ao imidacloprido e verificaram que a dose subletal de imidacloprido não teve nenhum efeito sobre a taxa de eclosão, porém afetou a capacidade associativa das operárias de abelhas adultas, concluindo que uma dose baixa de imidacloprido pode afetar a sobrevivência de toda a colônia. Estudos realizados por Soares et al. (2015) também relatou alta toxicidade do imidacloprido em abelhas *Scaptotrigona postica*.

Os dados apresentados indicam que o fipronil e o imidacloprido são inseticidas bastante tóxicos para as abelhas, bem como outros compostos que pertencem aos mesmos grupos químicos destes. Por isso são necessárias algumas medidas de conservação destes insetos, para que o equilíbrio ecológico não seja comprometido.

Para tentar minimizar os efeitos dos inseticidas em abelhas, a Europa, desde 2013, suspendeu a comercialização de agrotóxicos à base de clotianidina, imidacloprido e tiametoxam, podendo ser utilizados apenas em plantações que não atraem abelhas ou outros polinizadores. Essa suspensão foi baseada no relatório da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), que concluiu que tais inseticidas causam riscos para as abelhas e, por isso, devem ter o uso limitado (EFSA, 2013).

1.5. Perspectivas futuras do uso de inseticidas

A agricultura comercial de larga escala, tal como vem sendo praticada atualmente, em grandes áreas e onde predominam as monoculturas, não pode prescindir do uso de agrotóxicos (EUROPEAN CROP PROTECTION ASSOCIATION - ECPA, 2008). Porém, devido aos danos que esses produtos causam em organismos não alvos, os inseticidas devem ser utilizados corretamente. Portanto lançar mão das boas práticas agrícolas pode diminuir o uso excessivo de inseticidas, além de ser uma alternativa promissora para unir o efeito desejado da aplicação dos agrotóxicos e a proteção dos organismos não alvos. Segundo Chaim et al. (1999), o agrotóxico precisa ser aplicado em uma área alvo particular ocupada por um inseto. Outra alternativa eficiente para diminuir a utilização de inseticidas é o uso de controle biológico. Essa prática envolve a interferência do homem e funciona no sentido de incrementar as interações antagônicas que ocorrem entre os seres vivos na natureza (GALLO et al., 2002a). Esse tipo de controle pode ser clássico, natural e aplicado. O controle biológico clássico envolve a importação dos agentes de controle de um país para outro ou de uma região para outra, de modo a estabelecer um equilíbrio biológico a uma dada praga (GALLO et al., 2002a). O natural refere-se à população de inimigos naturais que ocorrem naturalmente (GALLO et al., 2002a). Segundo Bueno et al. (2015), do ponto de vista econômico, um inimigo natural efetivo é aquele que consegue regular a densidade populacional de uma praga e mantê-la em níveis abaixo do dano econômico estabelecido para um determinado cultivo.

O controle biológico aplicado é comercialmente empregado em grandes áreas, em vários sistemas de cultivo ao redor do mundo. É caracterizado pela introdução e liberação periódica de inimigos naturais na cultura que se deseja controlar o inseto praga após a criação massal em laboratório. Esse tipo de controle biológico é mais facilmente aceito, pois tem ação rápida, sendo muito semelhante a inseticidas químicos (GALLO et al., 2002a).

O controle biológico possui importantes benefícios quando comparado ao controle químico: não há efeitos fitotóxicos em plantas jovens; a liberação de inimigos naturais leva menos tempo do que a aplicação de produtos fitossanitários; várias pragas-chave podem ser controladas somente com inimigos naturais; não existe período de carência após a liberação de inimigos naturais e isto permite contínua colheita sem perigo para a saúde do homem, além de não deixar resíduos tóxicos nas plantas e no meio ambiente (VAN LENTEREN e BUENO, 2003). Atualmente existem empresas que comercializam os inimigos naturais, principalmente nos Estados Unidos e em países europeus (GALLO et al., 2002a).

Devido a utilização de controle biológico possuir várias vantagens, a demanda por esse tipo de controle tem aumentado mundialmente (IBAMA, 2010). Um exemplo disso é o controle biológico utilizado na cana-de-açúcar. Entre 1980 e 2005 foi reduzida a quantidade de inseticida contra a espécie *Diatraea saccharalis* (praga muito nociva às plantações de cana-de-açúcar, durante o estágio larval) em 951.000 litros devido a utilização do controle biológico (BROCA DE CANA..., 2012).

Além do controle biológico, outra alternativa é a utilização de feromônios como um método direto de controle de pragas ou para o monitoramento de populações podendo contribuir para prevenir o uso excessivo de inseticidas. Os semioquímicos (feromônios e aleloquímicos) são responsáveis por cerca de 30% do mercado de biopesticidas no mundo. No Brasil, o mercado dessa substância está em expansão, com mais de 15 produtos registrados e outros em fase de registro (EMBRAPA, 2014). Os feromônios têm várias vantagens quando comparados aos agrotóxicos químicos: são específicos, não afetam populações de pragas secundárias ou inimigos naturais, têm baixa toxicidade a mamíferos, não apresentam resíduos tóxicos e evitam desequilíbrios biológicos (SILVERSTEIN, 1981; GALLO et al., 2002a).

2. Conclusão

O uso incorreto e excessivo de inseticidas, como os fenilpirazóis e os neonicotinóides, pode provocar diversos danos às abelhas e outros polinizadores. Para tentar minimizar esses danos é necessário conhecer alternativas como a utilização de controle biológico, de feromônios e/ou de bioinseticidas. Esses produtos podem ser benéficos aos polinizadores já que são inseticidas específicos e por isso causam menos impactos aos insetos não alvos. Esses produtos também são considerados eficientes e menos poluentes, porém ainda é necessário aumentar as pesquisas nessa área, para que a utilização desses produtos seja cada vez maior.

3. Agradecimentos

Esse trabalho teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo nº 2013/20666-3.

4. Referências Bibliográficas

AIZEN, M. A. et al. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. **Current Biology**, v.18, n.20, p.1572-1575, 2008.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA-FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 20, 2001.

ALVES-FILHO, J. P. **Receituário agrônomo: a construção de um instrumento de apoio à gestão dos agrotóxicos e sua controvérsia**. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BARBOSA, L. C. A. Mercado e desenvolvimento dos agrotóxicos. In: _____ **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. p. 35-56.

BLACQUIÈRE, T. et al. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, Londres, v.21, n.4, p.973-992, 2012.

BORTOLLI, L. et al. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology**, Bolonha, v.56, n.1, p.63–67, 2003.

BROCA DE CANA como conseguir um controle biológico mais eficaz. 2012. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI327163-18531,00-BROCA+DE+CANA+COMO+CONSEGUIR+UM+CONTROLE+BIOLOGICO+MAIS+EFICAZ.html>>. Acesso em: 01 jun. 2015.

BUENO, V. H. P. et al. **Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável**. Disponível em: <[http://www.den.ufla.br/attachments/article/75/Apostila_CB%20\(final\).pdf](http://www.den.ufla.br/attachments/article/75/Apostila_CB%20(final).pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2015.

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

CHAIM, A. et al. **Avaliação de perdas de pulverização em culturas de feijão e de tomate**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 29p. (Boletim de pesquisa, 2).

CHAUZAT, M. P. et al. A Survey of Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France. **Entomological Society of America**, v.99, n.2, p.253-262, 2006.

CHAUZAT, M. P. et al. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Nova York, v.30, n.1, p.103-111, 2011.

CONNELY, P. **Environmental fate of fipronil**. 2001. Disponível em: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/enfate_archive/fipronil.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2015.

COSTA, E. L. N. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.38, 2009.

DECOURTYE, A. et al. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide of Biochemistry Physiology**, San Diego, v.78, n.2, p.83-92, 2004.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Patente de feromônio vai acelerar pesquisas de controle biológico no Brasil**. 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1911153/patente-de-feromonio-vai-acelerar-pesquisas-de-controle-biologico-no-brasil>>. Acesso em: 3 mar. 2015.

EUROPEAN CROP PROTECTION ASSOCIATION - ECPA. **Pesticides and honey bees – both essential to agriculture**. 2008. Disponível em: <www.cropscience.bayer.com/~media/Bayer%20CropScience/Global-portal/Press/Background-Information/Pesticides-and-Honey-Bees.ashx?force=1-18k>. Acesso em: 3 mar. 2015.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. **EFSA identifies risks to bees from neonicotinoids**. 2013. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130116.htm?utm_source=homepageutm_medium=infocuseutm_campaign=beehealth>. Acesso em: fev. 2015.

FERREIRA, C. R. R. P. T. et al. Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2011 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2012. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v.7, n.7, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Protección a los polinizadores**. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/0512sp1.htm>>. Acesso em: 21 fev. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Polinizadores - cuestiones globales: biodiversidad**. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/biodiversity/ecosystems/bio-pollinators/es/>>. Acesso em: 4 mar. 2015.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência**, Guarapuava, v.5, n.2, p.345-358, 2009.

FERNANDES, W. D. et al. Between-season attraction of cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae) adults by its aggregation pheromone. **Scientia Agricola**, v.58, n.2, p.229-234, 2001.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v.68, p.810-821, 2009.

GALLO, D. et al. Métodos de controle de pragas. In: _____ **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 243-360.

- GALLO, D. et al. Toxicologia de inseticidas. In: _____ **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p.361-398.
- GAZZONI, D. L. Perspectivas do manejo de pragas. In: Hoffmann-Campo, C. B. et al. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2012. p.789-830.
- GUEDES, R. N. C. et al. Características dos principais grupos de inseticidas e acaricidas. In: Zambolim, L. et al. **Produtos fitossanitários**. Viçosa: UFV/DFP, 2008. p. 489-518.
- GUERRA, M. S.; SAMPAIO, D. P. A. Toxicologia dos agrotóxicos. In: _____ **Receituário agrônômico**. São Paulo: Globo, 1991. p. 227-354.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotrópica**, v.10, n.4, p.59-62, 2010.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília, 2010. 84p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil**. Brasília, 2012. 88 p.
- JACOB, C. R. O. et al. Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.90, n.1, p.69-72, 2013.
- KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B**, Edimburgo, v.274, n.1608, p.303-313, 2007.
- LAZZARINI, G. M. J. **Efeito da umidade sobre a germinação in vitro de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e atividade contra *Triatoma infestans***. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.
- LOURENÇO, C. T. et al. Determination of fipronil LD₅₀ for the brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Julius Kühn-Institut**, Wageningen, v.437, p.174-178, 2012a.
- LOURENÇO, C.T. et al. Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bull Environ Contam Toxicol**, v.89, n.4, p.921–924, 2012b.
- MAIENFISCH, P. et al. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v.57, p.906-913, 2001.
- MALASPINA, O. et al. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8., 2008, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FUNPEC, Universidade de São Paulo, 2008. p. 41–48.

MCGREGOR, S. E. **Insect pollination of cultivated croppants**. 1976. Disponível em: <<http://xa.yimg.com/kq/groups/13211600/2067097133/name/Insect%252BPollination%252BOf%252BCultivated%252BCrop%252BPlants.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

MICHEREFF, M. F. F. et al. Uso do feromônio sexual sintético para captura de machos da traça-das-crucíferas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.10, p.1919-1926, 2000.

NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS SERVICE - NASS. **Honey**. 2008. Disponível em: <www.nass.usda.gov>. Acesso em: mar. 2015.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Fipronil: Technical fact sheet**. 2009. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>> Acesso em: 7 mar. 2015.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Imidacloprid: Technical fact sheet**. 2010. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>>. Acesso em: 7 mar. 2015.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.3, n.1, p.1-7, 2008.

PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções**. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 1979.106p.

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

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v.25, n.6, p.345-353, 2010.

REYNOLDS, S. E. The cuticle, growth regulators and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. **Pesticide Science**, v.20, n.2, p.131-146, 1987.

SANTOS, V. M. R. et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v.30, n.1, p.159-170, 2007.

SILVERSTEIN, R. M. Pheromones: background and potential use in insect pest control. **Science**, v.213, n.4514, p.1326-1332, 1981.

SOARES, H. M. et al. Toxicity of Imidacloprid to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bull Environ Contam Toxicol**, Nova York, 2015.

TOMÉ, H. V. V. et al. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Plosone**, v.7, n.6. 2012.

VAN LENTEREN, J. C.; BUENO, V. H. P. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **BioControl**, v.48, p.123-139, 2003.

VILELA, E. F. Adoção de feromônios no manejo integrado de pragas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.315-318, 1992.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **Introducción a los Insecticidas**. 2004. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/WeWinsectSP.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

WATANABE, M. E. Pollination worries rise as honey bees decline. **Science**, v.265, n.5176, p.1170, 1994.

WILLIAMS, I. H. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. **Agricultural Science Reviews**, v.6, p.229-257, 1994.

YANG, E-C. et al. Impaired Olfactory Associative Behavior of Honeybee Workers Due to Contamination of Imidacloprid in the Larval Stage. **Plosone**, v.7, n.11, 2012.

4. Capítulo 2

Determinação da dose letal média (DL₅₀) e da concentração letal média (CL₅₀) do inseticida imidacloprido para a abelha nativa *Melipona scutellaris*, Latreille (Hymenoptera: Apidae)

L. M. da COSTA; T. C. GRELLA; R. A. BARBOSA; O. MALASPINA; R. C. F. NOCELLI

Resumo

A espécie de abelha *Melipona scutellaris* é nativa, sem ferrão e pertence à família Apidae. No Brasil, as abelhas sem ferrão são responsáveis pela polinização de 40% a 90% das espécies arbóreas, dependendo do ecossistema considerado. Porém, sua sobrevivência tem sido ameaçada, uma vez que o país vem se destacando como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Muitos dos inseticidas utilizados são considerados tóxicos para as abelhas, dentre eles o imidacloprido, porém os estudos existentes foram realizados com a espécie *Apis mellifera*. Embora as abelhas não sejam o alvo dessas substâncias, são altamente vulneráveis à contaminação. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi estabelecer a dose letal média (DL₅₀) e a concentração letal média (CL₅₀) do imidacloprido para forrageiras de *M. scutellaris*. Para realizar esse experimento as abelhas foram coletadas e o teste foi procedido de acordo com protocolo da OECD (1998a, 1998b), desenvolvido para *A. mellifera*. Para a determinação da DL₅₀ e CL₅₀ os dados foram analisados através do método Probit utilizando o programa BioStat. A DL₅₀ tópica estabelecida neste trabalho foi de 2,41 ng/abelha para 24 horas e 1,29 ng/abelha para 48 horas. A CL₅₀ oral foi de 2,01 ng i.a./μL para 24 horas e 0,81 ng i.a./μL para 48 horas. Esses dados indicam que as abelhas nativas da espécie *M. scutellaris* são mais sensíveis a tal inseticida que *A. mellifera*. Dessa forma, é importante estabelecer métodos de manejo que levem essa maior susceptibilidade em consideração para proteger as espécies nativas.

Palavras-chave: abelha sem ferrão, inseto, neonicotinóide, toxicidade.

1. Introdução

As abelhas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera, assim como as vespas e as formigas. Estes insetos são os mais importantes para a conservação da biodiversidade por abrigar o maior número de polinizadores que utilizam pólen e néctar como fonte de alimento e energia (NOGUEIRA-NETO, 1997). Ao coletarem esses recursos nas flores transferem grãos de pólen dos órgãos reprodutivos masculinos para os femininos, garantindo a polinização.

No Brasil a família Apidae é a mais numerosa, com espécies de abelhas solitárias a sociais. Entre os representantes dessa família estão as abelhas do gênero *Melipona* (pertencente a tribo Meliponini) que possui mais de 50 espécies. Neste gênero destaca-se

Melipona scutellaris, abelha sem ferrão e eussocial, conhecida popularmente como “uruçu” ou “uruçu do nordeste” (NOGUEIRA-NETO, 1997; KERR et al., 2001; IMPERATRIZ-FONSECA E SANTOS, 2014). Esta espécie é endêmica do Nordeste brasileiro, habitando regiões de mata úmida e quente do litoral da Bahia e Chapada Diamantina e também é adaptada as condições ecológicas e climáticas do Estado de São Paulo (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIANA, 2014). Na Mata Atlântica é encontrada apenas em locais com baixos níveis de perturbação, podendo, também, ser considerada um indicador de qualidade ambiental (RAMALHO e BATISTA, 2005).

Além dos serviços de polinização prestados, os meliponíneos apresentam produtos e subprodutos bastante valorizados economicamente, tais como: mel, pólen e própolis. Entretanto, a importância dessas abelhas vai muito além dos benefícios econômicos, elas ajudam na reconstituição de florestas tropicais e conservação dos remanescentes, podem atuar como bioindicadoras da qualidade ambiental e desempenham um papel chave nos processos ecossistêmicos em que estão envolvidas (BALLIVIÁN, 2008).

Infelizmente, pouco se sabe sobre as abelhas brasileiras e por isso há dificuldades para estabelecer métodos de conservação para esse inseto. Concomitantemente, ainda ocorre a redução das fontes de alimento e locais de nidificação, a ocupação intensiva das terras e principalmente o uso excessivo e/ou incorreto de agrotóxicos, contribuindo para a redução das populações (EMBRAPA, 2014). Dentre esses inseticidas estão os neonicotinóides.

Os neonicotinóides imitam o neurotransmissor excitatório acetilcolina e competem com ele pelos seus receptores nicotinérgicos existentes na membrana pós-sináptica. Ao contrário da ligação natural da acetilcolina com o seu receptor, esta ligação é persistente, uma vez que os neonicotinóides são insensíveis à ação da enzima acetilcolinesterase. A ativação dos receptores de acetilcolina é prolongada de modo anormal, causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos. Os sintomas resultantes da intoxicação são tremores, convulsões e morte (FARIA, 2009).

As abelhas, embora não sejam o alvo desses agentes tóxicos, fazem o forrageamento nas áreas agrícolas pulverizadas, sendo, portanto, altamente vulneráveis à contaminação (IBAMA, 2012). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi estabelecer a dose letal média (DL₅₀) e a concentração letal média (CL₅₀) de tal inseticida para forrageiras de *M. scutellaris*.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das abelhas

As abelhas operárias adultas de *M. scutellaris* foram coletadas no meliponário do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Rio Claro. Para todos os testes foram utilizadas 30 abelhas, sendo três repetições de 10 abelhas de três diferentes colônias. As colônias escolhidas apresentavam condições fisiológicas normais, livre de doenças e uma rainha em franca postura. Os testes foram realizados nos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

2.2. Determinação da dose letal média tópica

Os procedimentos para a determinação da DL_{50} tópica basearam-se no protocolo da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1998a, desenvolvido para *Apis mellifera* (L.).

O inseticida imidacloprido (grau de pureza 95%) foi inicialmente diluído em acetona, sendo realizadas sucessivas diluições no mesmo solvente para atingir as doses a serem aplicadas (2; 4; 8; 16; 32 e 64 ng i.a./ μ L a fim de estabelecer a DL_{50} para 24 horas e 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 ng i.a./ μ L a fim de estabelecer a DL_{50} para 48 horas).

As abelhas coletadas foram transferidas para potes plásticos com volume de 250 mL perfurados na região da tampa para circulação de ar. Em cada pote havia um microtubo plástico contendo alimento (água e açúcar cristal 1:1 v/v) para que as abelhas se alimentassem à vontade. Nas abelhas do grupo experimental foi feita a aplicação tópica de 1 μ L da solução contendo a substância testada na parte dorsal do tórax, as abelhas do grupo controle receberam 1 μ L de acetona.

2.3. Determinação da concentração letal média oral

Os procedimentos para a determinação da CL_{50} oral basearam-se no protocolo da OECD (1998b), estabelecido para *A. mellifera*.

Para obter as concentrações desejadas do inseticida imidacloprido (grau de pureza 95%) foram feitas diluições que partiram de uma solução inicial, composta por inseticida dissolvido em 15% de acetona e 85% de água. As concentrações utilizadas para a contaminação das abelhas foram de 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 ng/ μ L. O alimento sem contaminação, oferecido no momento da coleta através de um microtubo plástico, foi substituído por alimento contaminado. Foram feitos também dois controles, que respeitaram um limite de morte de 10% para validação do teste, um com acetona e outro apenas com o alimento, que seguiram a mesma rotina de observação.

2.4. Análise estatística

Os testes foram conduzidos em estufas incubadoras (B.O.D.) com temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ e com $70\% \pm 5$ de umidade relativa. As abelhas mortas foram contabilizadas para cada concentração ao final de 24 e 48 horas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de sobrevivência, através do método Probit (FINNEY,1952) utilizando o programa BioStat (ANALYSTSOFT, 2008).

3. Resultados e Discussão

Os valores de DL_{50} tópica do inseticida imidacloprido obtidos para a espécie *M. scutellaris* foram: 2,41 ng i.a./abelha e 1,29 ng i.a./abelha, para 24 e 48 horas, respectivamente (Tabela 1 e Figura 2). A CL_{50} oral obtida foi: 2,01 ng i.a./ μL e 0,81 ng i.a./ μL , para 24 e 48 horas, respectivamente (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1 - Valores de toxicidade aguda do imidacloprido para *Melipona scutellaris*.

Modo de exposição	Tempo (horas)	DL_{50}	CL_{50}	I.C. _{95%}	χ^2	G.L.
Tópica ng i.a./ abelha	24	2,41	–	1,63 – 3,27	0,753	4
	48	1,29	–	0,813 – 1,903	2,642	4
Ingestão ng i.a./ μL dieta	24	–	2,01	1,551 – 2,618	2,534	4
	48	–	0,81	0,264 – 1,538	4,001	4

(DL_{50}) dose letal média; (CL_{50}) concentração letal média; (I.C._{95%}) intervalo de confiança 95%; (χ^2) qui-quadrado e (G.L.) grau de liberdade.

Figura 2 - Curva estatística de DL₅₀ indicando a mortalidade de abelhas *Melipona scutellaris*. A - 24 horas após a exposição tópica ao imidacloprido; B - 48 horas após a exposição tópica ao imidacloprido.

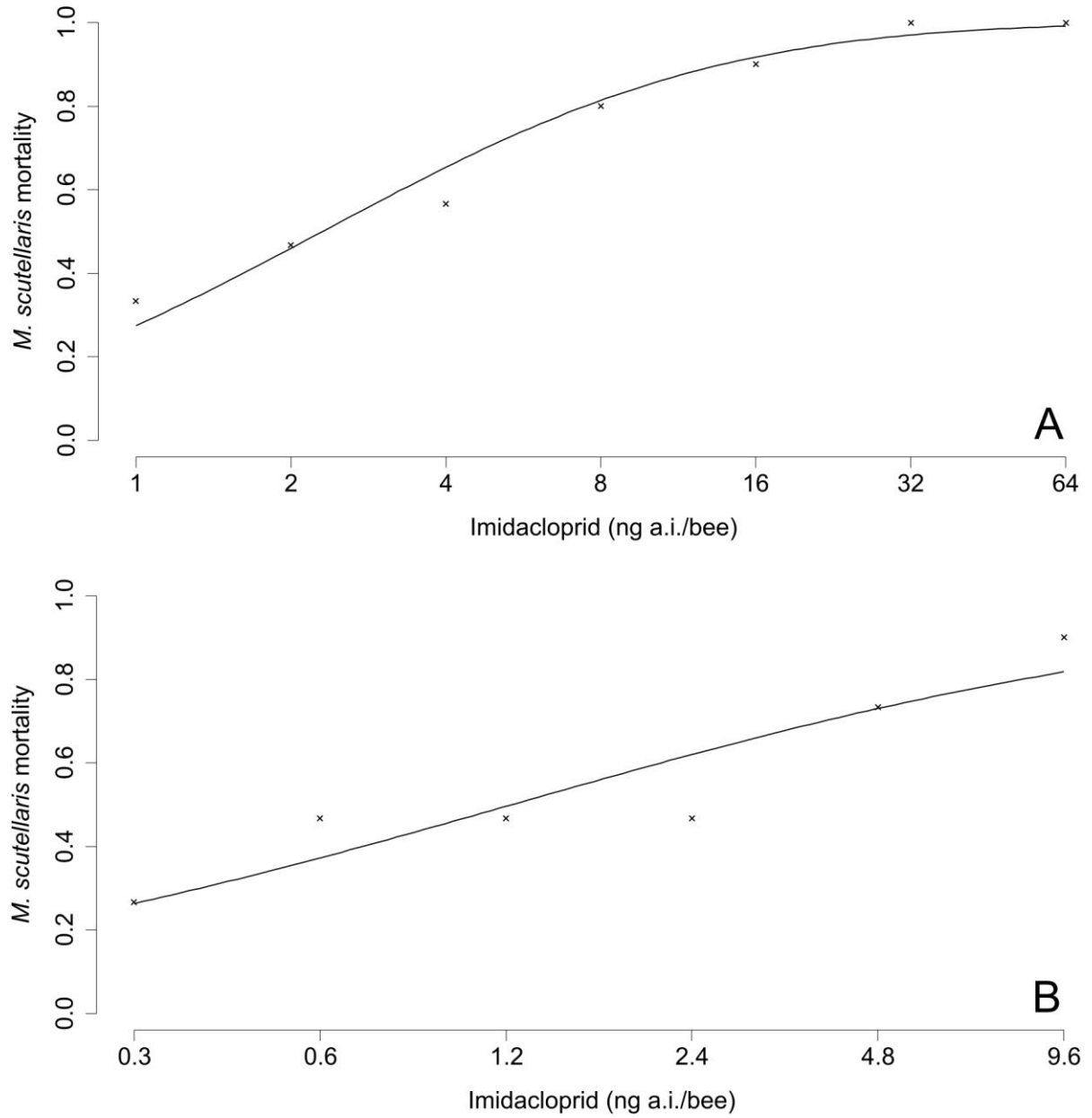
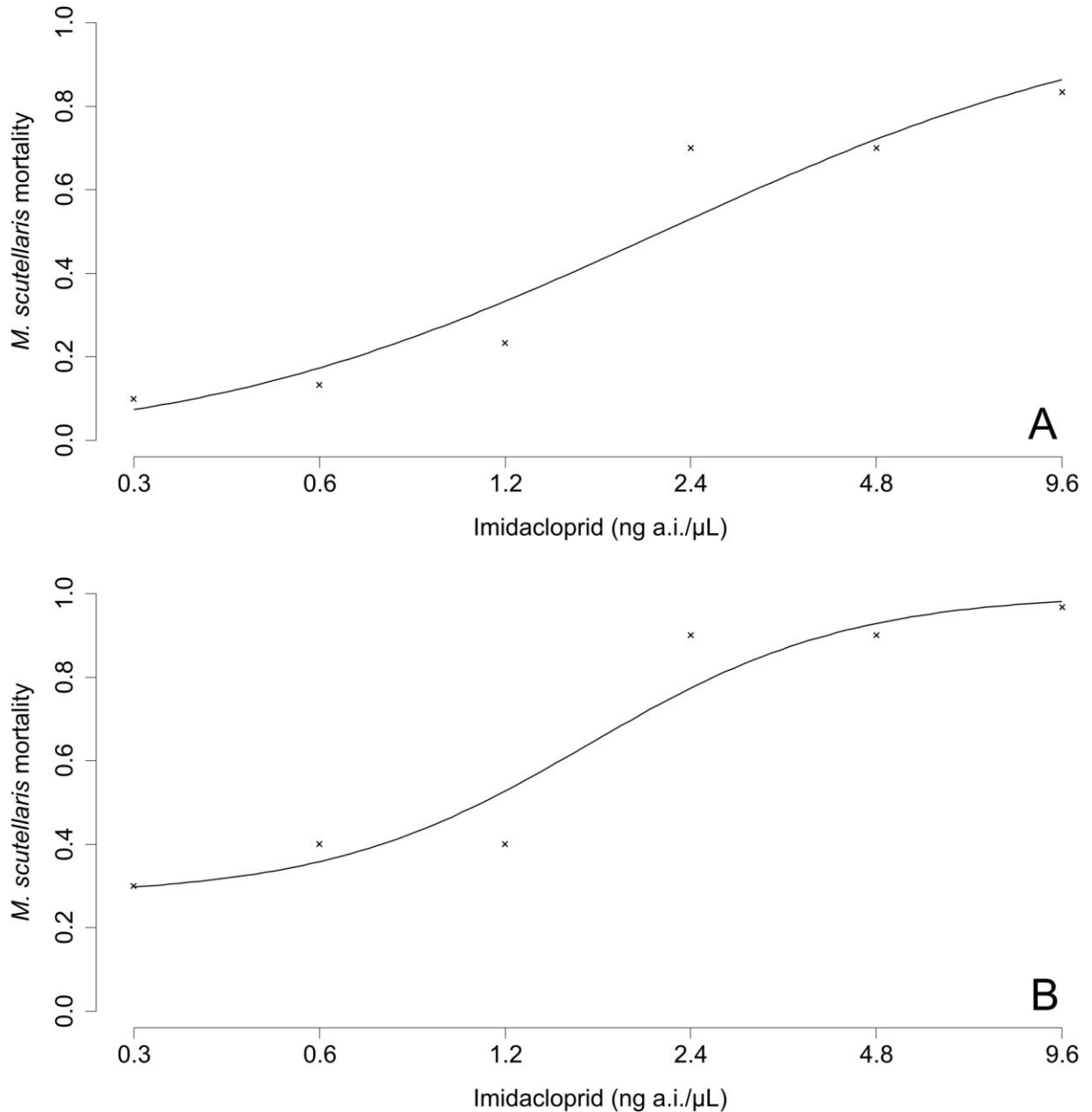


Figura 3 - Curva estatística de CL_{50} indicando a mortalidade de abelhas *Melipona scutellaris*. A - 24 horas após a exposição oral ao imidacloprido; B - 48 horas após a exposição oral ao imidacloprido.



De acordo com a classificação de Johansen e Mayer (1990), o imidacloprido é tido como altamente tóxico para a *M. scutellaris*, já que consideram inseticidas com uma $DL_{50} < 2\mu\text{g}/\text{abelha}$ como altamente tóxicos para esses insetos.

Para a espécie *A. mellifera* encontram-se vários resultados de DL_{50} tópica do imidacloprido, dentre eles: 17,9 ng i.a./abelha (24 h) (IWASA et al., 2004); 24 ng i.a./abelha (24 e 48 h) (SUCHAIL, DEBRAUWER e BELZUNCES, 2003); 42 – 104 ng i.a./abelha (48 h) (SCHMUCK et al., 2003); 49 – 102 ng i.a./abelha (48 h) (NAUEN et al., 2001); 80,9 ng

i.a./abelha (24 h) (ROSSI, 2011). Para a CL₅₀ os valores encontrados são: 81 ng i.a./μL de dieta (48 h) (NAUEN et al., 2001) e 40,9 ng i.a./μL de dieta (48 h) (SCHMUCK et al., 2001). Esses valores indicam que abelhas *M. scutellaris* são mais sensíveis ao imidacloprido que *A. mellifera*.

Esses resultados corroboram com o trabalho realizado por Soares et al. (2015), que determinou a DL₅₀ tópica e a CL₅₀ oral do imidacloprido para a espécie de abelha nativa *Scaptotrigona postica* (L.). Os valores obtidos foram: DL₅₀ tópica de 25,20 ng i.a./abelha (24 h) e 24,46 ng i.a./abelha (48 h) e CL₅₀ oral de 42,5 ng i.a./μL de alimento (24 h) e 14,3 ng i.a./μL de alimento (48 h), indicando que essa espécie também é mais susceptível ao inseticida neonicotinóide que *A. mellifera*.

Comparando os valores de DL₅₀ e CL₅₀ (48 horas) do imidacloprido para *S. postica* e *M. scutellaris*, verifica-se que esta é 19 vezes mais sensível quando comparada com àquela. A diferença na resposta ao inseticida das diferentes espécies de abelhas foi previamente relatada por Desneux et al. (2007).

Verifica-se que a dose obtida para 48 horas é menor que para 24 horas, ou seja, é mais tóxica. Uma possível explicação seria a de que quanto mais tempo a abelha permanece em contato com o inseticida menor a dose necessária para causar danos, pois a exposição constante impede seu organismo de se recuperar (SOARES, 2012).

O fato da abelha *M. scutellaris* ser mais sensível que *A. mellifera* também foi comprovado por Lourenço et al. (2012a, 2012b) que realizaram um estudo de toxicidade do fipronil com a espécie de abelha nativa e verificaram que o inseticida é altamente tóxico apresentando DL₅₀ (48h) tópico de 0,41 ng i.a./abelha e CL₅₀ (48 h) oral de 0,011 ng i.a./ μL de alimento. Jacob et al. (2013) também demonstraram a maior sensibilidade da abelha nativa *S. postica* ao fipronil. Nesse trabalho a DL₅₀ (24 h) tópica determinada foi de 0,54 ng i.a./abelha e a CL₅₀ (24 h) oral foi de 0,24 ng i.a./μL de alimento.

Quando comparamos a CL₅₀ e a DL₅₀ encontradas neste trabalho com os valores obtidos pelos estudos aqui apresentados, podemos inferir que a espécie *M. scutellares* é mais sensível ao inseticida fipronil que ao imidacloprido.

O trabalho realizado por Pereira (2010) confirmou que o fipronil é um dos inseticidas mais tóxicos para abelhas melíferas já que a DL₅₀ (24 horas) foi de 1,9 ng/abelha, menor valor encontrado comparando com outros ingredientes ativos estudados (acetamiprido – DL₅₀ 9,3x10³ ng/abelha e tiametoxam – DL₅₀ 17 ng/abelha).

Outros estudos que compararam a tolerância entre espécies de abelhas sem ferrão e as africanizadas mostraram que as primeiras, geralmente, são mais sensíveis aos inseticidas (MORAES et al., 2000; SILVA et al., 2008; DEL SARTO, 2009).

A toxicidade de inseticidas neonicotinóides em abelhas pode ser classificada em dois grupos baseados na presença do agrupamento nitro ou do agrupamento ciano. Os inseticidas com agrupamento nitro são os mais tóxicos, como o imidacloprido, pois a presença desse grupo funcional confere ao inseticida grande afinidade com o receptor nicotínico de acetilcolina e, portanto, alta toxicidade (TOMIZAWA e CASIDA, 2003; PEREIRA, 2010).

As abelhas expostas ao imidacloprido, tanto tópica como oralmente, apresentaram um quadro de paralisia, tremores e morte, sintomas comuns de intoxicação por inseticidas neonicotinóides observados por Faria (2009), uma vez que o órgão alvo dessa substância é o sistema nervoso.

Dependendo do cultivo e do método de aplicação, o imidacloprido pode apresentar uma concentração de aplicação de 0,07 g/L (equivalente a 70 ng/μL), excedendo em 54 vezes o valor encontrado que provoca a mortalidade das abelhas (DL₅₀ para 48 horas).

Por ser um inseticida altamente tóxico para as abelhas, o uso de imidacloprido deve ser evitado durante o período de florescimento, e utilizá-lo apenas através do tratamento de sementes ou aplicação de grânulos para minimizar os efeitos em insetos polinizadores não alvo (SUCHAIL et al., 2000). Mesmo assim, estudos referentes aos resíduos desse ingrediente ativo nos recursos florais precisam ser realizados, já que ele também é altamente tóxico via ingestão.

Estudo realizado por Suchail, Debrauwer e Belzunces (2003) indicou que a elevada toxicidade do imidacloprido via oral em *A. mellifera* pode ser devido ao fato de que essa molécula é rapidamente metabolizada em olefin e 5-hydroxyimidacloprid. Tais metabólitos são tóxicos em exposição aguda, sugerindo, fortemente, que o 5-hydroxyimidacloprid e/ou a olefina contribuem para o aumento da ação do imidacloprido em abelhas.

Diante dos dados apresentados, é necessário reavaliar o sistema de avaliação e registro dos agrotóxicos com o objetivo de tornar as recomendações para uso desses produtos mais seguros para as abelhas sem ferrão.

4. Agradecimentos

Esse trabalho teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2013/20666-3) e suporte financeiro (Processo nº 2012/50197-2).

Referências Bibliográficas

ANALYSTSOFT **BioStat 2008**: programa de análise estatística. Versão 5.8.0. [S.l.]: AnalystSoft, 2008.

BALLIVIÁN, J. M. P. P. (Org.) **Abelhas Nativas sem Ferrão – Myg Pe – Terra Indígena Guarita**, RS. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128p.

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

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annu Rev Entomol**, v.52, p.81–106, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. 2014. **As abelhas e a polinização**. Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/polinizacao.php>> Acesso em: 25 ago. 2014.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo Integrado de pragas florestais. **Ambiência**, v.5, n.2, p.345-358, 2009.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge: University Press, 1952. 318 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SANTOS, I. A. 2014. **Meliponíneos**. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/beetaxon/>> Acesso em: 22 ago. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. 2012. **Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil**. Brasília, 88p.

IWASA, T. et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Prot.**, v.23, n.5, p.371-378, 2004.

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

JACOB, C. R. O. et al. Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bull Environ Contam Toxicol.**, v.90, n.1, p.69–72, 2013.

KERR, W. E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, n.12, p.20-41, 2001

LOURENÇO, C. T. et al. Determination of fipronil LD₅₀ for the brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Julius Kühn-Institut.**, v.437, p.174-178, 2012a.

LOURENÇO, C. T. et al. Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bull Environ Contam Toxicol.**, v.89, p.921–924, 2012b.

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**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.31-37, 2000.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; SCHMUCK, R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Pest Manag Sci.**, v.57, n.7, p.577-586, 2001.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 445 p.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, n.214, set. 1998a. 7p. 28

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, set. 1998b. 8p.

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

RAMALHO, M.; BATISTA, M.A. Polinização na Mata Atlântica: perspectiva ecológica da fragmentação. In: FRANKE, C.R. et al. **Mata Atlântica e biodiversidade**, Salvador: EDUFBA, 2005, p. 93-142.

ROSSI, C. A. **Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de malpighi de *Apis mellifera* africanizada**. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

SCHMUCK R. et al. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Manag Sci.**, v.57, n.3, p.225–238, 2001.

SCHMUCK, R.; NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U. Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honeybee: toxicological and biochemical considerations. **Bulletin of Insectology**, v.66, n.1, p.27-34, 2003.

SILVA, F. M.; GARCIA, M. V. B.; GARCIA, T. B. Efeito de pesticidas aos polinizadores do guaranazeiro: avaliação da toxicidade aguda de inseticidas às abelhas (Hymenoptera: Apidae). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, n. III, 2008, Manaus. **Anais...** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

SOARES, H. M. et al. Toxicity of Imidacloprid to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bull Environ Contam Toxicol.**, 2015.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Manag Sci.**, v.60, n.3, p.291-296, 2003.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. **Environ Toxicol Chem.**, v.19, n.7, p.1901-1905, 2000.

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

VIANA, B. F. **Aspectos morfológicos:** *Melipona scutellaris*. Disponível em: <<http://www.qualibio.ufba.br/063.html>.> Acesso em: 18 ago. 2014.

5. Capítulo 3

Determinação do tempo letal médio (TL₅₀) dos inseticidas fipronil e imidacloprido, isolados e de forma associada, para a abelha nativa *Melipona scutellaris*, Latreille (Hymenoptera: Apidae)

L. M. da COSTA; T. C. GRELLA; R. A. BASBOSA; O. MALASPINA; R. C. F. NOCELLI

Resumo

A população de abelhas está diminuindo e os inseticidas, dentre eles o fipronil e o imidacloprido, têm sido apontados como principais causadores. No Brasil, as abelhas sem ferrão também acabam sofrendo os efeitos da exposição a essas substâncias, sendo que as abelhas nativas, como a *Melipona scutellaris*, são mais sensíveis aos inseticidas que a *Apis mellifera*. O fipronil e o imidacloprido agem no sistema nervoso do inseto, porém de maneiras distintas, provocando hiperexcitação e morte. Por isso, é de extrema importância conhecer os efeitos fisiológicos e comportamentais desses inseticidas em doses subletais nas abelhas. O fipronil e o imidacloprido podem agir tanto de forma isolada quanto combinados, uma vez que as abelhas realizam o forrageamento em áreas pulverizadas com uma das moléculas ou ambas. Além disso, a toxicidade de várias substâncias depende também do tempo de exposição. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo determinar o tempo letal médio do fipronil e do imidacloprido, isoladamente e de forma associada, quando as abelhas *M. scutellaris* são expostas a DL₅₀ e a CL₅₀, bem como as suas respectivas doses e concentrações subletais. Para isso, os testes foram realizados de acordo com as normas da OECD (1998a, 1998b). Os resultados obtidos indicam que o imidacloprido é capaz de matar as abelhas contaminadas em um tempo menor que o fipronil. Observou-se também que a TL₅₀ da combinação entre o fipronil e o imidacloprido, tanto em contaminação via tópica como via oral, apresentou valores intermediários entre a TL₅₀ do fipronil e do imidacloprido isolados. Isso também ocorreu para as doses e concentrações subletais. Por isso, pode-se inferir que não ocorreu sinergismo entre essas moléculas, já que a combinação entre os dois inseticidas não ocasionou a mortalidade das abelhas mais rapidamente.

Palavras-chave: abelha nativa, fenilpirazol, neonicotinóide, TL₅₀

1. Introdução

A população de abelhas está diminuindo em escala global e os agrotóxicos são apontados como principais contribuintes para as reduções desses insetos (POTTS et al., 2010). No Brasil, as abelhas sem ferrão também são contaminadas com inseticidas e acabam sofrendo os efeitos dessa exposição. Alguns trabalhos com as abelhas nativas *Melipona*

scutellaris (LOURENÇO et al., 2012a; LOURENÇO et al., 2012b) e *Scaptotrigona postica* (JACOB et al., 2013; SOARES et al., 2015) relatam que essas espécies são altamente sensíveis aos inseticidas fipronil e imidacloprido em relação a *Apis mellifera* e por isso necessitam de mais estudos.

Tanto o fipronil quanto o imidacloprido, desde que foram lançados no mercado em meados de 1990, têm sido apontados como as principais substâncias envolvidas no colapso das colônias (ALIOUANE et al., 2009; MOMMAERTS et al., 2010; BLACQUIÈRE et al., 2012; GOULSON, 2013).

O fipronil pertence ao grupo químico fenilpirazol. É utilizado nas culturas de batata, cana-de-açúcar, milho, algodão, arroz, eucalipto, soja, trigo, feijão, cevada e é empregado no controle de formigas e cupins (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2003).

Esse inseticida age sobre o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), bloqueando os canais de cloro. Dessa forma, não há inibição normal do impulso nervoso causando hiperexcitação, paralisia e morte do inseto (CONNELY, 2001; NPIC, 2009). Segundo Chauzat et al. (2011), o fipronil é altamente tóxico para as abelhas *Apis mellifera* e já foi apontado como uma possível causa da mortalidade aguda desses insetos, por isso tem sido dada atenção especial a esse inseticida e seus resíduos, pois ainda há pouca informação disponível sobre os níveis de fipronil e seus metabólitos para abelhas em campo.

Outro inseticida bastante utilizado na agricultura e muito tóxico para as abelhas é o imidacloprido, pertencente ao grupo químico dos neonicotinóides, que são derivados sintéticos da nicotina, um composto alcalóide encontrado nas folhas de diversas plantas além do tabaco (NPIC, 2010). O imidacloprido é utilizado nas culturas de abacaxi, abóbora, abobrinha, alface, algodão, alho, almeirão, batata, berinjela, brócolis, cana-de-açúcar, café, fumo, uva, amendoim, arroz, aveia, cevada, feijão, milho, soja, trigo, cebola, chicória, citros, couve, couve-flor, crisântemo, gérbera, girassol, jiló, melancia, melão, pepino, pimentão, repolho, soja, sorgo e tomate (MAPA, 2003).

Os neonicotinóides são agonistas da acetilcolina e ligam-se aos receptores nicotínicos desse neurotransmissor que estão localizados nos neurônios pós-sinápticos. Os neonicotinóides, ao invés de serem hidrolisados pela acetilcolinesterase, como ocorre com a acetilcolina, não são degradados imediatamente. Dessa forma, os impulsos nervosos são transmitidos de forma contínua e levam a hiperexcitação do sistema nervoso do inseto (BUCKINGHAM et al., 1997; GALLO et al., 2002; SUCHAIL, DEBRAUWER e BELZUNCES, 2003).

Apesar da toxicidade dos fenilpirazóis e dos neonicotinóides ser bem estudada e documentada em diversos organismos terrestres e aquáticos, pouco se sabe sobre os efeitos fisiológicos e comportamentais em doses subletais desses inseticidas nas abelhas (PEREIRA, 2010).

Em alguns casos, as abelhas são suscetíveis à exposição a diferentes grupos de produtos químicos, já que, em uma mesma cultura pode haver diversas aplicações seguidas umas às outras de diferentes tipos de inseticidas. Podem ser aplicadas concomitantemente, ou ainda as abelhas podem visitar mais de uma cultura nas quais houve a pulverização de inseticidas pertencentes a distintos grupos. A presença simultânea de mais de um produto leva a interações entre substâncias que podem mudar drasticamente a natureza e a importância dos efeitos observados (BELZUNCES, TCHAMITCHIAN e BRUNET, 2012).

Um fator importante da mistura de agrotóxicos é que podem ocorrer interações complexas, tais como o sinérgico (o efeito final é maior que a soma dos efeitos individuais), o antagônico (o efeito final é menor que a soma dos efeitos individuais) e o aditivo (o efeito final é igual à soma dos efeitos produzidos separadamente). Há poucos estudos sobre os efeitos combinados dessas substâncias nas abelhas, mas em alguns casos, principalmente em relação aos inseticidas, têm sido relatados que a toxicidade aumenta em até 100 vezes (THOMPSON, 1996; PAOLIELLO e SILVA, 2004).

Estudo realizado por Sanchez-Bayo e Goka (2014), com abelhas *Apis mellifera* e *Bombus* spp., indicou que o sinergismo do fungicida inibidor de ergosterol com os inseticidas das classes piretróides e neonicotinóides resulta em riscos muito elevados. A ingestão de pólen e mel contaminados requer maior preocupação com inseticidas sistêmicos, particularmente o imidacloprido, tiametoxam, clorpirifós e as misturas de cialotrina e o fungicida inibidor de ergosterol. Dessa forma, as combinações dessas substâncias necessitam de maior atenção já que podem resultar em toxicidade sinérgica para as abelhas.

O entendimento dos mecanismos de interação entre inseticidas é muito importante para a restrição do uso de misturas definidas e também para a previsão de potencial toxicidade das substâncias desenvolvidas para as abelhas (GLAVAN e BOŽIČ, 2013).

A toxicidade de várias substâncias, inclusive dos agrotóxicos, depende também do tempo de exposição. Alguns xenobióticos, como os inseticidas, permanecem certo tempo no organismo do animal, mesmo que em baixas doses, e por isso podem ocasionar acúmulo da substância em níveis que são suficientes para acarretar efeitos tóxicos (CHASIN e AZEVEDO, 2003). Além disso, moléculas que tem um tempo letal médio alto podem ser mais perigosas uma vez que, não matando a abelha rapidamente, permite que esta volte a

colônia, amplificando a contaminação. Dessa forma é necessário determinar o tempo letal médio do fipronil e do imidacloprido, isoladamente e de forma associada, quando as abelhas *M. scutellaris* são expostas a DL₅₀ e a CL₅₀, bem como as suas respectivas doses e concentrações subletais (DL_{50/10}, DL_{50/100}, CL_{50/10} e CL_{50/100}).

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das abelhas

As abelhas utilizadas consistiram de operárias adultas (forrageiras) de *Melipona scutellaris* que foram coletadas no meliponário do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Rio Claro. Foram utilizadas abelhas operárias de três colônias diferentes para garantir a variabilidade genética. Cada grupo experimental foi formado por três repetições, com dez abelhas de cada colônia por gaiola, totalizando 30 abelhas por grupo experimental. As colônias escolhidas apresentaram condições fisiológicas normais, livre de doenças e uma rainha em franca postura. Os testes foram realizados nos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

2.2. Determinação do tempo letal médio

Os procedimentos para a determinação da TL₅₀ seguiram o protocolo da OECD (1998a, 1998b).

2.2.1 Determinação da TL₅₀ baseado na DL₅₀

Para preparar as doses a serem aplicadas nas abelhas, foram feitas diversas diluições dos inseticidas em acetona, separadamente. Foram preparadas duas cascatas de diluição, uma para o fipronil e outra para o imidacloprido, sendo que estas iniciaram nas respectivas DL₅₀ estabelecidas, 0,41 ng i.a./μL (DL₅₀ do fipronil para *Melipona scutellaris* estabelecida por Lourenço et al., 2012a) e 1,29 ng i.a./μL (DL₅₀ do imidacloprido para *Melipona scutellaris* estabelecida no capítulo anterior¹), e as concentrações foram diminuídas em 10 e 100 vezes para obter as sub-doses de ambos inseticidas.

2.2.1.1 Determinação da TL₅₀ baseada na DL₅₀ dos inseticidas fipronil e imidacloprido utilizados isoladamente

Para determinar a TL₅₀ baseada na dose letal média e nas sub-doses, as abelhas receberam aplicação tópica de 1μL de solução para cada um dos ingredientes ativos avaliados. As doses do fipronil aplicadas nas abelhas foram: 0,0041 ng i.a./μL (DL_{50/100}); 0,041 ng i.a./μL (DL_{50/10}) e 0,41 ng i.a./μL (DL₅₀). Para o imidacloprido, as doses aplicadas foram:

¹DL₅₀ do imidacloprido para *Melipona scutellaris* estabelecida neste trabalho, no Capítulo 2.

0,0129 ng i.a./ μL ($\text{DL}_{50/100}$); 0,129 ng i.a./ μL ($\text{DL}_{50/10}$) e 1,29 ng i.a./ μL (DL_{50}). O grupo controle não recebeu aplicação e o grupo controle solvente recebeu apenas acetona.

2.2.1.2 Determinação da TL_{50} baseada na DL_{50} dos inseticidas fipronil e imidacloprido utilizados de forma associada

Para estabelecer a TL_{50} da mistura entre fipronil+imidacloprido baseado na dose letal média desses inseticidas, foi aplicado no dorso das abelhas 1 μL de cada uma das substâncias testadas (Tabela 2). No grupo controle solvente foi aplicado somente acetona.

Após as aplicações, as abelhas foram acondicionadas em potes plásticos de 250 mL no qual havia um microtubo (tipo *ependorf*) contendo alimento (água e açúcar cristal 1:1 v/v) sem contaminação.

Tabela 2: Doses de fipronil e imidacloprido aplicadas nas abelhas.

	Fipronil (ng i.a./μL)	+	Imidacloprido (ng i.a./μL)
$\text{DL}_{50/100}$	0,0041	+	0,0129
$\text{DL}_{50/10}$	0,041	+	0,129
DL_{50}	0,41	+	1,29

Fonte: Própria do autor.

2.2.2 Determinação da TL_{50} baseado na CL_{50}

Para preparar as concentrações a serem oferecidas às abelhas, foram feitas diversas diluições dos inseticidas em alimento (água e açúcar cristal 1:1 v/v), separadamente. Foram preparadas duas cascatas de diluição, uma para o fipronil e outra para o imidacloprido, sendo que estas iniciaram nas respectivas CL_{50} estabelecidas, 0,011 ng i.a./ μL de dieta (CL_{50} estabelecida por Lourenço et al., 2012b) e 0,81 ng i.a./ μL de dieta (CL_{50} do imidacloprido para *Melipona scutellaris* estabelecida no capítulo anterior²), e as concentrações foram diminuídas em 10 e 100 vezes para obter as sub-concentrações de ambos inseticidas.

2.2.2.1 Determinação da TL_{50} baseada na CL_{50} dos inseticidas fipronil e imidacloprido utilizados isoladamente

Para determinar a TL_{50} baseada na concentração letal média e nas sub-concentrações, as abelhas receberam alimento contaminado com os ingredientes ativos nas concentrações estabelecidas. As concentrações de alimento contaminado com fipronil que as abelhas receberam foram: 0,00011 ng i.a./ μL de dieta ($\text{CL}_{50/100}$); 0,0011 ng i.a./ μL de dieta ($\text{CL}_{50/10}$) e 0,011 ng i.a./ μL de dieta (CL_{50}). As concentrações de alimento contaminado com

² CL_{50} do imidacloprido para *Melipona scutellaris* estabelecida neste trabalho, no Capítulo 2.

imidacloprido que as abelhas receberam foram: 0,0081 ng i.a./ μL de dieta ($\text{CL}_{50/100}$); 0,081 ng i.a./ μL de dieta ($\text{CL}_{50/10}$) e 0,81 ng i.a./ μL de dieta (CL_{50}). No grupo controle foi oferecido somente alimento sem contaminação.

2.2.2.2 Determinação da TL_{50} baseada na CL_{50} dos inseticidas fipronil e imidacloprido utilizados de forma associada

Para estabelecer a TL_{50} da mistura entre fipronil+imidacloprido baseado na concentração letal média desses inseticidas, as abelhas receberam alimento contaminado pelas duas substâncias juntas (Tabela 3). No grupo controle foi oferecido somente alimento sem contaminação.

As abelhas ficaram acondicionadas em potes plásticos com volume de 250 mL perfurados na região da tampa para que ocorra circulação de ar.

Tabela 3: Concentrações de fipronil (volume de 500 μL) e imidacloprido (volume de 500 μL) que foram adicionadas ao alimento.

	Fipronil (ng i.a./ μL de dieta) 500 μL	+	Imidacloprido (ng i.a./ μL de dieta) 500 μL
$\text{CL}_{50/100}$	0,00011	+	0,0081
$\text{CL}_{50/10}$	0,0011	+	0,081
CL_{50}	0,011	+	0,81

Fonte: Própria do autor.

2.3. Análise estatística

Os testes foram conduzidos em estufa incubadora (B.O.D.) com temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ e com $70\% \pm 5$ de umidade relativa. As abelhas mortas foram contabilizadas a cada 24 horas até todos os indivíduos morrerem, inclusive os do grupo controle. Os dados foram submetidos à análise estatística de sobrevivência (Log-Rank) utilizando o programa SigmaPlot (SYSTAT, 2008).

3. Resultados e Discussão

Os valores obtidos de TL_{50} baseados na DL_{50} tópica, e nas sub-doses, do fipronil foram: 94,4 horas (DL_{50}), 148 horas ($\text{DL}_{50/10}$) e 143,2 horas ($\text{DL}_{50/100}$) (Tabela 4 e Figura 4). Para o imidacloprido, os valores encontrados foram: 41,6 horas (DL_{50}), 104 horas ($\text{DL}_{50/10}$) e 83,2 horas ($\text{DL}_{50/100}$) (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4: Valores obtidos de TL_{50} , para a *M. scutellaris*, baseados na DL_{50} tópica e nas sub-doses dos inseticidas fipronil e imidacloprido.

Inseticidas	TL_{50} (horas)	I.C. _{95%}	$TL_{50/10}$ (horas)	I.C. _{95%}	$TL_{50/100}$ (horas)	I.C. _{95%}
Fipronil	94,4	82,3-106,5	148,0	121,9-174,0	143,2	113,3-173,1
Imidacloprido	41,6	11,9-71,3	104	73,0-134,9	83,2	60,9-105,5

(DL_{50}) dose letal média; (I.C._{95%}) intervalo de confiança 95%.

Figura 4: Análise de sobrevivência das abelhas *M. scutellaris* contaminadas pela DL_{50} tópica do fipronil.

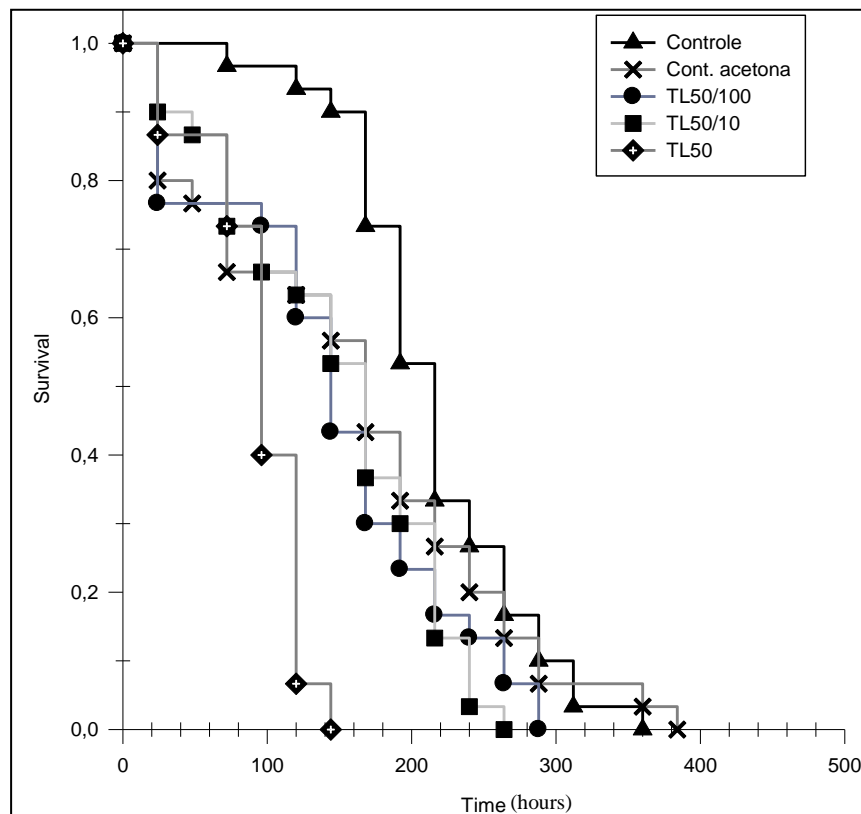
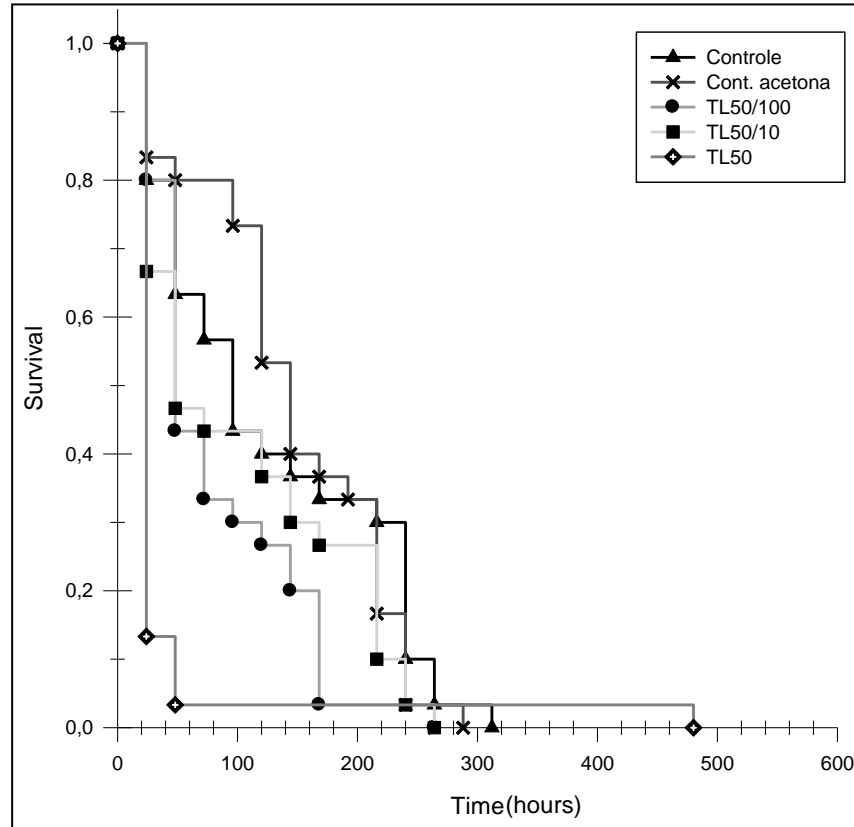


Figura 5: Análise de sobrevivência das abelhas *M. scutellaris* contaminadas pela DL₅₀ tópica do imidacloprido.



Os valores obtidos de TL₅₀ baseada na CL₅₀ oral, e nas sub-concentrações, do fipronil foram: 78,4 horas (TL₅₀), 104,8 horas (TL_{50/10}) e 107,2 horas (TL_{50/100}) (Tabela 5 e Figura 6). Para o imidacloprido, os valores encontrados foram: 42,4 horas (CL₅₀), 62,4 horas (CL_{50/10}) e 204,8 horas (CL_{50/100}) (Tabela 5 e Figura 7).

Tabela 5: Valores obtidos de TL₅₀, para a *M. scutellaris*, baseados na CL₅₀ oral e nas sub-concentrações dos inseticidas fipronil e imidacloprido.

Inseticidas	CL ₅₀ (horas)	I.C. _{95%}	CL _{50/10} (horas)	I.C. _{95%}	CL _{50/100} (horas)	I.C. _{95%}
Fipronil	78,4	70,6-86,2	104,8	96,8-112,8	107,2	98,2-116,1
Imidacloprido	42,4	35,4-49,4	62,4	51,9-72,9	204,8	147,9-261,7

(CL₅₀) concentração letal média; (I.C._{95%}) intervalo de confiança 95%.

Figura 6: Análise de sobrevivência das abelhas *M. scutellaris* contaminadas pela CL₅₀ oral do fipronil.

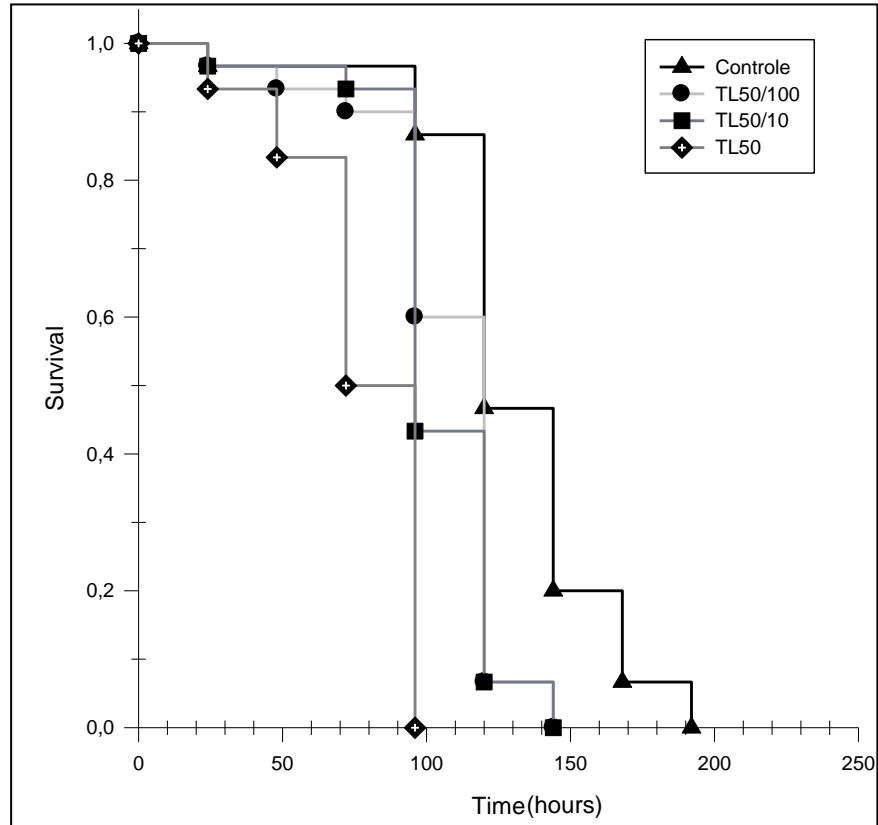
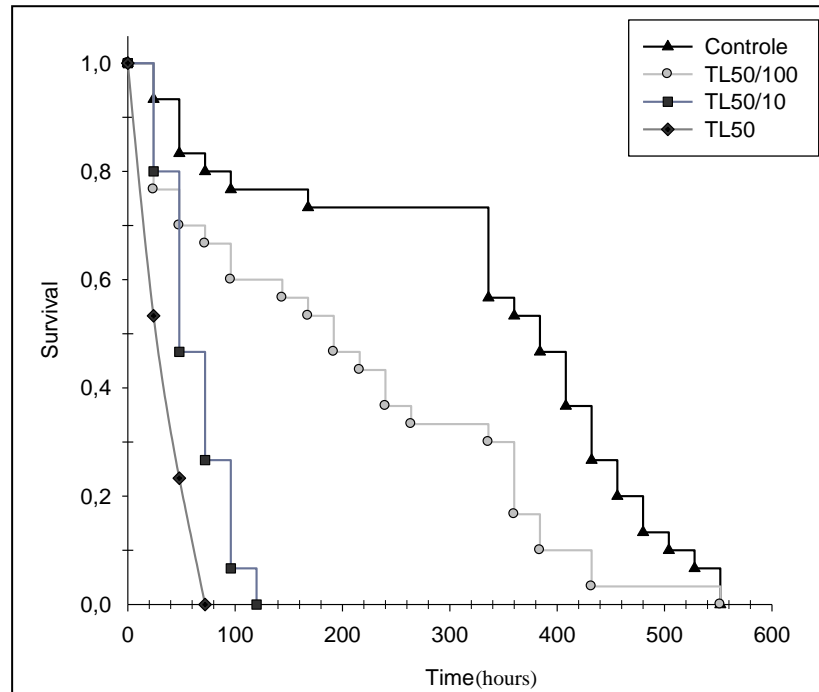


Figura 7: Análise de sobrevivência das abelhas *M. scutellaris* contaminadas pela CL_{50} oral do imidacloprido.



Esses dados mostram que o inseticida imidacloprido, mesmo apresentando DL_{50} e CL_{50} maior que a do fipronil, ou seja, é menos tóxico para as abelhas *M. scutellaris*, possui TL_{50} menor (exceto para a $TL_{50/100}$ baseado na CL_{50}). Isso indica que o imidacloprido é capaz de matar as abelhas contaminadas em um tempo menor que o fipronil.

A mortalidade, após 24 horas de início do teste da TL_{50} , foi de 86% das abelhas contaminadas topicamente pela DL_{50} do imidacloprido, enquanto que, para a contaminação tópica pela DL_{50} do fipronil, foi de 13%. O mesmo acontece para a contaminação via oral pela concentração letal. A mortalidade das abelhas contaminadas pelo imidacloprido, após 24 horas, foi de 46% e pelo fipronil, foi de 6%.

Suchail, Debrauwer e Belzunces (2003) realizaram um estudo com *Apis mellifera* sendo tratadas via oral com imidacloprido em dose única de 20 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de abelha. Os autores identificaram que a meia-vida desse inseticida no organismo das abelhas foi de 5 horas, sendo o composto metabolizado rapidamente em 5-hidroxiimidacloprido e olefina. Esses autores verificaram que 5-hidroxiimidacloprido e olefina apresentam toxicidade aguda próxima ao imidacloprido, sendo a olefina mais tóxica que 5-hidroxiimidacloprido. Para eles, a mortalidade de *A. mellifera* foi devido ao aumento desses metabólitos em comparação com imidacloprido original que diminuiu com o tempo, e foi relacionada com os sintomas iniciais de neurotoxicidade. Esse trabalho corrobora com o estudo realizado por Suchail, Guez e

Belzunces (2001) que estabelece a DL_{50} dos metabólitos do imidacloprido (5-hidroxiimidacloprido, 4,5-dihidroxiimidacloprido, desnitro imidacloprido, ácido 6-cloronicotínico, olefina e derivado de ureia). Apenas o 5-hidroxiimidacloprido e a olefina apresentaram DL_{50} próxima ao do imidacloprido para *A. mellifera*, que foram de 258 ng/abelha (48 horas), 28 ng/abelha (48 horas) e 60 ng/abelha (48 horas), respectivamente.

Nauen et al. (1998, 1999), demonstraram que a olefina é 16 vezes mais ativa que o imidacloprido, quando administrada via oral, para as espécies *Myzus persicae* (pulgão do pêssogo) e *Aphis gossypii* (pulgão do algodoeiro), além de ser mais ativa também para a mosca branca de algodão (*Bemisia tabaci*).

Dessa forma, a elevada toxicidade de 5-hidroxiimidacloprido e, principalmente, da olefina podem contribuir com a rápida mortalidade de *M. scutellaris*, em relação ao fipronil.

Diferentemente do que ocorre com as abelhas contaminadas pelo imidacloprido, aquelas que receberam fipronil, demoraram mais tempo para apresentar sintomas de intoxicação e morte. Esse fator pode ser ocasionado devido a penetração mais lenta do fipronil no tegumento do inseto e da ação tardia de seus metabólitos (DURHAM, SIEGFRIED e SCHARF, 2002). Pelo fato do fipronil ser mais lento para matar as abelhas, uma vez contaminadas durante o forrageamento, esses insetos retornam a colônia transportando o inseticida e amplificando a contaminação. Por outro lado, a rápida mortalidade ocasionada pelo imidacloprido faz com que as abelhas muitas vezes não consigam retornar à colônia e dessa forma, evitam contaminar outras abelhas com o inseticida. Porém, ocorre a diminuição do número de abelhas forrageiras, o que também pode comprometer o funcionamento da colônia.

Estudo realizado por Aliouane et al. (2009) com *A. mellifera* contaminada via tópica e oral com fipronil, verificou que na dose de 0,1 ng/abelha os indivíduos morreram após 7 dias do início do tratamento. Comparando com esse estudo, *M. scutellaris* teve 100% de mortalidade no 12º dia, contaminadas topicamente, e no 6º dia, contaminadas via oral com o fipronil.

Segundo Zhao et al. (2005), tanto o fipronil quanto seu metabólito sulfona, facilmente formado, bloqueiam os canais de cloro-glutamato (GluCl_s) no sistema nervoso central dos insetos, causando hiperexcitação e morte. Fang et al. (2008), estudando a susceptibilidade ao fipronil de duas espécies de larvas (*Chilo suppressalis* e *Sesamia inferens*) que atacam o arroz, observaram que a toxicidade da sulfona e do sulfeto foram maiores do que a do fipronil. Dessa forma, os metabólitos do fipronil também apresentam toxicidade para os insetos, assim como os metabólitos do imidacloprido.

O fipronil e o imidacloprido também podem agir de forma combinada nas abelhas devido a exposição do inseto a ambos inseticidas. Dessa maneira, os valores obtidos de TL₅₀ baseado na DL₅₀ tópica, e nas sub-doses, para a combinação entre o fipronil e o imidacloprido, foram: 60,8 horas (DL₅₀), 116,8 horas (DL_{50/10}) e 156,8 horas (DL_{50/100}) (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 6: Valores obtidos de TL₅₀, para a *M. scutellaris*, baseados na DL₅₀ tópica e nas sub-doses dos inseticidas fipronil e imidacloprido de forma combinada.

Inseticidas	DL₅₀ (horas)	I.C._{95%}	DL_{50/10} (horas)	I.C._{95%}	DL_{50/100} (horas)	I.C._{95%}
Fipronil + Imidacloprido	60,8	41,6-80,0	116,8	83,5-150,0	156,8	115,4-198,2

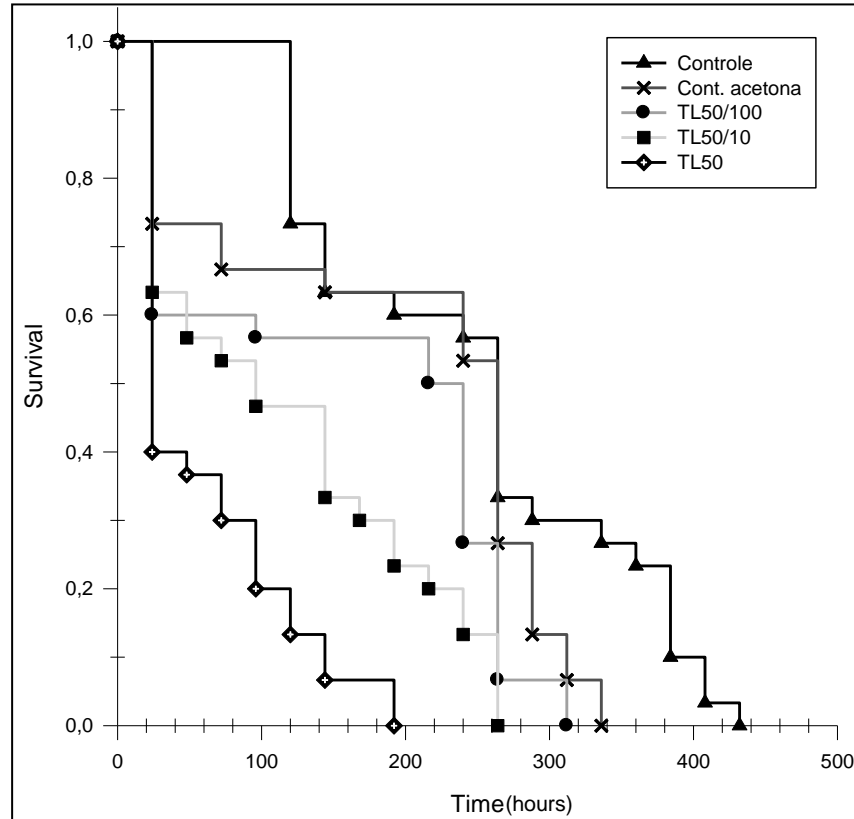
(DL₅₀) dose letal média; (I.C._{95%}) intervalo de confiança 95%.

Tabela 7: Comparação entre os valores obtidos de TL₅₀, para a *M. scutellaris*, baseados na DL₅₀ tópica dos inseticidas fipronil e imidacloprido isolados e associados.

Inseticidas	DL₅₀ (horas)	I.C._{95%}	DL_{50/10} (horas)	I.C._{95%}	DL_{50/100} (horas)	I.C._{95%}
Fipronil	94,4	82,3-106,5	148,0	121,9-174,0	143,2	113,3-173,1
Imidacloprido	41,6	11,9-71,3	104	73,0-134,9	83,2	60,9-105,5
Fipronil + Imidacloprido	60,8	41,6-80,0	116,8	83,5-150,0	156,8	115,4-198,2

(DL₅₀) dose letal média; (I.C._{95%}) intervalo de confiança 95%.

Figura 8: Análise de sobrevivência das abelhas *M. scutellaris* contaminadas pela DL₅₀ tóxica do fipronil e do imidacloprido simultaneamente.



Para a combinação entre o fipronil e o imidacloprido, os valores de TL₅₀ baseado na CL₅₀ oral, e nas sub-concentrações, foram: 60,8 horas (CL₅₀), 124,8 horas (CL_{50/10}) e 168,8 horas (CL_{50/100}) (Tabela 8 e Figura 9).

Tabela 8: Valores obtidos de TL₅₀, para a *M. scutellaris*, baseados na CL₅₀ oral e nas sub-concentrações dos inseticidas fipronil e imidacloprido de forma combinada.

Inseticidas	CL ₅₀ (horas)	I.C. _{95%}	CL _{50/10} (horas)	I.C. _{95%}	CL _{50/100} (horas)	I.C. _{95%}
Fipronil + Imidacloprido	60,8	51,0-70,6	124,8	100,4-149,2	168,8	152,0-185,6

(CL₅₀) concentração letal média; (I.C._{95%}) intervalo de confiança 95%.

Tabela 9: Comparação entre os valores obtidos de TL_{50} , para a *M. scutellaris*, baseados na CL_{50} tópica dos inseticidas fipronil e imidacloprido isolados e associados.

Inseticidas	CL_{50} (horas)	I.C. _{95%}	$CL_{50/10}$ (horas)	I.C. _{95%}	$CL_{50/100}$ (horas)	I.C. _{95%}
Fipronil	78,4	70,6-86,2	104,8	96,8-112,8	107,2	98,2-116,1
Imidacloprido	42,4	35,4-49,4	62,4	51,9-72,9	204,8	147,9-261,7
Fipronil + Imidacloprido	60,8	51,0-70,6	124,8	100,4-149,2	168,8	152,0-185,6

(CL_{50}) concentração letal média; (I.C._{95%}) intervalo de confiança 95%.

Figura 9: Análise de sobrevivência das abelhas *M. scutellaris* contaminadas pela CL_{50} oral do fipronil e do imidacloprido simultaneamente.

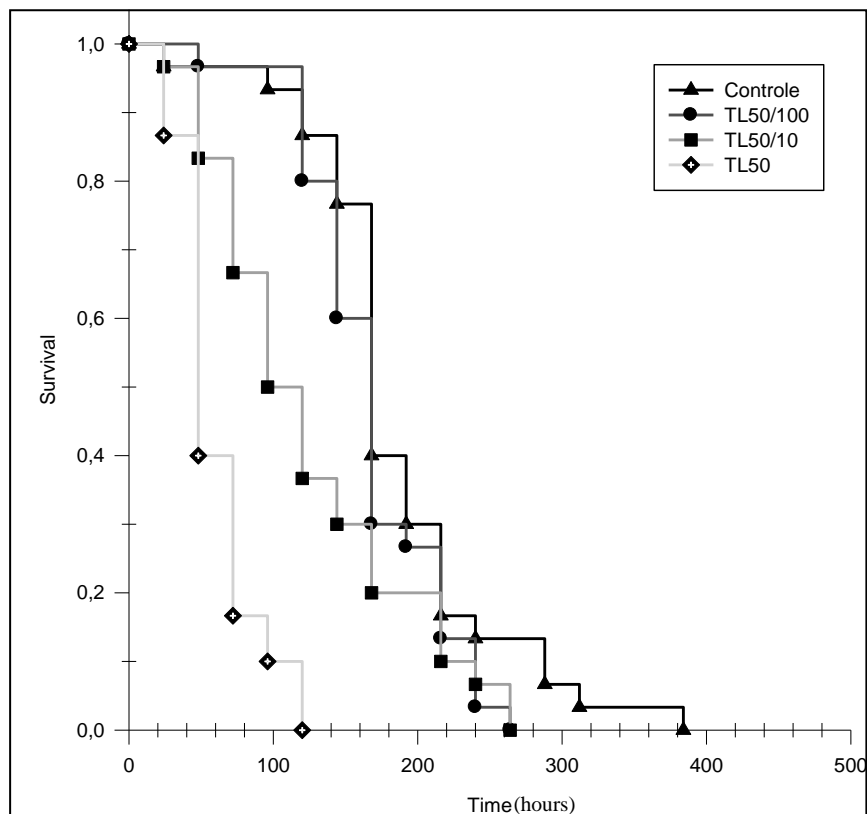


Tabela 10: Comparações múltiplas pareadas entre os tratamentos (método de Holm-Sidak) para a TL₅₀ baseada na contaminação tópica dos inseticidas fipronil e imidacloprido associados

	Controle	Controle acetona	DL _{50/100}	DL _{50/10}	DL ₅₀
Controle			*	*	*
Controle acetona				*	*
DL _{50/100}	*			*	*
DL _{50/10}	*	*	*		*
DL ₅₀	*	*	*	*	

*há diferença significativa estatística entre as curvas de sobrevivência (P<0,001).

Tabela 11: Comparações múltiplas pareadas entre os tratamentos (método de Holm-Sidak) para a TL₅₀ baseada na contaminação oral dos inseticidas fipronil e imidacloprido associados

	Controle	CL _{50/100}	CL _{50/10}	CL ₅₀
Controle			*	*
CL _{50/100}				*
CL _{50/10}	*			*
CL ₅₀	*	*	*	

*há diferença significativa estatística entre as curvas de sobrevivência (P = <0,001).

Esses dados mostram que, para a TL₅₀ dos inseticidas combinados, baseada na contaminação via tópica (Tabela 10), houve diferença significativa (P<0,001) entre todos os tratamentos. Em relação a TL₅₀, dos inseticidas combinados, baseada na contaminação via oral (Tabela 11), não houve diferença significativa (P>0,001) entre o controle e a dose sub-letal mais baixa (TL_{50/100}) e entre as duas sub-letais (TL_{50/10} e TL_{50/100}). Dessa maneira, tanto na contaminação tópica quanto na oral, houve diferença entre as doses/concentrações letais e o controle.

Por isso, pode-se inferir que não ocorreu sinergismo entre essas moléculas, já que a combinação entre os dois inseticidas não ocasionou a mortalidade das abelhas mais rapidamente. A ação conjunta do fipronil e do imidacloprido acelerou a mortalidade das abelhas em relação àquelas que foram submetidas apenas ao fipronil, e retardou a mortalidade daquelas que foram contaminadas pelo imidacloprido isolado.

Figura 10: Análise de sobrevivência das abelhas *M. scutellaris* comparando a TL₅₀, baseada na contaminação via tópica, do fipronil, imidacloprido e fipronil+imidacloprido.

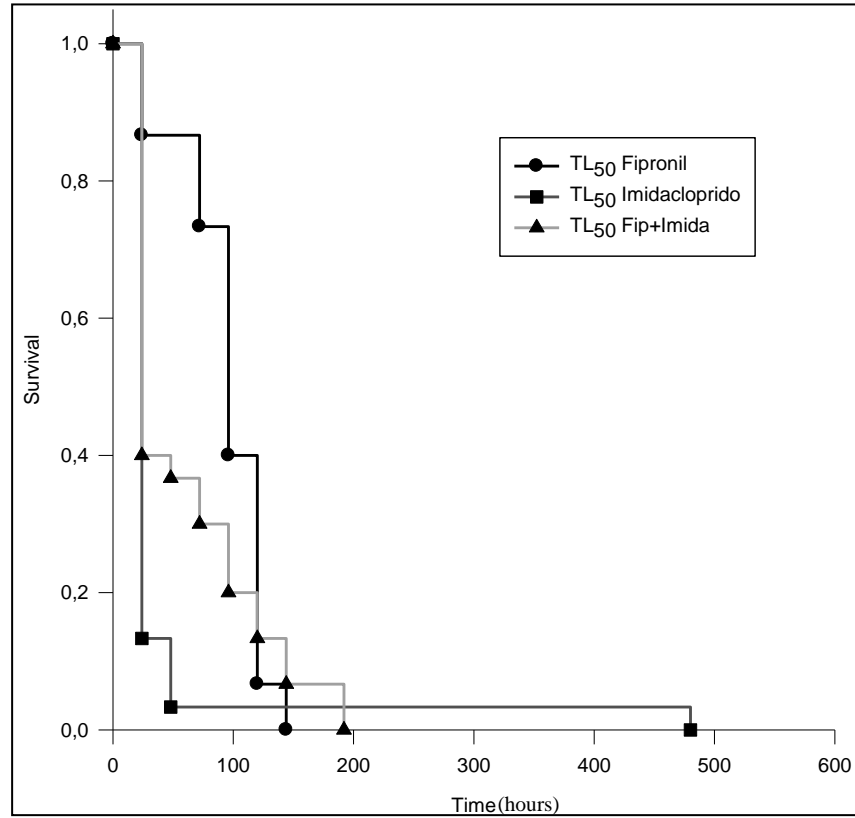
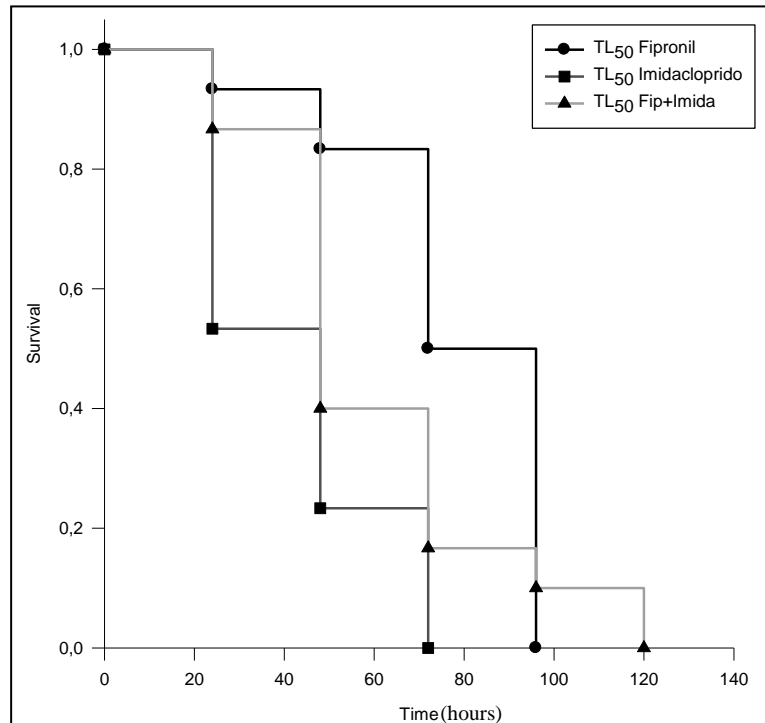


Figura 11: Análise de sobrevivência das abelhas *M. scutellaris* comparando a TL_{50} , baseada na contaminação via oral, do fipronil, imidacloprido e fipronil+imidacloprido.



Através das Figuras 10 e 11, observa-se que a TL_{50} da combinação entre o fipronil e o imidacloprido, tanto em contaminação via tópica ou via oral, apresenta valores intermediários entre a TL_{50} do fipronil e do imidacloprido. Isso também ocorre para as doses e concentrações subletais.

Tabela 12: Comparações múltiplas pareadas entre os tratamentos (método de Holm-Sidak) para a DL_{50} baseada na contaminação tópica dos inseticidas fipronil e imidacloprido isolados e associados

	DL_{50} fipronil	DL_{50} imidacloprido	DL_{50} fipronil+imidacloprido
DL_{50} fipronil		*	
DL_{50} imidacloprido	*		
DL_{50} fipronil+imidacloprido			

*há diferença significativa estatística entre as curvas de sobrevivência ($P = <0,001$).

Tabela 13: Comparações múltiplas pareadas entre os tratamentos (método de Holm-Sidak) para a TL_{50} baseada na contaminação oral dos inseticidas fipronil e imidacloprido isolados e associados

	CL ₅₀ fipronil	CL ₅₀ imidacloprido	CL ₅₀ fipronil+imidacloprido
CL ₅₀ fipronil		*	*
CL ₅₀ imidacloprido	*		*
CL ₅₀ fipronil+imidacloprido	*	*	

*há diferença significativa estatística entre as curvas de sobrevivência ($P = <0,001$).

As Tabelas 12 e 13 apresentam que há diferença significativa ($P=<0,001$) entre os três tratamentos baseados na contaminação oral (fipronil – 78,4 horas, imidacloprido – 42,4 horas e fipronil+imidacloprido – 60,8 horas). Em relação a contaminação tópica, houve diferença significativa apenas entre a TL_{50} dos inseticidas individuais (fipronil – 94,4 horas e imidacloprido – 41,6 horas), ou seja, entre a combinação dos compostos (fipronil+imidacloprido – 60,8 horas) e o fipronil/imidacloprido isolados não apresentou diferença.

Esses resultados diferiram daqueles encontrados na literatura, porém com outros compostos. Nasirian (2008), estudando o fipronil e o imidacloprido em isca gel contra uma espécie de barata, *Blattella germanica*, observou que esses inseticidas foram altamente efetivos no controle desse inseto, uma vez que a pulverização por inseticidas piretróides não foi eficaz. Nesse trabalho, a toxicidade dos inseticidas combinados foi alta, embora não tenha realizado testes com os compostos isolados. Johnson et al. (2013), estudando diversas associações entre acaricidas, fungicidas e compostos antimicrobianos em *Apis mellifera*, verificaram que ocorreu aumento de 5 vezes da toxicidade do tau-fluvalinato (piretróide) pelo amitraz, através da comparação entre a DL_{50} tópica das substâncias isoladas e das substâncias associadas. Interações entre formamidinas e piretróides são conhecidas em outros insetos e pode ser devido a sinergia no local alvo através de ligação cooperativa, ou por meio da inibição de desintoxicação do piretróide (LIU e PLAPP, 1992; USMANI, ABD-ELGHAFAR e KNOWLES, 1995).

Johnson et al. (2013) propuseram que as interações sinérgicas ocorrem quando os compostos possuem diferentes modos de ação, mas algumas experiências em insetos sugerem que o sinergismo é também possível para as substâncias que possuem o mesmo modo de ação, tais como sinapse colinérgica. Segundo Thompson (1996), o efeito sinérgico poderia ser

explicado pelo aumento da resposta no local quando as substâncias envolvidas têm alvos semelhantes. De acordo com esse autor, pode-se inferir que a combinação entre fipronil e imidacloprido não apresentou efeito sinérgico por possuírem modo de ação diferentes.

Moore et al. (2012), também estudaram o piretróide tau-fluvalinato, porém agindo junto com o butóxido de piperonilo (PBO), com o objetivo de verificar se essa mistura seria eficiente para controlar o besouro (*Meligethes aeneus*) e, concomitantemente, não causar efeitos adversos nas abelhas. Os autores concluíram que, em baixa concentração (100 ppm, ou seja, 1 ng/ μ L), o piretróide é capaz de controlar com eficiência o besouro e não prejudicar as abelhas, mesmo que utilizado junto com o PBO.

Em outros estudos, o fipronil e o imidacloprido não apresentaram toxicidade em combinações com outras substâncias. Min et al. (2014), realizaram estudo com nove inseticidas, dentre eles o imidacloprido e o fipronil, para selecionar compostos adequados que controlem a *Nilaparvata lugens* (praga do arroz). Os autores fizeram também a correlação entre os inseticidas. Os resultados obtidos por eles foram: baixa correlação entre os neonicotinóides, sugerindo a existência de mecanismos de resistência diferentes; nenhuma correlação entre o fipronil e os outros inseticidas, por isso, segundo os autores, o fipronil pode ser considerado inseticida ideal para controlar esse inseto.

Estudo realizado por Iwasa et al. (2004), utilizando *A. mellifera*, demonstrou que, quando as abelhas foram contaminadas topicamente pelo imidacloprido e por outros 3 inseticidas (PBO, triflumizol e propiconazol), não houve diferença significativa entre os tratamentos, ou seja, não ocorreu efeito sinérgico entre o imidacloprido e as outras substâncias.

Segundo Johnson et al. (2013), efeitos interativos entre compostos são observados quando a toxicidade de uma combinação de agrotóxicos é mais ou menos tóxico do que o esperado com base na toxicidade do componente mais tóxico. Sendo assim, esperava-se que o fipronil (inseticida mais tóxico para a *M. scutellaris* que o imidacloprido) aumentasse a toxicidade da outra substância. Porém, o fipronil retardou os efeitos do imidacloprido, provocando a morte das abelhas em um tempo maior do que se estivessem contaminadas apenas com o neonicotinóide.

4. Conclusão

Diante desses resultados, a combinação dos inseticidas fipronil e imidacloprido não apresentou efeito sinérgico para as abelhas *M. scutellaris*, porém adiantou o tempo de mortalidade em relação ao fipronil e retardou em relação ao imidacloprido quando comparado com os resultados da TL_{50} dos inseticidas isolados.

Se esses resultados também forem empregados para outros insetos, não seria viável a utilização do fipronil e do imidacloprido de forma combinada para controlar determinada praga, uma vez que não possuem ação sinérgica e, portanto, seria um investimento maior utilizar dois inseticidas ao invés de apenas um.

Em relação às abelhas, o fato de não ocorrer sinergismo entre o fipronil e o imidacloprido é algo positivo levando em consideração que, se esses insetos quando saem das colônias para o forrageamento são contaminadas com os inseticidas, elas morrem antes de retornar à colônia e com isso deixam de expandir a contaminação para os outros indivíduos. Porém isso também pode ser algo negativo, já que as colônias vão perder várias abelhas e dessa forma poderá ocorrer prejuízo nas atividades de manutenção da colônia e também na polinização, devido a baixa frequência desses polinizadores que visitam as flores.

Esses resultados são relevantes uma vez que na região do estado de São Paulo a utilização de fipronil e imidacloprido é expressiva principalmente na cultura de cana-de-açúcar e por ser um local onde a espécie *M. scutellaris* é bem adaptada. Dessa forma, a utilização dos inseticidas estudados pode influenciar a sobrevivência dessa espécie, já que são substâncias tóxicas tanto agindo de forma isoladas quanto de forma combinada.

5. Agradecimentos

Esse trabalho teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2013/20666-3) e suporte financeiro (Processo nº 2012/50197-2).

Referências Bibliográficas

ALIOUANE, Y. et al. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 113-122, 2009.

BELZUNCES, L. P.; TCHAMITCHIAN, S.; BRUNET, J. L. Neural effects of insecticides in the honey bee. **Apidologie**, França, n. 43, p. 348–370, 2012.

BLACQUIÈRE, T. et al. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 973-992, 2012.

BUCKINGHAM, S. D. et al. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 200, n. 21, p. 2685-2692, 1997.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: _____. (Coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. p. 127-163.

CHAUZAT, M. P. et al. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 30, n. 1, p. 103-111, 2011.

CONNELY, P. **Environmental fate of fipronil**. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, 17p., dez., 2001. Disponível em: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/enfate_archive/fipronil.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2014.

DURHAM, E. W.; SIEGFRIED, B. D.; SCHARF, M. E. *In vivo* and *in vitro* metabolism of fipronil by larvae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. **Pest Management Science**, v.58, p.799-804, 2002.

FANG, Q. et al. Differential Fipronil Susceptibility and Metabolism in Two Rice Stem Borers from China. **Journal of Economic Entomology**, v.101, n.4, p.1415-1420, 2008.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GLAVAN, G.; BOŽIČ, J. The synergy of xenobiotics in honey bee *Apis mellifera*: mechanisms and effects. **Acta Biologica Slovenica**, Liubliana, v.56, n.1, p.11-25, 2013.

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

IWASA, T. et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 371-378, 2004.

JACOB, C. R. O. et al. Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 90, p. 69–72, 2013.

JOHNSON, R. M. et al. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). **Plosone**, v.8, n.1, p.1-10, 2013.

LIU, M. Y.; PLAPP, F. W. Jr. Mechanism of formamidine synergism of pyrethroids. **Pestic Biochem Physiol**, v.43, p.134–140, 1992.

LOURENÇO, C. T. et al. Determination of fipronil LD₅₀ for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE ICP-BR BEE PROTECTION GROUP, 11., 2011, Wageningen. **Abstracts...** Wageningen: Julius-Kuhn-Archiv, 2012a, p. 174-178.

LOURENÇO, C. T. et al. Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bull Environ Contam Toxicol**, n. 89, p. 921–924, 2012b.

MIN, S. et al. Insecticide resistance monitoring and correlation analysis to select appropriate insecticides against *Nilaparvata lugens* (Stål), a migratory pest in Korea. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.17, p.711-716, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2003. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 23 jun. 2014.

MOMMAERTS, V. et al. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 207-215, 2010.

MOORES, G. D. et al. The effect of a piperonyl butoxide/taflumethoxymixture on pollen beetle (*Meligethes aeneus*) and honey bees (*Apis mellifera*). **Pest Manag Sci**, v.68, p.795-800, 2012.

NASIRIAN, H. Rapid Elimination of German Cockroach, *Blattella germanica*, by Fipronil and Imidacloprid Gel Baits. **Iranian J Arthropod-Borne Dis**, v.2, n.1, p.37-43, 2008.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Fipronil**: Technical fact sheet. 11p., jan. 2009. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>>. Acesso em 25 jun. 2014.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Imidacloprido**: Technical fact sheet. 14p., abr. 2010. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>>. Acesso em 25 jun. 2014.

NAUEN, R. et al. Efficacy of Plant Metabolites of Imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). **Pesticide Science**, v.52, p.53-57, 1998.

NAUEN, R. et al. Whitefly-active metabolites of imidacloprid: biological efficacy and translocation in cotton plants. **Pesticide Science**, v.55, p.265-271, 1999.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, n.214, set. 1998a. 7p.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 2, EFFECTS ON BIOTIC SYSTEMS. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, set. 1998b. 8p.

PAOLIELLO, M. M. B.; SILVA, E. S. Toxicodinâmica. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2004, p.93-114.

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

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

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

SOARES, H. M. et al. Toxicity of Imidacloprid to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bull Environ Contam Toxicol**, 2015.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 19, n. 7, p. 1901-1905, 2000.

SUCHAIL, S; DEBRAUWER, L; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, West Sussex, v.60, n.3, p. 291-296, mar. 2003.

SYSTAT **SigmaPlot**: programa de análise estatística. Versão 11.0.1. [S.l.]: Systat Software, 2008.

THOMPSON, H. M. Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. **Ecotoxicology**, v.5, p.59-81, 1996.

USMANI, A. K.; ABD-ELGHAFAR, S. F.; KNOWLES, C. O. Amitraz effect on the pharmacokinetics of permethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **J Econ Entomol**, v.88, p.1580–1585, 1995.

ZHAO, X. et al. Sulfone Metabolite of Fipronil Blocks γ -Aminobutyric Acid- and Glutamate-Activated Chloride Channels in Mammalian and Insect Neurons. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.314, n.1, p. 363–373, 2005.

7. Discussão Geral

Os resultados obtidos neste trabalho mostram, através da determinação da DL_{50} e da CL_{50} , que o inseticida imidacloprido é altamente tóxico para a abelha *Melipona scutellaris*. Essa espécie é mais sensível ao neonicotinóide do que a *Apis mellifera*. Esse resultado corrobora com outros estudos que demonstram a maior sensibilidade das abelhas nativas em relação a *A. mellifera* africanizada quando expostas ao imidacloprido e também ao fipronil (LOURENÇO et al., 2012a; LOURENÇO et al., 2012b; JACOB et al., 2013; SOARES et al., 2015) (Tabela 14).

Tabela 14: Comparação entre os valores de DL_{50} tóxico do fipronil e do imidacloprido para espécies de abelhas nativas e *Apis mellifera*

Espécies	Inseticida	DL ₅₀ da espécie	DL ₅₀ A.	Referência
		nativa (ng/abelha)	<i>mellifera</i> (ng/abelha)	
<i>Melipona scutellaris</i>	fipronil	0,41 (48 h)	4-12	LOURENÇO et al., 2012a
	imidacloprido	2,41 (24 h)	49-102	Dados próprios
		1,29 (48 h)	49-102	
<i>Scraptothrigona postica</i>	fipronil	0,54 (24 h)	4-12	JACOB et al., 2013
	imidacloprido	25,21 (24 h)	49-102	SOARES et al., 2015
		24,46 (48 h)	49-102	

Vários fatores interferem na toxicidade de inseticidas para os insetos, tais como, idade e fisiologia dos indivíduos, nutrição, doenças infecciosas, condições ambientais, entre outros (DECOURTYE et al., 2004; VIDAU et al., 2001).

Comparando os resultados obtidos para 24 horas com os obtidos para 48 horas, verifica-se que para 48 horas a toxicidade do imidacloprido é maior que para 24 horas. Segundo Soares (2012), quanto mais tempo a abelha permanece em contato com o inseticida menor a dose necessária para causar danos, uma vez que, a exposição constante impede seu organismo de se recuperar.

Além disso, observa-se que a *M. scutellaris* é mais sensível ao fipronil do que ao imidacloprido (LOURENÇO et al., 2012a; LOURENÇO et al., 2012b). PEREIRA (2010), estudando a toxicidade do fipronil para a *A. mellifera*, verificou que esse inseticida possui valor de DL₅₀ muito baixo, menor que o acetamiprido e o tiametoxam, ou seja, o fipronil é muito tóxico para as abelhas.

Essas substâncias, que em altas doses matam as abelhas, são muito tóxicas também em baixas concentrações, causando efeitos subletais, tais como: redução da movimentação e da mobilidade, diminuição da capacidade de comunicação e de aprendizagem, dificuldades de retorno à colônia, alterações no comportamento de forrageamento e na polinização, sendo que todos esses fatores podem prejudicar a manutenção da colônia (BORTOLLI et al., 2003; DECOURTYE et al., 2005).

Souza (2009) estudou os efeitos do inseticida fipronil no comportamento de locomoção, aprendizado olfatório e memória de abelhas *A. mellifera* tratadas topicamente com as doses 0,1; 0,5 e 1,0 ng/abelha. Ele observou que o grupo tratado com a maior dose de fipronil (1,0 ng/abelha) apresentou deficiência na locomoção das abelhas, aprendizado e memorização, sendo que para as menores doses (0,1 e 0,5 ng/abelha) as abelhas também mostraram alterações comportamentais, porém de forma menos acentuada.

El Hassani et al. (2005), que também estudou os efeitos do fipronil em *A. mellifera*, teve como resultado efeitos não lineares sobre o comportamento quando as abelhas foram submetidas a concentrações crescentes de fipronil. Para esses autores, o resultado obtido pode ser devido ao fato de que o fipronil afeta diferentes receptores com afinidades distintas para cada um deles. Sendo assim, a menor concentração de fipronil (0,1 ng/abelha) pode bloquear o primeiro receptor provocando efeitos comportamentais e, em seguida, a concentração mais alta (1,0 ng/abelha) poderia bloquear outro receptor que antagoniza os efeitos do primeiro. Outra possível explicação seria que este efeito não linear também poderia ser devido aos diferentes metabólitos do fipronil.

Em relação ao imidacloprido, Decourtye et al. (2004) relataram que esse inseticida reduziu a percepção olfativa e a atividade de voo em abelhas operárias de *A. mellifera* expostas a doses subletais.

Todas essas alterações influenciam no comportamento de forrageamento e, conseqüentemente, na polinização, alterando dessa maneira a manutenção das colônias, seja de *A. mellifera* ou de abelhas nativas.

No presente estudo, também foi realizado testes de TL₅₀ com os inseticidas fipronil e imidacloprido, utilizados de forma isolada e associados. O tempo letal médio obtido para o

fipronil foi maior que o valor encontrado para o imidacloprido, quando a TL_{50} foi baseada na contaminação tópica e oral. Isso significa que o inseticida neonicotinóide foi capaz de matar mais rapidamente as abelhas, mesmo sendo menos tóxico que o fipronil.

Uma possível explicação para isso seria que o imidacloprido, no organismo da abelha, possui a meia-vida de 5 horas, sendo o composto metabolizado rapidamente em 5-hidroxiimidacloprido e olefina (SUCHAIL, DEBRAUWER e BELZUNCES, 2003). De acordo com alguns autores (NAUEN et al., 1998; NAUEN et al., 1999; SUCHAIL, GUEZ e BELZUNCES, 2000), esses metabólitos podem ser mais tóxicos para os insetos do que o próprio imidacloprido. Sendo assim, a rápida metabolização acelerou a mortalidade da *M. scutellaris* devido a elevada toxicidade dos metabólitos do imidacloprido.

Em relação ao fato das abelhas contaminadas com o fipronil demorarem mais tempo para apresentar sintomas de intoxicação e morte, pode estar ligada a penetração mais lenta do fipronil no tegumento do inseto e da ação tardia de seus metabólitos (DURHAM, SIEGFRIED e SCHARF, 2002).

Sendo assim, as abelhas expostas ao fipronil durante o forrageamento retornam para a colônia transportando o inseticida e amplificando a contaminação. Por outro lado, a rápida mortalidade ocasionada pelo imidacloprido faz com que as abelhas muitas vezes não consigam retornar à colônia e dessa forma, evitam contaminar outras abelhas com o inseticida.

Quando os inseticidas fipronil e imidacloprido foram utilizados de forma associada era esperado que a TL_{50} apresentasse um baixo valor, já que os dois inseticidas são muito tóxicos para a *M. scutellaris*, dessa forma, o fipronil poderia potencializar o efeito do imidacloprido. A TL_{50} da combinação entre o fipronil e o imidacloprido, tanto em contaminação via tópica quanto via oral, apresentou valores intermediários entre a TL_{50} do fipronil e do imidacloprido, isolados. Então, de acordo com os valores obtidos, não ocorreu sinergismo e sim diminuição da toxicidade apresentada pelo imidacloprido.

Observou-se também, nesse trabalho, que quanto menor o valor de DL_{50} ou CL_{50} , ou seja, maior toxicidade do inseticida, menor o tempo necessário para ocasionar a mortalidade das abelhas. A TL_{50} baseada na DL_{50} e na CL_{50} , de ambos os inseticidas (isolados e associados), foi nitidamente menor (analisando as Figuras 4 a 9) que a TL_{50} baseada nas subdoses ($DL_{50/10}$ e $DL_{50/100}$) e sub-concentrações ($CL_{50/10}$ e $CL_{50/100}$).

Os inseticidas são metabolizados por várias reações enzimáticas diferentes que pode ser inibida ou induzida por outros compostos. A contaminação por dois ou mais compostos pode acarretar em alterações nas taxas de ativação e detoxificação dessas substâncias,

resultando em aumentos ou diminuições da toxicidade em função do equilíbrio das vias afetadas. Em muitos casos, a indução de enzimas tem sido observada por ser precedida pela inibição e por isso os efeitos podem ser dependentes do tempo (THOMPSON, 1996).

Dessa forma, a aceleração da morte das abelhas provocada pelo fipronil agindo junto com o imidacloprido, pode ser devido a inibição seguida de indução de enzimas que possivelmente aumenta a toxicidade do fipronil e diminui a do imidacloprido. Assim, se as abelhas não retornarem à colônia após o forrageamento, haverá menos indivíduos para manter os cuidados com a colônia e também para realizar a polinização, comprometendo, portanto, a produção agrícola e a manutenção da biodiversidade.

8. Conclusões Gerais

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

1. A DL_{50} tópica do imidacloprido para a abelha nativa *M. scutellaris* é de 2,41 ng i.a./abelha (24 horas) e 1,29 ng i.a./abelha (48 horas).
2. A CL_{50} oral, 2,01 ng i.a./ μ L de dieta (24 horas) e 0,81 ng i.a./ μ L de dieta (48 horas).
3. *Melipona scutellaris* é mais sensível que *Apis mellifera* africanizada independente da via de exposição.
4. A TL_{50} baseado na DL_{50} tópica, e nas sub-doses, do fipronil foram: 94,4 horas (DL_{50}), 148 horas ($DL_{50/10}$) e 143,2 horas ($DL_{50/100}$). Para o imidacloprido, foram: 41,6 horas (DL_{50}), 104 horas ($DL_{50/10}$) e 83,2 horas ($DL_{50/100}$).
5. A TL_{50} baseado na CL_{50} oral, e nas sub-concentrações, do fipronil foram: 78,4 horas (CL_{50}), 104,8 horas ($CL_{50/10}$) e 107,2 horas ($CL_{50/100}$). Para o imidacloprido, foram: 42,4 horas (CL_{50}), 62,4 horas ($CL_{50/10}$) e 204,8 horas ($CL_{50/100}$).
6. Para os inseticidas combinados, em exposição via tópica, as TL_{50} foram: 60,8 horas (DL_{50}), 116,8 horas ($DL_{50/10}$) e 156,8 horas ($DL_{50/100}$).
7. Para os inseticidas combinados, em exposição via oral, as TL_{50} foram: 60,8 horas (CL_{50}), 124,8 horas ($CL_{50/10}$) e 168,8 horas ($CL_{50/100}$).
8. Dessa forma, a combinação entre os inseticidas fipronil e imidacloprido não apresentou efeitos sinérgicos para as abelhas *M. scutellaris*.

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ – ADAPAR. **Fiscalização para coibir a deriva de agrotóxicos.** Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=46>>. Acesso em: 28 mai. 2015.

ALMEIDA, M. G. **Aspectos bionômicos, ecológicos e genéticos da abelha *Melipona scutellaris scutellaris* Latreille (1811).** 1974. 128 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1974.

ARMENGAUD, C.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M. Effects of imidacloprid on the neural processes of memory in honey bees. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. (Eds.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals.** London: Taylor e Francis, 2002. p. 85- 100.

BALLIVIÁN, J. M. P. P. (Org.) **Abelhas Nativas sem Ferrão – Myg Pe – Terra Indígena Guarita,** RS. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128p.

BARBOSA, L. C. A. Toxicidade dos agrotóxicos. In: BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o ambiente.** Viçosa: UFV, 2004. p. 95-124.

BORTOLLI, L. et al. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology,** Bologna, v.56, n.1, 63–67, 2003.

BYRNE, F. J. et al. Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. **Pest Manag Sci,** v.70, p. 470–482, 2013.

CAMPOS, L. A. O. et al. Abelhas – características e importância. **Informe Agropecuário,** v. 149, n. 13, p. 7-14, 1987.

CASTILHO, I. Onde estão as abelhas? **Revista Planeta,** 2012. Disponível em: <<http://revistaplaneta.terra.com.br/secao/reportagens/onde-estao-as-abelhas>>. Acesso em: 29 set. 2014.

DECOURTYE, A. et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v.57, p.410-419, 2004.

DECOURTYE, A. et al. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Arch Environ Contam Toxicol.,** v.48, p.242–250, 2005.

EARDLEY, C. et al. **Pollinators and pollination:** a resource book for policy and practice. 1.ed. Pretoria: Agricultural Research Council (ARC), 2006. 88 p.

EL HASSANI, A. K. et al. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** v.82, p.30-39, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **As abelhas e a polinização.** Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/polinizacao.php>>. Acesso em: 22 jun. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Polinizadores - cuestiones globales: biodiversidad.** 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/biodiversity/ecosystems/bio-pollinators/es/>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

FREITAS, B. M. et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, p. 332–346, 2009.

GIANNINI, T. C. et al. Qual poderá ser a distribuição geográfica de *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini) no futuro? In: Encontro sobre abelhas, 9., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FUNPEC, Universidade de São Paulo, 2010, p.457

GORDÓN, M. Á. R.; ATLÁNTICO, J. B.; ORNOSA, C. **Polinizadores y biodiversidad.** Disponível em: <<http://apolo.entomologica.es/index.php?d=polbiodiv>>. Acesso em: 20 jun. 2014

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CONTRERA, F. A. L.; KLEINERT, A. M. P. A Iniciativa Brasileira dos Polinizadores e a meliponicultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, n. XV e CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, n. I, 2004, Natal. **Anais...** Natal, 2004.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A. Abelhas sociais e flores: Análise polínica como método de estudo. In: AZOUBEL, M. L.; BEGO, L. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; GIANNINI, T. C.; GUIBU, L. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; KNOLL, F. R. N.; PIRANI, J. R.; RAMALHO, M.; SIMÃO-BIANCHINI, R.; SOUZA, V. C. **Flores e Abelhas em São Paulo.** São Paulo: Edusp, 1993. p. 17-30.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SANTOS, I. A. **Meliponineos.** Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/beetaxon/>>. Acesso em: 22 jun. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Efeito dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil.** Brasília, 2012. 88 p.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Espécies ameaçadas – Lista 2014. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>>. Acesso em: 24 abr. 2015.

IWASA, T. et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 371-378, 2004.

JACOB, C. R. O. et al. Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 90, p. 69–72, 2013.

- JOHNSON, R. Honey bee colony collapse disorder. **Congressional Research Service**, Washington, 20 p., jan, 2010.
- JOHNSON, R. M. et al. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). **Plosone**, v.8, n.1, p.1-10, 2013.
- KERR, W. E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, n. 12, p. 20-41, set. 2001.
- LEWIS, G.; THOMPSON, H.; SMAGGHE, G. Pesticides and honeybees – the work of the ICP-BR Bee Protection Group Editorial. **Pest Management Science**, Sussex, n. 63, p. 1047-1050, 2007.
- LOURENÇO, C. T. et al. Determination of fipronil LD₅₀ for the brazilian bee *Melipona scutellaris*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE ICP-BR BEE PROTECTION GROUP, 11., 2011, Wageningen. **Abstracts...** Wageningen: Julius-Kuhn-Archiv, 2012a, p. 174-178.
- LOURENÇO, C. T. et al. Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bull Environ Contam Toxicol**, n. 89, p. 921–924, 2012b.
- MALASPINA, O. et al. Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos. In: CONGRESSO DE APICULTURA, 18, CONGRESSO DE MELIPONICULTURA, 4, 2010, Cuiabá, **Anais...** Cuiabá, CD-ROM.
- MALASPINA, O. et al. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8., 2008, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FUNPEC, Universidade de São Paulo, 2008. p. 41–48.
- MICHENER, C. D. **The social behavior of bees**: a comparative study. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 1974. 404p.
- MIN, S. et al. Insecticide resistance monitoring and correlation analysis to select appropriate insecticides against *Nilaparvata lugens* (Stål), a migratory pest in Korea. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v.17, p.711-716, 2014.
- MOORES, G. D. et al. The effect of a piperonyl butoxide/tauflualinatemixture on pollen beetle (*Meligethes aeneus*) and honey bees (*Apis mellifera*). **Pest Manag Sci**, v.68, p.795-800, 2012.
- MOURE, J. M.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, Curitiba, **Sociedade Brasileira de Entomologia**. 2007.
- NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS SERVICE - NASS. 2008. **Honey**. Disponível em: <ww.nass.usda.gov.>. Acesso em: mar. 2015.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Fipronil**: Technical fact sheet. 11p., jan. 2009. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>>. Acesso em 25 jun. 2014.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Imidacloprido**: Technical fact sheet. 14p., abr. 2010. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>>. Acesso em 25 jun. 2014.

NAUEN, R. et al. Efficacy of Plant Metabolites of Imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). **Pesticide Science**, v.52, p.53-57, 1998.

NAUEN, R. et al. Whitefly-active metabolites of imidacloprid: biological efficacy and translocation in cotton plants. **Pesticide Science**, v.55, p.265-271, 1999.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 445 p.

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

PETTIS, J. S. et al. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v.8, n.7, 2013.

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology e evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

RAMALHO, M.; BATISTA, M.A. Polinização na Mata Atlântica: perspectiva ecológica da fragmentação. In: FRANKE, C.R. et al. **Mata Atlântica e biodiversidade**, Salvador: EDUFBA, 2005, p. 93-142.

ROUBIK, D. W. (Ed.). **Ecology and natural history of tropical bees**. Nova York: Cambridge University Press, 1989. 514 p.

SANTOS, A. B. Abelhas nativas: polinizadores em declínio. **Natureza on line**, v.8, n.3, p. 103-106, 2010.

SCHOLER, J.; KRISCHIK, V. Chronic Exposure of Imidacloprid and Clothianidin Reduce Queen Survival, Foraging, and Nectar Storing in Colonies of *Bombus impatiens*. **PLoS ONE**, v.9, n.3, 2014.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

SOARES, H. M. et al. Toxicity of Imidacloprid to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bull Environ Contam Toxicol**, 2015.

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais.** 2009. 49f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 19, n. 7, p. 1901-1905, 2000.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, v.60, p.291-296, 2003.

THOMPSON, H. M. Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. **Ecotoxicology**, v.5, p.59-81, 1996.

THOMPSON, H. M. et al. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. **Apidologie**, v.45, p.545-553, 2014.

TOMÉ, H. V. V. et al. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

VIANA, B. F. **Aspectos morfológicos: *Melipona scutellaris*.** Disponível em: <<http://www.qualibio.ufba.br/063.html>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

VIDAU, C et al. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. **NeuroToxicology**, v.32, p.935–943, 2011.

WEBBEE. **Preferências florais da abelha Uruçu.** Disponível em: <http://www.webbee.org.br/uruçu/preferencias_florais.htm>. Acesso em: 5 jul. 2014.