



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
MESTRADO EM ZOOTECNIA

LEONARDO DOS SANTOS GURGEL

**ESTABELECIMENTO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS DO
IMIDACLOPRIDO, PARA A ABELHA SEM FERRÃO *Scaptotrigona* sp. nov.**

FORTALEZA

2015

LEONARDO DOS SANTOS GURGEL

**ESTABELECIMENTO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS DO
IMIDACLOPRIDO PARA A ABELHA SEM FERRÃO *Scaptotrigona* sp. nov.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Produção e Melhoramento Animal

Orientador: Prof. PhD. Breno Magalhães Freitas

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

G987e Gurgel, Leonardo dos Santos.
Estabelecimento de parâmetros toxicológicos do imidacloprido para a abelha sem ferrão
Scaptotrigona sp. nov. / Leonardo dos Santos Gurgel. – 2015.
42 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Produção e melhoramento animal.

Orientação: Prof. Dr. Breno Magalhães Freitas.

Coorientação: Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli.

1. Abelha sem ferrão. 2. Inseticidas. 3. Imidacloprido. I. Título.

CDD 636.08

LEONARDO DOS SANTOS GURGEL

**ESTABELECIMENTO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS DO
IMIDACLOPRIDO PARA A ABELHA SEM FERRÃO *Scaptotrigona* sp. nov.**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção Título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

Área de concentração: Produção e Melhoramento Animal

Dissertação aprovada em Fortaleza em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. PhD. Breno Magalhães Freitas (ORIENTADOR)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (COORIENTADORA)
Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)

Dr. Francisco Deoclécio Guerra Paulino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, pelas bênçãos e misericórdia;
À minha mãe Francisca Goretti dos Santos Gurgel, ao
meu pai Narcélio Alves Gurgel e a minha irmã Allana
dos Santos Gurgel, pelo amor, dedicação e apoio.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e saúde que me dá diariamente e as bênçãos que tem me concedido, iluminando a minha vida e a de meus familiares.

Ao professor Dr. Breno Magalhães Freitas e a professora Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela orientação, paciência e esclarecimentos dados ao longo do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade, estrutura e qualidade do ensino aqui encontrado.

À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afrobrasileira-UNILAB, pela liberação das minhas atividades profissionais, para que eu pudesse cursar o mestrado.

À minha mãe, Francisca Goretti dos Santos Gurgel, pelo amor incondicional, apoio e amizade, sem ela nada disso seria possível, ao meu pai Narcélio Alves Gurgel, pelo companheirismo, amor e dedicação a mim destinado e a minha irmã Allana dos Santos Gurgel, pela sinceridade e parceria.

À minha avó Maria do Socorro Passos dos Santos, por suas orações, beijos e abraços.

Aos meus amigos Weverson, Wilson, Samuel, Allan, minha madrinha Graça, minha amiga Agaciane e meu primo Saulo, pelo apoio nos momentos difíceis.

Às minhas tias Gleuce, Greyci, Glaucia, Glícia, Clécia, Selma, Lili e aos meus tios Milton, Juarez, Neto, Mário e Everardo.

Ao amigo Alípio pela ajuda na elaboração dos gráficos e tabela, ao amigo Jânio pela parceria construída durante essa caminhada e a amiga Camila pela ajuda na correção e formatação do trabalho.

Aos meus afilhados Alícia e Noah, pelos mais sinceros sorrisos que já recebi.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisas com Abelhas (GPA): Diego, Amanda, Anderson, Epifânia, Victor, Ariane, Gersy, Elton, Keniesd, Nayane e Michelle, o apoio de vocês foi fundamental.

Aos funcionários do Setor de Abelhas, Francisco e Hélio pela prontidão que me atendiam.

Ao Engenheiro Agrônomo Dr. Deoclécio, pelos conselhos e apoio.

À todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

*“Porque Deus amou o mundo de tal maneira
que deu o seu único filho, para que todo
aquele que nele crê não pereça, mas tenha a
vida eterna”.*
(João 3:16)

ESTABELECIMENTO DE PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS DO IMIDACLOPRIDO PARA A ABELHA SEM FERRÃO *Scaptotrigona* sp. nov.

RESUMO GERAL

Dentre os vários fatores apontados como responsáveis pelo declínio das colônias de abelhas, os defensivos agrícolas do grupo químico dos neonicotinóides merecem destaque, principalmente o inseticida sistêmico imidacloprido, que é um agonista da acetilcolina e age nos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos, ocasionando comprometimento das funções vitais e morte. Com o presente trabalho objetivou-se determinar a toxicidade do imidacloprido por diferentes vias de exposição para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona* sp. nov. através da dose letal média tópica (DL_{50}) e da concentração letal média por ingestão (CL_{50}). Esse estudo foi conduzido no Setor de Abelhas do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará e baseado no protocolo internacional da OECD. Os dados de mortalidade das abelhas foram anotados após 24 e 48h da exposição dos insetos às diferentes dosagens do inseticida e submetidos à análise do tipo dose resposta no programa Bioestat® versão 5.3. A DL_{50} tópica foi de 16,65 (24 horas) e 8,23 (48 horas) ng p.c / μ L/abelha e a CL_{50} de ingestão foi 8,47 (24 horas) e 2,98 (48 horas) ng p.c / μ L dieta. O imidacloprido demonstrou ser tóxico para a espécie estudada e o mesmo é mais nocivo, quando administrado de forma oral, baseado na menor dosagem necessária para matar 50% da população testada.

Palavras-chaves: Agroquímicos. Meliponíneos. Intoxicação. Susceptibilidade.

TOXICOLOGICAL PARAMETER STABLISHMENT FOR IMIDACLOPRID IN STINGLESS BEES *Scaptotrigona* sp. nov.

GENERAL ABSTRACT

Among the whole factors pointed as responsible for the loss of bee's colonies, the crop protection products which belong to the chemical group of neonicotinoids deserve to be highlighted. Specially the systemic insecticides as imidacloprid which is an agonist acetylcholine and and acts on nicotinic acetylcholine receptors of insects, causing impairment of vital organ function and death. The currently job aimed to determinate the toxicity of imidacloprid by different exposition ways for stingless bees *Scaptotrigona* sp. nov. through the topical average lethal dose (DL₅₀) and the intake average lethal concentration (CL₅₀). It was conducted at *Setor de Abelhas*, Department of Animal Science at Federal University of Ceara and based on the international protocol of OECD. The mortality data was taken after 24 and 48 hours of exposition of the insects to different dosages and submitted to dose response analysis with Bioestat® version 5.3. The topical DL₅₀ in ng p.c /μL/bee was 16,65 (24 hours) and 8,23 (48 hours), and the intake CL₅₀ was 8,47 (24 hours) and 2,98 (48 hours) ng p.c /μL of food. The imidacloprid has shown to be toxic to the researched bee specie, been more harmful when taken by oral ways, based on its minor lethal dose needed to kill 50% of the tested population.

Keywords: Agrochemicals. Meliponines. Intoxication. Susceptibility.

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Toxicidade aguda do imidacloprido em 24 e 48 horas para <i>Scaptotrigona</i> sp. nov..... | 32 |
|--|----|

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Abelhas *Scaptotrigona* sp. nov. recebendo a gota de 1 μ L da solução com inseticida, na região do pronoto, durante o ensaio de dosagem tópica..... 30
- Figura 2** – Abelhas acondicionadas em potes plásticos de 250 ml e divididas por tratamentos dentro da BOD (demanda bioquímica de oxigênio)..... 30
- Figura 3** – Determinação da DL₅₀ tópica em 24 horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona* sp. nov..... 33
- Figura 4** – Determinação da DL₅₀ tópica em 48 horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona* sp. nov..... 33
- Figura 5** – Determinação da CL₅₀ tópica em 24 horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona* sp. nov..... 34
- Figura 6** – Determinação da CL₅₀ tópica em 48 horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona* sp. nov..... 34

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Referencial teórico

| | |
|--|-----------|
| 1.1. A importância dos polinizadores | 12 |
| 1.2. As abelhas nativas | 12 |
| 1.3. O declínio dos polinizadores | 13 |
| 1.4. Os impactos gerados pelos agroquímicos às abelhas, em especial o neonicotinóide imidacloprido | 14 |
| REFERÊNCIAS | 18 |

CAPÍTULO II

Toxicidade do inseticida imidacloprido para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona* sp. nov. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 24 |
| ABSTRACT | 25 |
| 1. INTRODUÇÃO | 26 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 2.1. Material biológico | 29 |
| 2.2. Determinação da DL ₅₀ média tópica | 29 |
| 2.3. Determinação da CL ₅₀ média por ingestão | 31 |
| 3. RESULTADOS | 32 |
| 4. DISCUSSÃO | 35 |
| 5. CONCLUSÃO | 38 |
| REFERÊNCIAS | 39 |

CAPÍTULO I
REFERENCIAL TEÓRICO

1. Referencial Teórico

1.1. A importância dos polinizadores

As abelhas são peças fundamentais para a ecologia, manutenção e conservação dos ecossistemas terrestres e seu valor econômico também é crucial, pois o serviço de polinização tem grande importância para a produção de alimentos (KLEIN et al., 2007; GALLAI et al., 2009).

Os polinizadores de plantas silvestres são um mecanismo de suporte a vida determinante para os ecossistemas e a biodiversidade (OLLERTON et al., 2011). Aproximadamente 75% das 240.000 espécies vegetais do mundo dependem da polinização, seja pela água, pelo vento, por animais como algumas aves, morcegos, insetos e outros. As abelhas são os principais polinizadores e responsáveis por polinizar cerca de 73% das espécies cultivadas no mundo (FAO, 2004; RICKETTS et al., 2008).

Estima-se que 33% das culturas utilizadas como alimento dependem da polinização por abelhas (BERNAL et al., 2011). Por volta de 40.000 das 170.000 espécies de plantas polinizadas por abelhas, necessitam da *A. mellifera* para auxiliar na sua auto perpetuação (TAUTZ, 2008).

1.2. As abelhas nativas

Os meliponíneos constituem um grupo independente e especializado que é altamente subordinado as características climáticas e florísticas de suas regiões de origem. No Brasil, estas abelhas representam uma fonte adicional de renda para o pequeno produtor, são responsáveis de acordo com o ecossistema, por cerca de 40 a 90% da polinização das árvores nativas e conseqüentemente, pela produção de frutos e sementes (KERR et al., 1996). A criação racional de abelhas sem ferrão (meliponicultura) é uma atividade em plena expansão em zonas tropicais e subtropicais do mundo (NUNES et al., 2014).

Segundo Kerr et al. (1999) a maior diversidade de abelhas sem ferrão do mundo encontra-se no Brasil, chegando a representar até 90% dos polinizadores de um ecossistema. A constante especialização dessas abelhas na exploração da flora nativa tem papel crucial na manutenção da vegetação brasileira. Trabalhos realizados em Manaus alusivos à associação inseto-planta, especificamente entre meliponíneos e plantas nativas, atestaram que a extinção de espécies de abelhas resultou na extinção de algumas espécies vegetais (ABSY et al., 1980).

As abelhas sem ferrão são insetos sociais e possuem organização semelhante a das *A. mellifera*, com divisão de castas e trabalho de acordo com a idade (FREE, 1980; NOGUEIRA-NETO, 1997). As abelhas sem ferrão dividem-se em duas tribos: Trigonini e Meliponini, e a diferença básica entre elas se dá na construção de células reais, pois na tribo Meliponini não há confecção das mesmas e todas as abelhas se desenvolvem em células do mesmo tamanho, já na tribo Trigonini quase sempre há construção de células reais maiores que as outras, para o desenvolvimento das rainhas (NOGUEIRA-NETO, 1997).

A tribo meliponini corresponde as “abelhas indígenas sem ferrão” e são encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, mas sua maior diversidade é observada nas regiões neotropicais (com mais de 300 espécies descritas) e na região Indo-Malaia (com cerca de 60 espécies), sendo que certos táxons são restritos às regiões subtropicais do hemisfério sul (CAMARGO, 1989; CAMARGO; PEDRO, 1992).

As abelhas sem ferrão possuem importância cultural (EARDLEY; KWAPONG, 2013) e são cada vez mais utilizadas na polinização de culturas, produção de mel e criação recreativa (HEARD 1999; HEARD; DOLLIN, 2000; CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006). Por conta do grande número de abelhas que podem ser mantidas em uma determinada área, as abelhas nativas são constantemente preferidas para a polinização das culturas cultivadas e são certamente os insetos sociais mais prósperos para utilização como polinizadores comerciais (CRUZ; CAMPOS, 2009).

1.3. O declínio dos polinizadores

Atualmente uma grande quantidade de relatórios têm sido divulgados a cerca do sumiço das abelhas, o que deu origem a uma preocupação global (GOULSON et al., 2008; BROWN; PAXTON, 2009). O alto nível de dependência das abelhas para polinização tem sido motivo de apreensão, devido as recentes diminuições das populações de abelhas, o que pode resultar em danos para os ecossistemas naturais e na produção das culturas comerciais (PINHEIRO; FREITAS, 2010). De acordo com Catae et al. (2014) a redução no número de polinizadores em especial das espécies de abelhas, tornou-se o maior problema para os apicultores.

Há dez anos, cientistas norte americanos identificaram um fenômeno que ficou conhecido como “desordem e colapso das colônias” (CCD), onde apicultores norte americanos perderam até 100% de suas colmeias e a partir de então cientistas em todo mundo passaram a dar mais importância à questão do sumiço dos polinizadores (OLDROYD, 2007).

VanEngelsdorp et al. (2009), apontaram as principais características deste fenômeno, como uma elevada quantidade de indivíduos mortos dentro e nas proximidades das colônias e o desaparecimento de abelhas campeiras adultas.

A redução populacional de abelhas é encarada com preocupação generalizada, principalmente por conta dos serviços de polinização e sua importância para a agricultura (GARIBALDI et al., 2011; AIZEN; HARDER, 2009). Devido o grande valor do serviço de polinização, alguns esforços estão sendo destinados à proteção dos polinizadores, e a descoberta dos fatores que os ameaçam, onde os agrotóxicos são apontados como variáveis importantes, no que diz respeito a prejuízos aos polinizadores (ISENRING, 2010). Por décadas, os agrotóxicos têm sido a maior ferramenta de proteção das culturas cultivadas e a cada ano diferentes compostos inseticidas com os mais variados modos de ação, são comercializados mundialmente (METCALF, 1980; COOPER; DOBSON, 2007; LAMBERTH et al., 2013).

Alguns estudos recentes atribuem a questão do declínio das abelhas a diversos fatores como doenças, parasitas, mudanças climáticas, perdas de hábitat e o uso indiscriminado de agroquímicos (FREITAS et al., 2009; VAN ENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

1.4. Os impactos gerados pelos agroquímicos às abelhas, em especial o neonicotinóide imidacloprido

Os neonicotinóides atuam como agonistas da acetilcolina e ligam-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) situados nos neurônios pós-sinápticos dos insetos (BUCKINGHAM et al., 1997; SUCHAIL et al., 2004).

A contaminação das abelhas pode ocorrer por contato, ingestão de recursos florais e durante o forrageamento em culturas que estão sendo pulverizadas com agrotóxicos. Comumente a ação dos inseticidas nas abelhas expostas a pulverização, ocorre pela absorção desses produtos através dos espiráculos, principalmente durante o florescimento das culturas. Muitos inseticidas atacam diretamente o sistema nervoso, ocasionando paralisia das asas, pernas e trato digestivo, por conta disso as abelhas param de beber água e se alimentar, morrendo de fome ou inanição (MALASPINA; STORT, 1985).

Segundo Del Sarto et al. (2014) a taxa de mortalidade de determinados defensivos agrícolas é influenciada diretamente pelo modo de exposição ao qual os insetos foram submetidos, sendo a via oral, onde o trato digestório é que recebe as moléculas do agente

contaminante através de dieta contaminada, é mais sensível aos agroquímicos do que a exposição via tópica.

O número de estudos sobre o impacto de agroquímicos em agentes polinizadores ainda é insipiente, principalmente em abelhas nativas. No entanto, alguns indícios apontam que os agrotóxicos influenciam diretamente de forma negativa, a quantidade de polinizadores e sua diversidade nos agroecossistemas, o que acaba comprometendo a produtividade de diversos campos agrícolas (FREITAS; PINHEIRO, 2012; PINHEIRO; FREITAS, 2010). Trabalho realizado por Pinheiro e Freitas (2010) apresentou uma revisão de literatura das doses letais (DL_{50}) e os efeitos dos agroquímicos com uso permitido no Brasil sobre polinizadores, os impactos distintos das formulações e utilização no país e recomendaram boas práticas de manejo no intuito de reduzir os efeitos negativos e promover uma melhor gestão do uso de produtos fitossanitários nos ecossistemas brasileiros.

A DL_{50} ou dose letal média de uma substância, expressa o grau de toxicidade aguda de substâncias químicas, correspondendo à dose suficiente para matar 50% dos animais de um lote utilizados num experimento. A CL_{50} ou concentração letal média de uma substância, diz respeito ao grau de toxicidade aguda de substâncias químicas, correspondendo a concentração suficiente para matar 50% dos animais de um lote utilizados num experimento.

Os defensivos agrícolas do grupo químico dos neonicotinóides em particular, são destaque neste contexto de grande tensão. O primeiro neonicotinóide aprovado para uso agrícola foi o imidacloprido em 1994 e a partir de então o seu uso e o de outros agroquímicos do mesmo grupo aumentaram consideravelmente, coincidindo com um período de queda contínua no número de colônias de abelhas em algumas partes do mundo (CRESSWELL et al., 2012).

Em 1999 na França, o imidacloprido foi atribuído publicamente pela primeira vez como ameaça para as abelhas, após manifestações de apicultores que alegaram ter sofrido perdas generalizadas de suas colônias, devido ao uso deste produto, que passou a ter utilização restrita naquele país (DOUCET-PERSONENI et al., 2003). Segundo Buckingham et al (1997) o imidacloprido age ligando-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos, atuando mais especificamente nas subunidades α do receptor. Esses receptores encontram-se em diversas regiões cerebrais, abrangendo áreas ligadas à aprendizagem e memória das abelhas (BICKER, 1999). Devido ao seu caráter neurotóxico o imidacloprido pode afetar a memória e o aprendizado, impactando no comportamento de forrageamento das abelhas (DECOURTYE et al., 2004; YANG et al., 2008).

Segundo Schmuck et al. (2001) diversos trabalhos apontam que os neonicotinóides incluindo o imidacloprido, por serem inseticidas sistêmicos, podem ser encontrados em várias partes das plantas as quais receberam aplicações desses compostos, incluindo néctar, pólen e outros produtos amplamente explorados por polinizadores. A partir do consumo de recursos florais contaminados, as abelhas estarão expostas aos efeitos deletérios desses agroquímicos e os resíduos tóxicos dos mesmos podem ser encontrados também no mel ou cera produzidos por elas (BLACQUIÈRE et al., 2012).

Os protocolos internacionais como os da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1998a e 1998b, desenvolvidos para *A. mellifera*, preconizam que a determinação da toxicidade de inseticidas para as abelhas se baseiem na dose letal média (DL₅₀) e na concentração letal média (CL₅₀), onde a primeira é obtida através da pipetagem do agrotóxico diretamente no dorso do inseto e a segunda é aferida através de fornecimento de alimento contaminado, sendo o pronoto e o trato digestório os meios pelos quais os agrotóxicos entrarão em contato com as abelhas.

Seguindo essas recomendações, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de atestar a toxicidade ou não de defensivos agrícolas amplamente utilizados nas culturas cultivadas e estabelecer suas respectivas DL₅₀ e CL₅₀ para as abelhas, como é o caso dos estudos realizados por: DECOURTYE et al., 2003; IWASA et al., 2004; LAURINO et al., 2011; ROSSI et al., 2013 e DEL SARTO et al., 2014.

Doses inferiores as letais também têm se demonstrado prejudiciais às abelhas, diante disso alguns estudos têm sido desenvolvidos para avaliar os efeitos nocivos das mesmas. Medrzycki et al. (2003) ao analisarem o comportamento de abelhas *A. mellifera* expostas a doses subletais de imidacloprido, observaram uma diminuição na comunicação e mobilidade das abelhas, o que pode comprometer as relações sociais desses insetos. Segundo Rossi et al. (2013) esse composto têm efeitos citotóxicos no cérebro das abelhas e doses subletais de imidacloprido podem causar morte celular neste órgão.

A literatura mostra que doses subletais podem não ocasionar a morte imediata das abelhas, mas algumas mudanças no comportamento podem ocorrer. Efeitos como desorientação ou diminuição da atividade de forrageamento, provenientes de intoxicação com doses subletais de imidacloprido, acabam afetando a colônia como um todo (BORTOLOTTI et al., 2003; MEDRZYCKI et al., 2003; DECOURTYE et al., 2004; SCHMUCK, 2004).

Diante da problemática mundial que envolve o declínio dos polinizadores em especial as abelhas, tendo em vista a importância econômica, cultural e para a manutenção da biodiversidade dos mais variados ecossistemas, se faz necessário a intensificação de estudos

avaliando a toxicidade de agrotóxicos para as abelhas em geral, com atenção especial aos meliponíneos, já que uma quantidade ínfima de trabalhos com este fim são encontrados na literatura para essas espécies.

REFERÊNCIAS

- ABSY, M. L.; BEZERRA, E. B.; KERR, W. E. Plantas nectaríferas utilizadas por duas espécies de *Melipona* da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.10, n.3, p.81-271, 1980.
- AIZEN, M. A.; HARDER, L. D. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current Biology**. 19:915–918, 2009.
- BORTOLOTTI, L.; MONTANARI, R.; MARCELINO, J.; MEDRZYCKI, P.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology**. 56:63–67, 2003.
- BICKER, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research and Technique**. 45:174–183, 1999.
- BERNAL, J.; MARTIN-HERNANDEZ, R.; DIEGO, J. C.; NOZAL, M. J.; GONZALEZ-PORTO, A. V.; BERNAL, J. L.; HIGES, M. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. **Pest Management Science**. 67:1320–1331, 2011.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; CORNELIS, A. M.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, New York, v. 21, n. 4, p. 973-992, May 2012.
- BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective. **Apidologie** 40:410–416, 2009.
- BUCKINGHAM, S. D.; LAPIED, B.; CORRONG, H. L. E.; GROLLEAU, F.; SATTELLE, D. B. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**. 200:2685–2692, 1997.
- CAMARGO, J. M. F. Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera: Apoidea). In: **Simpósio Anual da Aciesp**, 14, 1989, São Paulo, SP. n. 68, p. 41-61, 1989.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Systematic, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera: Apoidea): a mini-review. **Apidologie**, Paris, França, n. 23, p. 509-522, 1992.
- CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic Effects of Thiamethoxam in the Midgut and Malpighian Tubules of Africanized *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Apidae) **Microscopy Research and Technique** 77:274–281, 2014.
- COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**. 26:1337–1348, 2007.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO; P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, 27: 275-292, 2006.

CRESSWELL, J. E.; DESNEUX, N.; VAN ENGELSDORP, D. Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria. **Pest Management Science**. 6, 819–827, 2012.

CRUZ, D. O.; CAMPOS, L. A. O. Polinização por abelhas em cultivos protegidos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 5-10, 2009.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUSEAU, S.; CHARRETON, M.; PHAM-DELEGUE, M. H. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 57:410–419, 2004.

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

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

DEL SARTO, M. C. L.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C.; CAMPOS, L. A. O. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, 45:626–636. INRA, DIB and Springer-Verlag France, 2014 DOI: 10.1007/s13592-014-0281-6, 2014.

DOUCET-PERSONENI, C.; HALM, M.; TOUFFET, F.; RORTAIS, A.; ARNOLD, G. Imidaclopride utilisé em enrobage de semences (Gaucho) et troubles des abeilles – **Rapport final du Comité Scientifique et Technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles**. Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires Rurales, Paris, France, 2003.

EARDLEY, C.; KWAPONG, P. Taxonomy as a tool for conservation of African stingless bees and their honey. *In*: **Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees** (eds P Vit, S Pedro & DW Roubik), pp. 261–268. Springer, New York, USA, 2013.

FAO (Food and Agriculture Organization). Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. Pp. 19-25. *In*: B. M. Freitas & J. O. B. Portela (eds.). **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 285p, 2004.

FREITAS B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L.; MEDINA LM, KLEINERT A. D.P.; GALETTO L.; NATES-PARRA G.; QUEZADA-EUAN J. J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie** 40:332–346, 2009.

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

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. Polinizadores e pesticidas: princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Brasília: MMA**, 2012. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>. Acesso em: 07 out. 2013.

FREE, J. B. A organização social das abelhas (*Apis*). **Editora da Universidade de São Paulo**, São Paulo, pp. 79 (1980).

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

GARIBALDI, L. A.; AIZEN, M. A.; KLEIN, A. M.; CUNNINGHAM, S. A.; HARDER, L. D. Global growth and stability of agricultural yield decrease with pollinator dependence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 108:5909–5914, 2011.

GOULSON, D.; LYE, G. C.; DARVILL, B. Decline and conservation of bumble bees. **Annual Review of Entomology**, 53:191–208, 2008.

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

HEARD, T. A.; DOLLIN A. E. 2000. Stingless beekeeping in Australia: snapshot of an infant industry. **Bee World** 81, 116–125.

ISENRING, R. Pesticides and the Loss of Biodiversity. **Pesticide Action Network Europe**, London, UK, 2010.

IWASA, T; MOTOYAMA, N; AMBROSE, J. T; ROE, R. M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. In: CHAUHAN B. S.; CORRELL J.; CROSS, J. V.; KORSTEN L.; REAY-JONES F. P. F.; WEGULO S. N. (Org) **Crop Protection**, v. 23, p. 371–378, 2004.

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

KERR, W. K.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação. **Paracatu: Acangaú**, 1996.

KERR, W. E. ; CARVALHO, G. A. E NASCIMENTO, V. A. - 1999 - The probable consequences of the destruction of Brazilian stingless bees. Section 6. Pages 393-403. In : **Várzea: diversity, development and conservation of Amazonia's whitewater flood plains**. Edited by Christine Padoch; José Márcio Ayres; Miguel Pinedo-V asquez; Andrew Henderson.

LAURINO, D.; PORPORATO, M.; PATETTA, A.; MANINO, A. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, 64:107-113, 2011.

LAMBERTH, C.; JEANMART, S.; LUKSCH, T.; PLANT, A. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. **Science** 341:742–746, 2013.

MALASPINA, O.; STORT, A. C. As abelhas e os pesticidas. **Apicultura do Brasil**, v. 2, n. 10, p. 42-45, 1985.

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

METCALF, R. L. Changing role of insecticides in crop protection. **Annual Review of Entomology**, 25:219–255, 1980.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. **Editora Nogueirapis**, São Paulo, 447pp, 1997.

NUNES, T. M; HEARD, T. A; VENTURIERI, G. C; OLDROYD, B. P. Emergency queens in *Tetragonula carbonária* (Smith, 1854) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Austral Entomology**. Doi: 10.1111/aen. 12104, 2014.

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

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

OLDROYD, B. P. What’s killing American honey bees? **PLos Biology** 5: 1195–1199, 2007.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos** 120: 321–26, 2011.

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

ROSSI, C. A.; ROAT, T. C.; TAVARES, D. A.; SOKOLOWSKI, P. C.; MALASPINA, O. Brain Morphophysiology of Africanized Bee *Apis mellifera* Exposed to Sublethal Doses of Imidacloprid. Springer Science+Business Media New York, **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, DOI 10.1007/s00244-013-9897-1, 2013.

RICKETTS, T. H; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A; KREMEN, C.; BOGDANSKI, A.; GEMMILL-HERREN, B.; GREENLEAF, S. S; KLEIN, A. M; MAYFIELD, M. M; MORANDIN, L. A; OCHIENG, A; VIANA, B. F. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, 11: 499-515, 2008.

SCHMUCK, R.; SCHONING, R.; STORK, A.; SCHRAMEL O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 57, n. 3, p. 225-238, Mar. 2001.

SCHMUCK, R. Effects of a chronic dietary exposure of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to imidacloprid. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, 47:471–478, 2004.

SUCHAIL, S; DEBRAUWER, L; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, West Sussex, v.60, n.3, p. 291-296, mar. 2004.

TAUTZ, J. The buzz about bees: Biology of a superorganism. Berlin: **Springer**. 284 p, 2008.

VANENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed bee populations in Europe and United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, 103:S80-S95, 2010.

VANENGELSDORP, D; EVANS, J. D; SAEGERMAN, C; MULLIN, C; HAUBRUGE, E; NGUYEN, B. K; FRAZIER, M; FRAZIER, J; COXFOSTER, D; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R. M.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. **Plos One**, San Francisco, v.4, n.8, p.1-17, ago. 2009.

YANG, E. C; CHUANG, Y. C; CHEN, Y.L; CHANG, L. H. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (*Hymenoptera: Apidae*). **Journal of Economic Entomology**, 101:1743–1748, 2008.

CAPÍTULO II

**TOXICIDADE DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO PARA A ABELHA SEM
FERRÃO *SCAPTOTRIGONA* sp. nov. (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI).**

RESUMO

As abelhas sem ferrão são fundamentais na manutenção da biodiversidade e polinização das plantas nativas e cultivadas. Atualmente devido ao intenso desmatamento, monocultivos, patógenos, parasitas e o uso indiscriminado de agrotóxicos, entre eles o imidacloprido tem resultado na diminuição desses insetos. Este produto pertence ao grupo químico dos neonicotinóides que são neurotoxinas que atuam como agonistas da acetilcolina pelos receptores nicotínicos dos insetos, ocasionando hiperexcitação e morte. O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade do imidacloprido para *Scaptorigona* sp. nov. por diferentes vias de exposição. Baseando-se no protocolo oficial da OECD (1998a), foi determinada a toxicidade aguda do imidacloprido medida pela dose letal média (DL₅₀) como uma ferramenta para a estimativa dos efeitos deletérios deste inseticida. Fundamentado na exposição que ocorre no campo o inseticida foi administrado topicamente, onde a DL₅₀ encontrada foi de 16,65 (24 horas) e 8,23 (48 horas) ng p.c / μ L/abelha. Devido sua propriedade sistêmica o imidacloprido, também pode ser encontrado no néctar e no pólen das plantas, ou seja, as estruturas externas das abelhas não são os únicos meios de contaminação, mas também a ingestão de néctar e pólen contaminados, sendo assim a partir do protocolo oficial da OECD (1998b) a toxicidade oral do produto foi aferida pela concentração letal média (CL₅₀) e o resultado foi de 8,47 (24 horas) e 2,98 (48 horas) ng p.c / μ L dieta. O imidacloprido demonstrou ser tóxico para a espécie estudada e o mesmo é mais nocivo, quando administrado de forma oral, baseado na menor dosagem necessária para matar 50% da população testada.

Palavras-chave: CL₅₀. DL₅₀. Mortalidade. Meliponíneo. Sensibilidade. Agrotóxicos.

ABSTRACT

The stingless bees are fundamental to upkeep the biodiversity and the pollination of native and cropped plants. Nowadays due to massive deforestation, monocultures, pathogens, parasites and the indiscriminate use of pesticides, imidacloprid inclusive, are resulting in the decrement of bee's populations. Imidacloprid belongs to the chemical group of neonicotinoids which are neurotoxins that act as agonists on the acetylcholine nicotinic receptors of these insects driving them to overexcitation and death. The main objective of this research was to evaluate how toxic is the imidacloprid for *Scaptotrigona* sp. nov. by different exposition ways. Basing itself on the official protocol of OECD (1998a) was determinate the acute toxicity of imidacloprid, measured through average lethal dose (DL_{50}) as a tool to estimate the deleterious effects caused by this insecticide. Based on what happens in the fields, the insecticide has been topically administered and the established DL_{50} was 16,65 (24 hours) and 8,23 (48 hours) ng p.c / μ L/bee. Due to its systemic priority, the imidacloprid also can be find in both nectar and pollen, in other words the external structures of the bees are not the single ways to contaminate but also the ingestion of nectar e pollen though. Therefore the intake toxicity of that product was measured following the official protocol of OECD (1998b) and the result of average lethal concentration (CL_{50}) was established as 8,47 (24 hours) e 2,98 (48 hours) ng p.c / μ L of food. The imidacloprid has shown to be toxic to the researched bee specie, been more harmful when taken by oral ways, based on its minor lethal dose needed to kill 50% of the tested population.

Keywords: CL_{50} . DL_{50} . Mortality. Meliponines. Sensibility. Agrotoxics.

1. INTRODUÇÃO

Os polinizadores são fundamentais para o fornecimento de nutrientes essenciais à alimentação humana através do serviço de polinização (EILERS et al., 2011). A polinização envolve um sistema conexo de interações entre a vegetação, a fauna e o bem estar humano (KEVAN; MENZEL, 2012). A proporção de espécies vegetais polinizadas por animais possui uma média de aproximadamente 78% nas regiões temperadas, já nas regiões tropicais esse valor cresce para 94% e geralmente 87% das espécies de plantas com flores conhecidas, dependem em algum momento, de animais polinizadores (OLLERTON et al., 2011).

As abelhas são os mais importantes dentre a grande diversidade de insetos polinizadores (BUCHMANN; NABHAN, 1997). Segundo Gallai et al. (2009), o valor da polinização por insetos é estimado em 212 bilhões de dólares, representando aproximadamente 9,5 % do valor total da produção agrônômica mundial. Segundo Potts et al. (2010) em um trabalho feito sobre o valor econômico da polinização por abelhas, foi estimado que esse serviço movimentaria algo em torno de 11,6 bilhões de euros por ano só na América do Sul.

As abelhas nativas ou meliponíneos, distribuem-se em grande parte das regiões tropicais da Terra, abrangendo praticamente toda a América Latina e África, além do norte da Austrália e sudeste asiático. Não obstante, é nas Américas que a maior parte da diversidade de espécies ocorre, com aproximadamente 400 tipos descritos e é onde a criação destes insetos é mais difundida e praticada (VILLAS-BÔAS, 2012). As intervenções humanas como desmatamento, fragmentação de habitats e o uso indiscriminado de produtos fitossanitários tem causado declínio na população de polinizadores (BIESMEIJER et al., 2006).

O Brasil consumiu aproximadamente 730 milhões de toneladas de agroquímicos em 2008, superando o então líder mundial Estados Unidos e se tornando o maior consumidor do planeta. Cerca de 30% dos produtos fitossanitários consumidos no Brasil são inseticidas e, desses, aproximadamente 40% são considerados tóxicos para as abelhas (FREITAS; PINHEIRO, 2010; GUAZELLI, 2009).

Avalia-se a susceptibilidade de insetos à inseticidas em laboratório, através de ensaios de dose ou concentração letal média (DL_{50} ou CL_{50}). DL_{50} quando se administra um volume conhecido de inseticida, o qual entra em contato uma única vez com o inseto e CL_{50} quando os insetos são expostos ao conteúdo tóxico em uma determinada concentração por um período de tempo (CAMPOS; ANDRADE, 2001). Esses testes são feitos seguindo um protocolo de diretrizes para testes de produtos químicos da OECD (Organization for

Economic Cooperation and Development), 1998a, 1998b e são administrados tópicamente ou oralmente, sendo o tórax e o trato digestório os meios pelos quais o inseticida entra no organismo.

Todos os inseticidas do grupo químico dos neonicotinóides, atuam como agonistas da acetilcolina e agem nos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos, ocasionando comprometimento das funções vitais e morte. Os sete produtos que foram lançados entre 1991 e 2002 representam a carga de esforços e o intensivo desenvolvimento de pesquisas das indústrias de produtos fitossanitários para essa classe química. Os perfis técnicos e os variados usos de inseticidas neonicotinóides são exemplificados utilizando o imidacloprido, que é a molécula pioneira e de maior sucesso desse grupo químico (ELBERT et al., 2008).

Apis mellifera é a abelha mais utilizada em pesquisas, especialmente aquelas que analisam a resistência desses insetos à inseticidas, devido sua grande importância como polinizador (JACOB et al., 2014). Existem alguns valores de toxicidade de neonicotinóides para *A. mellifera* na literatura: imidacloprido DL₅₀ oral (48h) = 30 ng/abelha (DECOURTYE et al., 2003); imidacloprido DL₅₀ tópico (24h) = 17,90 ng/abelha (IWASA et al., 2004); tiametoxam DL₅₀ oral (24 e 48h) = 4,67 e 4,41 ng/abelha e CL₅₀ (24 e 48h) = 0,134 e 0,126 ng/μL e clotianidina DL₅₀ oral (24 e 48h) = 2,84 e 2,69 ng/abelha e CL₅₀ (24 e 48h) = 0,081 e 0,077 ng/μL (LAURINO et al., 2011); imidacloprido DL₅₀ oral (24 e 48h) = 80,9 ng/abelha (ROSSI et al., 2013).

No que diz respeito às abelhas nativas, poucos trabalhos são encontrados na literatura, sobre a toxicidade de inseticidas neonicotinóides para esses insetos. Segundo Soares (2012) a toxicidade do inseticida imidacloprido para as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica*, quando administrado topicamente é: DL₅₀ = 25,21 ng i.a. / abelha em 24 horas e de 24,46 ng i.a. / abelha em 48 horas. Quando o inseticida foi fornecido oralmente em dieta contaminada: CL₅₀ = 42,50 ng i.a. / μL dieta em 24 horas e de 14,28 ng i.a. / μL dieta em 48 horas.

Infelizmente a quantidade de pesquisas avaliando a toxicidade do imidacloprido para abelhas sem ferrão, estabelecendo valores de DL₅₀ tópica e CL₅₀ oral é inexpressível, tendo em vista que o presente trabalho é apenas o segundo do Brasil nesse sentido e o primeiro que testa a toxicidade da formulação comercial deste composto para meliponíneos.

Devido à escassez de pesquisas, a grande importância das abelhas nativas na polinização de biomas específicos e como pouco se sabe sobre a influência que os agroquímicos, em especial os neonicotinóides exercem sobre essas abelhas, este trabalho teve

como objetivo determinar a toxicidade do inseticida imidacloprido sobre a abelha sem ferrão *Scaptotrigona* sp. nov, através da DL_{50} média tópica e da CL_{50} média oral, no intuito de fornecer dados a pesquisas futuras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Abelhas campeiras de *Scaptorigona* sp. nov. de três colônias diferentes, foram coletadas através de sugador bucal no meliponário do Setor de Abelhas do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici e conduzidas ao Laboratório de Abelhas.

2.2. Determinação da DL₅₀ média tópica

Para a determinação da dose letal média tópica (DL₅₀ de uma substância, expressa o grau de toxicidade aguda de substâncias químicas, correspondendo à dose suficiente para matar 50% dos animais de um lote utilizados num experimento) foi utilizado o método internacional preconizado pela OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1998a, desenvolvido para *Apis mellifera*, ressaltando uma adaptação no que diz respeito à anestesia das abelhas, pois no protocolo é recomendado que esse procedimento seja realizado utilizando-se dióxido de carbono ou nitrogênio e no presente trabalho foi realizado por resfriamento através de um freezer.

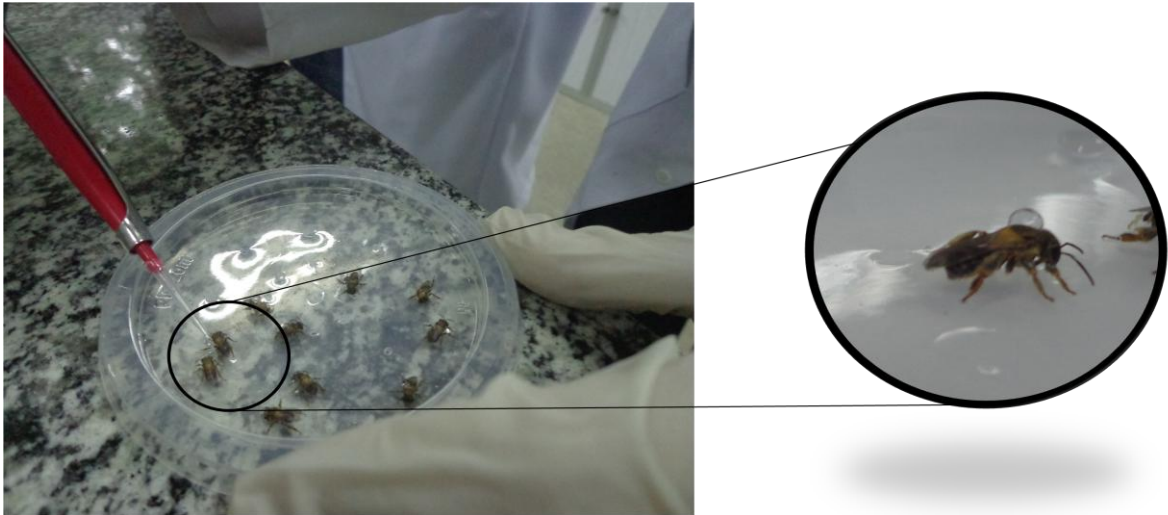
O produto comercial com o ingrediente ativo do imidacloprido (Evidence® 700 WG da Bayer CropScience, Brasil), foi diluído várias vezes em água destilada, até se obter as doses a serem testadas (1 ng p.c./μL, 5 ng p.c./μL, 20 ng p.c./μL, 40 ng p.c./μL, 60 ng p.c./μL, 100 ng p.c./μL, 150 ng p.c./μL).

As abelhas foram anestesiadas por resfriamento através de um freezer a uma temperatura de -2° C por 80 segundos. Após isso cada abelha recebeu um 1μL na região do pronoto, através de uma micropipeta monocal de volume variável, contendo as respectivas soluções do inseticida (figura 1), exceto as do grupo controle que receberam 1μL de água destilada.

Após serem expostas ao produto as abelhas foram colocadas em uma bandeja plástica por 10 minutos para que ocorresse a evaporação do solvente. Posteriormente foram acondicionadas em potes plásticos de 250 mL e colocadas em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio) com suprimento de água e alimento sem contaminação, por meio de tubos do tipo *ependorf*, temperatura de 28 ± 2°C e umidade relativa de 70 ± 10 % durante todo o experimento (figura 2).

Cada dose testada era composta por três repetições contendo 10 abelhas por pote plástico. Foram feitas anotações de abelhas vivas e mortas 24 e 48 horas após o contato com o inseticida e os dados foram submetido à análise estatística do tipo dose-resposta, utilizando-se o programa Bioestat® - versão 5.3.

Figura 1 - Abelhas *Scaptotrigona* sp. nov. recebendo a gota de 1 μ L da solução com inseticida, na região do pronoto, durante o ensaio de dosagem tópica.



Fonte: Gurgel, L. S., 2014.

Figura 2 – Abelhas acondicionadas em potes plásticos de 250 mL e divididas por tratamentos dentro da BOD (demanda bioquímica de oxigênio)



Fonte: Gurgel, L. S., 2014.

2.3. Determinação da (CL₅₀) média por ingestão.

Para a determinação da concentração letal média via oral (CL₅₀ de uma substância, diz respeito ao grau de toxicidade aguda de substâncias químicas, correspondendo a concentração suficiente para matar 50% dos animais de um lote utilizados num experimento) foi utilizado o método internacional preconizado pela OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1998b, desenvolvida para *Apis mellifera*.

O produto comercial com o ingrediente ativo do imidacloprido (Evidence® 700 WG da Bayer CropScience, Brasil), foi diluído várias vezes diretamente no alimento oferecido as abelhas, que foi preparado a partir de uma mistura 1:1 de açúcar comercial e água destilada (xarope), até se obter as doses a serem testadas (1 ng p.c./μL dieta, 5 ng p.c./μL dieta, 10 ng p.c./μL dieta, 20 ng p.c./μL dieta, 40 ng p.c./μL dieta, 80 ng p.c./μL dieta, 120 ng p.c./μL dieta).

As abelhas foram acondicionadas em potes plásticos de 250 mL com suprimento de água por meio de tubos do tipo *ependorf* e colocadas em estufa BOD (demanda bioquímica de oxigênio), temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10 \%$ onde permaneceram em jejum por 2 horas. Após o jejum, o xarope contaminado com as diferentes concentrações de imidacloprido foi oferecido às abelhas durante todo o ensaio, exceto as do grupo controle que receberam xarope sem nenhum tipo de contaminação.

Cada dose testada era composta por três repetições contendo 10 abelhas por pote plástico. A anotação de abelhas vivas e mortas foi feita 24 e 48 horas após o oferecimento do alimento contaminado e submetido à análise estatística do tipo dose-resposta, utilizando o programa Bioestat® - versão 5.3.

3. RESULTADOS

A partir dos dados de mortalidade, foram calculados os valores de DL₅₀ tópica e CL₅₀ oral, em 24 e 48 h após o início da exposição das abelhas ao imidacloprido. A DL₅₀ tópica foi de 16,65 ng p.c / μ L/abelha em 24 horas (Tabela 1 e Figura 3) e de 8,23 ng p.c / μ L/abelha em 48 horas (tabela 1 e figura 4). A CL₅₀ oral foi de 8,47 ng p.c / μ L/dieta em 24 horas (tabela 1 e figura 5) e de 2,98 ng p.c / μ L/dieta em 48 horas (Tabela 1 e Figura 6).

O nível de mortalidade para *Scaptotrigona* sp. nov. foi diferenciado de acordo com a via de exposição, apontando uma maior resistência a dosagem tópica em comparação a dieta contaminada. As abelhas expostas a doses inferiores às obtidas como letais médias, também tiveram prejuízos vitais, tendo em vista a evidência de mudança comportamental, prostração e tremores que foram observados horas após a exposição ao inseticida em ambos os ensaios.

Tabela 1 – Toxicidade aguda do imidacloprido em 24 e 48 horas para *Scaptotrigona* sp. nov.

| Modo de exposição | Tempo (horas) | DL ₅₀ | CL ₅₀ | IC _{95%} | χ^2 | P |
|------------------------------------|---------------|------------------|------------------|-------------------|----------|-------|
| Tópica ng p.c./ abelha | 24 | 16,65 | - | 11,51 - 22,72 | 5,51 | 0,356 |
| | 48 | 8,24 | - | 5,09 - 12,07 | 6,22 | 0,285 |
| Ingestão ng p.c./ μ L dieta | 24 | - | 8,47 | 5,96 - 11,43 | 1,59 | 0,902 |
| | 48 | - | 2,98 | 0,72 - 6,08 | 5,47 | 0,361 |

(DL₅₀) dose letal média; (CL₅₀) concentração letal média; (IC_{95%}) intervalo de confiança 95%; (χ^2) qui-quadrado e (P) probabilidade de valores.

Figura 3 – Determinação da DL_{50} tópica em 24 horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona* sp. nov.

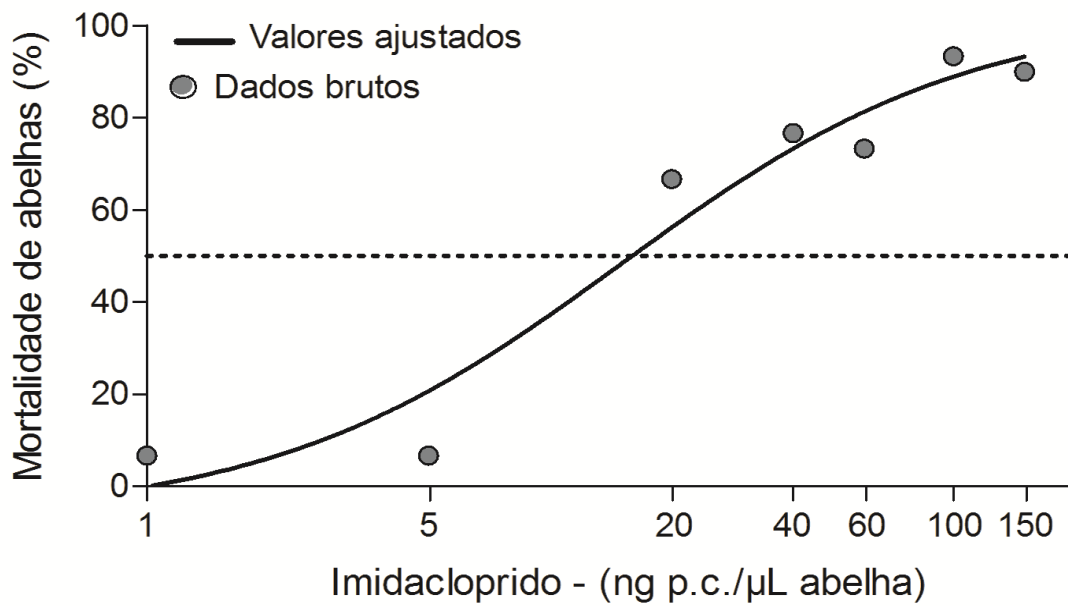


Figura 4 – Determinação da DL_{50} tópica em 48 horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona* sp. nov.

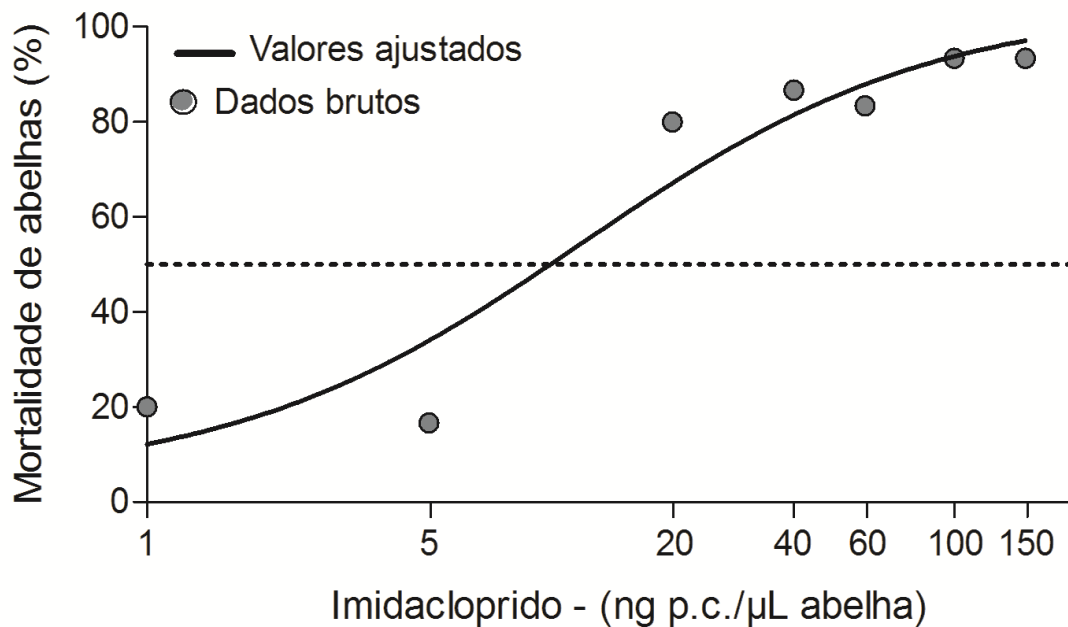


Figura 5 – Determinação da CL_{50} oral em 24 horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona* sp. nov.

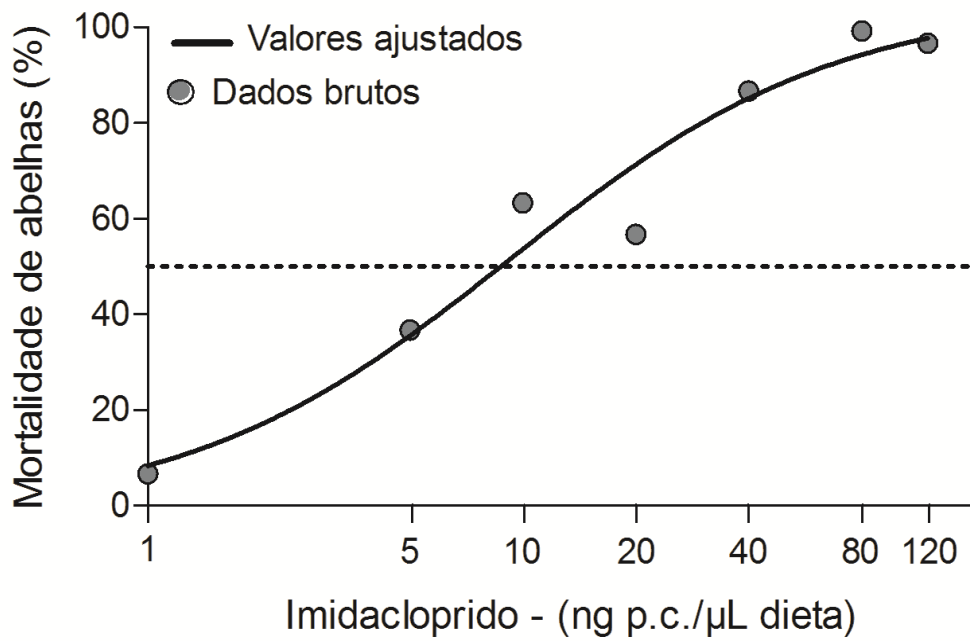
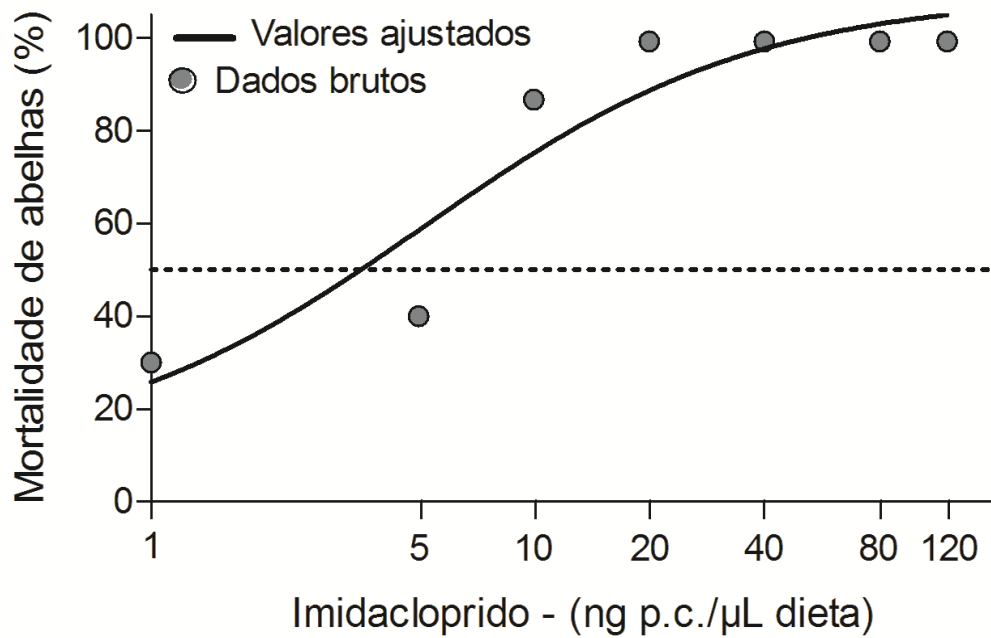


Figura 6 – Determinação da CL_{50} oral em 48 horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona* sp. nov.



4. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a toxicidade do produto comercial contendo ingrediente ativo do imidacloprido para a abelha *Scaptotrigona* sp. nov. e constatou que se trata de um produto tóxico para esta espécie. Comparando-se as duas formas de exposição (tópica e oral), esta abelha demonstrou ser mais susceptível ao imidacloprido quando o mesmo é administrado de forma oral, pois uma menor quantidade de inseticida foi necessária para matar 50% da população testada, o que pode ser explicado devido ao alimento contaminado ter sido fornecido constantemente às abelhas durante todo o experimento, enquanto que as do ensaio com dosagem tópica, foram expostas ao inseticida uma única vez.

Em trabalho realizado por Soares (2012), onde foram estabelecidas a DL_{50} e CL_{50} do imidacloprido em 24 e 48 h, para a abelha *Scaptotrigona postica*, foi constatado que este inseticida é tóxico para a espécie estudada e os resultados apontaram que esta espécie é mais sensível ao inseticida quando o mesmo foi aplicado de forma tópica, diferindo do que foi encontrado neste experimento para a *Scaptotrigona* sp. nov.

A baixa toxicidade tópica do imidacloprido para a *Scaptotrigona* sp. nov. pode ter ocorrido devido à dificuldade de penetração do inseticida pela cutícula, já que sua composição e espessura podem ter influenciado nesse processo. Segundo Decourtye e Devillers (2010), os neonicotinóides geralmente são mais tóxicos quando oferecidos por via oral do que por contato e essa diferença pode ser explicada devido às moléculas desse composto, possuírem uma pequena capacidade de repelir água o que resulta numa baixa taxa de penetração através da cutícula dos insetos.

Del Sarto et al. (2014), avaliando a toxicidade de inseticidas via tópica e oral para duas espécies de abelhas (*A. mellifera* e *Melipona quadrifasciata*), constataram que o modo de exposição pode acarretar maior ou menor mortalidade, tendo em vista que os resultados mostraram que os agroquímicos foram altamente tóxicos para as abelhas quando oferecidos via oral, em especial para os meliponíneos, onde foram dez vezes mais eficientes em matar essa espécie de abelhas.

Segundo Jacob et al. (2012), ao avaliarem a toxicidade tópica e oral do inseticida fipronil em 24h para abelha *Scaptotrigona postica*, foram encontrados os valores de $DL_{50} = 0,54$ ng i.a. / μ L abelha e $CL_{50} = 0,24$ ng i.a. / μ L dieta, o que mais uma vez endossa que as abelhas sem ferrão são mais sensíveis aos inseticidas, quando os mesmos são oferecidos via oral.

Comparando os resultados da presente pesquisa para DL₅₀ tópica (24 e 48 horas) e CL₅₀ oral (24 e 48 horas), com os obtidos por Soares (2012) onde o imidacloprido foi administrado nas mesmas dosagens, observa-se que esse agroquímico é mais tóxico para a *Scaptotrigona* sp. nov. do que para a *Scaptotrigona postica*, tanto via contato como oral, tendo em vista a menor quantidade de inseticida requerida para matar 50% das abelhas em ambos os testes.

Porém Soares (2012) utilizou abelhas recém emergidas, o ingrediente ativo do imidacloprido e o alimento que recebeu a contaminação era composto de um mix proteico, já o presente trabalho utilizou abelhas adultas campeiras, o produto comercial com o ingrediente ativo do imidacloprido (Evidence® 700 WG da Bayer CropScience, Brasil) e o alimento que recebeu as doses do composto químico era o xarope 1/1 (água destilada e açúcar), o que levanta a reflexão que os adjuvantes existentes na formulação comercial, podem estar potencializando os efeitos tóxicos desse inseticida neonicotinóide.

As diferenças de toxicidade para as abelhas pode ser resultado da capacidade evolutiva, sociabilidade, tamanho, peso corporal, metabolismo e poder de desintoxicação inerente a cada espécie, sejam elas nativas ou exóticas. Esse argumento também foi levantado por alguns autores, que alegam que a história de vida das espécies de abelha variam substancialmente, bem como sua socialização, tamanho corporal, capacidade de desintoxicação de acordo com o metabolismo e esses fatores são associados diretamente a uma susceptibilidade diferenciada aos pesticidas (LIU et al., 2005; HARDSTONE; SCOTT 2010; BRITAIN; POTTS, 2011; DECOURTYE et al., 2013).

Trabalhos que abordam a toxicidade de inseticidas para *A. mellifera* e abelhas sem ferrão com base em valores de DL₅₀ apontam uma maior resistência da primeira em relação aos inseticidas, como demonstrados nos estudos toxicológicos de (MAYER et al., 1998), (MAYER; LUNDEN, 1999), (DEL SARTO, 2009), (VALDOVINOS-NÚÑEZ et al., 2009), (HARDSTONE; SCOTT, 2010), (JACOB et al., 2012) e (LOURENÇO et al., 2012).

Durante os experimentos, as abelhas expostas ao inseticida mostraram sintomas claros de intoxicação em ambos os ensaios, como tremores nas pernas e asas, agitação, dificuldades em manter o equilíbrio e prostração, o que não foi observado no grupo controle. Essas observações foram feitas inclusive em doses inferiores a letal o que demonstra a importância de estudos futuros sobre a influência e efeitos deletérios de doses subletais nessa espécie de abelha.

Alguns autores relatam que é possível os polinizadores entrarem em contato com os inseticidas e não apresentarem nenhum sintoma de imediato, porém efeitos subletais como

comprometimento de algumas funções fisiológicas, redução da capacidade de forrageamento, mudanças de comportamento e funções cognitivas, irão comprometer a vida desse inseto e sua capacidade como polinizadores (BELZUNCES; TCHAMITCHIAN; BRUNET, 2012; DECOURTYE et al., 2005). Medrzycki et al. (2003), analisando o comportamento de abelhas *A. mellifera* expostas a doses subletais de imidacloprido, observaram uma diminuição na comunicação e mobilidade das abelhas, o que pode comprometer as relações sociais desses insetos. Segundo Rossi et al. (2013), doses subletais de imidacloprido têm efeitos citotóxicos no cérebro das abelhas e os lóbulos óticos são mais sensíveis que outras regiões cerebrais.

Devido o papel fundamental das abelhas nativas no meio ambiente, sua variedade de espécies, importância econômica, ecológica, manutenção da biodiversidade e na produção de frutos e sementes no Brasil, se faz necessário um maior esforço para se desenvolver pesquisas de campo e laboratoriais, com técnicas específicas para o estabelecimento de toxicidade em abelhas sem ferrão, explicando melhor sobre os efeitos deletérios dos inseticidas neonicotinóides e a vulnerabilidade de diferentes espécies nativas aos mesmos, tendo em vista que uma drástica redução na população desses insetos poderia comprometer a biodiversidade de vários ambientes.

Infelizmente os protocolos internacionais existentes para avaliação de toxicidade, foram desenvolvidos para testes em *A. mellifera*, que é uma espécie exótica no Brasil, e que tem se mostrado mais resistente aos efeitos dos pesticidas em comparação com as abelhas nativas. Tendo em vista que a maioria dos trabalhos científicos que avaliam a toxicidade de agroquímicos, são realizados com abelhas exóticas e sabendo da maior susceptibilidade das abelhas sem ferrão em relação aos produtos fitossanitários, fica claro que as espécies nativas estão correndo grande risco expostas ao uso indiscriminado de inseticidas neonicotinóides e outros que já se encontram suspensos em países europeus.

Pesquisas nesse sentido com abelhas sem ferrão são escassas na literatura, porém as mesmas podem ser utilizadas pelos órgãos competentes brasileiros, contribuindo para uma melhor avaliação do processo de registro de defensivos agrícolas neste país, baseando-se na toxicidade desses produtos para espécies locais.

5. CONCLUSÃO

O imidacloprido é tóxico para a espécie *Scaptotrigona* sp. nov., a qual se mostrou mais vulnerável à ação desse produto do que a *A. mellifera*.

O imidacloprido é mais tóxico para esta espécie de abelha, quando administrado de forma oral.

Doses de imidacloprido abaixo das obtidas como letais, também demonstraram ser comprometedoras das funções vitais dessas abelhas.

REFERÊNCIAS

- BELZUNCES, L. P.; TCHAMITCHIAN, S.; BRUNET, J. L. Neural effects of insecticides in the honey bee. **Apidologie**, Versailles, v.43, n. 3, p. 348-370, May 2012.
- BIESMEIJER, J. C.; ROBERTS, S. P. M.; REEMER, M.; OHLEMULLER, R.; EDWARDS, M.; PEETERS, T.; SCHAFFERS, A. P.; POTTS, S. G.; KLEUKERS, R.; THOMAS, C. D.; SETTELE, J.; KUNIN, W. E. Parallel Declines in Pollinators and Insect-pollinated Plants in Britain and the Netherlands. **Science**, 313: 351-354, 2006.
- BUCHMANN, S.L.; NABHAN, G.P.; **The Forgotten Pollinators**. Island Press; 1997.
- BRITTAIN, 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**. 12, 321–331, 2011.
- CAMPOS, J; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.35, n.3, p.232-236, 2001.
- DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELEGUE, M. H. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. **Pest Management Science** 59:269–278, 2003.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 48, n. 2, p. 242-250, Feb. 2005.
- DECOURTYE A., DEVILLERS J. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees, *In*: THANY S. H., (Org) **Insect nicotinic acetylcholine receptors: advances in experimental medicine and biology**. New York, USA: Springer Science + Business Media, LLC. p. 85-95. 2010.
- DECOURTYE, A., HENRY, M., DESNEUX, N. Overhaul pesticide testing on bees. **Nature** 497, 188, 2013.
- DEL SARTO, M. C. L. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. 2009. 64f. Tese de doutorado em Entomologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.
- DEL SARTO, M. C. L., OLIVEIRA, E. E., GUEDES, R. N. C., CAMPOS, L. A. O. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, 45:626–636. INRA, DIB and Springer-Verlag France, 2014 DOI: 10.1007/s13592-014-0281-6, 2014.
- EILERS, E. J.; KREMEN, C.; SMITH, GREENLEAF, S.; GARBER, A. K.; KLEIN, A. M. Contribution of pollinator mediated crops to nutrients in the human food supply. **PLoS ONE**, v. 6:e21363, 2011.

ELBERT, A.; HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELERTW; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *In: STEPHEN O. DUKE. (Org) Pest Management Science*. Reino Unido: SOCI. v. 64: p. 1099–1105, 2008.

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, 282–298, mar. 2010.

GALLAI, N.; SALLES, J-M; SETTELE, J.; VAISSIE`RE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *In: HOWARTH R. B. (Org) Ecological Economics*. v. 68:p. 810–821, 2009.

GUAZELLI, M. J. Brasil: o maior consumidor de agrotóxicos. **Portal Ecodebate**. Publicado em 09/06/2009. Entrevista especial concedida ao Portal Ecodebate. Disponível em <http://www.ecodebate.com.br/2009/06/09/brasil-o-maior-consumidor-de-agrotoxicos-entrevista-especial-com-maria-jose-guazzelli/>. Acesso em 7 fev. 2011.

HARDSTONE; SCOTT, J. Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *In: STEPHEN O. DUKE. (Org) Pest Management Science*. Reino Unido: SOCI. 66(66), p. 1171–1180, 2010.

IWASA, T; MOTOYAMA, N; AMBROSE, J. T; ROE, R. M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *In: CHAUHAN B. S.; CORRELL J.; CROSS, J. V.; KORSTEN L.; REAY-JONES F. P. F.; WEGULO S. N. (Org) Crop Protection*, v. 23, p. 371–378, 2004.

JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 90, issue 1, 69-72, 2012.

JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Impact of Fipronil on the Mushroom Bodies of the Stingless Bee *Scaptorigona postica*. **Society of Chemical Industry (wileyonlinelibrary.com)** DOI 10.1002/ps.3776, 2014.

KEVAN, P. G.; MENZEL, R. The plight of pollination and the interface of neurobiology, ecology and food security. *The Environmentalist*, v.32, p. 300-310, 2012.

LIU, Z.; WILLIAMSON, M. S.; LANSDELL, S. J.; DENHOLM, I.; HAN, Z.; MILLAR, N. S. Anicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U. S. A. 102(24), 8420–8425, 2005.

LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreilli, 1811). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89: 921–924, 2012.

MAYER, D. F.; KOVACS, G.; LUNDEN, J. D. Field and laboratory tests on the effects of cyhalothrin on adults of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. *Journal of Apicultural Research*. v. 37: 33-37, 1998.

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

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

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

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

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How Many Flowering Plants are Pollinated by Animals? **Oikos**, 120(3): 321-326, 2011.

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

ROSSI, C. A.; ROAT, T. C.; TAVARES, D. A.; SOKOLOWSKI, P. C.; MALASPINA, O. Brain Morphophysiology of Africanized Bee *Apis mellifera* Exposed to Sublethal Doses of Imidacloprid. Springer Science+Business Media New York, **Arch Environ Contam Toxicol** DOI 10.1007/s00244-013-9897-1, 2013.

SOARES, Hellen. Maria. **Avaliação dos Efeitos do Inseticida Imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, apidae, Meliponini)**.2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

VALDOVINOS-NÚÑEZ, G. R.; QUEZADA-EUAN, J. J. G.; ANCONA-XIU P.; MOO-VALLE, H.; CARMONA, A.; SANCHEZ, E. R. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Journal of Economic Entomology** 102: 1737-1742, 2009.

VILLAS-BÔAS, Jerônimo. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012. 96P.