



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

DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE TÓPICA E ORAL DO INSETICIDA
FIPRONIL E EFEITOS DE SUAS DOSES SUBLETAIS NO COMPORTAMENTO DE
ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona scutellaris* (LATREILLE, 1811)

CLARA TAVARES LOURENÇO

ARARAS

2012



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

DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE TÓPICA E ORAL DO INSETICIDA
FIPRONIL E EFEITOS DE SUAS DOSES SUBLETAIS NO COMPORTAMENTO DE
ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona scutellaris* (LATREILLE, 1811)

CLARA TAVARES LOURENÇO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Araras
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L892dt

Lourenço, Clara Tavares.

Determinação da toxicidade tópica e oral do inseticida fipronil e efeitos de suas doses subletais no comportamento de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) / Clara Tavares Lourenço. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 64 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Abelha sem ferrão. 2. Agrotóxicos. 3. DL₅₀. 4. CL₅₀. 5. Abelha - comportamento. I. Título.

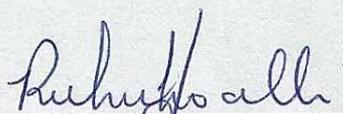
CDD: 638.12 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE

CLARA TAVARES LOURENÇO

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
E AMBIENTE, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, **EM 09 DE
MAIO DE 2012.**

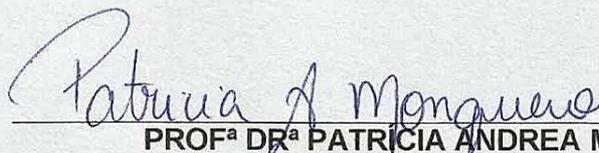
BANCA EXAMINADORA:



PROF^a DR^a ROBERTA CORNÉLIO FERREIRA NOCELLI

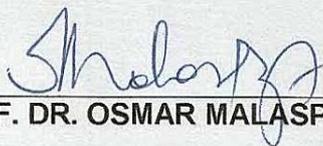
ORIENTADOR (A)

DCNME/CCA/UFSCar



PROF^a DR^a PATRÍCIA ANDREA MONQUERO

DRNPA/CCA/UFSCar



PROF. DR. OSMAR MALASPINA

UNESP

*Dedicado a minha mãe Simone, minha
irmã Paula e ao Silvio, por me apoiarem
sempre.*

AGRADECIMENTOS

Ao PPGAA, sua coordenação, secretaria e professores, pelo suporte à pesquisa realizada.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais), Departamento de Biologia, UNESP Rio Claro, por me fornecer suporte e condições para a realização desse projeto, em especial ao Professor Dr. Osmar Malaspina, por disponibilizar seus laboratórios e materiais.

À Professora Dr^a. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela oportunidade, confiança, orientação e amizade.

Ao técnico do apiário Antônio Sérgio Pascon, pela atenção e cuidado com as colônias de melíponas e por toda a ajuda na manutenção das mesmas.

As ICs de Biologia da UFSCar Araras, Tatiane Grella e Mariana Barroti, pela disposição em sempre ajudar.

À Ita, Marcela, Necis, Olívia e Zanon pela atenção e empréstimo de materiais.

Ao Professor Dr. Fernando Carlos Pagnocca, por permitir o uso de equipamentos de seu laboratório e aos amigos que fiz na microbiologia.

A todos os colegas da 1^a turma do PPGAA, em especial a Jussara Santos, Estela Inacio e Ana Paula Schitkoski.

Aos colegas do CEIS, principalmente a Cynthia Jacob, Hellen Soares e Rodrigo Barbosa, pela amizade e momentos divididos em laboratório; ao Andriago Pereira e ao Felipe “Chaves”, por toda a ajuda com os testes comportamentais; e ao Stephan Carvalho, pelas análises estatísticas de DL₅₀ e CL₅₀ que foram fundamentais.

Ao Silvio Arcuri, amigo e mais que um namorado, pelo amor e apoio incondicionais, pela convivência, companhia e sugestões.

À minha mãe Simone e minha irmã Paula, pelo apoio e amor em todos os momentos e por estarem ao meu lado, sempre.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e a Deus, por permitir concluir mais essa etapa cercada por pessoas especiais.

RESUMO

A abelha *Melipona scutellaris*, conhecida como “uruçu”, pertencem à tribo Meliponini, popularmente chamadas de abelhas sem ferrão. Essa abelha é endêmica do nordeste brasileiro e se destaca por sua fácil domesticação e manejo, expressiva produção de mel e potencial para polinização em ambientes protegidos e campo aberto. O inseticida fipronil atua no sistema nervoso dos insetos bloqueando os canais de cloro através dos receptores ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato (GluCl). Amplamente usado no Brasil e em mais de 70 países é considerado altamente tóxico para abelhas, motivo pelo qual seu uso foi proibido na França em 2004. Estudos toxicológicos de inseticidas para abelhas utilizam em sua grande maioria como espécie modelo a abelha *A. mellifera*, na qual doses subletais de fipronil causam alterações comportamentais relacionadas a tarefas fundamentais para a colônia, como alimentação e forrageamento. No entanto, diferenças quanto à suscetibilidade entre as espécies de abelhas aos inseticidas poderiam estar expondo as abelhas nativas a um maior risco. O objetivo desse trabalho foi determinar a DL_{50} tópica e a CL_{50} oral do inseticida fipronil para abelhas sem ferrão *M. scutellaris* e avaliar os efeitos das doses e concentrações subletais desse inseticida na atividade locomotora e no Reflexo de Extensão da Probóscide (REP) dessas abelhas. As forrageiras foram coletadas na saída de três colmeias diferentes, consistindo em três repetições formadas por dez abelhas cada e colocadas em potes plásticos de 250 mL. Abelhas submetidas aos tratamentos tópicos foram anestesiadas com CO_2 e receberam 1.0 μ L de solução de inseticida no pronoto com doses previamente estabelecidas (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 e 5.0 ng de fipronil/ μ L de solução), aplicadas com uma micropipeta automática repetitiva. Abelhas submetidas aos tratamentos de contaminação oral receberam solução de sacarose com as concentrações de fipronil determinadas anteriormente (0.0, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, e 0.5) durante 24 horas. O inseticida fipronil foi considerado altamente tóxico para essas abelhas, tanto por via tópica como oral. A intoxicação tópica resultou em uma DL_{50} (48 horas) de 0.41 ng i.a./abelha (4.1 ng i.a./g de abelha). A contaminação oral resultou em uma CL_{50} (48 horas) de 0.011 ng i.a./ μ L de solução de sacarose ou, considerando a quantidade de alimento que as forrageiras de *M. scutellaris* consomem por dia, em uma DL_{50} oral de 0.6 ng i.a./abelha. A dose subletal tópica de 0.05 ng i.a./abelha e a concentração subletal oral de 0.0011 ng i.a. / μ L de solução de sacarose causaram alterações significativas para a atividade locomotora dessas abelhas. O REP não foi uma metodologia funcional para abelhas *M. scutellaris*. Os resultados mostram que a abelha *M. scutellaris* é mais sensível ao fipronil que *A. mellifera* e que doses e concentrações subletais desse inseticida afetam a atividade locomotora dessas abelhas.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão. Agrotóxicos. DL_{50} . CL_{50} . Alterações comportamentais.

ABSTRACT

Melipona scutellaris bee, known as "uruçu" belong to the tribe Meliponini, popularly called stingless bees. This bee is endemic in northeastern Brazil and is distinguished by its ease of domestication and management, significant honey production and potential for pollination in greenhouses and open field. The insecticide fipronil acts on the insect nervous system by blocking the chloride channels through of the receptors gamma-aminobutyric acid (GABA) and glutamate (GluCl). Widely used in Brazil and more than 70 countries is considered highly toxic to bees, which is why its use was banned in France in 2004. Toxicological studies of pesticides to bees use mostly as a model species *A. mellifera* bee, which sublethal doses of fipronil can cause behavioral changes related to core tasks for the colony, such as feeding and foraging. However, differences in susceptibility between species of bees to insecticides may expose native bees there is a greater risk. The aim of this study was to determine the topical LD₅₀ and oral LC₅₀ of insecticide fipronil for stingless bee *M. scutellaris* and evaluate the effects of fipronil sublethal doses and concentrations in the locomotor activity and in the Proboscis Extension Reflex (PER) these bees. Foragers were collected in the output of three different colonies, consisting of three repetitions with ten bees each and they were placed in plastic pots of 250 mL. Bees subjected to topical treatments were anesthetized with CO₂ and received 1.0 µL insecticide solution on pronotum with previously established doses (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 5.0 ng of fipronil / µL solution), applied with a repetitive automatic micropipette. Bees subjected to oral contamination received sucrose solution contaminated with concentrations of fipronil determined previously (0.0, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, and 0.5 ng a.i./ µL sucrose solution) for 24 hours. The insecticide fipronil was considered highly toxic to these bees, both topically and orally. The topical intoxication resulted in a LD₅₀ (48 hours) was 0.41 ng / bee (4.1 ng / g bee). The oral contamination resulted in a LC₅₀ (48 hours) was 0.011 ng / µL of sucrose solution or, considering the amount of food they forage *M. scutellaris* consume daily in an oral LD₅₀ of 0.6 ng a.i. / bee. The topic sublethal dose 0.05 ng a.i./bee and oral sublethal concentration 0.0011 ng a.i./ µL sucrose solution were cause significant changes for the locomotor activity these bees. The PER don't was a functional methodology for *M. scutellaris* bees. Results show that the bee *M. scutellaris* is more sensitive to fipronil than *A. mellifera* and that fipronil sublethal dose and concentrations affected the locomotor activity these bees.

Keywords: Stingless bees. Pesticides. LD₅₀. LC₅₀. Behavioral changes.

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 2 – Visão interna de uma colmeia de *M. scutellaris*.

Figura 3 – Tubo plástico que conecta as colônias de *M. scutellaris* ao ambiente externo.

Figura 4 – Acesso das abelhas *M. scutellaris* para sua respectiva colônia e ao ambiente externo.

Figura 5 – Composição de cada grupo experimental: três repetições (cada repetição refere-se a uma colônia) de dez abelhas por gaiola, totalizando 30 abelhas por tratamento.

Figura 6 – Gaiola descartável de 250 mL com alimentador.

Figura 7 – Aplicação de 1.0 μ L de solução no pronoto de forrageira de *M. scutellaris* com uma micropipeta automática repetitiva.

Figura 8 – Forrageira de *M. scutellaris* se alimentando com solução de sacarose.

Figura 9 – Caixa utilizada para o teste de atividade locomotora. E= entradas individuais; R= raias individuais; T = tela protetora; L = lâmpada fluorescente.

Figura 10 – Forrageira de *M. scutellaris* submetida ao teste de REP, aprisionadas somente com as antenas e peças bucais livres. A – Oferecimento de água, sem extensão da probóscide; B – oferecimento de solução de sacarose 50%, com extensão da probóscide.

Figura 11 – Determinação da DL₅₀ tópica (ng i.a./abelha) (48 horas) do inseticida fipronil para forrageiras de *M. scutellaris*.

Figura 12 – Toxicidade aguda tópica de fipronil para forrageiras de *M. scutellaris* e respectiva porcentagem de mortalidade.

Figura 13 – Determinação da CL₅₀ oral (ng i.a./ μ L de dieta) (48 horas) do inseticida fipronil para forrageiras de *M. scutellaris*.

Figura 14 – Toxicidade aguda oral de fipronil para forrageiras de *M. scutellaris* e respectiva porcentagem de mortalidade.

Figura 15 – Velocidade média de abelhas *M. scutellaris* 24 horas após tratamento com doses e concentrações subletais de fipronil.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Árvores visitadas por forrageiras de *M. scutellaris* nas coletas de pólen e néctar.

Quadro 1 – Comparação entre a DL_{50} de fipronil/abelha para forrageiras de *M. scutellaris* e outras espécies de abelhas.

Quadro 2 – Comparação entre a DL_{50} de fipronil/g de abelha para forrageiras de *M. scutellaris* e outras espécies de abelhas.

Quadro 4 – Comparação entre a CL_{50} de fipronil/ μ L de dieta para forrageiras de *M. scutellaris* e outras espécies de abelhas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Toxicidade aguda (48 horas) de fipronil via tópica para abelhas forrageiras de *M. scutellaris*.

Tabela 2 – Toxicidade aguda (48 horas) de fipronil via oral para abelhas forrageiras de *M. scutellaris*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Importância das abelhas	11
1.2 Abelhas sem ferrão	13
1.2.1 <i>A espécie Melipona scutellaris (Latreille, 1811)</i>	14
1.3 Abelhas e os inseticidas	17
1.4 Inseticida fipronil	20
2 OBJETIVOS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Bioensaios	31
3.2 Tratamentos	32
3.2.1 <i>Controle acetona tópico e oral</i>	32
3.2.2 <i>Determinação da dose média letal (DL₅₀) e da concentração média letal (CL₅₀)</i>	33
3.3 Análises comportamentais	35
3.3.1 <i>Atividade locomotora</i>	36
3.3.2 <i>Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)</i>	37
3.4 Análises estatísticas	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Controle acetona	39
4.2 Dose média letal (DL₅₀) tópica e concentração média letal (CL₅₀) oral	39
4.3 Análises comportamentais	44
4.3.1 <i>Atividade locomotora</i>	44
4.3.2 <i>Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)</i>	48
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO	63
ANEXO A - Produção bibliográfica	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância das abelhas

As abelhas são um grupo monofilético originado de vespas, que surgiu provavelmente no período Cretáceo Médio, com o aparecimento das Angiospermas. Fósseis de abelhas do período Eoceno indicam que a maioria dos grupos de abelhas conhecidas atualmente já existia naquele período (KERR, 1996; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; ROUBIK, 2006).

Considerando a polinização de ambientes naturais, a ordem Hymenoptera, da qual fazem parte abelhas, vespas e formigas, é a mais importante 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).

As abelhas participam da manutenção do fluxo de energia para outras espécies animais por fazerem parte da base das cadeias tróficas, sendo parte integrante do mecanismo de reprodução vegetal, aumentando a fertilidade e produtividade da maioria de plantas que dependem de polinização cruzada, bem como na manutenção da variabilidade genética da flora (PRONÍ, 2000).

A polinização é um dos principais serviços prestados pelo ecossistema, responsável pela manutenção da vida e capaz de fornecer importantes argumentos para políticas de conservação. É o primeiro passo para a reprodução dos vegetais superiores, essencial para quase todos os ecossistemas terrestres (CONSTANZA et al., 1997; KEVAN, 1999; KREMEN; WILLIAMS; THORP, 2002; CONVENIO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA, 2010).

As abelhas são os principais polinizadores, responsáveis pela polinização de mais de um terço das angiospermas e, cerca de 70% das culturas agrícolas que alimentam praticamente todos os países, sendo os agroecossistemas quase totalmente dependentes da polinização por abelhas. Para as culturas não dependentes de polinizadores, a participação das abelhas é essencial para que a produção seja melhorada e tenha melhor qualidade, diminuindo o número de frutos defeituosos (KEVAN, 1999; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2005; KLEIN et al., 2007).

A relação entre planta e abelha é tão intrínseca, que a não-polinização de uma espécie vegetal tem efeito quase fatal em sua população, atinge a fauna que

dela depende e altera o equilíbrio ecológico de todas as espécies que participam dessa cadeia (KERR et al., 2001; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Se as abelhas desaparecerem, a estrutura florestal terá de modificar sua capacidade de produzir sementes férteis será diminuída e só sobreviverão as espécies cujas flores aceitarem outros mecanismos de polinização ou outros polinizadores (KERR et al., 2001).

Desconsiderar os recursos naturais que as abelhas exigem dificulta a gestão e conservação da polinização, um serviço ambiental que só recentemente começou a ser devidamente valorizado, pois seus fundamentos ecológicos e econômicos sempre foram subestimados (KREMEN; WILLIAMS; THORP, 2002; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2005; CONVENIO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLOGICA, 2010).

O serviço ambiental da polinização era, até então, visto como um serviço gratuito prestado pelo ecossistema e, só começou a ser monetariamente valorizado após o desaparecimento inexplicado de cerca de 80% das colmeias dos Estados Unidos e Europa, principalmente após 2006, devido suas conseqüências econômicas e ecológicas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2005; GUIMARÃES, 2007; FIORAVANTI, 2010).

Esse fenômeno, conhecido como Desordem do Colapso de Colônia (do inglês *Colony Collapse Disorder* - CCD), é caracterizado pelo desaparecimento de grande porcentagem das abelhas de uma colmeia, as quais não são encontradas mortas em locais próximos às colônias (JOHNSON, 2010).

A causa do desaparecimento das abelhas é motivo de estudos e ainda não foi concluído e, a hipótese mais aceita é de uma síndrome causada por diferentes fatores, com três principais possibilidades: i) efeitos negativos não esperados de agrotóxicos sobre as abelhas; ii) um novo parasita ou patógeno e, iii) uma combinação de diferentes fatores estressores (como por exemplo: elevados níveis de infestação pelo ácaro *Varroa destructor* e deficiência nutricional decorrente principalmente de áreas de monocultura) que possam comprometer o sistema imune das abelhas, tornando-as mais susceptíveis ao CCD (JOHNSON, 2010).

No Brasil, entre 2008 e 2010, o desaparecimento de abelhas causado por inseticidas já causou a morte, segundo uma estimativa realizada através de informações de apicultores, de mais de cinco mil colmeias de *A. mellifera*

africanizadas, principalmente na região central do estado de São Paulo. Abelhas nativas não foram incluídas (MALASPINA et al., 2010).

O valor econômico da polinização foi calculado por Gallai et al. (2009) em 153 bilhões de euros para 2005, correspondente a 9,5% da produção agrícola mundial. Essa notícia foi divulgada também na mídia popular pela Revista Veja em junho de 2010, com um valor econômico do serviço ecológico da polinização podendo chegar a 540 bilhões de dólares ao ano e os prejuízos causados pela diminuição das abelhas atingindo valores de 15 bilhões de dólares/ano (CARELLI, 2010).

1.2 Abelhas sem ferrão

As abelhas estão reunidas na superfamília Apoidea, que é constituída por 13 subfamílias reunidas em cinco famílias, com quase 18 mil espécies descritas no mundo e uma estimativa de cinco mil espécies no Brasil, com 1.678 espécies descritas. A família Apidae é a mais comum e diversa família de abelhas com distribuição no mundo todo (SILVA; MELO; ALMEIDA, 2002; MICHENER, 2007; MOURE; URBAN; MELO, 2008).

A família Apidae é formada por três subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apinae. A subfamília Apinae engloba 19 tribos, dentre elas a tribo Meliponini. Abelhas pertencentes a essa tribo são denominadas eussociais, por apresentarem hábitos sociais mais avançados, com uma rainha responsável pela reprodução e operárias responsáveis pelas tarefas do ninho. Outra característica comum a essa tribo é a presença de corbícula nas fêmeas, uma concavidade presente na tíbia das pernas traseiras onde carregam pólen e outras substâncias para seus ninhos (KERR, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997, SILVA; MELO; ALMEIDA, 2002; MICHENER, 2007; IMPERATRIZ-FONSECA, 2010).

Meliponíneos são conhecidos popularmente como “abelhas sem ferrão”. Suas operárias têm tamanho moderado, variando de 0,2 a mais de 20 milímetros, geralmente robustas. Suas rainhas não possuem corbícula e, quando fecundadas tornam-se incapazes de voar, devido ao grande desenvolvimento de seu abdômen. Nidificam principalmente em ocos de troncos e galhos de árvores, mas podem também construir ninhos no chão ou em ninhos de outros animais e cupinzeiros abandonados. Seus ninhos têm a entrada quase sempre no centro de uma estrutura

de terra ou geoprópolis, com aspecto crateriforme e raiado (NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; WEBBEE, 2010).

A tribo Meliponini abrange 42 gêneros e 390 espécies que possuem um ferrão vestigial e são incapazes de ferroar, ocorrem na maior parte da América Neotropical, na maioria da América Latina e Central, distribuídas da Argentina ao México. São encontradas também nas ilhas do Caribe, na África, na Austrália, na Índia, no sudeste da Ásia e em Taiwan. Cerca de 100 espécies estão em perigo de extinção (NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; WEBBEE, 2010).

O Brasil é um dos principais locais de ocorrência dessas abelhas, com 33 gêneros e 192 espécies descritas, importantes para a manutenção da biodiversidade por polinizar, de acordo com o ecossistema onde são encontradas, de 30% a 90% de nossa flora nativa, principalmente espécies da caatinga, pantanal e Mata Atlântica (KERR, 2001; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Muitas abelhas Meliponini apresentam grande potencial como polinizadores em estufas, pois além da fácil domesticação e de não ferroarem, possuem a capacidade de realizar a “polinização por vibração”, onde as abelhas vibram a musculatura torácica para agitar as anteras e liberar o pólen, essencial para polinização eficiente de flores com anteras poricidas (o pólen sai das anteras através de poros apicais), como algumas plantas do gênero *Solanaceae* (berinjela, jiló pimentão, pimenta e tomate, por exemplo) de grande destaque agrícola (HEARD, 1999; NUNES-SILVA; HRNCIR; IMPERATRIZ-FONSECA, 2010).

Dentre a tribo Meliponini o gênero *Melipona* possui o maior número de espécie e são distribuídas exclusivamente entre América do Sul, América Central e Ilhas do Caribe. Caracterizam-se por não construírem células reais, isto é, todos os indivíduos sejam rainhas, operárias ou machos, nascem e se desenvolvem dentro de células de cria de cerume de tamanhos iguais, preenchidas com alimento líquido (KERR, 1996, NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

1.2.1 A espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811)

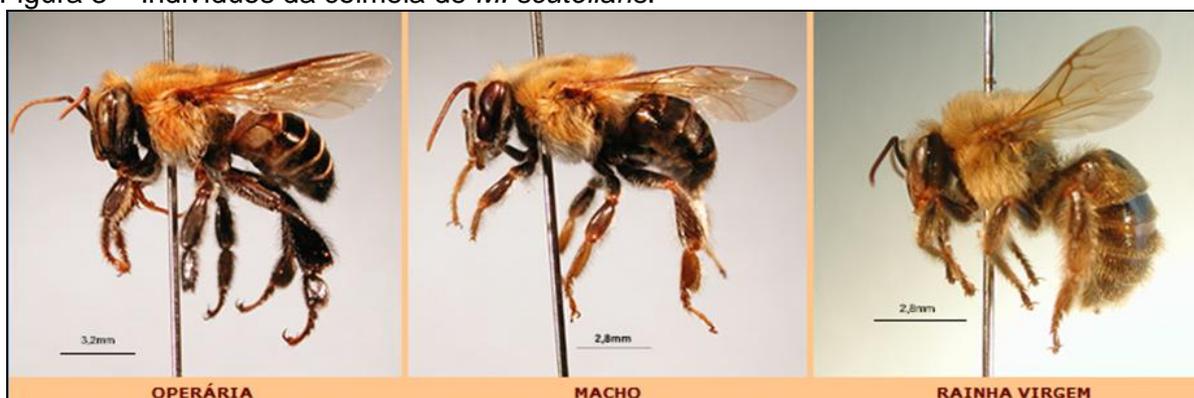
O gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) possui mais de 50 espécies dentre as quais se destaca a espécie *Melipona scutellaris*, conhecida popularmente como “uruçu”, “uruçu do nordeste” ou “uruçu verdadeira”, é uma das três espécies de *Melipona* mais manipuladas pelo homem, domesticada pelos índios

da região Nordeste do Brasil para a produção de mel, que atualmente é muito apreciado e apresenta propriedades medicinais (NOGUEIRA-NETO, 1997; KERR et al, 2001; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2008).

É uma espécie endêmica do Nordeste brasileiro, habitando regiões de mata úmida e quente do litoral da Bahia e Chapada Diamantina e bem adaptada às condições climáticas e ecológicas do Estado de São Paulo (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIANA, 2010). Na Mata Atlântica é encontrada em locais com baixos níveis de perturbação e ausente onde há perturbação ambiental moderada e alta (RAMALHO; BATISTA, 2005).

Suas operárias (Figura 1) medem entre 10 e 12 milímetros, possuem corpo robusto e cabeça de coloração marrom e preta, o vértice é marrom-amarelado com muitos pêlos amarelo-ruivos e dourados. O clipeo é levemente convexo com face relativamente estreita, o tórax é preto no dorso com densos pêlos 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, 2010).

Figura 3 – Indivíduos da colmeia de *M. scutellaris*.



Fonte: WebBee, 2010.

Constroem seus favos em forma de disco sobrepostos e suas rainhas tem em média 22 meses de vida. Quando há duas rainhas na mesma colônia a nova rainha é escolhida pelas operárias e após seis dias já inicia a postura. Os machos, quando atingem a maturidade sexual (cerca de 10 dias), formam agrupamentos próximos às colônias (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2008).

Suas colmeias são menores que as de *Apis mellifera* e, seu alimento (pólen e mel) é armazenado em potes que ficam ao redor dos favos de cria (Figura 2). Por

ser uma abelha sem ferrão seus mecanismos de defesa são limitados a mandíbulas fortes, entrada da colmeia pequena, com túneis pegajosos e odor desagradável (ABRAMSON; AQUINO; STONE, 1999).

Figura 4 – Visão interna de uma colmeia de *M. scutellaris*.



As principais fontes de pólen para *M. scutellaris* em seu ambiente nativo são plantas das famílias *Myrtaceae*, *Mimosaceae*, *Caesalpinaceae*, *Anacardaceae*, *Sapindaceae* e *Fabaceae* e os tipos polínicos dominantes são *Eucalyptus* spp. e *Psidium* sp. (CARVALHO et al., 2001; RAMALHO; SILVA; CARVALHO, 2007).

Segundo Almeida (1974) as preferências florais da abelha *M. scutellaris* são por espécies nativas, que se encontram no Quadro 1 (WEBBEE, 2011).

Quadro 3 – Árvores visitadas por forrageiras de *M. scutellaris* nas coletas de pólen e néctar.

Nome Vulgar	Nome científico
Angilim	<i>Andira nitida</i>
Cajá	<i>Spondias mombin</i>
Embiriba	<i>Eschweilera luschathii</i>
Ipê amarelo	<i>Tabebuia chrysotricha</i>
Ipê roxo	<i>Tabebuia avellanedae</i>
Jatobá	<i>Hymenaea martiana</i>
Munguba	<i>Bombax gracilipes</i>
Murici	<i>Byrsonima sericea</i>
Pitanga	<i>Eugenia uniflora</i>
Sucupira	<i>Bowdichia virgiloides</i>
Urucum	<i>Bixa orellana</i>

Fonte: Adaptado de WebBee (2011).

Na Bahia são considerados polinizadores potenciais das monoculturas *Eugenia aquea* (maçã aguada rosa), *Eugenia jambosa* (jambo), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Grewia anatica* (falsa), *Persea americana* (abacate), *Psidium guajava* (goiaba), *Talisia esculenta* (pitomba) e *Eryobotrya japonica* (nêspera) (KEVAN; IMPERATRIZ-FONSECA, 2002; IMPERATRIZ-FONSECA; SARAIVA; DE JONG, 2006; WEBBEE, 2011).

É ainda considerada uma espécie potencial para reprodução em larga escala para ser utilizada como polinizador em ambiente protegido ou campo aberto, por ser um polinizador eficaz e pela facilidade de se manter colmeias racionais fortes, que podem ser facilmente transportadas e multiplicadas (IMPERATRIZ-FONSECA; SARAIVA; DE JONG, 2006).

1.3 Abelhas e os inseticidas

As abelhas são polinizadores que ocorrem naturalmente nos agroecossistemas e vêm desaparecendo de áreas agrícolas devido principalmente: i) à introdução de espécies exóticas, tanto vegetais como animais, aumentando a competição por alimento e sobrevivência; ii) às grandes áreas de monocultura, desmatamento para agricultura e pastagem e, fragmentação de habitat, diminuindo as fontes de alimento, a variedade nutricional e os locais para nidificação, acasalamento e repouso; e iii) uso indiscriminado de agrotóxicos (KEVAN, 1999; VIANA & SILVA, 2010).

Os defensivos agrícolas, que englobam inseticidas, acaricidas, nematicidas, fungicidas, bactericidas e herbicidas, além da função de proteção para as culturas agrícolas de doenças e pragas, oferecem riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Seu uso pode contaminar os solos, as águas e os alimentos, bem como apresentar efeitos negativos em organismos não-alvos (SPADOTTO et al., 2004).

De 1964 a 1998 o Brasil aumentou o uso de agrotóxicos em cerca de 700% enquanto as áreas de culturas agrícolas aumentaram apenas 78%, evidenciando o uso excessivo de produtos químicos, hábito difundido durante a Revolução Verde, que visava o aumento da produtividade agrícola (SPADOTTO, 2004).

Entre 2000 e 2010 o consumo de agrotóxicos no Brasil cresceu 190% e em 2008 o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos do planeta, sendo

responsável por 19% do consumo mundial de agrotóxicos (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL, 2009; KUSSAMA, 2012).

De acordo com estimativas do SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG) em 2011 os inseticidas foram os agrotóxicos mais utilizados, passando a frente dos herbicidas (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA, 2011). Cerca de 60% dos inseticidas de amplo uso no Brasil apresentam alguma toxicidade para as abelhas (FREITAS & PINHEIRO, 2010; LOURENÇO; SANTOS; NOCELLI, 2010).

A ecotoxicidade (potencial de afetar os ecossistemas) dos agrotóxicos varia de acordo com as propriedades dos ingredientes que compõe o produto. Seus efeitos podem ser imediatos (efeitos agudos), de médio prazo (subcrônico) e de longo prazo (crônico), que podem interferir na fisiologia, comportamento, reprodução e longevidade dos organismos. Sua toxicidade e persistência no ambiente pode causar redução de populações, entre outros efeitos (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2010).

Os primeiros estudos sobre toxicologia de inseticidas para abelhas datam a década de 1940 e tiveram início nos Estados Unidos e Europa. No Brasil, as primeiras pesquisas a respeito da toxicidade de inseticidas para abelhas aconteceram a partir de 1970, principalmente com o diclorodifenilcloretano (DDT) e inseticidas organoclorados (MALASPINA, 1979; MALASPINA; STORT, 1983; MACIEIRA; HEBLING-BERALDO, 1989).

Os inseticidas podem afetar as abelhas por três vias principais de intoxicação: por contato, ingestão ou fumigação e, seus efeitos variam de acordo com as doses e concentrações utilizadas, tempo de exposição ao inseticida e modo de intoxicação. Podem causar morte por toxicidade aguda ou, doses baixas e frequentes podem causar alterações no desenvolvimento, comportamento, morfofisiologia e sistema imunológico dos indivíduos, não causando a morte imediata, mas em longo prazo prejudicam o funcionamento da colônia e diminuem a longevidade dos indivíduos (MALASPINA, 1979; FRAZIER et al., 2008; MALASPINA et al., 2008).

A toxicidade de inseticidas para abelhas tem se baseado principalmente na determinação de uma dose média letal (DL_{50}) e/ou de uma concentração média letal (CL_{50}), ou seja, uma dose ou concentração do inseticida que causa a mortalidade de 50% da população experimental. Além da mortalidade causada pela DL_{50} ou CL_{50}

dos inseticidas, é importante considerar as doses inferiores a DL_{50} e a CL_{50} , as chamadas doses ou concentrações subletais, que não causam diretamente a mortalidade na população experimental, mas causam alterações significativas entre os indivíduos tratados e não tratados, podendo trazer desvantagens a esses animais (LEWIS et al., 2007; THOMPSON & MAUS, 2007).

A intoxicação por doses subletais é dificilmente observada no campo, por não haver altas taxas de mortalidade das abelhas expostas ao inseticida e, por seus principais sintomas serem comportamentais. Os efeitos das doses subletais estão principalmente relacionados aos aspectos da biologia das abelhas, como comportamento, aprendizagem, orientação e fisiologia, que resultam em efeitos sobre a colônia como um todo. As doses subletais devem também ser consideradas para uma análise mais completa da toxicidade de inseticidas para as abelhas, pois à medida que os inseticidas afetam o comportamento das abelhas podem comprometer também a eficiência da polinização (PHAM-DÉLEGUE et al., 2002; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; BRITTAİN; POTTS, 2011).

Mesmo não causando mortalidade imediata, as alterações comportamentais das abelhas afetam diretamente o funcionamento da colônia, tornando-a mais fraca e menos produtiva ao longo do tempo, o que pode causar altas taxas de mortalidade em um período prolongado. Os principais efeitos comportamentais causados por envenenamento por inseticidas às abelhas, variando com o inseticida, suas doses e o tempo de exposição, são distúrbios de coordenação motora, tremores, efeito *knock down* (choque imediato causando imobilização do inseto que pode, ou não, se recuperar), prostração, paralisia, deficiência no aprendizado e memória olfativa, dificuldade locomotora, incapacidade de voo e diminuição da longevidade (GUIMARÃES; BRIGHENTI; CIRILLO, 2000; SOUZA et al., 2006; CARVALHO et al., 2009).

Como as abelhas são um grupo muito diverso, também diferem quanto sua vulnerabilidade a exposição de inseticidas, sendo os padrões de referência para as diversas espécies de abelhas, baseados geralmente em estudos com *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007). É importante que esses estudos ecotoxicológicos diversifiquem os organismos utilizados para obter uma melhor compreensão de como os inseticidas afetam outras espécies de abelhas (BRITTAİN; POTTS, 2011).

No Brasil já foram realizados testes de toxicidade com mais de 30 inseticidas diferentes, tanto para *A. mellifera* africanizada, em diversas fases de desenvolvimento, como para algumas espécies de abelhas nativas. O modelo mais utilizado no Brasil é a abelha *A. mellifera* africanizada (cerca de 70%), devido principalmente a sua importância econômica, resultando em um amplo conhecimento da ação de diversos inseticidas para essa abelha. Por outro lado, estudos a respeito da toxicidade de inseticidas para espécies de abelhas nativas utilizaram até agora apenas seis espécies, com pouca variedade de inseticidas testados para cada espécie. Consequentemente, as informações disponíveis quanto à toxicidade de inseticidas para abelhas nativas é ainda bastante escassa, principalmente quando comparado com as informações disponíveis para *A. mellifera* africanizada (NOCELLI et al., 2012).

Diferenças quanto à suscetibilidade entre espécies de abelhas a inseticidas já foram observadas por Malaspina (1979), Malaspina e Stort (1983), Macieira e Hebling-Beraldo (1989), Mayer e Lunden (1999), Moraes, Bautista e Viana, (2000), Del Sarto (2009), Stuchi (2009), Valdovinos-Núñez et al., (2009) Jacob et al., (2011) e Roessink et al. (2011) e, a maioria desses resultados mostram que a espécie *A. mellifera* africanizada foi menos suscetível quando comparada a espécies de abelhas nativas.

Segundo Brittain et al., (2010) as abelhas nativas são um grupo de polinizadores cuja exposição aos pesticidas é mais preocupante e, considerando a diversidade de espécies de abelhas brasileiras é importante que estudos de toxicidade de inseticidas realizados no Brasil priorizem essas espécies (LOURENÇO; SANTOS; NOCELLI, 2010).

1.4 Inseticida fipronil

O inseticida fipronil faz parte do grupo químico fenilpirazol e é considerado um inseticida de nova geração, pois seu modo de ação difere dos inseticidas clássicos, aos quais muitos insetos desenvolveram resistência. Sua composição química de acordo com a Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) é (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoro-methylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile e sua fórmula bruta $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ (CONNELY, 2001; AGÊNCIA NACIONAL DE

VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER, 2009).

Possui amplo espectro atuando em todas as fases de desenvolvimento do inseto e eficácia em baixas concentrações de aplicação. Sua formulação pode ser pó, líquida ou granular, sendo a granular mais persistente no ambiente. Suas características permitiram o aumento de seu uso tanto para fins agrícolas como domésticos e atualmente é usado em cerca de 70 países, com amplo uso no Brasil (AAJOUD; RAVANEL; TISSUT, 2003; ROGERS, 2004; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; GUNASEKARA et al., 2007; THOMPSON, 2010).

O fipronil atua no sistema nervoso do inseto, agindo como um bloqueador não competitivo sobre o sistema receptor ácido gama-aminobutírico (GABA), onde bloqueia os canais de cloro, eliminando a inibição normal do impulso nervoso e provocando atividade neural excessiva. Causa hiperexcitação, paralisia e morte (CONNELY, 2001; STENERSEN, 2004; GUNASEKARA et al., 2007; NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER, 2009). Também bloqueia completamente os canais de cloro dos receptores glutamato (GluCl) (BARBARA et al., 2005).

Age por contato ou ingestão e, para fins agrícolas é indicado para o controle de: larva-alfinete (*Diabrotica speciosa*), tripes (*Frankliniella schultzei*), curuquerê (*Alabama argillacea*), bicudo (*Anthonomus grandis*), pão-de-galinha (*Diloboderus abderus*), tamanduá-da-soja (*Sternechus subsignatus*), broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), migdolos (*Migdolus fryanus*) e principalmente cupim (*Heterotermes tenuis*, *Cornitermes cumulans*, *Neocapritermes opacus*, *Proconitermes triacifer*) principalmente em cultivos de algodão, batata, cana-de-açúcar, milho e soja (BASF, 2010; INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2010; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012).

A meia vida do fipronil e seus metabólitos, no solo varia de 18 a 350 dias de acordo com o ambiente e com a formulação. É baixo a moderadamente solúvel em água com preferência para matrizes lipofílicas e um coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) de 3.9 – 4.1. Na água, quando exposto a luz ultravioleta, sua meia vida geralmente é de 4 a 12 horas, mas pode chegar até 125 horas e, seus metabólitos se acumulam no sedimento do leito de corpos hídricos (GUNASEKARA et al., 2007; NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER, 2009).

É considerado altamente tóxico (classe II), segundo a Classificação Toxicológica da ANVISA (2007) e, de acordo com a Classificação Ambiental do IBAMA (2010), é avaliado como muito perigoso ao ambiente (classe II) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012).

Também é considerado altamente tóxico para abelhas e atinge outros insetos não-alvo, sendo que sua aplicação deve ser evitada em períodos de maior visitação por esses animais, pois deixa resíduos no pólen e néctar (NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER, 2009; BASF, 2010; JOHNSON, 2010) e altamente tóxico para peixes e animais aquáticos. A degradação do fipronil resulta em cinco principais produtos no ambiente: fipronil-sulfona, fipronil sulfeto, fipronildesulfinil, fipronil-amida, e fipronil detrifluorometilsulfinil e seus metabólitos são cerca de três a seis vezes mais tóxicos para organismos aquáticos e podem se bioacumular nos mesmos. Não é bem absorvido pelas plantas e quando aplicado no campo mata cerca de 90% de insetos não-alvo em dois dias (GUNASEKARA et al., 2007; NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER, 2009).

1.4.1 *Fipronil e as abelhas*

Há indícios que o fipronil, associado a outros fatores, esteja envolvido com o CCD (FREITAS; PINHEIRO, 2010), motivo pelo qual seu uso foi proibido na França em 2004, quando os apicultores franceses relataram perdas de até 40% de suas abelhas (ROGERS, 2004).

Em 2007 a European Commission (2010) determinou, dentre outras condições especiais exigidas pelos seus países membros para a autorização de fitossanitários que contem fipronil, atenção particular a proteção de abelhas e apresentação de estudos suplementares que confirmem a avaliação de risco para esses polinizadores.

Como o fipronil é altamente tóxico para as abelhas e já foi apontado como uma possível causa da mortalidade aguda desses insetos, uma atenção especial tem sido dada a esse inseticida e seus resíduos, pois ainda há pouca informação disponível sobre os níveis de fipronil e seus metabólitos para abelhas em campo (CHAUZAT et al., 2011).

Chauzat et al., (2009; 2011) encontraram resíduos de fipronil e de seus metabólitos em amostras de abelhas (*A. mellifera*) e dos produtos coletados por elas

analisando matrizes apícolas (mel, pólen, cera e abelhas) em cinco localidades da França, entre 2002 e 2005. Os resíduos de fipronil estiveram presentes em 12.4% do pólen levado pelas abelhas em 16 das 125 colônias estudadas (CHAUZAT et al., 2006), também encontrado em duas amostras de apiários na Espanha por Garrido-Bailon et al., (2010). Entre janeiro e fevereiro de 2007, Mullin et al. (2010) também encontraram fipronil (3.1 ppm) em duas de 106 amostras de abelhas mortas na Flórida e Califórnia.

Cruz et al., (2010) realizaram estudos sobre efeitos do fipronil na morfologia de órgãos de larvas de 1º instar de operárias de *A. mellifera* africanizada tratadas com três doses de fipronil (0.1, 0.4 e 1.0 ng i.a./g de alimento) e observaram alterações morfológicas nos ventrículos. Ainda, estudando os efeitos da exposição crônica a 0.1ng i.a./g de alimento para larvas de 1º instar de *A. mellifera* africanizada, Dantas et al. (2009), observaram que no sexto e último dia dos testes houve aumento significativo nas taxas de mortalidade das larvas e as sobreviventes não conseguiram completar a metamorfose.

Decourtye et al., (2005) estabeleceram a DL₅₀ oral de fipronil (48 horas) para *A. mellifera* em 6 ng i.a./abelha. Souza (2009) obteve uma DL₅₀ tópica de fipronil para operárias de *A. mellifera* africanizada de 0.157 ng i.a./abelha e uma DL₅₀ oral de 3.27 ng i.a./abelha. Pereira (2010) avaliando os efeitos do inseticida fipronil na sobrevivência e comportamento de operárias de *A. mellifera* africanizada obteve uma DL₅₀ tópica de 1.9 ng i.a./abelha e um tempo médio letal (TL₅₀) de 19.8 horas.

Para operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, Roat et al., (2010) determinou uma DL₅₀ tópica de fipronil de 1.06 ng i.a./abelha e uma CL₅₀ oral de 1.27ng i.a./μL de dieta. Em seu estudo, a autora ofereceu 10μL de dieta contaminada com 0.1ng de fipronil diariamente e observou menor longevidade nas abelhas tratadas com esse inseticida, com 100% de mortalidade no nono dia. Ainda, verificou que a sobrevivência não é afetada com o cessar da ingestão de fipronil, quando a dieta tratada foi substituída por dieta sem tratamento.

Para as abelhas sem ferrão, Stuchi (2009) avaliando a toxicidade de quatro inseticidas (fipronil, malatiom, nim e tiametoxam) para duas espécies de jataí (*Tetragonista angustula* e *Tetragonista fiebrigi*, Latreille, 1811), observou que o inseticida fipronil foi o mais tóxico por contato para essas abelhas.

Em seus estudos sobre toxicidade do inseticida fipronil para operárias de abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), Ferreira (2010) observou

mortalidade de 100% dos indivíduos tratados com dose subletal (0.1ng i.a./abelha) após 14 dias. O autor ainda notou que essa dose pode causar alterações morfológicas nos túbulos de Malpighi dessas abelhas, principalmente aumento na porção apical das microvilosidades, dilatações das cisternas dos retículos endoplasmáticos rugosos, presença de vesículas e acúmulo de polirribossomos no citoplasma.

Jacob (2012) determinou a DL_{50} tópica e CL_{50} oral do inseticida fipronil para forrageiras de *S. postica* e, encontrou uma DL_{50} de 0.54ng i.a./abelha e uma CL_{50} de 0.24 ng i.a./ μ L de dieta após 24 horas de exposição. Em suas análises morfológicas dos corpos pedunculados dos cérebros das abelhas, pôde observar células com alterações nos grupos tratados com dose subletal (0.27ng i.a./abelha) após 12 horas de exposição ao fipronil. Em doses mais altas (0.54 e 1.08 ng i.a./abelha) as mesmas alterações morfológicas foram observadas após 30 minutos de intoxicação.

Atualmente, estudos que identificam e caracterizam os efeitos causados por doses subletais de inseticida tem aumentado e mostram principalmente alterações fisiológicas e comportamentais. Efeitos bioquímicos ou neurofisiológicos negativos causados por inseticidas são difíceis de observar, pois suas consequências, individual ou populacional, são na maioria das vezes desconhecidas (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

Testes comportamentais que avaliam os efeitos subletais dos inseticidas para abelhas através da capacidade de orientação/locomoção, aprendizagem olfatória e memória tem sido cada vez mais aplicados, como uma alternativa aos bioensaios de campo e semi-campo que, apesar de representarem condições de exposição mais realistas que bioensaios laboratoriais, são tecnicamente difíceis de manter e controlar (PHAM-DELÈGUE et al., 2002; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; THOMPSON; MAUS, 2007).

Colin et al., (2004) analisaram e quantificaram a atividade de forrageamento de abelhas *A. mellifera* tratadas com doses subletais de fipronil, através de um túnel que leva a um alimentador. As abelhas receberam 2 g fipronil/kg de solução de sacarose por até quatro dias e foram submetidas ao teste. Os autores concluíram que essa dose subletal do fipronil tem um forte efeito sobre a frequência de visita das abelhas ao alimentador, bem como causou diminuição drástica no número de forrageiras e aumento de abelhas inativas no alimentador. Observaram também

abelhas com sinais de intoxicação, como deficiência na atividade locomotora, convulsões e paralisia, tornando-as incapazes de forragear.

Também observando o comportamento de forrageamento e retorno à colônia de operárias de *A. mellifera linguistica* (Spinola, 1806), Decourtye et al., (2011) utilizaram um túnel para observar o deslocamento de forrageiras e detectar alterações no padrão de voo entre um alimentador e a colônia. Cada abelha foi contaminada oralmente com as doses subletais de 0.06 e 0.3 ng de fipronil. As abelhas tratadas com 0.3 ng de fipronil apresentaram significativamente um menor número de forrageamento e um aumento significativo no tempo de voo de retorno à colônia.

Abelhas *A. mellifera* tratadas oralmente com dose subletal de fipronil de 1 µg i.a./kg de solução de sacarose foram testadas por Decourtye et al., (2009) em um labirinto para avaliar sua habilidade de orientação. A taxa de abelhas tratadas a chegarem ao final do labirinto diretamente foi diminuída em mais de 25% quando comparada com abelhas do controle e, paralelamente, o número de abelhas que erraram o caminho e se perderam dentro do labirinto aumentou 30%. Ainda, mais de 15% das abelhas tratadas não chegaram a entrar no labirinto, mostrando que a capacidade de orientação dessas abelhas foi afetada pelo fipronil.

Aliouane et al., (2009) também avaliaram os efeitos comportamentais que doses subletais do inseticida fipronil causam para abelhas *A. mellifera* recém-emergidas. Doses subletais de fipronil (0.01 e 0.1 ng i.a./abelha) foram administradas cronicamente via oral e por contato durante 11 dias. A dose de 0.1ng i.a./abelha, por via oral e por contato, induziu a mortalidade de todas as abelhas tratadas após uma semana, com aumento significativo de mortalidade a partir do terceiro dia de exposição oral e após o quinto dia de contaminação por contato, indicando que uma dose subletal de fipronil torna-se letal com a exposição repetida. Com a dose de 0.01ng/ abelha a mortalidade, ao final dos 11 dias de tratamento, foi de 25% e 20% para os tratamentos oral e tópico, respectivamente. Abelhas tratadas com 0.01ng de fipronil por contato permaneceram mais tempo imóveis. Para o mesmo grupo houve um aumento significativo no consumo de água durante a primeira semana de tratamento. Já a exposição oral ao fipronil (0.01 ng i.a./abelha) levou a uma diminuição significativa da resposta positiva de Reflexo de Extensão da Probóscide (REP) a sacarose (0.3%). Dentre os inseticidas avaliados por esses

autores (acetamiprido, fipronil e tiametoxam) o fipronil mostrou-se o mais tóxico para as abelhas (ALIOUANE et al., 2009).

Pereira (2010) avaliando os efeitos do inseticida fipronil no comportamento de operárias de *A. mellifera* africanizada, através da atividade locomotora, observou diferenças significativas na velocidade média entre os grupos controle e tratado com a DL₅₀ de fipronil (1.9 ng i.a./ abelha) e suas doses subletais, após quatro e 24 horas da aplicação tópica. Avaliando o Reflexo de Extensão da Probóscide (REP) também observou diferença significativa entre os grupos controle e tratados com a DL₅₀, DL_{50/10} e DL_{50/100} de fipronil no teste de após 24 horas da aplicação tópica do inseticida.

O ensaio de REP é considerado um método quantificável e confiável para avaliação de doses subletais de inseticidas, pois reproduz a interação abelha-planta: quando a abelha pousa na flor seus receptores gustativos são estimulados pelo néctar e em resposta a abelha estende sua probóscide, absorvendo o néctar e memorizando os odores florais que, uma vez memorizados são fundamentais para o reconhecimento de flores no próximo forrageamento. O REP é ainda um teste de importância ecológica, pois é um requisito para o sucesso de forrageamento, com comprometimento de toda a colônia (DECOURTYE et al., 2005; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

Também já foi demonstrado que os dados de REP são bem correlacionados com as respostas olfativas das abelhas em condições de vôo livre, sugerindo que os efeitos encontrados nas respostas de REP em condições de laboratório podem refletir os efeitos que ocorreriam em situações reais de campo (PHAM-DÉLEGUE et al., 2002).

Para observar os efeitos de três concentrações subletais do inseticida fipronil (0.075, 0.15 e 0.3 ng i.a./abelha) na aprendizagem de operárias de *A. mellifera*, Decourtye et al. (2005) submeteram as abelhas ao ensaio de REP. As operárias tratadas oralmente com 0.15 ng i.a./abelha apresentaram cerca de 50% de respostas mais baixas, quando comparadas aos grupos controle. Dos nove inseticidas testados nesse estudo (deltametrina, cialotrim, cipermetrim, fluvalinate, procloraz, triazamate, endosulfam, dimetoato e fipronil) o fipronil se mostrou com maior capacidade de comprometer a aprendizagem, mostrando que o teste de REP pode ser aplicado para estimar os efeitos subletais dos inseticidas para abelhas. Além dos efeitos comportamentais, abelhas tratadas com a solução de sacarose

com as três concentrações desse inseticida tiveram sua mortalidade aumentada significativamente após 11 dias.

El Hassani et al., (2005) avaliaram efeitos de doses subletais do inseticida fipronil (0.01, 0.1, 0.5 e 1.0 ng i.a./abelha) para operárias adultas de *A. mellifera* através de atividade locomotora, REP e aprendizagem olfatória, por contaminação oral e tópica. Não observaram efeitos do fipronil na capacidade locomotora, mas houve diminuição da mobilidade nas abelhas tratadas topicamente. Para o teste de REP, reduções nas repostas positivas para solução de sacarose a 0.1% e 0.3% foram observadas nos grupos tratados topicamente com 0.01 e 0.5 ng i.a./abelha. Após uma hora da contaminação tópica por 1.0 ng i.a./abelha houve diminuição significativa do REP para as menores concentrações de sacarose (0.1% e 0.3%), enquanto a dose subletal de 0.1 ng i.a./abelha induziu uma diminuição significativa de REP para solução de sacarose a 30%. Quanto à aprendizagem olfatória, a aplicação tópica de 0.5 ng i.a./abelha prejudicou a formação do traço de memória, mas as doses superiores ou inferiores a esta não afetaram significativamente os processos de aprendizagem (EL HASSANI et al., 2005).

Em 2009 esses autores repetiram o experimento injetando no tórax das abelhas duas diferentes doses de fipronil (0.1 e 0.5 ng i.a./abelha) e observaram que a dose de 0.1 ng/abelha comprometeu a memória olfativa, avaliada através da REP, enquanto a dose maior (0.5 ng i.a./abelha) não mostrou efeito. Os autores sugerem que o fipronil poderia ter afinidade e afetar de modo diferente receptores diferentes, onde uma menor concentração de fipronil poderia bloquear um primeiro receptor e provocar efeitos comportamentais, em seguida, uma maior concentração bloqueia outro receptor que antagonizariam os efeitos do primeiro ou, um efeito não-linear poderia ser desencadeado por diferentes metabólitos de fipronil (EL HASSANI et al., 2005).

Esses resultados podem sugerir que ambos os receptores GABA e GluCl estejam envolvidos na alteração da memória olfativa induzida por fipronil e, assim, ilustrar a diversidade de processos de transmissão inibitória participantes na memória olfativa das abelhas e estas observações suportam a hipótese de que o fipronil afeta o aprendizado e a memória olfativa através de múltiplos alvos (EL HASSANI et al. 2009).

A ação de doses subletais do fipronil estão na maioria das vezes ligadas a uma perturbação global nas tarefas essenciais da colônia: alimentação e

forrageamento, as quais afetam a sobrevivência da colônia a longo prazo (COLIN et al., 2004).

Determinar as DL_{50} tópica e CL_{50} oral do inseticida fipronil para abelha *M. scutellaris* e observar os efeitos de doses e concentrações subletais desse inseticida para essas abelhas é fundamental para entendermos se as avaliações de toxicidade baseadas no modelo de abelha *A. mellifera* africanizada são seguras também para essa espécie de abelha sem ferrão.

2 OBJETIVOS

Determinar a DL_{50} tópica e a CL_{50} oral do inseticida fipronil para abelhas forrageiras *M. scutellaris*; e

Avaliar os efeitos das doses subletais via tópica ($DL_{50/10}$ e $DL_{50/5}$) e das concentrações subletais via oral ($CL_{50/10}$ e $CL_{50/5}$) do inseticida fipronil para abelhas forrageiras de *M. scutellaris* através dos testes comportamentais de atividade locomotora e Reflexo de Extensão da Probóscide (REP).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Três colônias de *M. scutellaris*, provenientes do meliponário do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) *campus* Rio Claro, foram utilizadas no experimento. As colmeias ficaram alojadas em uma sala do Biotério e as abelhas tinham acesso livre ao ambiente externo através de um tubo plástico que conecta a caixa com a área externa, permitindo a saída das abelhas (Figuras 3 e 4).

Figura 3 – Tubo plástico que conecta as colônias de *M. scutellaris* ao ambiente externo.



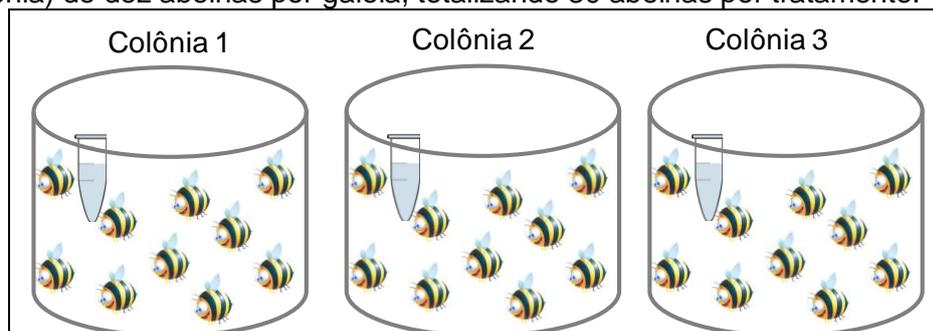
Figura 4 – Acesso das abelhas *M. scutellaris* para sua respectiva colônia e ao ambiente externo.



Os experimentos foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP Rio Claro seguindo os padrões da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998a; 1998b) para avaliação de agrotóxicos para abelhas através de testes de laboratório. Cada grupo experimental

foi formado por três repetições, com dez abelhas de cada colônia por gaiola, totalizando 30 abelhas por grupo experimental (Figura 5). Abelhas com comportamento anormal como letargia, paralisia, hiperexcitação, tremores e dificuldade motora foram descartadas inicialmente.

Figura 5 – Composição de cada grupo experimental: três repetições (cada repetição refere-se a uma colônia) de dez abelhas por gaiola, totalizando 30 abelhas por tratamento.



As três colônias eram consideradas saudáveis pois apresentavam rainha em plena postura, estoque de alimento e atividade de forrageamento constante. Para favorecer a manutenção das colônias, os ninhos receberam xarope de açúcar (solução de água e sacarose a 60% com adição de suco de limão, adaptado de Brighenti et al., (2011)) como alimentação energética artificial.

3.1 Bioensaios

As abelhas forrageiras foram coletadas na saída de cada uma das colônias no período da manhã para realização do experimento. Dez abelhas coletadas da mesma colônia eram transferidas para gaiolas plásticas descartáveis de 250 mL (Figura 6) com alimentador (*ependorf* de 1,5 mL com um orifício central e dois laterais com 1000 μ L de solução de sacarose a 50%).

Figura 6 – Gaiola descartável de 250 mL com alimentador.



As gaiolas foram mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (*Biochemical Oxygen Demand* - BOD) - a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\% \pm 5\%$. Os experimentos foram conduzidos por até 72 horas e, as taxas de mortalidade e comportamento anormal (como letargia, paralisia, hiperexcitação, tremores, dificuldade motora e bater de asas, por exemplo) foram observados uma, quatro e a cada 24 horas após o tratamento. Para a validação dos testes a mortalidade do grupo controle não excedeu 10% e foi respeitado o limite de confiança de 95%.

Para os grupos tratados foi utilizada a formulação técnica do inseticida Fipronil 95%, fornecido pela Bayer CropScience Ltda. Uma solução inicial foi preparada com o inseticida diluído em acetona (1:1), mantida em vidro escuro e câmara fria. A partir da solução inicial foram realizadas diluições em cascata para obtenção das concentrações desejadas.

3.2 Tratamentos

3.2.1 Controle acetona tópico e oral

Como o inseticida fipronil foi diluído em acetona 99% foi necessário realizar um teste inicial a fim de avaliar se a acetona apresenta algum efeito tóxico para essas abelhas. Foram realizados bioensaios com dois grupos tratados: controle com

uso de acetona tópico (CAT) e controle com uso de acetona oral (CAO) e, um grupo controle.

As abelhas do grupo CAT foram anestesiadas na própria gaiola com CO₂ por cerca de dez segundos e transferidas para bandeja plástica onde foi aplicado 1.0 µL de acetona com uma micropipeta automática repetitiva no pronoto de cada abelha. Após a aplicação, as abelhas foram recolocadas em suas respectivas gaiolas, que permaneceram abertas por cerca de 5 minutos para evaporação do solvente.

O grupo CAO recebeu solução de sacarose a 2% de acetona (valor máximo da concentração de acetona presente nas dietas contaminadas para determinação da CL₅₀). Após 24 horas a solução de sacarose contaminada com acetona foi substituída por solução de sacarose sem solvente.

O grupo controle não recebeu nenhum tratamento e todos os grupos foram mantidos em BOD por até 72 horas.

3.2.2 Determinação da dose média letal (DL₅₀) e da concentração média letal (CL₅₀)

3.2.2.1 Determinação da DL₅₀ via tópica e peso médio das abelhas

Para a determinação da DL₅₀ via tópica do inseticida fipronil para forrageiras de *M. scutellaris* foram determinadas seis concentrações do inseticida: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 e 5.0 ng de fipronil/µL de solução, baseadas nas DL₅₀ desse inseticida estabelecidas para *A. mellifera* africanizada de 1.9 e 1.06 ng/abelha por Pereira (2010) e Roat et al. (2010) respectivamente e, para *S. postica* de 0.54 ng/abelha por Jacob (2011).

Houve um grupo experimental (Figura 5) para cada concentração, que corresponde à dose única de tratamento que cada abelha recebeu, além do grupo controle, que não recebeu nenhum tratamento.

Para a aplicação do inseticida as abelhas coletadas foram anestesiadas com CO₂ na própria gaiola por aproximadamente dez segundos, transferidas para bandeja plástica e 1.0 µL da solução do inseticida com as concentrações determinadas foi aplicado no pronoto de cada abelha com uma micropipeta automática repetitiva (Figura 7). Após a aplicação as abelhas foram colocadas novamente em suas respectivas gaiolas, que permaneceram abertas por aproximadamente cinco minutos para evaporação do solvente e mantidas em BOD por até 72 horas.

As abelhas, logo após a anestesia e antes da aplicação do tratamento, foram pesadas individualmente em balança analítica para a obtenção do peso médio a fim de transformar o resultado da DL_{50} de ng de i.a./abelha para ng de i.a./g de abelha.

Figura 7 – Aplicação de 1.0 μ L de solução no pronoto de forrageira de *M. scutellaris* com uma micropipeta automática repetitiva.



3.2.2.2 Determinação da CL_{50} via oral e consumo de alimento diário

Para a determinação da CL_{50} via oral do inseticida fipronil para operárias forrageiras de *M. scutellaris* foram determinadas cinco concentrações do inseticida: 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, e 0.5 ng de fipronil/ μ L de solução de sacarose, baseadas nas CL_{50} desse inseticida (1.27 e 0.24 ng/ μ L dieta) estabelecidas para *A. mellifera* africanizada por Roat et al., (2010) e para *S. postica* por Jacob (2012) respectivamente, além do grupo controle.

Os grupos de abelhas tratadas receberam a solução de sacarose contaminada com as concentrações determinadas, de forma que o único contato com a dieta contaminada foi através da alimentação (Figura 8). Após 24 horas a solução de sacarose tratada foi substituída por solução de sacarose sem tratamento. O grupo controle recebeu solução de sacarose sem tratamento.

Figura 8 – Forrageira de *M. scutellaris* se alimentando com solução de sacarose.



Para avaliar a quantidade de solução de sacarose consumida por abelha por dia, os alimentadores dos grupos controle foram previamente pesados em balança analítica e pesados novamente com 1000 μ L de solução de sacarose. Posteriormente foram oferecidos nas gaiolas para as abelhas durante 24 horas, quando foram novamente pesados. Um alimentador passou pelos mesmos procedimentos e foi colocado em uma gaiola vazia na BOD para avaliar quanto do alimento é evaporado, e não consumido, no mesmo período. A partir desses dados foi determinada a média de solução de sacarose consumida por abelha por dia.

3.3 Análises comportamentais

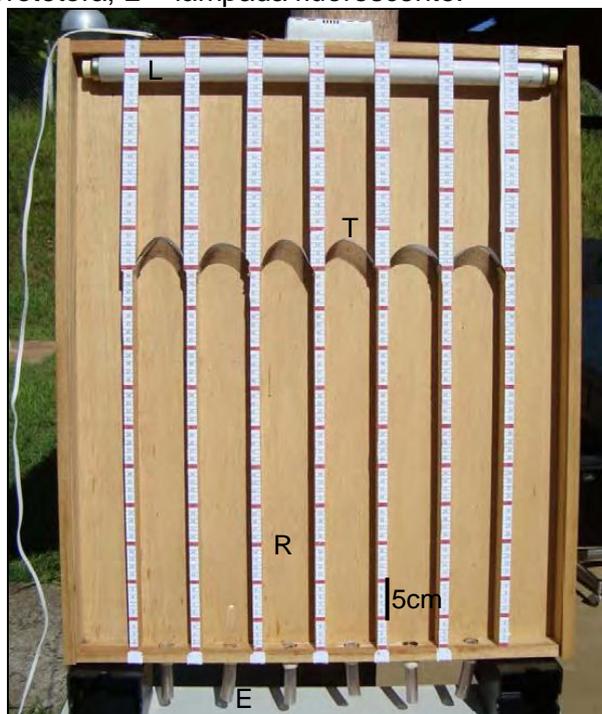
Para a realização dos testes comportamentais abelhas forrageiras de *M. scutellaris* foram tratadas com doses e concentrações subletais (DL_{50/5}, DL_{50/10}, CL_{50/5} e CL_{50/10}) do inseticida fipronil. As abelhas tratadas topicamente com doses subletais receberam 1.0 μ L da solução e as abelhas tratadas oralmente com as concentrações subletais receberam solução de sacarose tratada. Ambos os tratamentos seguem a mesma metodologia de intoxicação usada para determinação da DL₅₀ tópica e da CL₅₀ oral, descritas anteriormente.

De acordo com Pereira (2011) o TL_{50} do fipronil para operárias de *A. mellifera* africanizada é de 19.8 horas, portanto, os testes comportamentais foram realizados apenas após 24 horas de exposição ao inseticida.

3.3.1 Atividade locomotora

A atividade locomotora foi testada em uma caixa de madeira (80 cm x 30 cm x 4 cm) com seis divisões formando raias de 50 cm, e uma tampa de vidro na parte frontal que permitiu a visualização das abelhas (Figura 9). Na parte inferior da caixa estão seis entradas individuais para cada uma das raias e na parte superior uma lâmpada fluorescente para estimular as abelhas, que apresentam fototaxia positiva (as abelhas tendem a ir em direção à luz, contra a força da gravidade) (EL HASSANI et al., 2005; LAMBIN et al., 2001), motivo pelo qual os testes foram realizados em ambiente com ausência de luz. Uma tela de nylon foi colocada após a marca de 50 cm para evitar que abelhas chegassem até a lâmpada.

Figura 9 – Caixa utilizada para o teste de atividade locomotora. E= entradas individuais; R= raias individuais; T = tela protetora; L = lâmpada fluorescente.



Fonte: Adaptado de Pereira (2010).

Após 24 horas da exposição ao inseticida as abelhas foram colocadas individualmente na entrada de cada raia e, com a caixa posicionada verticalmente,

seis abelhas eram liberadas a cada vez. Foram gravados vídeos e o tempo que cada abelha levou para percorrer o percurso de 50 cm foi contabilizado.

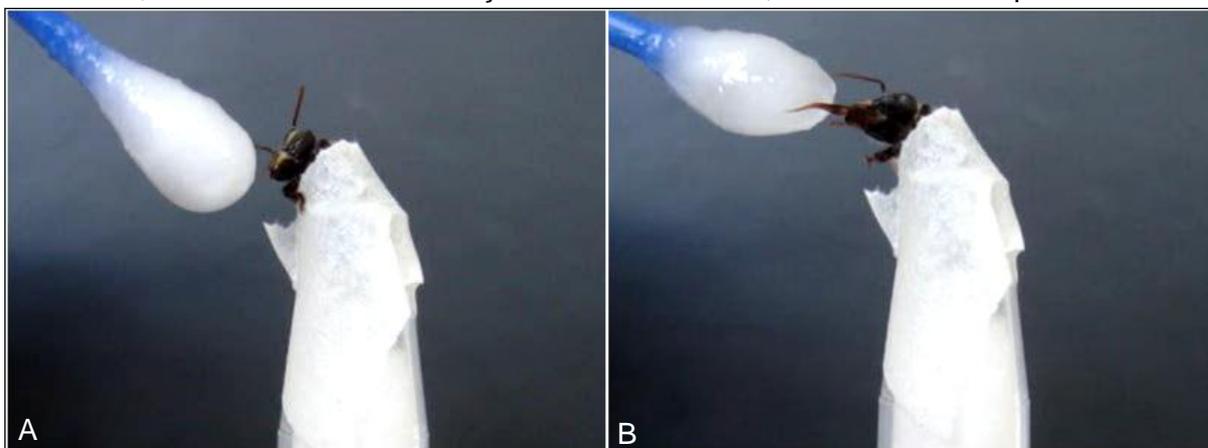
Para o teste foram utilizadas 30 abelhas de cada tratamento e um total de 80 abelhas do grupo controle (40 para os tratamentos tópicos e 40 para os tratamentos orais). Nesse teste, além dos grupos tratados citados acima, a dose subletal tópica de 0.05 ng i.a./abelha também foi incluída.

3.3.2 Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)

Inicialmente foi realizado um pré-teste de REP não condicionado (apenas gustativo) com trinta abelhas do grupo controle para saber se essas abelhas: i) apresentavam uma clara extensão da probóscide, requisito básico para realização do teste e; ii) identificar a sensibilidade dessas abelhas a concentrações crescentes de sacarose, observando a partir de qual concentração todas as abelhas testadas respondem com a mesma intensidade (considerando a extensão da probóscide uma resposta positiva – Figura 10-B).

As abelhas forrageiras, após coletadas permaneceram nas gaiolas plásticas por três horas em jejum. Em seguida foram anestesiadas com CO₂ por aproximadamente dez segundos e colocadas em ponteiras de pipeta automática (1000 µL) cortadas de forma a restringir os movimentos do corpo, contidas com fita adesiva e com as antenas e peças bucais livres (Figura 10), onde permaneceram por mais uma hora sem alimento. Foram preparadas soluções de sacarose de concentração 0.1%, 0.3%, 1%, 3%, 10%, 30%, 50%, 55%, 65%, 75% e 85%, que foram oferecidas intercaladas com água, com um cotonete individual para cada concentração.

Figura 10 – Forrageira de *M. scutellaris* submetida ao teste de REP, aprisionadas somente com as antenas e peças bucais livres. A – Oferecimento de água, sem extensão da probóscide; B – oferecimento de solução de sacarose 50%, com extensão da probóscide.



O efeito das doses e concentrações subletais de fipronil no teste de REP gustativo foi avaliado após a determinação da concentração mínima de solução de sacarose a qual todas as abelhas responderam e suas concentrações superiores, 24 horas após os tratamentos com o inseticida, com a mesma metodologia do pré-teste.

3.4 Análises estatísticas

Para a determinação das DL_{50} e CL_{50} o número de abelhas mortas foi contabilizado e submetido à análise estatística do tipo dose-resposta, empregando-se um modelo *log-logistic* do pacote “*drc*” (*Analysis of Dose-Response Curves*) (RITZ; STREIBIG, 2005) compilado pelo programa R® (2011). De posse do modelo matemático, os valores de referência para DL_{50} e CL_{50} foram calculados.

Na avaliação da atividade locomotora foi realizada uma análise de variância através do teste Kruskal-Wallis (Teste H) e, quando a estatística H obteve valor de p significativo, foi realizado o teste de Dunn para verificar qual tratamento apresentava diferença significativa em relação ao grupo controle (AYRES et al., 2007), utilizando o programa BioEstat 5.3 (2012).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Controle acetona tópico e oral

Todos os bioensaios realizados com os grupos de controle acetona, tanto tópico como oral, não diferiram em seus resultados quando comparados aos grupos controle, mostrando que a acetona não foi tóxica para forrageiras de *M. scutellaris* durante o período testado, de forma que o solvente não interfere nos resultados obtidos.

4.2 Dose média letal (DL₅₀) tópica e concentração média letal (CL₅₀) oral

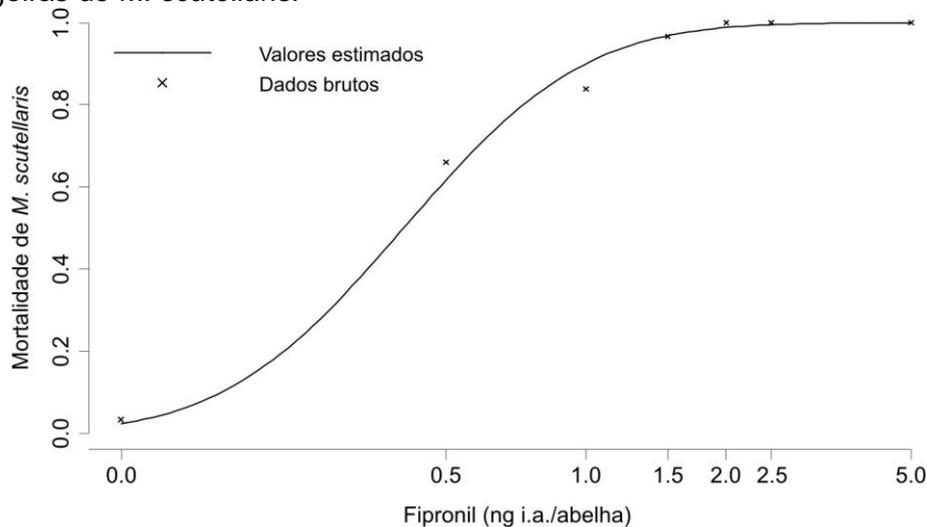
Por contato, a DL₅₀ (48 horas) de fipronil foi de 0,41ng i.a./abelha (Tabela 1 e Figura 11) considerado altamente tóxico para forrageiras de *M. scutellaris* de acordo com a classificação de Johansen e Mayer (1990), que consideram inseticidas com uma DL₅₀ < 2,0 µg/abelha como altamente tóxicos para esses insetos.

Tabela 3 – Toxicidade aguda (48 horas) de fipronil via tópica para abelhas forrageiras de *M. scutellaris*.

Modo de exposição	DL ₅₀ (ng i.a./abelha)	I.C. 95%	χ^2	G.L.	DL ₅₀ (ng i.a./g abelha)
Tópico	0.41	0.23 – 0.58	9.8238	16	4.1

I.C. – Intervalo de Confiança; G.L. – Graus de Liberdade.

Figura 11 – Determinação da DL₅₀ tópica (ng i.a./abelha) (48 horas) do inseticida fipronil para forrageiras de *M. scutellaris*.



Comparando esse resultado com a DL₅₀ de fipronil estabelecida para outras espécies de abelhas (Quadro 2), forrageiras de *M. scutellaris* se mostraram mais sensíveis ao fipronil que *A. mellifera* (1.06 ng/abelha – Roat et al., 2010; 1.9 ng/abelha – Pereira, 2010; 4 ng/abelha – Tingle, 2003; 6 ng/abelha – Decourtye et al., 2005; e 13 ng/abelha – Mayer; Lunden, 1999), *Megachile rotundata* (Fabricius, 1787) (4 ng/abelha), *Nomia melanderi* (Cockerell, 1906) (1.130 µg/abelha) (MAYER; LUNDEN, 1999) e *S. postica* (0.54 ng/abelha) (JACOB et al., 2011).

Quadro 4 – Comparação entre a DL₅₀ de fipronil/abelha para forrageiras de *M. scutellaris* e outras espécies de abelhas.

Abelha	DL ₅₀ de Fipronil/abelha
<i>Apis mellifera</i>	1.06 - 13 ng/abelha (Decourtye et al., 2005; Mayer; Lunden, 1999; Pereira, 2011; Roat et al., 2010; Tingle, 2003)
<i>Megachile rotundata</i>	4 ng/abelha (Mayer; Lunden, 1999)
<i>Melipona scutellaris</i>	0.41 ng/abelha
<i>Nomia melanderi</i>	1.130 µg/abelha (Mayer; Lunden, 1999)
<i>Scaptotrigona postica</i>	0.54 ng/abelha (Jacob et al., 2011)

Considerando que operárias de *M. scutellaris* tem um peso corpóreo médio de 0.1 g e transformando a DL₅₀ de ng de i.a./abelha para ng de i.a./g de abelha obtemos uma DL₅₀ de 4.1 ng i.a./g de abelha. Nesse caso, abelhas *M. scutellaris* são cerca de 25 vezes mais suscetíveis ao fipronil que *A. mellifera* (103 ng/g abelha), cerca 32 vezes mais sensíveis que *M. rotundata* (132 ng/g abelha) e mais de 3.000 vezes mais sensíveis que *N. melanderi* (13.190 ng/g de abelha) (MAYER; LUNDEN, 1999) (Quadro 3).

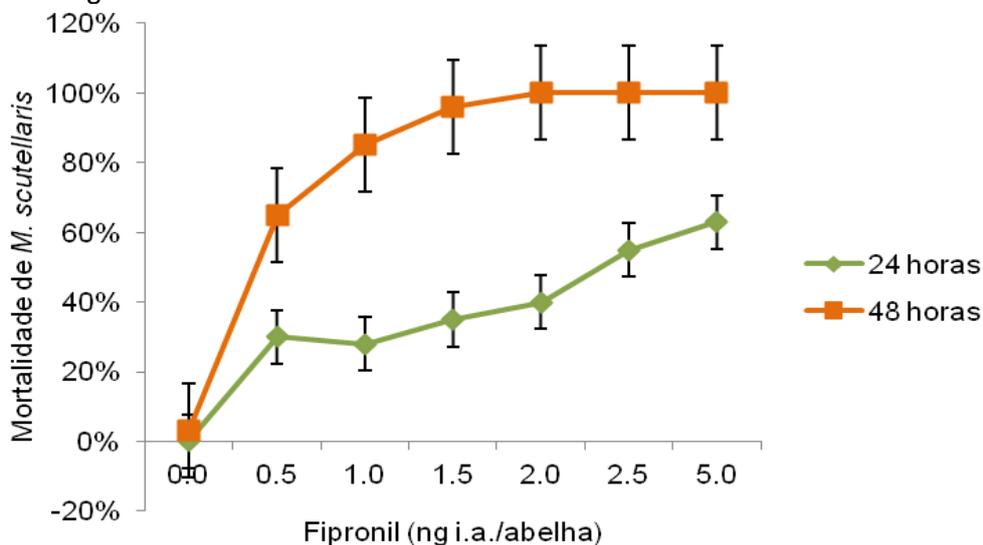
Quadro 5 – Comparação entre a DL₅₀ de fipronil/g de abelha para forrageiras de *M. scutellaris* e outras espécies de abelhas.

Abelha	DL ₅₀ de Fipronil/g de abelha
<i>Apis mellifera</i>	103 ng/g de abelha (Mayer; Lunden, 1999)
<i>Megachile rotundata</i>	132 ng/g de abelha (Mayer; Lunden, 1999)
<i>Melipona scutellaris</i>	4.1 ng/g de abelha
<i>Nomia melanderi</i>	13.190 ng/g de abelha (Mayer; Lunden, 1999)

As maiores doses do inseticida fipronil (5.0 e 2.5 ng i.a./abelha) causaram mortalidade de 63% e 55%, respectivamente, após 24 horas de contaminação e 100% de mortalidade, incluindo o grupo tratado com 2.0 ng/abelha, após 48 horas da contaminação. As doses de 1.5 e 1.0 ng i.a./abelha também apresentaram alta

taxa de mortalidade após 48 horas de intoxicação, com 96% e 85% de abelhas mortas, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – Toxicidade aguda tópica de fipronil para forrageiras de *M. scutellaris* e respectiva porcentagem de mortalidade.



Ainda, as abelhas do grupo tratado com 5.0 ng de fipronil/abelha apresentaram sinais de intoxicação: após 4 horas havia abelhas desse grupo paradas com as asas vibrando. Esse mesmo comportamento foi observado em *A. mellifera* tratadas com 0.1ng de fipronil/abelha e após 11 dias de exposição à dose de 0.01 ng de fipronil/abelha por Aliouane et al. (2009). Segundo os autores, o comportamento de asas vibrando é acompanhado pela emissão de feromônio de alarme, que provoca ataque entre os indivíduos, comportamento que as abelhas *M. scutellaris* também apresentaram nesse estudo.

Após 24 horas da contaminação, abelhas sobreviventes dos grupos tratados com as maiores doses de fipronil (2.0, 2.5 e 5.0 ng/abelha) apresentaram tremores, seguidos por paralisia e morte. Esses mesmos sinais também foram observado por Colin et al. (2004) em *A. mellifera* tratadas com solução de sacarose contaminada com 2 g fipronil/kg dieta.

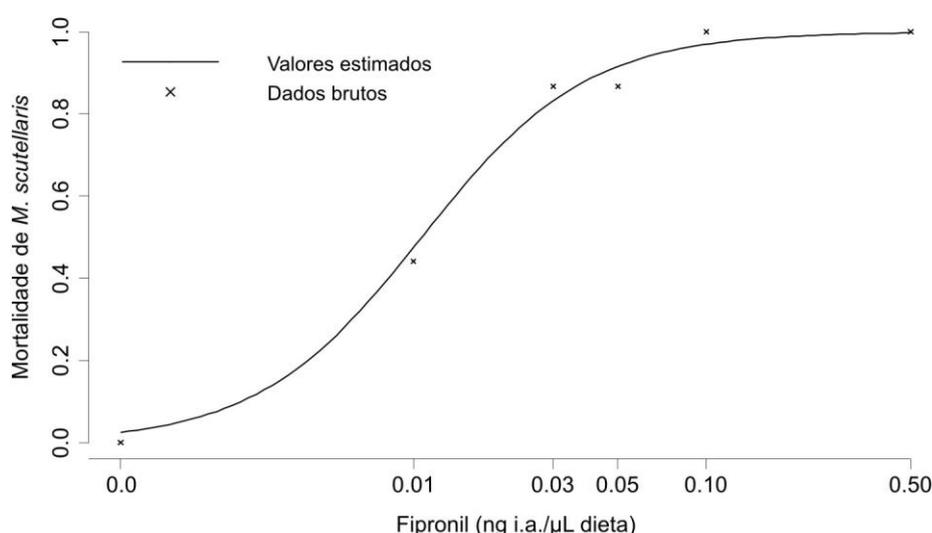
A intoxicação através da solução de sacarose tratada determinou a CL_{50} oral (48 horas) do inseticida fipronil para forrageiras de *M. scutellaris* em 0.011ng i.a./ μ L de solução de sacarose (Tabela 2 e Figura 13).

Tabela 4 – Toxicidade aguda (48 horas) de fipronil via oral para abelhas forrageiras de *M. scutellaris*.

Modo de exposição	CL ₅₀ (ng i.a./μL de dieta)	I.C. 95%	χ ²	G.L.	DL ₅₀ (ng i.a./abelha)
Oral	0.011	0.005 – 0.02	15.286	12	0.66

I.C. – Intervalo de Confiança; G.L. – Graus de Liberdade.

Figura 13 – Determinação da CL₅₀ oral (ng i.a./μL de dieta) (48 horas) do inseticida fipronil para forrageiras de *M. scutellaris*.



Comparando esse resultado com as CL₅₀ de fipronil já obtidas para outras abelhas (Quadro 4) observamos que as abelhas sem ferrão *M. scutellaris* são cerca de 115 vezes mais sensíveis a esse inseticida que *A. mellifera* africanizada (1.27ng/μL de dieta – Roat et al., 2010) e cerca de 21 vezes mais sensíveis que *S. postica* (0.24 ng/μL de dieta - Jacob, 2012).

Quadro 4 – Comparação entre a CL₅₀ de fipronil/μL de dieta para forrageiras de *M. scutellaris* e outras espécies de abelhas.

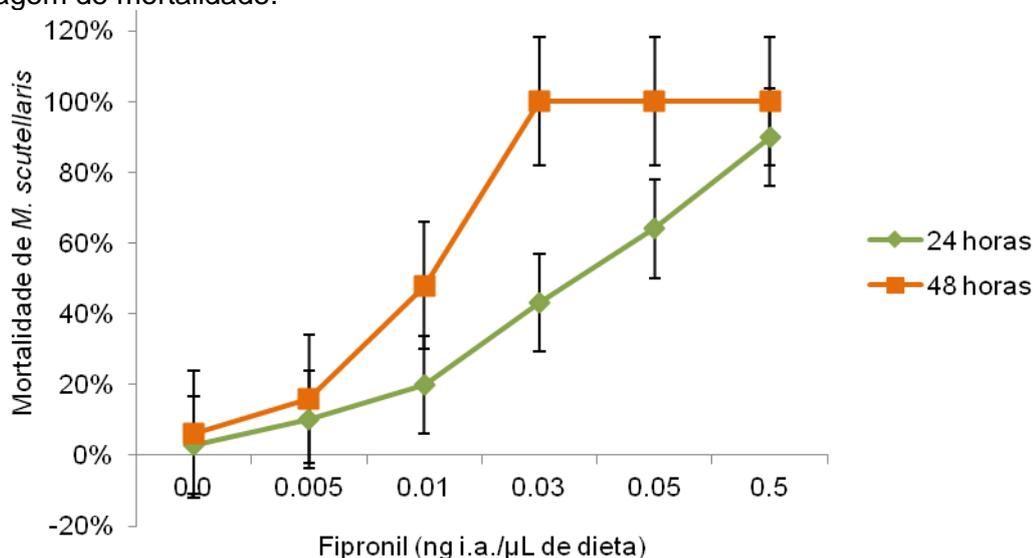
Abelha	CL ₅₀ de Fipronil/μL dieta
<i>Apis mellifera</i> africanizada	1.27 ng/μL dieta (Roat et al., 2010)
<i>Melipona scutellaris</i>	0.011 ng/μL dieta
<i>Scaptotrigona postica</i>	0.24 ng/μL dieta (Jacob, 2012)

Considerando que o fipronil não apresenta nenhum efeito anti-alimentação ou de aversão ao alimento contaminado por ele, mesmo em altas doses (MAYER; LUNDEN, 1999; COLIN et al., 2004) e que a média de consumo de solução de sacarose para *M. scutellaris* é de 55 μL/dia/abelha, estimamos uma DL₅₀ oral (48 horas) de 0,6 ng i.a./abelha, 10 vezes menor que a DL₅₀ oral (48 horas) de fipronil

para *A. mellifera* (6 ng/abelha) determinada por Decourtye et al. (2005), sendo o fipronil classificado também como altamente tóxico por via oral para forrageiras de *M. scutellaris* de acordo com Johansen e Mayer (1990).

A solução de sacarose com as concentrações mais altas de fipronil (0.5 e 0.05 ng/ μ L de dieta) causaram mortalidade de 90% e 64%, respectivamente, após 24 horas de ingestão da dieta. Ambos os grupos e o grupo de abelhas tratadas com 0.03 ng/ μ L de dieta tiveram 100% de mortalidade após 48 horas (Figura 14).

Figura 14 – Toxicidade aguda oral de fipronil para forrageiras de *M. scutellaris* e respectiva percentagem de mortalidade.



As abelhas sobreviventes dos grupos que receberam a solução de sacarose com a maior concentração de fipronil (0.5 ng i.a./ μ L dieta) e nas abelhas tratadas com dieta contaminada com 0.05 e 0.03 ng/ μ L de dieta apresentaram tremores (comportamento que sinaliza a intoxicação) após 24 horas da intoxicação, assim como as abelhas tratadas com as maiores doses de fipronil topicamente e como descrito por Colin et al., (2004) em que abelhas *A. mellifera* apresentam sinais de comprometimento, descritos como convulsão por esses autores, quando expostas a uma dieta contaminada com 2 g de fipronil/kg de solução de sacarose. Após 48 horas as abelhas que receberam solução de sacarose contaminada com 0.01 e 0.005 ng de fipronil/ μ L de dieta também apresentaram os mesmos sintomas.

Esses resultados estão de acordo com Desneux, Decourtye e Delpuech (2007), pois também mostram que diferentes espécies de abelhas diferem quanto a vulnerabilidade a exposição de inseticidas. Diversos estudos (MALASPINA, 1979;

MALASPINA; STORT, 1983; MACIEIRA; HEBLING-BERALDO, 1989; MAYER; LUNDEN, 1999; MORAES; BAUTISTA; VIANA, 2000; DEL SARTO, 2009; STUCHI, 2009; VALDOVINOS-NÚÑEZ et al., 2009; JACOB et al., 2011; ROESSINK et al., 2011) também mostram diferenças quanto a suscetibilidade entre espécies de abelhas a inseticidas e, a maioria desses resultados mostram que a espécie *A. mellifera* é mais tolerante quando comparada a espécies de abelhas nativas e corroboram as sugestões de Brittain et al., (2010) de que as abelhas selvagens são um grupo de polinizadores em risco particular à exposição a pesticidas.

Os resultados desse trabalho, ainda, condizem com a recomendação Brittain e Potts (2011) de que estudos ecotoxicológicos diversifiquem as espécies de polinizadores utilizadas para compreender melhor como é a sensibilidade do modelo representante das abelhas (*A. mellifera*) em comparação a outras espécies de polinizadores.

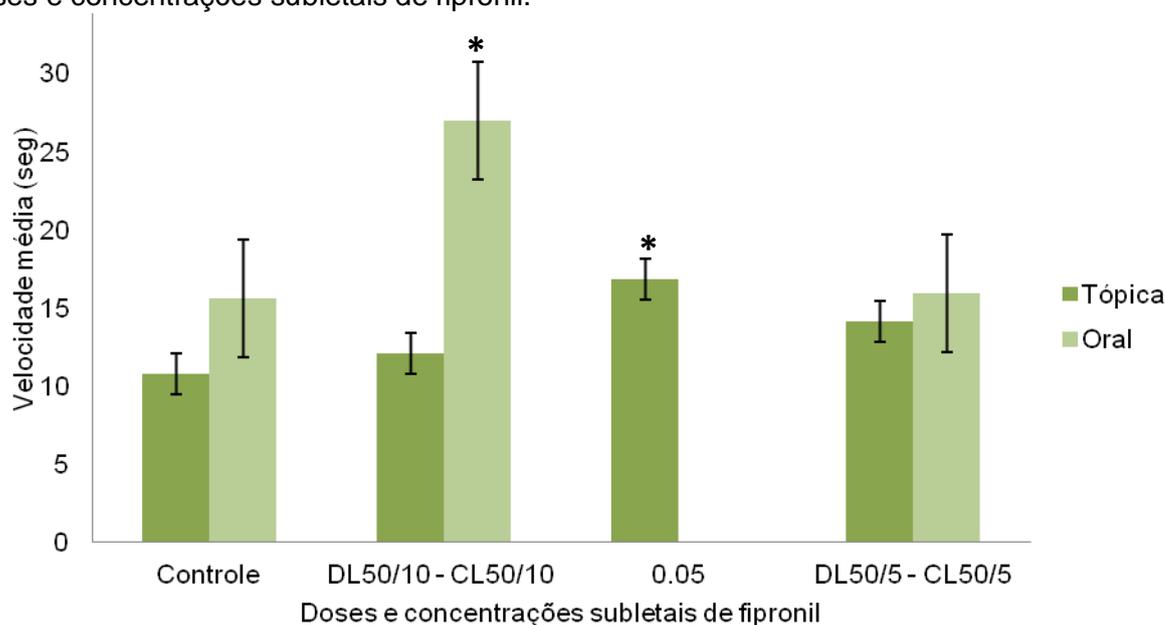
4.3 Análises comportamentais

A partir da DL_{50} tópica e da CL_{50} oral foram determinadas duas doses subletais: $DL_{50/10}$ (0.041 ng i.a./abelha) e $DL_{50/5}$ (0.082 ng i.a./abelha) e; duas concentrações subletais: $CL_{50/10}$ (0.0011 ng i.a./ μ L de dieta) e $CL_{50/5}$ (0.0022 ng i.a./ μ L de dieta), que foram usadas para os grupos tratados nos testes comportamentais, realizados 24 horas após a intoxicação pelo fipronil. Para o teste de atividade locomotora uma dose intermediária (0.05 ng i.a./abelha) foi incluída, a fim de observar o efeito de mais uma dose subletal.

4.3.1 Atividade locomotora

Comparando a velocidade média na raia dos grupos de abelhas tratadas com as doses e concentrações subletais de fipronil ($DL_{50/10}$, $DL_{50/5}$, 0.05 ng fipronil/abelha, $CL_{50/10}$ e $CL_{50/5}$) (Tabela 3 e Figura 15) e controle, através do teste Kruskal-Wallis, houve diferença estatística significativa tanto no tratamento tópico ($H = 20.2472$; G.L. = 3; $p = 0.0002$) como no tratamento oral ($H = 14.6161$; G.L. = 2; $p = 0.0007$).

Figura 15 – Velocidade média de abelhas *M. scutellaris* 24 horas após tratamento com doses e concentrações subletais de fipronil.



*Kruskal-Wallis, Dun, $p < 0.001$.

Comparando-se os grupos tratados e controle através do teste Dunn observou-se diferença estatística significativa entre a velocidade média das abelhas do grupo controle e as abelhas do grupo tratado topicamente com a dose subletal de 0.05 ng i.a./abelha ($p < 0.001$) e o grupo tratado oralmente com a $CL_{50/10}$ (0.0011 ng i.a./ μ L de dieta) ($p < 0.001$) (Figura 14) mostrando que doses e concentrações subletais do inseticida fipronil causam alterações no comportamento de forrageiras de *M. scutellaris*, comprometendo a atividade locomotora dessas abelhas. Para os outros tratamentos com doses subletais de fipronil, apesar de a velocidade média não diferir significativamente do controle, as abelhas levaram mais tempo para percorrer o mesmo percurso.

Um efeito não-linear de doses e concentrações crescentes de fipronil sobre o comportamento foi observado nesse trabalho (os tratamentos que apresentaram velocidade média significativamente mais alta não foram necessariamente os tratamentos com dose e concentrações mais elevadas).

Esse mesmo comportamento foi observado por El Hassani et al., (2005) que sugerem que o fipronil afeta diferentes receptores com uma afinidade diferente para cada um deles, então, a menor dose/concentração poderia bloquear um primeiro receptor, desencadeando os efeitos comportamentais. Esses autores sugerem que em uma dose/concentração maior aconteceria o bloqueio do primeiro receptor, que

causa alterações comportamentais, mas também um segundo receptor seria bloqueado, antagonizando os efeitos desencadeados pelo primeiro, onde os receptores GABA e GluCl seriam os principais alvos desse efeito. Outra alternativa proposta pelos mesmos autores é que esse efeito não-linear poderia também ser desencadeado por diferentes metabólitos de fipronil (EL HASSANI et al., 2005).

O tempo de voo de abelhas *A. mellifera* tratadas oralmente com dose subletal de fipronil ($1\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ solução de sacarose), durante testes de orientação em um labirinto, foi significativamente maior quando comparado com as forrageiras do controle (DECOURTYE et al. 2009) como também observado em nossos resultados com forrageiras de *M. scutellaris* tratadas com doses e concentrações subletais de fipronil, tópica e oralmente.

Pereira (2010) comparou a velocidade média de *A. mellifera* tratadas com doses subletais do fipronil (DL_{50} , $\text{DL}_{50/10}$ e $\text{DL}_{50/100}$) após uma, quatro e 24 horas do tratamento, com a mesma metodologia para teste de atividade locomotora utilizada nesse trabalho. Após quatro e 24 horas do tratamento, os grupos de abelhas que receberam a dose equivalente a DL_{50} (1,9 ng i.a./abelha) tiveram a velocidade média significativamente maior quando comparada com as abelhas do grupo controle.

Utilizando metodologia semelhante, El Hassani et al., (2005) analisaram a atividade locomotora de abelhas *A. mellifera* após uma hora de tratadas oral e topicamente com doses subletais igual ou inferior a $\text{DL}_{50/5}$ (0.1, 0.5 e 1.0 ng de fipronil/abelha) e não observaram efeito significativo do fipronil na atividade locomotora, embora as abelhas tratadas topicamente com esse inseticida apresentaram uma redução na mobilidade.

Avaliando a atividade locomotora de *A. mellifera* recém-emergidas através de uma metodologia parecida, Aliouane et al. (2009) observaram que abelhas tratadas topicamente com 0.01 ng de fipronil/abelha ($\text{DL}_{50/500}$) permaneceram significativamente mais tempo imóveis e o comprimento do percurso e deslocamento diminuiu para as abelhas tratadas, mas não diferiu estatisticamente.

O aumento na velocidade de voo das abelhas pode estar relacionado ao principal alvo do fipronil, os receptores GABA, localizado na membrana das células musculares, que tem importante função na modulação locomotora e atividade de voo de insetos e, a ação do fipronil nesses insetos pode ocorrer na junção neuromuscular periférica das fibras musculares, diminuindo essas atividades (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993; DECOURTYE et al., 2009).

Ainda, a porcentagem de abelhas que não conseguiram iniciar e/ou completar o percurso foi maior, tanto para os tratamentos tópicos como orais, quando comparada ao controle. Enquanto nos grupos controle um máximo de 2.5% das abelhas não conseguiram completar o percurso, nas doses subletais ($DL_{50/10}$, $DL_{50/5}$ e a intermediária 0.05 ng i.a./abelha) 16%, 17% e 10% das abelhas não conseguiram iniciar ou concluir o trajeto, respectivamente. Nas concentrações subletais ($CL_{50/10}$ e $CL_{50/5}$) essa taxa foi de 40% e 22%, respectivamente. Apesar da dose subletal de 0.05 ng i.a./abelha ter a menor porcentagem das abelhas que não completaram o percurso, foi o tratamento que mais causou efeito sobre a atividade locomotora dessas abelhas, com diferença significativa na velocidade média desses insetos.

As concentrações subletais de fipronil causaram mais prejuízos ao comportamento locomotor e a orientação dessas abelhas em comparação aos tratamentos tópicos, com maior porcentagem de abelhas que não conseguiram começar ou completar o percurso.

A capacidade locomotora e de orientação das forrageiras de *M. scutellaris* foi diminuídas após 24 horas da exposição a doses e concentrações subletais do fipronil, por via tópica e oral. Considerando que o forrageamento é um processo complexo que envolve performances individuais coordenadas, dentre elas a locomoção e orientação, a eficácia dessa atividade essencial para as abelhas também é comprometida por doses e concentrações subletais do fipronil (COLIN et al., 2004).

Para quantificar e analisar a atividade de forrageamento em *A. mellifera* expostas a uma concentração subletal de fipronil 70 vezes inferior a DL_{50} ($2\mu\text{g}/\text{kg}$ de solução de sacarose), Colin et al. (2004) utilizaram colônias confinadas limitadas por um túnel, de modo que as abelhas só tinham acesso a fonte alimentar determinada. O alimento contaminado foi oferecido por quatro dias consecutivos e o número de abelhas no alimentador foi contado a cada três minutos, através de filmes gravados durante o decorrer dos testes. Do primeiro ao terceiro dia o fipronil causou uma drástica diminuição de abelhas no alimentador e sinais clínicos evidentes de intoxicação (tremores e paralisia), mostrando que as abelhas eram incapazes de realizar o forrageamento. No quarto e último dia a frequência das abelhas no alimentador foi de zero ou próximo de zero em duas das três colônias contaminadas, concluindo o forte efeito do fipronil para as abelhas forrageiras.

Para avaliar como duas doses subletais de fipronil (0.06 e 0.3 ng i.a./abelha) afetam o comportamento de forrageamento em *A. mellifera linguistica*, Decourtye et al., (2011) também utilizaram um método de túnel com forrageiras identificadas com etiquetas de rádio frequência, a fim de detectar alteração no padrão de voo entre o alimentador artificial e a colmeia. As abelhas foram tratadas oralmente e o padrão de voo analisado diariamente até quatro dias após o tratamento. A dose de 0.3 ng i.a./abelha reduziu o número de viagens de forrageamento nas primeiras 24 horas e as abelhas tratadas com essa dose tiveram um aumento no tempo de voo entre o alimentador e a colmeia nos primeiros três dias.

A fim de examinar se uma dose subletal oral de fipronil ($1\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ solução de sacarose) pode causar desorientação em forrageiras de *A. mellifera*, as abelhas tiveram que voar por um labirinto complexo para atingir um alimentador. As abelhas tratadas apresentaram desempenho significativamente mais baixo que as abelhas controle. A taxa de forrageiras tratadas que entraram no labirinto foi menor, bem como a taxa de abelhas tratadas que chegou ao alimentador (cerca de 26% a 29% mais baixa que o controle). Ainda, a porcentagem de abelhas tratadas que não encontraram o alimentador foi 35% maior que no controle, concluindo que o fipronil afeta a capacidade de orientação dessas abelhas (DECOURTYE et al., 2009).

Os resultados apresentados no presente trabalho também corroboram os dados de Decourtye et al., (2009; 2011) que sugerem que a exposição a doses subletais do inseticida fipronil pode induzir deficiência locomotora e de orientação nas abelhas e, possivelmente acarretar no desaparecimento de forrageiras, um sintoma característico do CCD.

4.3.2 Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)

A maioria (95%) das forrageiras de *M. scutellaris* não apresentou uma resposta positiva durante o pré-teste de REP não condicionado para nenhuma das 11 concentrações de solução de sacarose, sendo assim, a avaliação do efeito de doses e concentrações subletais de fipronil para essas abelhas se tornou inviável com essa metodologia. A maioria das abelhas tentava escapar da ponteira, como também foi observado por Toda, Song e Nieh (2009) com *Bombus impatiens* (Cresson, 1863).

Experimentos de Abramson, Aquino e Stone (1999), mostraram que o teste de REP não condicionado pode não ser útil para forrageiras de *M. scutellaris* e que a sacarose não seria um estímulo eficiente para essas abelhas. Em observação em um teste de campo, os autores relataram a preferência dessas abelhas por mel da própria espécie, em comparação a sacarose. Eles sugerem que essa é uma técnica falha para *M. scutellaris*, propondo duas hipóteses: i) desenvolver novas metodologias para esse ensaio para essa espécie de abelha sem ferrão; ou ii) essas abelhas simplesmente não respondem ao protocolo de REP.

Roselino e Hrnčir (2012) também utilizaram o protocolo de REP para realizar um condicionamento clássico olfatório (onde as abelhas estendem a probóscide ao contato das antenas com um odor associado ao oferecimento de solução de sacarose) com forrageiras de *M. scutellaris* e nenhuma das abelhas testadas responderam de forma positiva ao REP e, menos de 20% das abelhas responderam positivamente no teste de memória de curto prazo, avaliado também através do mesmo protocolo.

Laloi et al., (1999) utilizaram o REP para um condicionamento olfatório em mamangavas (*Bombus terrestris*, Linnaeus, 1758) e observaram que o aumento da concentração da solução de sacarose induz ao aumento da performance nesse teste, diferindo dos resultados que aqui foram apresentados para *M. scutellaris*. Ainda assim, com a solução de sacarose a 75% esses autores obtiveram uma resposta positiva de REP de, no máximo, 44% das mamangavas testadas, uma porcentagem considerada baixa quando comparada aos resultados para *A. mellifera* (70%-100% de respostas positivas).

Comparando o condicionamento clássico olfatório através do REP com abelhas *A. mellifera* africanizadas e duas espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifasciata*, Lepeletier, 1836) e *Scaptotrigona aff. depilis*, Moure, 1942) McCabe et al., (2007) também observaram que abelhas sem ferrão apresentam respostas mais baixas (60% das abelhas sem ferrão responderam positivamente para solução de sacarose a 50%) enquanto 95.5% das abelhas melíferas mostraram respostas positivas.

McCabe e Farina (2009) utilizaram o protocolo de REP para avaliar o condicionamento clássico olfatório de abelhas *M. quadrifasciata* e, observaram que um número muito baixo de abelhas respondeu espontaneamente a esse protocolo e, esse é um processo limitado, que não parece fornecer variáveis adequadas para

uma avaliação quantitativa em espécies de abelhas sem ferrão. Os mesmos autores, em 2010, também observaram baixas respostas positivas de REP em abelhas *Tetragonista angustula* (69%) e um máximo de 20% de respostas positivas quando essas abelhas foram submetidas ao REP condicionado (McCABE; FARINA, 2010).

Avaliando a resposta ao REP para abelhas não-*Apis* (*Bombus* spp., *Megachile rotundata*, *M. pugnata*, Say, 1837 e *Osmia lignaria*, Say, 1837) em uma comparação com *A. mellifera*, Vorel e Pitts-Singer (2010) observaram que, enquanto a abelha melífera responde prontamente com a extensão da probóscide quando suas antenas são estimuladas com solução de sacarose (25% e 50%) as abelhas testadas não exibiram uma resposta positiva ao mesmo teste.

A falta de resposta positiva ao REP das abelhas sem ferrão poderia ser devido a essa metodologia ter sido desenvolvida para a espécie *A. mellifera*, conforme sugerem McCabe e Farina, (2007) e Toda, Song e Nieh (2009). Um estudo neuro-anatômico do lobo antenal de *M. scutellaris* revelou que a estrutura central olfatória dessas abelhas é muito diferente das abelhas melíferas, o que pode ser um dos motivos da ausência de uma resposta positiva dessas abelhas ao teste de REP estabelecido para *A. mellifera* (ROSELINO, 2009; TODA; SONG; NIEH, 2009).

Ou ainda, uma das possíveis causas do baixo desempenho de respostas positivas mostrado pelas abelhas sem ferrão, poderia ser um elevado nível de estresse ou enfraquecimento dos indivíduos quando tem seus corpos presos para a realização do teste de REP (McCABE et al., 2007; ROSELINO; HRNCIR, 2012).

A capacidade das abelhas se alimentarem regularmente mesmo quando contidas, é uma condição necessária ao REP e, o comportamento de alimentação normal da *M. scutellaris* aprisionada pode ter sido alterado, bem como essas abelhas podem não ser mais viáveis depois de presas (ABRAMSON; AQUINO; STONE, 1999).

Toda, Song e Nieh (2009), obtiveram um aumento de dez vezes nas respostas positivas de REP em *B. impatiens* utilizando uma cápsula em que as abelhas ficam dentro, mas seus corpos não ficam presos, como no aprisionamento tradicional para protocolo de REP (com o corpo preso e somente as antenas e peças bucais livres).

O insucesso com o teste de REP para forrageiras de *M. scutellaris* reforçam outros trabalhos que também mostraram dificuldades de executar essa metodologia para essa e outras espécies de abelhas nativas, mostrando a necessidade do

desenvolvimento de uma nova metodologia para esse ensaio de forma que essas abelhas respondam prontamente, assim como *A. mellifera*. Uma metodologia adequada para as abelhas sem ferrão é importante não só para a avaliação dos efeitos de inseticidas no comportamento alimentar, mas também para entender o processo de aprendizagem dessas abelhas (ABRAMSON; AQUINO; STONE, 1999).

5 CONCLUSÃO

O inseticida fipronil se mostrou altamente tóxico segundo classificação de Johansen e Mayer (1990), para forrageiras de abelhas sem ferrão *M. scutellaris* em condições de laboratório, por via tópica ou oral, em 48 horas com uma DL_{50} de 0.41 ng/abelha (4.1 ng de fipronil/g de abelha) e uma CL_{50} de 0.011 ng/ μ L de solução de sacarose, equivalente a uma DL_{50} oral de 0.6 ng/abelha.

Doses e concentrações subletais de fipronil causaram alterações no comportamento de atividade locomotora e orientação de forrageiras de *M. scutellaris*, por via tópica e oral. A dose subletal de 0.05 ng i.a./abelha alterou significativamente a velocidade média dessas abelhas, bem como a concentração subletal $CL_{50/10}$ (0.0011 ng i.a./ μ L de solução de sacarose).

O protocolo de REP estabelecido para *A. mellifera* não se mostrou uma metodologia eficiente para abelhas *M. scutellaris*, sendo que apenas 5% dessas abelhas responderam de forma positiva ao teste.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, n. 51, p. 1347-1352, 2003.

ABRAMSON, C.I.; AQUINO, I.S.; STONE, S.M. Failure to find proboscis conditioning in one-day old Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) and in adult Uruçu honey bees (*Melipona scutellaris*). **International Journal of Comparative Physiology**, v. 12, n. 4, p. 242-262, 2009.

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

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL - ANDEF. Tecnologia em primeiro lugar. **Revista Defesa Vegetal**, São Paulo, p. 16-17, maio, 2009. Disponível em: <<http://www.andef.com.br/revista/arquivos/maio2009.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Fipronil**. [S.l.], 11 jun. 2007, 2 p. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[18765-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[18765-1-0].PDF)>. Acesso em 12 set. 2011.

AYRES, M. et al. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. 5 ed. Belém, 2007, 380 p. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/>>. Acesso em 07 mar. 2011.

BARBARA, G.S. et al. Acetylcholine, Gaba and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 191, p. 823-836, 2005.

BASF AGRICULTURA. **REGENT® 800 WG**. Disponível em: <<http://www.agro.basf.com.br/UI/Regent.aspx>>. Acesso em: 07 jan. 2010.

BIOESTAT 5.3. **Bioestat**: software de estatística para a área de ciências biológicas. Tefé: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2012. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>>. Acesso em: 02 fev. 2012.

BRIGHENTI, D.M. et al. Inversão da sacarose utilizando ácido cítrico e suco de limão para preparo de dieta energética de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 297-304, mar./abr. 2011.

BRITTAIN, C.A. et al. Impacts of a pesticide on pollinators species richness at different spatial scale. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 11, n. 2, p. 106-115, 2010.

BRITAIN, C.; POTTS, S.G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 12, p. 321-331, 2011.

CARELLI, G. Matar a natureza é matar o lucro. **Revista Veja**, São Paulo, ed. 2168, p. 148-154, 5 jun. 2010.

CARVALHO, C.A.L. et al. Pollen spectrum of honey of “Uruçu” bee (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 61, n. 1, p. 63-67, 2001.

CARVALHO, S.M. et al. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 597-606, out./dez. 2009.

CHAUZAT, M.P. et al. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 253-263, apr. 2006.

CHAUZAT, M.P. et al. Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, n. 3, p. 514-523, jun. 2009.

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.

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

COLIN, M.E. et al. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 47, p. 387-395, 2004.

CONVENIO SOBRE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA - CDB. **Polinizadores: Introducción**. 2010. Disponível em: <<http://www.cbd.int/agro/pollinator.shtml>>. Acesso em: 28 abr. 2010.

CONNELLY, P. **Environmental fate of fipronil**. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, 17 p., dec, 2001. Disponível em: <<http://www.pw.ucr.edu/textfiles/fipronil.pdf>>. Acesso em 12 sep. 2011.

CONSTANZA, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, London, v. 387, p. 253-260, may, 1997.

- CRUZ, A.S.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; BUENO, O.C.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht, v. 26, p. 165-176, 2010.
- DANTAS, T.A. et al. Bioensaios ecotoxicológicos para avaliação do efeito da exposição crônica ao inseticida fipronil na taxa de mortalidade de larvas de *Apis mellifera*. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9, 2009, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço, 2009.
- DECOURTYE, A. et al. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, n. 48, p. 242-250, 2005.
- DECOURTYE, A. et al. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. **Julius Kühn Archives**, v. 423, p. 75-83, 2009.
- DECOURTYE, A. et al. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. **Ecotoxicology**, Edinburgh, v. 20, p. 429-437, 2011.
- DEL SARTO, M.C.L. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 2009. 64 f. Tese (*Doctor Scientiae* em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 52, p. 81-106, 2007.
- 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.
- EL HASSANI, A.K. et al. Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee. **Invertebrate Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 91-100, 2009.
- EVANGELISTA-RODRIGUES, A. et al. Desenvolvimento produtivo de colmeias de abelhas *Melipona scutellaris*. **Revista Biotemas**, Florianópolis, n. 21, v. 1, p. 59-64, mar, 2008.
- EUROPEAN COMMISSION – Health & Consumer Protection Directorate-General. **Review report for the active substance fipronil**. 9 p., 12 mar. 2010. Disponível em:
<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_fipronil_en.pdf>
. Acesso em: 12 sep. 2011.

FERREIRA, R.A.C. **Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico.** 2010, 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

FIORAVANTI, C. As asas dos alimentos: abelhas ganham valor na produção agrícola. **Revista Pesquisa Fapesp Online**, maio 2010. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=4139&bd=1&pg=1&lg=>>. Acesso em: 14 jun. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Protección a los polinizadores**, dez. 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/esp/revista/0512sp1.htm.>> Acesso em: 23 abr. 2010.

FRAZIER, M. et al. What have pesticides got to do with it? **American Bee Journal**, Hamilton, p. 521-523, jun. 2008. Disponível em: <<http://maarec.cas.psu.edu/CCDPpt/WhatPesticidesToDoWithItJune08ABJ.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2010.

FREITAS, B.M; PINHEIRO, J.N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 282-298, mar. 2010.

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

GARRIDO-BAILON, E. et al. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 8, n. 3, p. 658-661, 2010.

GUIMARÃES, C.R.; BRIGHENTI, D.M.; CIRILLO, M.A. Método Probit utilizando XLSTAT-Dose: aplicação a estudos de eficiência de inseticida biológico. In: SEMANA DA AGRONOMIA, 11, 2000, Lavras. **Anais...** Lavras, 2000.

GUIMARÃES, M. Colmeia às moscas: síndrome misteriosa causa sumiço de abelhas na América e na Europa. **Revista Pesquisa Fapesp Online**, jul. 2007. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=3295&bd=1&pg=1&lg=>>. Acesso em 23 abr. 2010.

GUNASEKARA, A.S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, n. 32, v. 3, p. 189-199, 2007.

HEARD, T.A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 44, p. 183-206, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil**: uma abordagem ambiental. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2010, 84 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. As abelhas sociais sem ferrão. **WebBee**. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/beelife/>>. Acesso em: 5 ago 2010.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; SARAIVA, A.M.; DE JONG, D. **Bees as pollinators in Brazil**: assessing the status and suggesting best practices. Ribeirão Preto: Holos, 2006, 112 p.

JACOB, C.R.O. et al. Determining the lethal dose of fipronil for native bee *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). In: APIMONDEA, CONGRESO INTERNACIONAL DE APICULTURA, 42, 2011, Buenos Aires. **Libro de Resúmenes...** Buenos Aires: CFI, CD-ROM.

JACOB, C.R.O. **Efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2012, 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2012.

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

JOHNSON, R. Honey bee colony collapse disorder. **Congressional Research Service**, Washington, 20 p., jan, 2010.

KERR, W.E. As abelhas e o meio ambiente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12, 1998, Salvador, **Anais...** Salvador, 1999, p. 1-8.

KERR, W.E. **Biologia e manejo de meliponíneos**, 13 p. 1996. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/bee/abelhsf.htm>>. Acesso em: 5 ago. 2010.

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

KEVAN, P.G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 373-393, 1999.

KEVAN, P.G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. **Pollinating bees**: the conservation link between agriculture and nature. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2002, 313 p.

KLEIN, A.M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B**, Edinburgh, v. 274, p. 303-313, 2007.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N.M.; THORP, R.W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 99, n. 26, p. 16812-16816, dec. 2002.

KUSSAMA, D. Brasil usa 19% dos agrotóxicos produzidos no mundo; Governo registra 8 mil casos de intoxicação por agrotóxicos em 2011. **Mundo Sustentável**, mai, 2012. Disponível em: <<http://www.mundosustentavel.com.br/2012/05/brasil-usa-19-dos-agrotoxicos-produzidos-no-mundo-governo-registra-8-mil-casos-de-intoxicacao-por-agrotoxicos-em-2011/>>. Acesso em: 23 maio 2012.

LALOI, D. et al. Olfactory conditioning of the proboscis extension in bumble bees. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 90, p. 123-129, 1999.

LAMBIN, M. et al. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 48, p. 129-134, 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.; SANTOS, J.F.; NOCELLI, R.C.F. Effects of insecticides in bees: situation in Brazil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 9, 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FFCLRP-USP, p. 607, 2010. CD-ROM.

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

MALASPINA, O. **Estudo genético da resistência ao DDT e relação com outros caracteres em *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. 1979, 81 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Invertebrados) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro, 1979.

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

MALASPINA, O. et al. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 8, 2008, Ribeirão Preto, **Anais...** Ribeirão Preto, 2008, p. 41-48. CD-ROM.

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.

MAYER, D.F.; LUNDEN, J.D. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adults female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. **Journal of Apiculture Research**, London, v. 38, n. 3-4, p. 191-197, 1999.

McCABE, S.I. et al. Odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in two stingless bees species in comparison to Africanized honeybees. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 193, p. 1089-1099, 2007.

McCABE, S.I.; FARINA, W.M. Odor information transfer in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*: effect of in-hive experiences on classical conditioning of proboscis extension. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 195, p. 113-122, 2009.

McCABE, S.I.; FARINA, W.M. Olfactory learning in the stingless bee *Tetragonista angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 196, p. 481-490, 2010.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. 2 ed. Johns Hopkins: Baltimore, 2007, 953 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 jan. 2012.

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, mar. 2000.

MOURE, S.J.; URBAN, D.; MELO, G.A.R. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region**, jul, 2008. Disponível em: <<http://moure.cria.org.br/>>. Acesso em 21 maio 2012.

MULLIN, C.A. et al. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **Plos One**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. 1-19, mar. 2010.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER - NPIC. **Fipronil**: Technical fact sheet. 11p., jan. 2009. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>>. Acesso em 20 jan. 2010.

NOCELLI, R.C.F. et al. As abelhas e os defensivos agrícolas. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; CANHOS, D.A.L.; SARAIVA, A.M. **Polinizadores no Brasil – contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: EDUSP, 2012, in press.

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

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 140-151, mar. 2010.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Honeybees, acute contact toxicity test. **OECD guidelines for the testing of chemicals 214**, 8 p., sep. 1998a.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Honeybees, acute oral toxicity test. **OECD guidelines for the testing of chemicals 213**, 8 p., sep. 1998b.

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

PHAM-DELÈGUE, M.H. et al. Behavioral methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, Versailles, v. 33, p. 425-432, 2002.

PRONÍ, E.A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) na bacia do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Cascavel, v. 3, n. 2, p. 145-150, ago. 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 06 out. 2011.

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.

RAMALHO, M.; SILVA, M.D.; CARVALHO, C.A.L. Dinâmica de uso de fontes de pólen por *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae): uma análise comparativa com *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), no domínio Tropical Atlântico. **Neotropical Entomology**, Londrina, n. 36, v. 1, p. 38-45, jan./fev., 2007.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v.12, n.5, p. 1-22, 2005.

ROAT, T.C. et al. Acute toxicity of fipronil to newly-emerged honeybee *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) Africanized. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 9, 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FFCLRP-USP, 2010. CD-ROM.

ROESSINK, I. et al. Is the European honeybee (*Apis mellifera mellifera*) a good representative for other pollinators species? In: SETAC EUROPE ANNUAL MEETING, 21., may 2011, Milan, **Abstract...** Ecosystem Protection in a Sustainable World: A challenge for science and regulation. Abstract book, p. 35, 2011.

ROGERS, R.E.L. Why is France banning certain pesticides? **Bee World**, Bucks, p. 40-41, jun. 2004.

ROSELINO, A.C. **Determinantes do comportamento forrageador de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2009. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências, área Entomologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto, 2009.

ROSELINO, A.C.; HRNCIR, M. Repeated unrewarded scent exposure influences the food choice of stingless bees foragers, *Melipona scutellaris*. **Animal Behavior**, London, v. 83, p. 755-762, mar. 2012.

ROUBIK, D.W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, Versailles, v. 37, p. 124-143, 2006.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002, 253 p.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA – SINDAG. Mercado de defensivos. **Câmara Temática de Insumos Agropecuários**, ago, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_tematicas/Insumos_agropecu_arios/56RO/App_Defensivos_CTIA.pdf>. Acesso em: 23 maio 2012.

SOUZA, T.F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) por meio de análises morfológicas e comportamentais**. 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro, 2009.

SOUZA, T.F. et al. Toxicity effects of methanolic and dichlorometane extracts of flowers and penduncles of *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae: Mimosoideae) on *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* workers. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 45, n. 3, p. 112-116, 2006.

SPADOTTO, C.A et al. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Documentos 42**, Jaguariúna: Embrapa, 29 p., dez, 2004.

STENERSEN, J. Interference with signal transduction in the nerves. IN: _____ **Chemical Pesticides: mode of action and toxicology**. New York: CRC Press, 2004. cap. 6.

STUCHI, A.L.P.B. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonista* após a contaminação com agrotóxicos**. 2009, 120 f. Tese (Doutorado em Zootecnia, ênfase em Produção Animal) – Universidade Estadual do Maringá, 2009.

THOMPSON, H.M. Risk assessment for honey bees and pesticides – recent development and “new issues”. **Pest Management Science**, Sussex, n. 66, p. 1157-1152, 2010.

THOMPSON, H.M.; MAUS, C. The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. **Pest Management Science**, Sussex, n. 63, p. 1058-1061, 2007.

TINGLE, C.C. et al. Fipronil environmental fate, ecotoxicology and human health concerns. **Reviews Environmental Contamination & Toxicology**, New York, v.176, p.1-66, 2003.

TODA, N.R.T.; SONG, J.; NIEH, J.C. Bumblebees exhibit the memory spacing effect. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 96, p. 1185-1191, 2009.

VALDOVINOS-NÚÑEZ, G.R. et al. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 5, p. 1737-1742, oct. 2009.

VIANA, B.F. Exemplos regionais de animais: *Melipona scutellaris*. **Projeto Qualibio**. Disponível em: <<http://www.qualibio.ufba.br/063.html>>. Acesso em: 9 ago. 2010.

VIANA, B.F.; SILVA, F.O. Polinização por abelhas em agroecossistemas. **Rede Apis**, Sebrae. Disponível em: <http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/16%C2%BA%20Cong_Bras_Apic/Anais_1/POLINIZA%C3%87%C3%83O%20POR%20ABELHAS%20EM%20AGROECOSSIS TEMAS.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2010.

WEBBEE. **Tópicos em biologia de abelhas**. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/beelife/>>. Acesso em: 5 ago. 2010.

WEBBEE. **A abelha Uruçu**. Disponível em: <<http://www.webbee.org.br/urucu/index.html>>. Acesso em: 2 set.

ANEXO

ANEXO A - Produção bibliográfica referente ao trabalho de mestrado

Artigo submetido

LOURENÇO, C.T.; CARVALHO, S.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. Oral toxicity of fipronil insecticide for stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). Submetido em: 24 abr. 2012 para **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** (Qualis Capes para Ciências Agrárias I – A2).

Capítulo de livro

NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O.; CARVALHO, S.M.; LOURENÇO, C.T.; ROAT, T.C.; PEREIRA, A.M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M. As abelhas e os defensivos agrícolas. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; CANHOS, D.A.L.; SARAIVA, A.M. **Polinizadores no Brasil** – contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: EDUSP, 2012, in press.

Artigo aceito para publicação

LOURENÇO, C.T.L.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R.C.F. Determination of LD₅₀ for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Julius Kühn Archiv**, n. 426, 2012, in press.

Resumos e apresentação de trabalhos

LOURENÇO, C.T.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R.C.F. Determination of fipronil LD₅₀ for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. In: 11th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group – Hazard of pesticides to bee, Wageningen, 2011.

LOURENÇO, C.T.; SANTOS, J.F.; NOCELLI, R.C.F. Effects of the insecticides in bees: situation in Brazil. In: IX Encontro Sobre Abelhas, Ribeirão Preto, 2010.