



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**LEONARDO DOS SANTOS GURGEL**

**TOXICOLOGIA DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE INSETICIDAS PARA AS**  
**ABELHAS *Scaptotrigona aff. depilis* E *Apis mellifera* L.**

**FORTALEZA**

**2020**

LEONARDO DOS SANTOS GURGEL

TOXICOLOGIA DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE INSETICIDAS PARA AS  
ABELHAS *Scaptotrigona aff. depilis* E *Apis mellifera* L.

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal da Paraíba; como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia. Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. PhD. Breno Magalhães Freitas.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- G987t Gurgel, Leonardo dos Santos.  
Toxicologia de formulações comerciais de inseticidas para as abelhas *Scaptotrigona aff. depilis* e *Apis mellifera* L. / Leonardo dos Santos Gurgel. – 2020.  
62 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Breno Magalhães Freitas.
1. CL50. 2. DL50. 3. Pesticida. 4. TL50. 5. Toxicidade. I. Título.

CDD 636.08

---

LEONARDO DOS SANTOS GURGEL

TOXICOLOGIA DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE INSETICIDAS PARA AS  
ABELHAS *Scaptotrigona aff. depilis* E *Apis mellifera* L.

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zootecnia. Área de concentração: Produção Animal.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Patrik Luiz Pastori  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof. Dr. Jose Everton Alves  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Prof. Dr. Mikail Olinda de Oliveira  
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

A Deus, pelas bênçãos e misericórdia.

A 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.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, oportunidades e força que me dá diariamente para encarar as adversidades da vida. Tu és maravilhoso Senhor.

Ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia – PDIZ, da Universidade Federal do Ceará, instituição esta, que muito me orgulho de fazer parte.

Aos professores doutores e amigos que compuseram a banca examinadora, enriqueceram meu trabalho e fizeram parte da realização desse sonho;

Ao amigo, professor e orientador Dr. Breno Magalhães Freitas, pela orientação e apoio ao longo do trabalho, que foram fundamentais para a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao amigo e Engenheiro Agrônomo Dr. Francisco Deoclécio Guerra Paulino, pelos conselhos e apoio.

Ao amigo e professor Dr. Mikail Olinda de Oliveira, pelos momentos descontraídos que tivemos quando você ainda era aluno de Pós Doutorado, aqui no setor de abelhas. Parabéns pelo sucesso na carreira profissional.

Ao amigo e professor Dr. Patrik Luiz Pastori, o qual não mediu esforços para se fazer presente neste projeto e assim como eu é apaixonado pela entomologia. Seus conselhos foram valiosos.

Ao amigo e professor Dr. José Everton Alves por me instigar na busca do conhecimento.

À secretária da Coordenação da Pós-Graduação Francisca Prudêncio, pela amizade e suporte administrativo durante essa minha caminhada.

A minha mãe, Francisca Goretti dos Santos Gurgel, pelo amor incondicional, apoio, “puxões de orelha” e amizade, sem ela nada disso seria possível, ao meu pai Narcélio Alves Gurgel, pelo companheirismo, amor e dedicação a mim destinados e a minha irmã Allana dos Santos Gurgel, pela sinceridade e parceria.

A minha namorada, Luciana Rodrigues, pelo amor, apoio e cumplicidade.

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

A minha avó Maria Alice Alves Gurgel, a senhora faz muita falta e estará sempre no meu coração (In Memoriam).

Aos meus avôs Raimundo dos Santos e Sebastião Gurgel, a simplicidade dos senhores moldaram o meu caráter (In Memoriam).

Aos meus amigos Weverson Nobre, Samuel Freire, Wendell Guedes, Luís Mourão, Fred Magalhães, minha madrinha Maria das Graças, minhas amigas Agaciane Rodrigues, Kamila Sousa e Denise de Castro.

Aos meus primos Saulo Dantas e Mário Miranda, pelo rock and roll, apoio e momentos divertidos.

As minhas tias Gleuce dos Santos, Greyci dos Santos, Glaucia dos Santos, Glícia Passos, Clécia Gurgel, Selma Gurgel, Lili Miranda e aos meus tios, Juarez Gurgel, Raimundo Filho (In Memoriam), Neto Gurgel, Mário Pacheco e Everardo Gurgel.

Ao meu tio, amigo e Engenheiro Agrônomo, Me. Milton Alves Gurgel, o senhor foi a minha inspiração na escolha da profissão. O amor com o qual o senhor falava da Agronomia me contagiou de tal forma, que eu não poderia ter escolhido outro ofício. Muito obrigado!

Aos meus afilhados Alícia Passos dos Santos e Noah Nobre, por vossa inocência me transmitir a esperança de dias melhores.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisas com Abelhas (GPA): Janio Felix, Elton Melo, Larysson Feitosa, Alípio Pacheco Filho, Elvis Costa, Dalila Martins, Epifânia Rocha, Hiara Marques, Victor Monteiro, David Rezende, Gercy Pinto, Conceição Parente, Paloma Eleutério, Nádia Carvalho, e Diego Bezerra, o apoio de vocês foi fundamental.

Aos colegas de trabalho, Ana Roberta Fontenele, Marcelo Vasconcelos, Francisco Carneiro, Hélio Rocha e Clécio Bezerra pela amizade e prontidão que me atendiam.

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

## RESUMO

Os defensivos agrícolas são apontados como responsáveis pela mortandade de abelhas manejadas e silvestres. Apesar de alguns estudos realizados com os ingredientes ativos, pouco se investigou sobre a ação das formulações comerciais, mesmo havendo indícios de que os materiais inertes potencializem o efeito tóxico dos inseticidas para as abelhas. O presente trabalho objetivou investigar a toxicidade para abelhas de três produtos comerciais amplamente usados no Brasil como defensivos agrícolas; Verismo<sup>®</sup> (metaflumizone) e Actara<sup>®</sup> (tiametoxam) em *Apis mellifera*, e Evidence<sup>®</sup> (imidacloprido) em *Scaptotrigona aff. depilis*. Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Abelhas do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará entre os anos de 2016 e 2018 e baseados nos protocolos internacionais da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). A toxicidade dos inseticidas foi avaliada por diferentes vias de exposição, por meio da Dose Letal média tópica (DL<sub>50</sub>) e da Concentração Letal média por ingestão (CL<sub>50</sub>) para *A. mellifera* e do Tempo Letal médio (TL<sub>50</sub>), tópico e oral para *Scaptotrigona aff. depilis*. Os dados de mortalidade foram anotados após 1, 6, 12, 24 e 48h para *Apis* e por 300h com intervalos de 1, 6, 12 e 24h no primeiro dia e a partir do segundo a cada 24h, para *Scaptotrigona*, da exposição dos insetos às diferentes dosagens dos inseticidas. Para *Apis* os dados foram analisados através de um modelo log-logístico ou modelo de Gompertz com auxílio do pacote “drc” presente no ambiente estatístico R e para *Scaptotrigona* os dados foram submetidos à análise estatística do tipo dose-resposta, utilizando-se o programa Bioestat<sup>®</sup> - versão 5.3. O Actara<sup>®</sup> produziu a DL<sub>50</sub> tópica de 0,055 (24h) e 0,052 (48h) ng p.c./μL/abelha e a CL<sub>50</sub> de ingestão foi 1,467 (24h) e 0,095 (48h) ng p.c./μL dieta. O Verismo<sup>®</sup> teve a DL<sub>50</sub> tópica de 97,223 (24h) e 1,157 (48h) nL p.c./μL/abelha e a CL<sub>50</sub> de ingestão foi 2,493 (24h) e 0,334 (48h) nL p.c./μL dieta. O TL<sub>50</sub> tópico do Evidence<sup>®</sup> para *Scaptotrigona aff. depilis* foi de 22,1h e de 29,4h por ingestão. Os resultados apontaram que o Actara<sup>®</sup> é muito mais tóxico para *A. mellifera* que o Verismo<sup>®</sup>, independentemente da via de exposição. O Evidence<sup>®</sup> demonstrou ser tóxico para as abelhas *Scaptotrigona aff. depilis*, no entanto, o efeito letal do produto se manifesta mais rapidamente quando a contaminação ocorre por meio tópico do que quando por meio oral.

**Palavras-chave:** CL<sub>50</sub>. DL<sub>50</sub>. Pesticida. TL<sub>50</sub>. Toxicidade.

## ABSTRACT

Pesticides are considered responsible for the death of managed and wild bees. Despite some studies carried out with the active ingredients, little has been investigated about the action of commercial formulations, even though there are indications that inert materials potentiate the toxic effect of insecticides to bees. The present work aimed to investigate the toxicity to bees of three commercial products widely used in Brazil as pesticides; Verismo<sup>®</sup> (metaflumizone) and Actara<sup>®</sup> (thiametoxam) in *Apis mellifera*, and Evidence<sup>®</sup> (imidacloprid) in *Scaptotrigona aff. depilis*. The studies were conducted at the Bee Laboratory of the Zootechnics Department of the Federal University of Ceará between the years 2016 and 2018 and based on the international protocols of the OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). The toxicity of insecticides was assessed by different exposure routes, using the Topical Average Lethal Dose (LD<sub>50</sub>) and the Average Lethal Concentration per ingestion (LC<sub>50</sub>) for *A. mellifera* and the Average Lethal Time (LT<sub>50</sub>), topical and oral for *Scaptotrigona aff. depilis*. Mortality data were recorded after 1, 6, 12, 24 and 48 hours for *Apis* and for 300 hours with intervals of 1, 6, 12 and 24 hours on the first day and from the second every 24 hours, for *Scaptotrigona*, from insect exposure different dosages of insecticides. For *Apis* the data were analyzed using a log-logistic model or Gompertz model with the help of the “drc” package present in the R statistical environment and for *Scaptotrigona*, the data were subjected to dose-response statistical analysis using the program Bioestat<sup>®</sup> - version 5.3. Actara<sup>®</sup> produced the topical LD<sub>50</sub> of 0.055 (24h) and 0.052 (48h) ng c.p./μL/bee and the ingestion LC<sub>50</sub> was 1.467 (24h) and 0.095 (48h) ng c.p./μL diet. Verismo<sup>®</sup> had a topical LD<sub>50</sub> of 97.223 (24h) and 1.157 (48h) nL c.p./μL/bee and the ingestion LC<sub>50</sub> was 2.493 (24h) and 0.334 (48h) nL c.p./μL diet. The LT<sub>50</sub> topical Evidence<sup>®</sup> for *Scaptotrigona aff. depilis* was 22.1h and 29.4h if swallowed. The results showed that Actara<sup>®</sup> is much more toxic to *A. mellifera* than Verismo<sup>®</sup>, regardless of the route of exposure. Evidence<sup>®</sup> has been shown to be toxic to bees *Scaptotrigona aff. depilis*, however, the lethal effect of the product manifests itself more quickly when contamination occurs topically than when orally.

**Keywords:** LC<sub>50</sub>. LD<sub>50</sub>. Pesticide. LT<sub>50</sub>. Toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Abelhas <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> recebendo a gota de 1 µL da solução com inseticida, na região do pronoto, durante o ensaio de dosagem tópica .....	28
Figura 2	– Abelhas acondicionadas em potes plásticos de 250 mL e divididas por tratamentos dentro da BOD (demanda bioquímica de oxigênio) .....	28
Figura 3	– Abelhas acondicionadas em potes plásticos de 250 mL, divididas por tratamentos dentro da BOD e imagem ampliada do tubo com a dieta contaminada.....	30
Figura 4	– Determinação da TL <sub>50</sub> tópica em horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> .....	31
Figura 5	– Determinação da DL <sub>50</sub> oral em horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> .....	31
Figura 6	– Determinação da DL <sub>50</sub> tópica em 24 horas do inseticida tiametoxam para abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> .....	43
Figura 7	– Determinação da DL <sub>50</sub> tópica em 48 horas do inseticida tiametoxam para abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> .....	43
Figura 8	– Determinação da CL <sub>50</sub> oral em 24 horas do inseticida tiametoxam para abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> .....	44
Figura 9	– Determinação da CL <sub>50</sub> oral em 48 horas do inseticida tiametoxam para abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> .....	44
Figura 10	– Determinação da DL <sub>50</sub> tópica em 24 horas do inseticida metaflumizone para abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> .....	45
Figura 11	– Determinação da DL <sub>50</sub> tópica em 48 horas do inseticida metaflumizone para abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> .....	45
Figura 12	– Determinação da CL <sub>50</sub> oral em 24 horas do inseticida metaflumizone para abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> .....	46
Figura 13	– Determinação da CL <sub>50</sub> oral em 48 horas do inseticida metaflumizone para abelhas operárias de <i>Apis mellifera</i> .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Toxicidade aguda do imidacloprido (TL <sub>50</sub> ) em horas para <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> .....	30
Tabela 2 – Toxicidade aguda do Tiametoxam em 24 e 48 horas para <i>Apis mellifera</i> .....	42
Tabela 3 – Toxicidade aguda do Metaflumizone em 24 e 48 horas para <i>Apis mellifera</i> .....	43

## SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	A importância das abelhas na polinização.....	15
2.2	As abelhas nativas sem ferrão.....	16
2.3	O declínio das abelhas.....	17
2.4	Os impactos gerados pelos pesticidas às abelhas.....	18
3	<b>CAPÍTULO I - TEMPO LETAL (TL<sub>50</sub>) DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO PARA A ABELHA SEM FERRÃO <i>Scaptotrigona aff. depilis</i> (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) .....</b>	<b>22</b>
3.1	Introdução.....	24
3.2	Material e Métodos.....	26
3.3	Resultados.....	30
3.4	Discussão.....	31
3.5	Conclusão.....	35
4	<b>CAPÍTULO II - TOXICIDADE DOS INSETICIDAS TIAMETOXAM E METAFLUMIZONE EM FORMULAÇÕES COMERCIAIS, PARA A ABELHA <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE) .....</b>	<b>36</b>
4.1	Introdução.....	38
4.2	Material e Métodos.....	40
4.3	Resultados.....	42
4.4	Discussão.....	46
4.5	Conclusão.....	50
5	CONCLUSÃO GERAL.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As abelhas se destacam como sendo o grupo de insetos mais importante para a manutenção dos ecossistemas e sua biodiversidade, tendo em vista o seu papel fundamental como polinizadores da flora nativa e cultivada, e também como indicadores biológicos do estado de conservação e qualidade dos habitats. Algumas espécies ofertam (mel, pólen, cera, própolis, entre outros), esses produtos de grande valor biológico e econômico movimentam milhões de dólares em todo mundo. O serviço de polinização realizado pelas abelhas também gera bastante recursos e promove tanto o aumento na produção quanto na qualidade dos produtos agrícolas.

Apesar da inegável importância das abelhas para a produção agrícola, manutenção e equilíbrio do meio ambiente, a interferência humana tem causado impactos significativos sobre esse grupo de agentes polinizadores, inclusive levando a grandes reduções populacionais de algumas espécies de abelhas em vários países. A problemática do declínio dos polinizadores foi alertada inicialmente com a publicação *The Forgotten Pollinators* (BUCHMANN e NABHAN, 1996). No entanto, a situação só ganhou as manchetes mundiais e foi levada à população em geral a partir do surgimento da DCC em 2007 - Desordem do Colapso da Colônias (CCD - Colony Collapse Disorder), que é um fenômeno que atingiu inicialmente as abelhas melíferas (*Apis mellifera*) nos EUA, e posteriormente em outros países. O CCD já promoveu uma perda massiva de colônias dessas abelhas, causando prejuízos enormes aos apicultores e aos cultivos dependentes do aluguel de colmeias para a polinização. Estudos subsequentes têm demonstrado perdas populacionais em várias espécies de abelhas, manejadas e silvestres, devido a uma variedade de fatores e a interação entre eles. Dentre as diversas causas desse declínio, a introdução de espécies exóticas, a redução de habitats, a incidência de pragas e doenças, o aquecimento global e o uso inadequado de agrotóxicos, especialmente os neonicotinóides, são apontados como os principais fatores responsáveis por esse fenômeno.

Os neonicotinóides são um grupo específico de pesticidas que tiveram origem em meados dos anos 90 e hoje em dia são representados por sete exemplares nessa categoria. Desde o seu lançamento, eles correspondem a uma fatia de mercado considerável na comercialização de pesticidas em todo o mundo e isso se deve a sua eficiência, facilidade na aplicação e versatilidade. Estudos têm alertado sobre o quão tóxico os neonicotinóides são para as abelhas, principalmente os ingredientes ativos imidacloprido e tiametoxam. No entanto, na grande maioria das vezes, esses estudos têm sido conduzidos com os ingredientes ativos dos produtos em testes com abelhas *A. mellifera*. Porém, evidências sugerem que os produtos em formulação

comercial podem ser mais tóxicos para as abelhas do que os ingredientes ativos isolados, porque os materiais inertes adicionados nas formulações comerciais poderiam apresentar um efeito sinérgico com o ingrediente ativo potencializando a sua toxicidade para os insetos. Além disso, os estudos de toxicidade de ingredientes ativos têm a *Apis mellifera* como espécie modelo para os testes. Essa abelha é exótica no Brasil, e há indícios de que espécies nativas, especialmente os meliponíneos, sejam mais susceptíveis aos pesticidas de uma forma geral quando comparados às abelhas melíferas.

Devido os defensivos agrícolas serem apontados como responsáveis por mortandade de abelhas manejadas e silvestres e já que os estudos realizados até então contemplam apenas os ingredientes ativos, com pouca investigação da ação das formulações comerciais, mesmo havendo indícios de que os materiais inertes potencializem o efeito tóxico dos pesticidas, o presente estudo objetivou investigar a toxicidade para abelhas de três produtos comerciais amplamente usados no Brasil como defensivos agrícolas Verismo<sup>®</sup> (metaflumizone) e Actara<sup>®</sup> (tiametoxam) em *Apis mellifera*, e Evidence<sup>®</sup> (imidacloprido) em *Scaptotrigona aff. depilis*, no intuito de fornecer valores de letalidade desses produtos e mais dados sobre essa questão para essas duas espécies de abelhas distintas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A importância das abelhas na polinização

As abelhas são os polinizadores mais importantes e agentes bióticos fundamentais para o serviço de polinização de diversas culturas agrícolas (CASTRO et al., 2006; IPBES, 2016; POTTS et al., 2016). Elas se destacam dentre os animais envolvidos nos processos de polinização, pois possuem grande diversidade morfológica entre as espécies e comportamento especializado, principalmente nas regiões tropicais (RICHARDS e KOPTUR, 1993; MOORE, 2001; CARDINAL e DANFORTH, 2013). Segundo a FAO (2004) e Ricketts et al. (2008), 73% das espécies de plantas cultivadas no mundo são polinizadas por alguma espécie de abelha. Elas também são organismos fundamentais para a ecologia, manutenção e conservação dos ecossistemas terrestres e seu valor econômico é enorme, pois o serviço de polinização tem grande importância para a produção de alimentos (KLEIN et al., 2007; GALLAI et al., 2009).

A polinização realizada de forma eficiente pelas abelhas aumenta a qualidade dos frutos, a quantidade, o valor do produto e ainda eleva o tempo de prateleira, reduzindo as perdas em pelo menos 11% das frutas de forma a impactar consequentemente na economia de milhões de dólares (KLATT et al., 2014). Essa eficiência na polinização está diretamente relacionada ao número de visitas e ao comportamento que as abelhas exercem nas flores, influenciando assim na frutificação e no cultivo de frutos com melhor qualidade (MALERBO-SOUSA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2011; MALERBO-SOUSA e HALAK, 2013; TOLEDO et al., 2013).

Segundo Ascher e Pickering (2018), das cerca de 20.000 espécies de abelhas descritas no mundo, 1.902 encontram-se no Brasil. Essa grande quantidade de grupos de abelhas e sua diversidade exercem um papel fundamental e pragmático nos serviços de polinização dos ecossistemas nativos e cultivados (GARIBALDI et al., 2014). Um dos produtos mais explorados das abelhas no Brasil é o mel, com uma produção média de 41.594 toneladas e o comércio dessa iguaria movimentou milhões de reais (IBGE, 2017). O Brasil exportou em 2015, aproximadamente 18.6 t de mel, colocando o país entre os principais exportadores desse produto, tendo como principais importadores, os Estados Unidos e Alemanha (ABEMEL, 2015).

Considerando a produção agrícola brasileira no ano de 2012, foi atribuído o valor econômico da polinização para 44 culturas, que apresentam ganhos diversos com a polinização animal, em algo em torno de 30% da produção total que corresponde a 45 bilhões de dólares

(GIANNINI et al., 2015a). As abelhas não são os únicos artrópodes que são altamente especializados e fundamentais na realização da polinização, pois essa atividade executada por insetos silvestres e manejados é um ofício que possui papel trivial para a efetivação de um dos mais valiosos serviços ecossistêmicos do planeta (IPBES, 2016). Segundo Ollerton et al. (2011) os polinizadores de plantas silvestres são um mecanismo de suporte à vida determinante para os ecossistemas e a biodiversidade. Este serviço de polinização desempenhado por estes agentes é uma ferramenta essencial do ecossistema, que está unido ao bem-estar humano através da manutenção saudável e funcional do meio ambiente, produção agrícola, reprodução de plantas e segurança alimentar (POTTS et al., 2016).

Em 2005, a polinização realizada por insetos de 100 culturas utilizadas diretamente para a alimentação humana, resultou num valor de aproximadamente 153 bilhões de euros e isso corresponde a quase 10% do valor total da produção agrícola mundial (GALLAI et al., 2009). Das 124 principais culturas utilizadas na alimentação humana, aproximadamente 70% dependem da polinização por insetos para produzirem frutos e sementes (RICKETTS et al., 2008; CHAGNON et al., 2015; RAMIREZ et al., 2018).

## 2.2 As abelhas nativas sem ferrão

Os meliponíneos habitam as regiões tropicais da Terra há mais de 65 milhões de anos (CAMARGO e PEDRO, 1992; MICHENER, 2007). As abelhas nativas sem ferrão são fundamentais para a manutenção da flora brasileira e de diversas culturas agrícolas (MACIEIRA e PRONI, 2004; KERR et al., 2010). Os meliponíneos (Hymenoptera: Apidae: Tribo Meliponini) são elencados como polinizadores-chave para diversas espécies de plantas em ecossistemas tropicais e subtropicais, fornecendo também serviços de polinização para culturas agrícolas de importância econômica (HEARD, 1999; SLAA et al., 2006).

A diversidade de abelhas sem ferrão no Brasil pode ultrapassar 500 espécies (CASTRO et al., 2006) e segundo Kerr et al. (1999) a maior variedade de abelhas sem ferrão do mundo encontra-se no Brasil. A grande diversidade de meliponíneos no Brasil possui elevada diversidade morfológica, tamanho corporal, fisiologia e preferências florais (SLAA et al., 2006; PEDRO, 2014). A constante especialização dessas abelhas na exploração da flora nativa tem papel crucial na manutenção da vegetação brasileira.

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). Este grupo de abelhas divide-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 às “abelhas indígenas sem ferrão” e são encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo. 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 e PEDRO, 1992; NOGUEIRA-NETO, 1997).

As abelhas sem ferrão possuem importância cultural (EARDLEY e KWAPONG, 2013) e são cada vez mais utilizadas na polinização de culturas, produção de mel e criação recreativa (HEARD, 1999; HEARD e DOLLIN, 2000; CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006). 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). 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 e CAMPOS, 2009).

### **2.3 O declínio das abelhas**

Em vários lugares do mundo a redução das populações de abelhas é uma realidade e teme-se que esse contingente diminua ainda mais, causando impactos ambientais e econômicos imensuráveis por conta das perdas na biodiversidade e na produção agrícola. Uma grande quantidade de relatórios foram divulgados a cerca do sumiço das abelhas, o que deu origem a uma preocupação global (GOULSON et al., 2008; BROWN e PAXTON, 2009). A polinização depende em alto nível das abelhas para a realização desse processo, e isso é 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 agrícolas comercialmente importantes (PINHEIRO e 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 quatorze anos, cientistas norte americanos identificaram um fenômeno que ficou conhecido como “Desordem e Colapso das Colônias” (CCD), onde apicultores daquele país

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. Pesquisas demonstram que o CCD não tem origem em um único fator isolado e sim no somatório de diferentes variáveis, que agem sinergicamente sobre os indivíduos da colônia (CORNMAN et al., 2012). Alguns estudos atribuem a questão do declínio das abelhas a diversos fatores como doenças, parasitas, mudanças climáticas, perdas de hábitat, plantas geneticamente modificadas (OGM) e o uso indiscriminado de agroquímicos (FREITAS et al., 2009; VANENGELSDORP et al., 2009; POTTS et al., 2016).

A redução populacional de abelhas é encarada com preocupação generalizada, principalmente por conta dos serviços de polinização e sua importância para a agricultura (AIZEN e HARDER, 2009; GARIBALDI et al., 2011). Devido o grande valor do serviço de polinização, alguns esforços estão sendo destinados à proteção dos polinizadores, e a descoberta das causas que os ameaçam. Neste contexto, 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 e DOBSON, 2007; LAMBERTH et al., 2013).

No intuito de solucionar os problemas e esclarecer as causas do CCD, pesquisas estão sendo conduzidas por equipes multidisciplinares, de forma simultânea e coordenada (PETTIS e DELAPLANE, 2010). Por isso mais estudos precisam ser feitos para que se obtenham dados robustos no intuito de enxugar todas as hipóteses.

## **2.4 Os impactos gerados pelos pesticidas às abelhas**

A contaminação das abelhas pode ocorrer por contato, ingestão de recursos florais e durante o forrageamento em culturas que estão sendo pulverizadas com agrotóxicos. Habitualmente 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 e STORT, 1985).

No Brasil a utilização de pesticidas data do início do século XX e os produtos mais utilizados naquela época eram o mercúrio, arsênico e enxofre (MORAGAS e SCHNEIDER, 2003). Como de lá para cá o Brasil tem se tornado uma potência do agronegócio, aumentando suas exportações e expandindo as suas fronteiras agrícolas, automaticamente o uso de insumos, dentre eles os pesticidas, tem crescido exponencialmente. Em 2011, no Brasil, foram plantados 71 milhões de hectares e consumido cerca de 826.683 t de agrotóxicos com uma utilização de aproximadamente 3,2 Kg/ha de ingrediente ativo, sendo 12% inseticidas (ABRASCO, 2015). Cerca de 30% dos produtos fitossanitários consumidos no Brasil são inseticidas e, desses, aproximadamente 40% são considerados tóxicos para as abelhas (GUAZELLI, 2009; FREITAS e PINHEIRO, 2010). Apicultores brasileiros dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina denunciaram uma enorme mortalidade de colônias de abelhas africanizadas, principalmente de operárias nas proximidades das colmeias e atribuem essas mortes a utilização de agrotóxicos (LIMA e ROCHA, 2012; PIRES et al., 2016).

Segundo Del Sarto et al. (2014) a taxa de mortalidade de determinados pesticidas 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 abelhas 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 (PINHEIRO e FREITAS, 2010; FREITAS e PINHEIRO, 2012). Pinheiro e Freitas (2010) apresentaram uma revisão de literatura das doses letais (DL<sub>50</sub>) e os efeitos dos agroquímicos com uso permitido no Brasil sobre polinizadores, os impactos distintos das formulações e utilização no país. Neste estudo, 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<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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 o Tiametoxam e o Imidacloprido, 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). Os neonicotinóides atuam como agonistas da acetilcolina e ligam-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) situados nos neurônios pós-sinápticos dos insetos, atuando mais especificamente nas subunidades  $\alpha$  do receptor (BUCKINGHAM et al., 1997; SUCHAIL et al., 2004). 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, 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 ( $DL_{50}$ ) e na Concentração Letal média ( $CL_{50}$ ), 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. O Tempo Letal médio ( $TL_{50}$ ) para as abelhas, é obtido a partir dos resultados de  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  previamente encontrados, adotando os mesmos protocolos.

Seguindo essas recomendações, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de atestar a toxicidade ou não de defensivos agrícolas amplamente utilizados nas áreas cultivadas e estabelecer suas respectivas  $DL_{50}$ ,  $CL_{50}$  e  $TL_{50}$  para as abelhas, como é o caso dos estudos realizados por: DECOURTYE et al., 2003; IWASA et al., 2004; LAURINO et al., 2011;

JACOB et al., 2012; TOMÉ et al., 2012; ROSSI et al., 2013; DEL SARTO et al., 2014, SOARES et al., 2015, TOMÉ et al., 2015a e LUNARDI et al., 2017.

Doses inferiores às 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 tem 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). É provável também que as doses subletais contidas no néctar ou pólen, coletados por abelhas campeiras e levados para a colônia seja algo preocupante, tendo em vista que esses recursos poderão ser utilizados na alimentação das crias, impactando diretamente na densidade populacional.

Diante da problemática mundial que envolve a redução populacional das abelhas, tendo em vista a sua importância econômica, cultural e para a manutenção da biodiversidade dos mais variados ecossistemas, se faz necessário à intensificação dos estudos avaliando a toxicidade de agrotóxicos principalmente nas formulações comerciais já que alguns trabalhos apontam que os adjuvantes incrementam a toxicidade dos produtos, para as abelhas em geral, com atenção especial aos meliponíneos, que são mais susceptíveis aos pesticidas em comparação com as *Apis melliferas*.

### 3 CAPÍTULO I - TEMPO LETAL MÉDIO (TL<sub>50</sub>) DO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO PARA A ABELHA SEM FERRÃO *Scaptotrigona aff. depilis* (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

#### RESUMO

Os meliponíneos são fundamentais à manutenção da biodiversidade por meio da polinização das plantas nativas e cultivadas. No entanto, uma série de fatores naturais e/ou causados pelo homem vem acarretando o declínio da população desses insetos. Dentre esses, o uso inadequado de produtos fitossanitários são apontados como uma das causas dessa redução. O objetivo desse trabalho foi avaliar o tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) do inseticida Evidence<sup>®</sup> (Imidacloprido) para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* sob duas vias de exposição. Foram utilizados os valores de DL<sub>50</sub> = 16,6524 ng p.c./μL (24 horas); DL<sub>50/10</sub> = 1,6652 ng p.c./μL e DL<sub>50/100</sub> = 0,1665 ng p.c./μL; CL<sub>50</sub> = 8,47 ng p.c./μL (24 horas); CL<sub>50/10</sub> = 0,8472 ng p.c./μL e CL<sub>50/100</sub> = 0,0847 ng p.c./μL, disponíveis na literatura para esse ingrediente ativo e espécie de abelha, baseando-se portanto nos protocolos oficiais da OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, 1998a e 1998b. As abelhas foram observadas por 300h com intervalos de 1, 6, 12 e 24h no primeiro dia e a partir do segundo a cada 24h, após a exposição dos insetos às diferentes dosagens dos inseticidas. Fundamentado na exposição que ocorre no campo, o inseticida foi administrado tanto topicamente como por meio oral. Os resultados mostraram que a TL<sub>50</sub> da formulação comercial Evidence<sup>®</sup> por contaminação tópica para *Scaptotrigona aff. depilis* é de 22,1 horas, enquanto esse valor sobe para 29,4 horas quando a contaminação acontece por ingestão. Dessa forma, o imidacloprido na formulação comercial Evidence<sup>®</sup> demonstrou ser altamente tóxico para as abelhas *Scaptotrigona aff. depilis*, baseado na literatura, independentemente da via de exposição, sendo que o efeito letal do produto se manifesta mais rapidamente quando a contaminação ocorre por meio tópico do que quando por via oral.

**Palavras-chave:** CL<sub>50</sub>. DL<sub>50</sub>. Mortalidade. Meliponíneo. OECD. Pesticidas. TL<sub>50</sub>.

## ABSTRACT

Meliponines are fundamental to the maintenance of biodiversity through the pollination of native and cultivated plants. However, a series of natural and/or man-made factors has led to the decline in the population of these insects. Among these, the inadequate use of phytosanitary products is pointed out as one of the causes of this reduction. The objective of this work was to evaluate the mean lethal time ( $LT_{50}$ ) of the insecticide Evidence<sup>®</sup> (Imidacloprid) for the stingless bee *Scaptorigona* aff. *depilis* under two routes of exposure.  $LD_{50}$  values = 16.6524 ng c.p./ $\mu$ L (24 hours) were used;  $LD_{50/10}$  = 1,6652 ng c.p./ $\mu$ L and  $LD_{50/100}$  = 0.1665 ng c.p./ $\mu$ L;  $LC_{50}$  = 8.47 ng c.p./ $\mu$ L (24 hours);  $LC_{50/10}$  = 0.8472 ng c.p./ $\mu$ L and  $LC_{50/100}$  = 0.0847 ng c.p./ $\mu$ L, available in the literature for this active ingredient and species of bee, based therefore on the official protocols of the OECD - Organization for Cooperation and Economic Development, 1998a and 1998b. Bees were observed for 300h at intervals of 1, 6, 12 and 24h on the first day and from the second every 24h, after exposure of insects to different dosages of insecticides. Based on the exposure that occurs in the field, the insecticide was administered both topically and orally. The results showed that the  $LT_{50}$  of the commercial formulation Evidence<sup>®</sup> by topical contamination for *Scaptotrigona* aff. *depilis* is 22.1 hours, while this value rises to 29.4 hours when contamination occurs if swallowed. Thus, the imidacloprid in the commercial formulation Evidence<sup>®</sup> proved to be highly toxic to bees *Scaptorigona* aff. *depilis*, based on the literature, regardless of the route of exposure, and the lethal effect of the product manifests itself more quickly when contamination occurs topically than when orally.

**Keywords:**  $LC_{50}$ .  $LD_{50}$ . Mortality. Meliponine. OECD. Pesticides.  $LT_{50}$ .

### 3.1 Introdução

Os polinizadores são fundamentais para o fornecimento de nutrientes essenciais à alimentação humana por meio do serviço de polinização (EILERS et al., 2011). A polinização por animais silvestres é um serviço importante do ecossistema, atrelado diretamente ao bem-estar humano pois mantém saudável e funcional o ambiente, contemplando a reprodução de plantas silvestres, a produção agrícola e a segurança alimentar (POTTS et al., 2016). A polinização envolve um sistema associado de interações entre a vegetação, a fauna e o bem-estar humano (KEVAN e MENZEL, 2012). A proporção de espécies vegetais polinizadas por animais é de aproximadamente 78% nas regiões temperadas, no entanto 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). Além disso, a polinização tem elevado valor econômico. Segundo Gallai et al. (2009), o valor mundial da polinização por insetos é estimado em 212 bilhões de dólares.

As abelhas são os mais importantes dentre a grande diversidade de insetos polinizadores por apresentarem alta diversidade morfológica entre as espécies e comportamento especializado principalmente em regiões tropicais (RICHARDS e KOPTUR, 1993; BUCHMANN e NABHAN, 1997; MOORE, 2001; CARDINAL e DANFORTH, 2013). Os serviços de polinização são muito mais valiosos que qualquer outro produto produzido pelas abelhas (ORTH, 2000), representando aproximadamente 9,5% do valor total da produção agrônômica mundial. O valor econômico da polinização por abelhas foi estimado em torno de 11,6 bilhões de euros por ano só na América do Sul (POTTS et al., 2010). Nessa região, um importante grupo de abelhas polinizadoras são os meliponíneos nativos.

As abelhas nativas ou meliponíneos distribuem-se em grande parte das regiões tropicais da Terra, abrangendo praticamente toda a América Latina e África subsahariana, 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). No entanto, as intervenções humanas como desmatamento, fragmentação de habitats e o estresse ocasionado pelos parasitas, falta de flores e o uso indiscriminado de produtos fitossanitários tem causado declínio na população desses polinizadores (BIESMEIJER et al., 2006; GOULSON et al., 2015). Em 2011 no Brasil foram plantados 71 milhões de hectares e consumidas cerca de 826.683 t de agrotóxicos com uma utilização de aproximadamente 3,2 Kg/ha de ingredientes ativos, sendo 12% inseticidas (ABRASCO, 2015). Cerca de 30% dos produtos fitossanitários consumidos no

Brasil são inseticidas e, desses, aproximadamente 40% são considerados tóxicos para as abelhas (GUAZELLI, 2009; FREITAS e PINHEIRO, 2010).

A susceptibilidade de insetos à inseticidas em laboratório é avaliada por meio de ensaios de dose ou concentração letal média (DL<sub>50</sub> ou CL<sub>50</sub>). DL<sub>50</sub> é quando se administra um volume conhecido de inseticida, o qual entra em contato uma única vez com o inseto e CL<sub>50</sub> é quando os insetos são expostos ao conteúdo tóxico em uma determinada concentração por um período de tempo pré-determinado (CAMPOS e ANDRADE, 2001). A partir dos resultados de DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> são realizados os ensaios de Tempo Letal médio (TL<sub>50</sub>) tópica e oral. Esses testes seguem protocolos e diretrizes para testes de produtos químicos da OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 1998a, 1998b) e são administrados tópica ou oralmente, sendo o tórax e o trato digestório os meios pelos quais o inseticida entra em contato com o organismo.

Os inseticidas do grupo químico dos neonicotinóides atuam como agonistas da acetilcolina e agem nos receptores nicotínicos de acetilcolina no organismo dos insetos, causando comprometimento das funções vitais e morte. Os sete produtos lançados entre 1991 e 2002 representam os esforços e o intensivo desenvolvimento de pesquisas das indústrias de produtos fitossanitários para essa classe de inseticidas. Os perfis técnicos e as diferentes possibilidades de uso dos inseticidas neonicotinóides são exemplificados pelo imidacloprido, que é a molécula pioneira e de maior sucesso desse grupo químico (ELBERT et al., 2008).

No Brasil, o imidacloprido é autorizado para ser comercializado em várias formulações no combate a pragas de importantes culturas cultivadas, porém a autorização para o uso desse produto está sendo revisada e a aplicação aérea do mesmo em culturas com flores está proibida (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013, 2016; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016).

*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) é a espécie de abelha mais utilizada em pesquisas, especialmente naquelas que analisam a resistência desses insetos à inseticidas, devido a sua grande importância como polinizador (JACOB et al., 2014). Assim existem valores de toxicidade de neonicotinóides para *A. mellifera* sendo: DL<sub>50</sub> oral (48h) de imidacloprido = 30 ng/abelha (DECOURTYE et al., 2003); DL<sub>50</sub> tópico (24h) de imidacloprido = 17,90 ng/abelha (IWASA et al., 2004); DL<sub>50</sub> oral (24 e 48h) de tiametoxam = 4,67 e 4.41 ng/abelha e CL<sub>50</sub> (24 e 48h) = 0,134 e 0,126 ng/μL e DL<sub>50</sub> oral (24 e 48h) de clotianidina = 2,84 e 2.69 ng/abelha e CL<sub>50</sub> (24 e 48h) = 0,081 e 0,077 ng/μL (LAURINO et al., 2011); DL<sub>50</sub> tópico (24h) de imidacloprido = 0,0626 μg/abelha e oral (24h) = 0,0809 μg/abelha (LUNARDI et al., 2017).

No que diz respeito às abelhas nativas, poucos trabalhos são encontrados na literatura, sobre a toxicidade de inseticidas neonicotinóides para esses insetos. Segundo Soares et al. (2015) a DL<sub>50</sub> tópica de imidacloprido para as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* é 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 a CL<sub>50</sub> foi de 42,50 ng i.a./μL dieta em 24 horas e de 14,28 ng i.a./μL dieta em 48 horas. A DL<sub>50</sub> tópica de imidacloprido para as abelhas *Melipona scutellaris* (24 e 48h) foi de 2,41 e 1,29 ng/abelha e oral (24 e 48h) de 2,01 e 0,81 ng/μL/dieta (COSTA et al., 2015). Tomé et al. (2012) encontraram TL<sub>50</sub> do imidacloprido inferior a 120 horas para *Melipona quadrifasciata anthidioides* e segundo Tomé et al. (2015a) as TL's<sub>50</sub> do imidacloprido para *Partamona helleri* e *Scaptotrigona xanthotrica* são inferiores a 15 minutos para as duas espécies.

Infelizmente a quantidade de pesquisas avaliando a toxicidade do imidacloprido para abelhas sem ferrão, estabelecendo valores de DL<sub>50</sub> tópica, CL<sub>50</sub> oral e TL<sub>50</sub> tópica e oral é inexpressível e pouquíssimos trabalhos no Brasil desenvolveram testes que abordam a toxicidade da formulação comercial deste composto para meliponíneos.

Devido a grande importância das abelhas nativas na polinização de plantas em biomas específicos e do pouco conhecimento sobre a interferência dos neonicotinóides em formulações comerciais sobre essas abelhas, este trabalho teve como objetivo determinar o Tempo Letal médio (TL<sub>50</sub>) do inseticida imidacloprido na formulação Evidence<sup>®</sup> por contato e ingestão, sobre a abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis*.

### 3.2 Material e Métodos

#### Material biológico

No mês de fevereiro do ano de 2016, cento e vinte abelhas campeiras de *Scaptotrigona aff. depilis* de três colônias diferentes mantidas no meliponário do Setor de Abelhas do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Cep. 60356-000, Fortaleza – CE, Brasil, localizado entre as coordenadas geográficas 3.74° S e 38.58° W, clima tropical semiúmido, foram coletadas usando um sugador bucal e conduzidas ao Laboratório de Abelhas para serem realizados os ensaios.

## Determinação da TL<sub>50</sub> média tópica

Para determinação do Tempo Letal médio (TL<sub>50</sub>) que expressa o grau de toxicidade aguda de substâncias químicas, correspondendo à dose suficiente para matar 50% dos animais de um lote utilizados em um 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 que foi realizada por resfriamento.

O produto comercial (Evidence<sup>®</sup> 700 WG - Bayer CropScience) com o ingrediente ativo imidacloprido foi diluído em água destilada, até se obter as doses a serem testadas (0,1665 ng p.c/μL; 1,6652 ng p.c/μL; 16,6524 ng p.c/μL).

As abelhas foram anestesiadas por resfriamento em freezer à -2°C por 80 segundos e, após anestesiadas, cada abelha recebeu 1μL da respectiva solução inseticida (figura 1) na região do pronoto usando uma micropipeta monocanal de volume variável. As abelhas do grupo controle receberam 1μL de água destilada na mesma região sem qualquer contaminação.

Após serem expostas ao produto, as abelhas foram colocadas em uma bandeja plástica por 10 minutos para que ocorresse a evaporação da solução inseticida. Posteriormente, em grupos de 10, foram acondicionadas em potes plásticos de 250 mL perfurados na região da tampa para haver circulação de ar e mantidas em câmaras climatizadas tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) reguladas à 28 ± 2°C, umidade relativa de 70 ± 10% com suprimento de água e alimento (xarope de água destilada + açúcar refinado cristal, na proporção 1/1) sem contaminação servidos por meio de tubos do tipo *ependorf* durante todo o experimento (figura 2).

Cada tratamento (dose) foi composto por três repetições de 10 abelhas por pote plástico totalizando 30 abelhas. Foram realizadas observações à cada 1, 6, 12 e 24h no primeiro dia e a partir do segundo a cada 24h, durante 300 horas após o contato com o inseticida, anotando-se o quantitativo de abelhas vivas e mortas. As abelhas foram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo feito por um pincel de pelos finos.

Os dados foram submetidos à análise estatística do tipo dose-resposta, utilizando-se o programa Bioestat<sup>®</sup> - versão 5.3.

Figura 1 - Aplicação de 1  $\mu$ L da solução inseticida, na região do pronoto de abelhas *Scaptotrigona* aff. *depilis*.

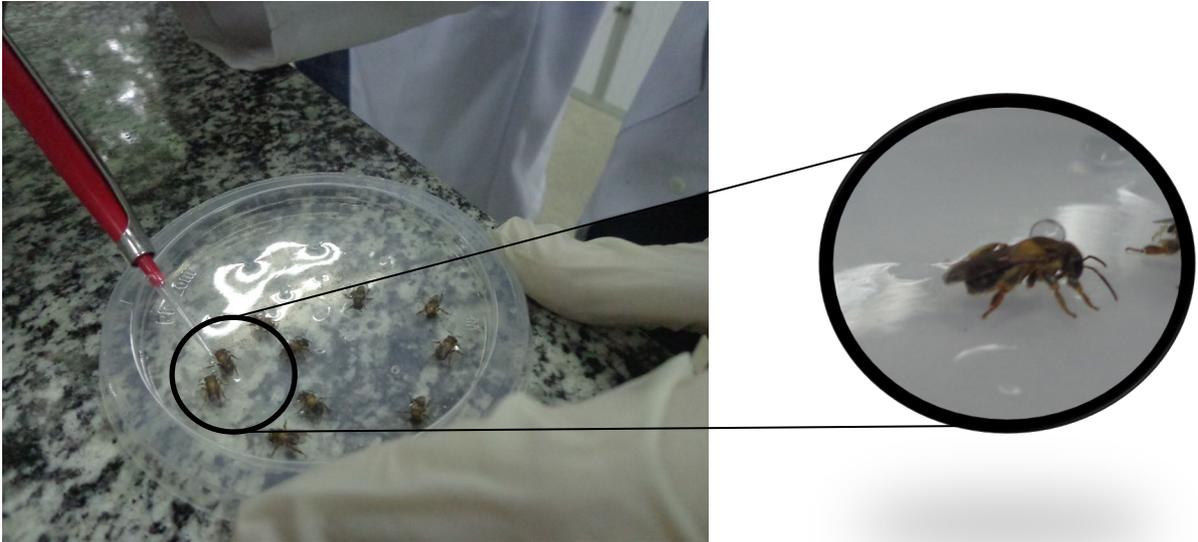


Figura 2 – Abelhas acondicionadas em potes plásticos de 250 mL e divididas por tratamentos dentro da BOD após a aplicação de 1  $\mu$ L da solução inseticida.



## Determinação da (TL<sub>50</sub>) média por ingestão

Para a determinação do tempo letal médio via oral (TL<sub>50</sub>) foi utilizado o método internacional preconizado pela OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, (1998b), desenvolvido para *Apis mellifera*.

O produto comercial (Evidence<sup>®</sup> 700 WG - Bayer CropScience) com o ingrediente ativo do imidacloprido foi diluído até se obter as doses a serem testadas (0,0847 ng p.c/μL; 0,8472 ng p.c/μL; 8,4721 ng p.c/μL) incluídas diretamente no alimento [mistura 1:1 de açúcar comercial refinado e água destilada (xarope)] oferecido as abelhas.

Grupos de 10 abelhas foram acondicionadas em potes plásticos de 250 mL com suprimento de água por meio de tubos do tipo *ependorf* e mantidas em câmaras climatizadas tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) reguladas à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 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 experimento, exceto as do grupo controle que receberam xarope sem nenhum tipo de contaminação (figura 3).

Cada tratamento (dose) foi composto por três repetições de 10 abelhas por pote plástico totalizando 30 abelhas. Foram realizadas observações à cada 1, 6, 12 e 24h no primeiro dia e a partir do segundo a cada 24h, durante 300 horas após o contato com o inseticida, anotando-se o quantitativo de abelhas vivas e mortas. As abelhas foram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo feito por um pincel de pelos finos.

Os dados foram submetidos à análise estatística do tipo dose-resposta, utilizando-se o programa Bioestat<sup>®</sup> - versão 5.3.

Figura 3 – Abelhas acondicionadas em potes plásticos de 250 mL e divididas por tratamentos dentro da BOD, com suas respectivas dietas contaminadas por solução inseticida.



### 3.3 Resultados

A  $TL_{50}$  tópica do imidacloprido na formulação comercial Evidence<sup>®</sup> 700WG para *Scaptotrigona aff. depilis* foi de 22,1 horas (Tabela 1 e Figura 4) e o  $TL_{50}$  oral foi de 29,4 horas (Tabela 1 e Figura 5).

Os resultados mostraram que esse produto fitossanitário é altamente tóxico para esta espécie de abelha de acordo com a classificação de Johansen e Mayer (1990), que consideram inseticidas com uma  $DL_{50} < 2,0 \mu\text{g}/\text{abelha}$  como altamente tóxicos para esses insetos. O tempo de mortalidade foi levemente diferenciado de acordo com a via de exposição, pois devido a dosagem tópica ser bem mais elevada em comparação a dieta contaminada, 50% das abelhas utilizadas nos ensaios, morreram mais rapidamente.

Tabela 1 – Toxicidade aguda do imidacloprido ( $TL_{50}$ ) em horas para *Scaptotrigona aff. depilis*.

Modo de exposição	$TL_{50}$	$IC_{95\%}$	$\chi^2$	$P$
Tópica Horas/abelha	22,1	12,31 – 32,01	5,02	0,833
Ingestão Horas/ $\mu\text{L}$ dieta	29,4	24,80 - 33,99	2,34	0,967

( $TL_{50}$ ) tempo letal médio; ( $IC_{95\%}$ ) intervalo de confiança 95%; ( $\chi^2$ ) qui-quadrado e ( $P$ ) probabilidade de valores.

Figura 4 – Determinação da TL<sub>50</sub> tópica em horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona aff. depilis*.

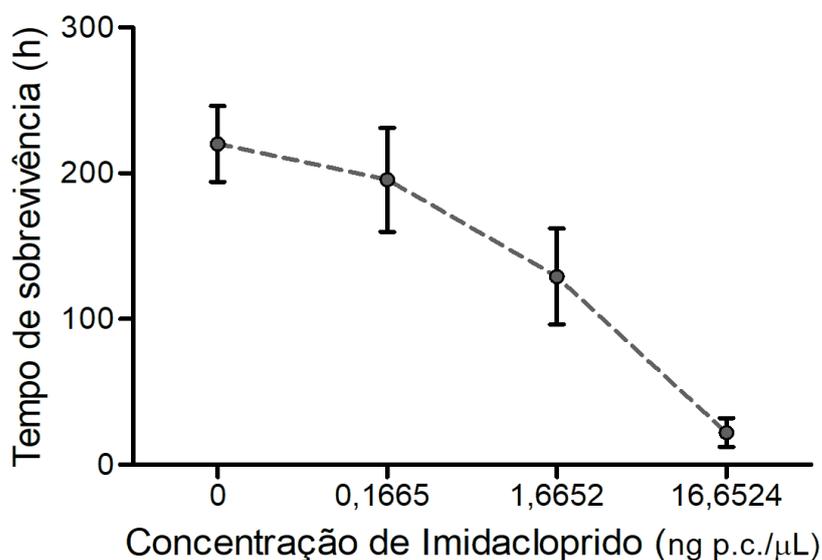
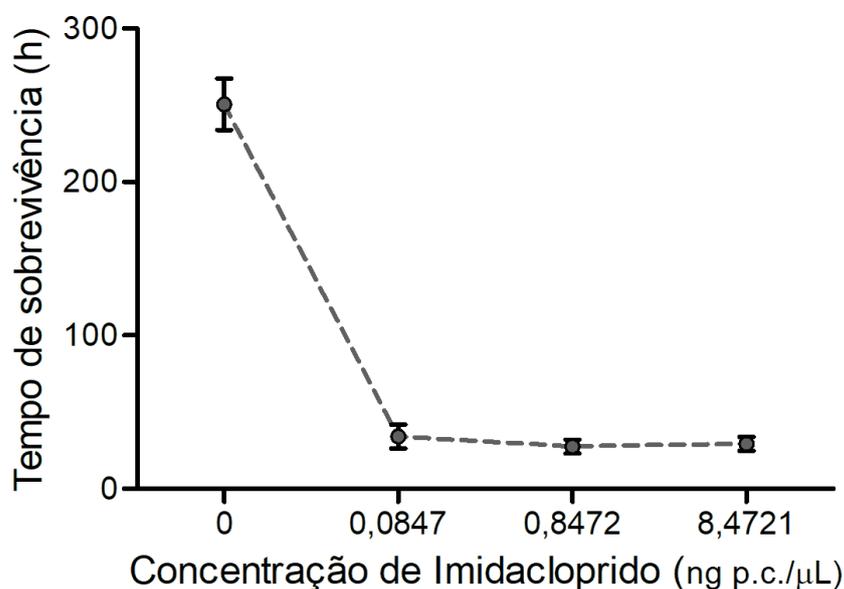


Figura 5 – Determinação da DL<sub>50</sub> oral em horas do inseticida imidacloprido para abelhas operárias de *Scaptotrigona aff. depilis*.



### 3.4 Discussão

Este trabalho avaliou o tempo letal (TL<sub>50</sub>) do produto comercial imidacloprido (Evidence<sup>®</sup> 700 WG da Bayer CropScience, Brasil) para a abelha *Scaptotrigona aff. depilis* e constatou que se trata de um produto altamente tóxico para esta espécie. Tomé et al. (2012) avaliando os efeitos do imidacloprido aos corpos de cogumelos e ao comportamento das abelhas

nativas sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides*, encontrou  $TL_{50}$  inferior à 120 h para larvas dessa espécie, alimentadas com 56,00  $\mu\text{g}$  i.a./abelha. As taxas de sobrevivência superiores a 50% foram observadas apenas nas larvas que receberam as dosagens mais baixas 0,0056  $\mu\text{g}$  i.a./abelha, mostrando que a sobrevivência das larvas de abelhas sem ferrão expostas ao imidacloprido foi significativamente prejudicada.

Segundo Tomé et al. (2015a), comparando os impactos dos inseticidas de baixo risco azadiractina, clorantropirrole e espinosade com o imidacloprido, para duas espécies de abelhas sem ferrão (*Partamona helleri* e *Scaptotrigona xanthotrica*), constatou que os dois primeiros ocasionaram baixa toxicidade e mortalidade insignificante para as espécies de abelhas citadas. Já o espinosade exibiu altas toxicidades por via oral e de contato em operárias adultas de ambas as espécies, com tempos médios de sobrevivência ( $TL's_{50}$ ) variando de 1 a 4 horas, e o produto mais tóxico dentre os testados foi o imidacloprido com  $TL's_{50}$  inferiores a 15 minutos. Os trabalhos citados demonstram que, assim como foi apresentado no presente estudo, o imidacloprido é tóxico e possui baixos valores de  $TL_{50}$  para os meliponíneos, apontando que deve se fazer o uso desse produto com bastante moderação em lugares próximo a meliponários, sobretudo nas primeiras horas do dia nas culturas em estágio de floração, para evitar o contato direto das abelhas com o pesticida.

Comparando-se as duas formas de exposição (tópica e oral), ambas demonstraram que a *Scaptotrigona* aff. *depilis* é extremamente susceptível ao imidacloprido, tendo em vista a rapidez e a pequena diferença em horas para a obtenção dos respectivos  $TL's_{50}$ . A exposição via tópica foi mais eficiente na eliminação de 50% da população testada. Isso provavelmente ocorreu em virtude das doses utilizadas nesse teste (tópico) serem superiores ao dobro daquelas dos ensaios de exposição oral, mesmo tendo sido fornecido constantemente às abelhas durante todo o experimento a dieta contaminada, enquanto que as do ensaio com dosagem tópica, foram expostas ao inseticida uma única vez. Segundo Tomé et al. (2012) existe uma correlação negativa entre a dose do inseticida e o tempo médio de sobrevivência das abelhas.

A necessidade de dosagens mais elevadas do imidacloprido para o estabelecimento da  $TL_{50}$  tópica para *Scaptotrigona* aff. *depilis*, 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 em 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 produtos fitossanitários 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./ $\mu$ L abelha e  $CL_{50} = 0,24$  ng i.a./ $\mu$ 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.

As diferenças de toxicidade para as abelhas podem 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 e SCOTT, 2010; BRITAIN e 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  $DL_{50}$  apontam uma maior resistência da primeira em relação aos inseticidas, como demonstrados nos estudos toxicológicos de (MAYER et al., 1998), (MAYER e LUNDEN, 1999), (VALDOVINOS-NÚÑEZ et al., 2009), (HARDSTONE e SCOTT, 2010), (JACOB et al., 2012), (LOURENÇO et al., 2012) e (DEL SARTO, et al., 2014).

Durante os experimentos de  $TL_{50}$ , 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 às letais, o que demonstra a importância de estudos futuros sobre a influência e efeitos deletérios de doses subletais nessa espécie de abelha. Segundo Tomizawa e Casida (2005) isso é comum em insetos expostos a inseticidas neonicotinóides, pois estes atuam como agonistas dos receptores pós-sinápticos nicotínicos da acetilcolina (nAChR) causando hiperexcitação, culminando com a morte do indivíduo.

É importante levar em consideração a susceptibilidade de abelhas nativas expostas a doses não letais de pesticidas, pois estas podem ter a memória e o aprendizado alterados,

dificuldades na busca por alimentos, desenvolvimento e sobrevivência de crias e a perda das habilidades no desempenho de atividades vitais à colônia (GOULSON et al., 2015; PISA et al., 2015). 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 de agir como polinizadores (DECOURTYE et al., 2005; BELZUNCES, TCHAMITCHIAN e BRUNET, 2012).

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 de pesticidas 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 risco por estarem expostas ao uso indiscriminado de inseticidas neonicotinóides e outros que já se encontram suspensos em outros países.

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.

### 3.5 Conclusão

O produto comercial Evidence<sup>®</sup> 700 WG com o ingrediente ativo imidacloprido é altamente tóxico para a abelha *Scaptotrigona* aff. *depilis* independentemente da via de exposição, segundo a classificação de Johansen e Mayer (1990).

Os valores de TL<sub>50</sub> em horas do produto testado para a espécie de abelha em questão, demonstraram que as doses administradas via tópica foram mais eficientes em eliminar 50% das abelhas testadas.

#### 4 CAPÍTULO II - TOXICIDADE DOS INSETICIDAS TIAMETOXAM E METAFLUMIZONE EM FORMULAÇÕES COMERCIAIS, PARA *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

##### RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* são generalistas, possuem milhares de indivíduos por colônia e encontram-se no mundo inteiro, por isso são as preferidas pelos apicultores, principalmente para a produção de mel e a realização dos serviços de polinização. Atualmente a intensa antropização, as grandes áreas utilizadas em monocultivo, o aquecimento global, os parasitas, as doenças e o uso inadequado de pesticidas têm impactado negativamente esses insetos. Objetivando estabelecer parâmetros de toxicidade de alguns inseticidas para as abelhas *A. mellifera*, o presente estudo determinou por diferentes vias de exposição à dose letal média tópica  $DL_{50}$  e a concentração letal média por ingestão  $CL_{50}$  em 24 e 48 horas, dos inseticidas tiametoxam (Actara<sup>®</sup>) e metaflumizone (Verismo<sup>®</sup>), baseando-se nos protocolos oficiais da OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, (1998a; 1998b). As abelhas foram observadas em intervalos de 1, 6, 12, 24 e 48 horas, após a exposição às diferentes dosagens dos inseticidas. A  $DL_{50}$  tópica do tiametoxam foi de 0,055 ng p.c./ $\mu$ L/abelha (24 horas) e 0,052 ng p.c./ $\mu$ L/abelha (48 horas) e a  $CL_{50}$  de ingestão foi 1,467 ng p.c./ $\mu$ L dieta (24 horas) e 0,095 ng p.c./ $\mu$ L dieta (48 horas). A  $DL_{50}$  tópica do metaflumizone foi de 97,223 nL p.c./ $\mu$ L/abelha (24 horas) e 1,157 nL p.c./ $\mu$ L/abelha (48 horas) e a  $CL_{50}$  de ingestão foi 2,493 nL p.c./ $\mu$ L dieta (24 horas) e 0,334 nL p.c./ $\mu$ L dieta (48 horas). Os resultados apontaram que o tiametoxam é mais tóxico para *A. mellifera* que metaflumizone, baseado nas doses utilizadas nos ensaios independentemente da via de exposição.

**Palavras-chave:** *Apis*.  $CL_{50}$ .  $DL_{50}$ . OECD. Pesticidas. Toxicidade.

## ABSTRACT

*Apis mellifera* bees are generalists, have thousands of individuals per colony and are found all over the world, which is why they are preferred by beekeepers, mainly for the production of honey and the performance of pollination services. Currently, intense anthropization, large areas used in monoculture, global warming, parasites, diseases and the inappropriate use of pesticides have negatively impacted these insects. In order to establish toxicity parameters of some insecticides for *A. mellifera* bees, the present study determined by different routes of exposure to the topical average lethal dose LD<sub>50</sub> and the average lethal concentration per ingestion LC<sub>50</sub> in 24 and 48 hours, of the insecticides thiametoxam (Actara®) and metaflumizone (Verismo®), based on the official protocols of the OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, (1998a; 1998b). Bees were observed at intervals of 1, 6, 12, 24 and 48 hours, after exposure to different dosages of insecticides. The topical LD<sub>50</sub> of thiametoxam was 0.055 ng c.p./μL/bee (24 hours) and 0.052 ng c.p./μL/bee (48 hours) and the ingestion LC<sub>50</sub> was 1.467 ng c.p./μL diet (24 hours) and 0.095 ng c.p./μL diet (48 hours). The topical LD<sub>50</sub> of metaflumizone was 97.223 nL c.p./μL/bee (24 hours) and 1.157 nL c.p./μL/bee (48 hours) and the ingestion LC<sub>50</sub> was 2.493 nL c.p./μL diet (24 hours) and 0.334 nL c.p./μL diet (48 hours). The results showed that thiametoxam is more toxic to *A. mellifera* than metaflumizone, based on the doses used in the tests regardless of the route of exposure.

**Keywords:** *Apis*. LC<sub>50</sub>. LD<sub>50</sub>. OECD. Pesticides. Toxicity.

## 4.1 Introdução

As abelhas são os polinizadores de maior importância econômica e responsáveis por 35% da produção de alimentos, englobando aqueles de elevado teor de nutrientes (PARK et al., 2015). O serviço de polinização consiste na transferência do pólen produzido nas anteras para o estigma da mesma flor ou de outra flor da mesma espécie, sendo esta a principal contribuição econômica das abelhas melíferas, pois em diversas regiões do mundo, a agricultura depende dessas abelhas para ter uma boa produtividade (TEIXEIRA, MARINHO e PAULINO, 2014; GARIBALDI et al., 2016).

A polinização realizada de maneira adequada melhora a qualidade dos frutos, aumenta a quantidade e ainda eleva o tempo de prateleira, reduzindo as perdas em pelo menos 11% das frutas e impactando, por exemplo, na economia de 320 milhões de dólares na cultura do morango cultivado nos Estados Unidos da América (KLATT et al., 2014). Estudos demonstram que o número de visitas e o comportamento das abelhas nas flores, exercem influência direta na frutificação e no cultivo de frutos com melhor qualidade (MALERBO-SOUSA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2011; MALERBO-SOUSA e HALAK, 2013; TOLEDO et al., 2013).

Na alimentação humana, aproximadamente 70% das 124 culturas utilizadas para este fim dependem da polinização realizada por insetos para produzirem frutos e sementes (RICKETTS et al., 2008; CHAGNON et al., 2015; RAMIREZ et al., 2018). Segundo Ascher e Pickering (2018) das cerca de 20.000 espécies de abelhas descritas no mundo, 1.902 encontram-se no Brasil. Essa grande quantidade de grupos de abelhas e sua diversidade exercem papel fundamental e pragmático nos serviços de polinização dos ecossistemas nativos e cultivados (GARIBALDI et al., 2014).

Existem alguns fatores que são fundamentais para assegurarem o sucesso das abelhas *A. mellifera* na produção agrícola, que são o domínio das técnicas de manejo, população com milhares de indivíduos por colmeia e o seu hábito generalista. Essas características ajudam os apicultores na exploração de mel, pólen, própolis, cera, geleia real e apitoxina (principalmente para a indústria farmacêutica), gerando assim emprego e renda.

No entanto, muitos relatos de desaparecimento e redução populacional de abelhas *Apis mellifera* L. manejadas e selvagens têm sido feitos ao redor do mundo nos últimos 60 anos (NRC, 2006; OLDROYD, 2007; STOKSTAD, 2007; VANENGELSDORP e MEIXNER, 2010; VAN DER SLUIJIS et al., 2013). Estudos apontam que além de outras causas, como patógenos, doenças e perda de habitat's, existe uma correlação entre o uso indiscriminado de

produtos fitossanitários, incluindo os inseticidas do grupo dos neonicotinóides e a perda crescente de colônias de abelhas (GOULSON et al., 2015). Segundo Sanchez-Bayo e Goka (2016), o uso de pesticidas nas culturas cultivadas para controlar pragas, doenças, ervas daninhas e nematóides, têm impactado negativamente na sobrevivência de polinizadores nativos e nas práticas apícolas. Segundo Malaspina (2010), no Brasil principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, o desaparecimento das abelhas tem preocupado bastante, especula-se que essa mortalidade elevada se dá pelo uso massivo de pesticidas. Entre 2008 e 2010 foi apontada a perda de aproximadamente cinco mil colmeias de abelhas africanizadas na região central do Estado de São Paulo.

Abelhas operárias podem ser contaminadas pelo contato direto com os produtos fitossanitários durante o forrageamento em áreas onde esses insumos foram aplicados ou posteriormente através dos recursos coletados em campo (pólen, néctar e água) e, o contato com doses elevadas, pode ser suficiente para matar a abelha de imediato (SANCHEZ-BAYO e GOKA, 2014).

Os inseticidas podem intoxicar as abelhas majoritariamente de três formas: por contato; ingestão e fumigação e, seus efeitos variam de morte causada por toxicidade aguda e consequências a longo prazo provocando prejuízos nas atividades da colônia e diminuição da longevidade dos indivíduos (MALASPINA et al., 2008).

Estima-se a vulnerabilidade de insetos à inseticidas em condições de laboratório, por meio de ensaios de dose ou concentração letal média ( $DL_{50}$  ou  $CL_{50}$ ). A  $DL_{50}$  é considerada quando se administra um volume conhecido de inseticida, o qual entra em contato uma única vez com o inseto e a  $CL_{50}$  é considerada quando os insetos são expostos ao conteúdo tóxico em uma determinada concentração por um período de tempo estabelecido (CAMPOS e ANDRADE, 2001). Esses testes são realizados baseados nos protocolos e diretrizes para testes de produtos químicos da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (OECD 1998a, 1998b) e são administrados tópicamente ou oralmente, sendo o tórax e o trato digestório os meios pelos quais o inseticida entra no organismo.

Os ensaios de toxicidade de pesticidas estabelecem valores de  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  para *A. mellifera* utilizando os ingredientes ativos e poucos relatam essas informações utilizando as formulações comerciais que são efetivamente utilizados nas lavouras agrícolas e serão aqueles que as abelhas irão se deparar no campo, sem mencionar os possíveis impactos negativos dos adjuvantes ou inertes contidos nessas formulações podem causar.

Diante disso, o presente trabalho constituiu parâmetros toxicológicos pautados nos valores de  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  tópicos e orais para *A. mellifera*, de tiametoxam na formulação comercial

Actara® e de metaflumizone na formulação comercial Verismo®, para se estabelecer uma comparação do ponto de vista de toxicidade entre os produtos para a espécie de abelha em questão.

## 4.2 Material e Métodos

### Material biológico

Nos meses de agosto e setembro do ano de 2018, quatrocentas e oitenta abelhas campeiras de *Apis mellifera* de três colônias diferentes mantidas no apiário do Setor de Abelhas do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Cep. 60356-000, Fortaleza – CE, Brasil, localizado entre as coordenadas geográficas 3.74° S e 38.58° W, clima tropical semiúmido, foram coletadas usando potes de vidro e conduzidas ao Laboratório de Abelhas para serem realizados os ensaios.

### Determinação da DL<sub>50</sub> média tópica dos pesticidas

Para a determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>) tópica dos inseticidas foi utilizado o protocolo internacional preconizado pela OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (OECD, 1998a) desenvolvido para *Apis mellifera*, ressaltando uma adaptação no que diz respeito à anestesia das abelhas.

O produto comercial (Actara® 250 WG - Syngenta Proteção de Cultivos) com o ingrediente ativo tiametoxam foi diluído em água destilada, até se obter as doses a serem testadas (0,08 ng p.c./μL, 0,2 ng p.c./μL, 0,4 ng p.c./μL, 0,8 ng p.c./μL, 2 ng p.c./μL, 10 ng p.c./μL, 40 ng p.c./μL). O produto comercial (Verismo® SC - BASF S.A.) com o ingrediente ativo metaflumizone foi diluído em água destilada, até se obter as doses a serem testadas (0,8 nL p.c./μL, 5 nL p.c./μL, 10 nL p.c./μL, 20 nL p.c./μL, 40 nL p.c./μL, 80 nL p.c./μL, 120 nL p.c./μL).

Em ambos ensaios as abelhas foram anestesiadas por resfriamento em freezer à -2°C por 40 minutos e, após isso, cada abelha recebeu 1μL da respectiva solução inseticida na região do pronoto usando uma micropipeta monocanal de volume variável. As abelhas do grupo controle receberam 1μL de água destilada na mesma região sem qualquer contaminação.

Após serem expostas ao produto, as abelhas foram colocadas em uma bandeja plástica por 10 minutos para que ocorresse a evaporação da solução inseticida. Posteriormente,

em grupos de 10, foram acondicionadas em potes plásticos de 250 mL perfurados na região da tampa para haver circulação de ar e mantidas em câmaras climatizadas tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) reguladas à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  com suprimento de água e alimento (xarope de água destilada + açúcar refinado cristal, na proporção 1/1) sem contaminação servidos por meio de tubos do tipo *ependorf* durante todo o experimento.

Cada tratamento (dose) foi composto por três repetições de 10 abelhas por pote plástico totalizando 30 abelhas. Foram realizadas observações à cada 1, 6, 12, 24 e 48h após o contato com o inseticida, anotando-se o quantitativo de abelhas vivas e mortas. As abelhas foram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo feito por um pincel de pelos finos.

#### Determinação da $CL_{50}$ média por ingestão dos pesticidas

Para a determinação da concentração letal média via oral ( $CL_{50}$ ) foi utilizado o método internacional preconizado pela OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, (1998b), desenvolvido para *Apis mellifera*.

O produto comercial (Actara<sup>®</sup> 250 WG da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda), com o ingrediente ativo do tiametoxam foi diluído até se obter as doses a serem testadas (0,08 ng p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 0,2 ng p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 0,4 ng p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 0,8 ng p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 2 ng p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 10 ng p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 40 ng p.c./ $\mu\text{L}$  dieta) incluídas diretamente no alimento [mistura 1:1 de açúcar comercial refinado e água destilada (xarope)] oferecido as abelhas.

O produto comercial (Verismo<sup>®</sup> SC da BASF S.A.), com o ingrediente ativo do metaflumizone, foi diluído até se obter as doses a serem testadas (0,8 nL p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 5 nL p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 10 nL p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 20 nL p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 40 nL p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 80 nL p.c./ $\mu\text{L}$  dieta, 120 nL p.c./ $\mu\text{L}$  dieta) incluídas diretamente no alimento [mistura 1:1 de açúcar comercial refinado e água destilada (xarope)] oferecido as abelhas.

Em ambos ensaios as abelhas foram anestesiadas por resfriamento em freezer à  $-2^\circ\text{C}$  por 40 minutos, após isso, grupos de 10 abelhas foram acondicionadas em potes plásticos de 250 mL com suprimento de água por meio de tubos do tipo *ependorf* e mantidas em câmaras climatizadas tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) reguladas à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  onde permaneceram em jejum por 2 horas. Após o jejum, o xarope contaminado com as diferentes concentrações de tiametoxam e metaflumizone foram oferecidos às abelhas durante todo o ensaio, exceto as do grupo controle que receberam xarope sem nenhum tipo de contaminação.

Cada tratamento (dose) foi composto por três repetições de 10 abelhas por pote plástico totalizando 30 abelhas. Foram realizadas observações à cada 1, 6, 12, 24 e 48h após o contato com os inseticidas, anotando-se o quantitativo de abelhas vivas e mortas. As abelhas foram consideradas mortas quando não respondiam ao estímulo feito por um pincel de pelos finos.

#### Análise estatística

Com o objetivo de determinar a dose letal ( $DL_{50}$ ) e a concentração letal ( $CL_{50}$ ) em 24 e 48 horas, dos inseticidas Actara<sup>®</sup> 250 WG, com ingrediente ativo tiametoxam e Verismo<sup>®</sup> SC, com ingrediente ativo metaflumizone, foram contabilizados os números de abelhas vivas e mortas em cada tratamento, nos intervalos anteriormente citados, após o contato com os inseticidas. Esses dados foram analisados através de um modelo log-logístico ou modelo de Gompertz com auxílio do pacote “drc” (RITZ et al., 2015) presente no ambiente estatístico R (R Core Team, 2017). Uma vez elaborados os modelos, foram estimados a  $DL_{50}$ , a  $CL_{50}$ , e seus respectivos intervalos de confiança (95%).

### 4.3 Resultados

A  $DL_{50}$  tópica de tiametoxam foi de 0,055 ng p.c./ $\mu$ L/abelha em 24 horas (tabela 2 e figura 6) e de 0,052 ng p.c./ $\mu$ L/abelha em 48 horas (tabela 2 e figura 7). A  $CL_{50}$  oral de tiametoxam foi de 1,467 ng p.c./ $\mu$ L/dieta em 24 horas (tabela 2 e figura 8) e de 0,095 ng p.c./ $\mu$ L/dieta em 48 horas (Tabela 2 e Figura 9).

A  $DL_{50}$  tópica de metaflumizone foi de 97,223 nL p.c./ $\mu$ L/abelha em 24 horas (tabela 3 e figura 10) e de 1,157 nL p.c./ $\mu$ L/abelha em 48 horas (tabela 3 e figura 11). A  $CL_{50}$  oral de metaflumizone foi de 2,493 nL p.c./ $\mu$ L/dieta em 24 horas (tabela 3 e figura 12) e de 0,334 nL p.c./ $\mu$ L/dieta em 48 horas (Tabela 3 e Figura 13).

Tabela 2. Toxicidade aguda do Tiametoxam em 24 e 48 horas para *Apis mellifera*.

Modo de exposição	Tempo (horas)	$DL_{50}$	$CL_{50}$	$IC_{95\%}$	$\chi^2$	p
Tópica ng p.c./ $\mu$ L/abelha	24h	0,055	----	0,024 – 0,123	22	0,054
	48h	0,052	----	0,050 – 0,054	13	0,924
Ingestão ng p.c./ $\mu$ L/dieta	24h	----	1,467	0,549 – 2,385	19	0,832
	48h	----	0,095	0,042 – 0,148	19	0,973

Tabela 3. Toxicidade aguda do Metaflumizone em 24 e 48 horas para *Apis mellifera*.

Modo de exposição	Tempo (horas)	DL <sub>50</sub>	CL <sub>50</sub>	IC <sub>95%</sub>	$\chi^2$	p
Tópica	24h	97,223	----	23,233 – 406,852	22	0,077
nL p.c./ $\mu$ L/abelha	48h	1,157	----	0,094 – 2,219	19	0,197
Ingestão	24h	----	2,493	1,615 – 3,848	22	0,048
nL p.c./ $\mu$ L/dieta	48h	----	0,334	0,010 – 0,659	19	0,817

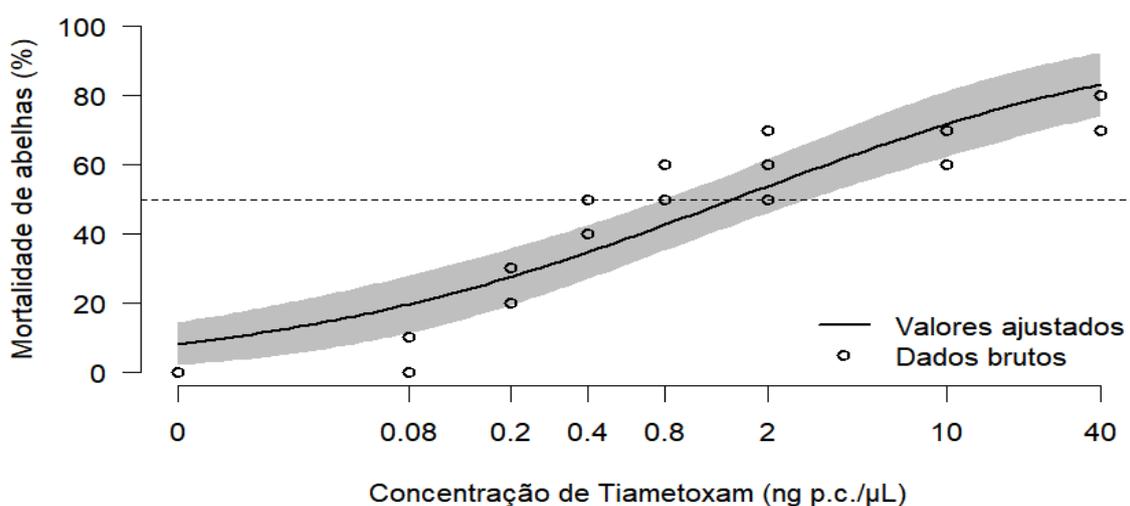
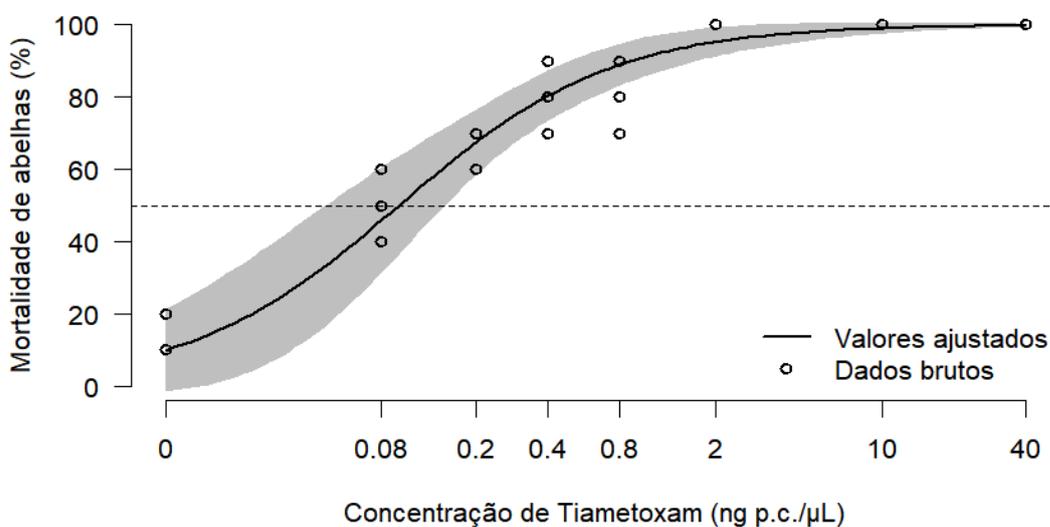
Figura 6 – Determinação da DL<sub>50</sub> tópica em 24 horas do inseticida tiametoxam para abelhas operárias de *Apis mellifera*.Figura 7 – Determinação da DL<sub>50</sub> tópica em 48 horas do inseticida tiametoxam para abelhas operárias de *Apis mellifera*.

Figura 8 – Determinação da  $CL_{50}$  oral em 24 horas do inseticida tiametoxam para abelhas operárias de *Apis mellifera*.

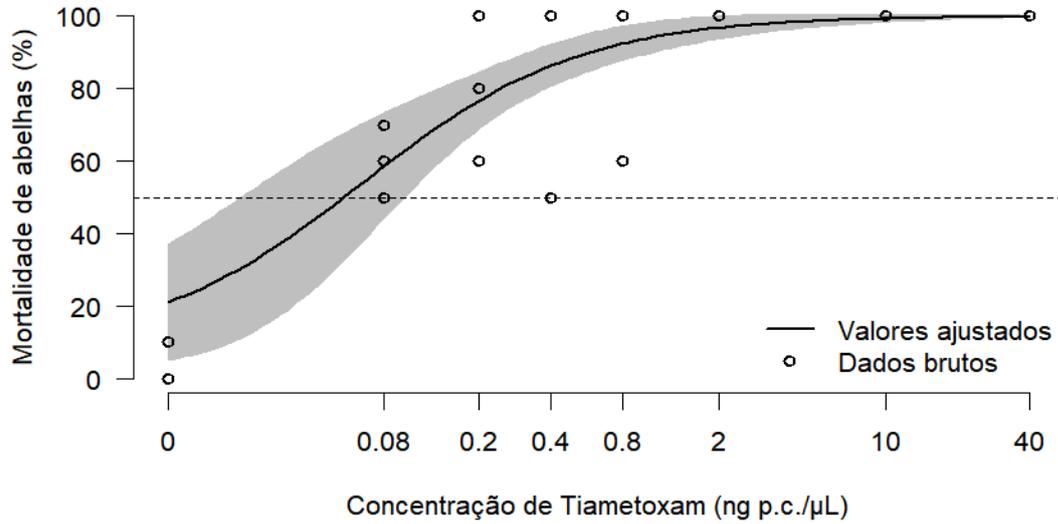


Figura 9 – Determinação da  $CL_{50}$  oral em 48 horas do inseticida tiametoxam para abelhas operárias de *Apis mellifera*.

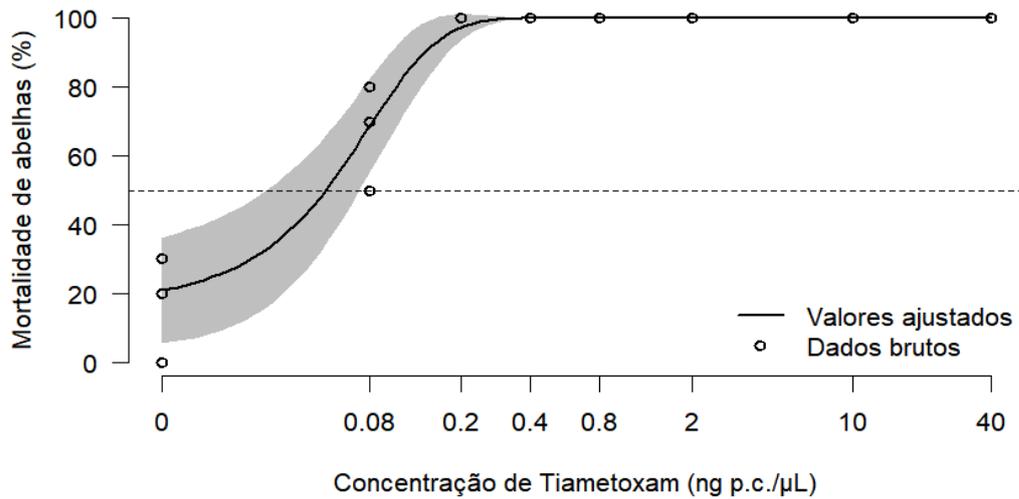


Figura 10 – Determinação da DL<sub>50</sub> tópica em 24 horas do inseticida metaflumizone para abelhas operárias de *Apis mellifera*.

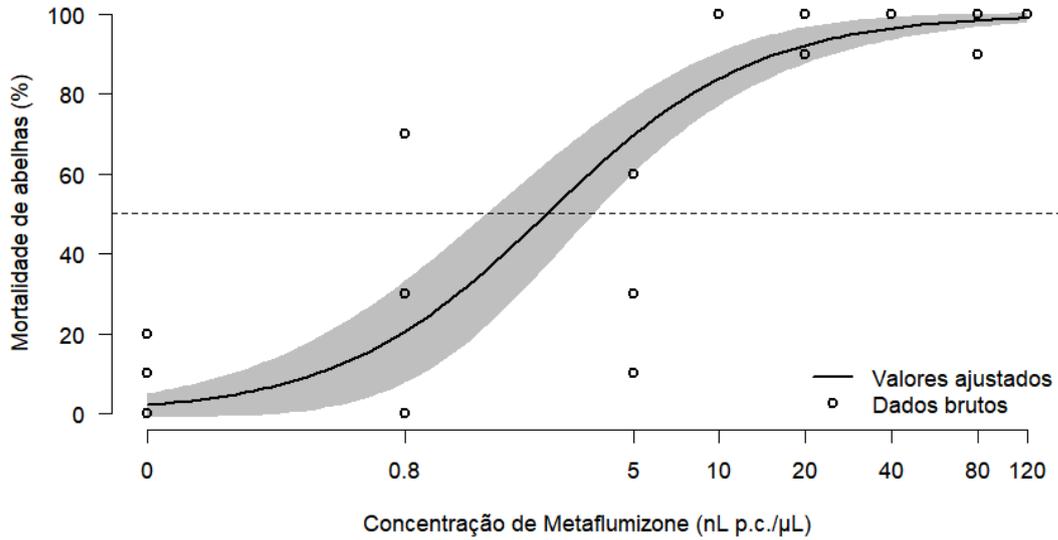


Figura 11 – Determinação da DL<sub>50</sub> tópica em 48 horas do inseticida metaflumizone para abelhas operárias de *Apis mellifera*.

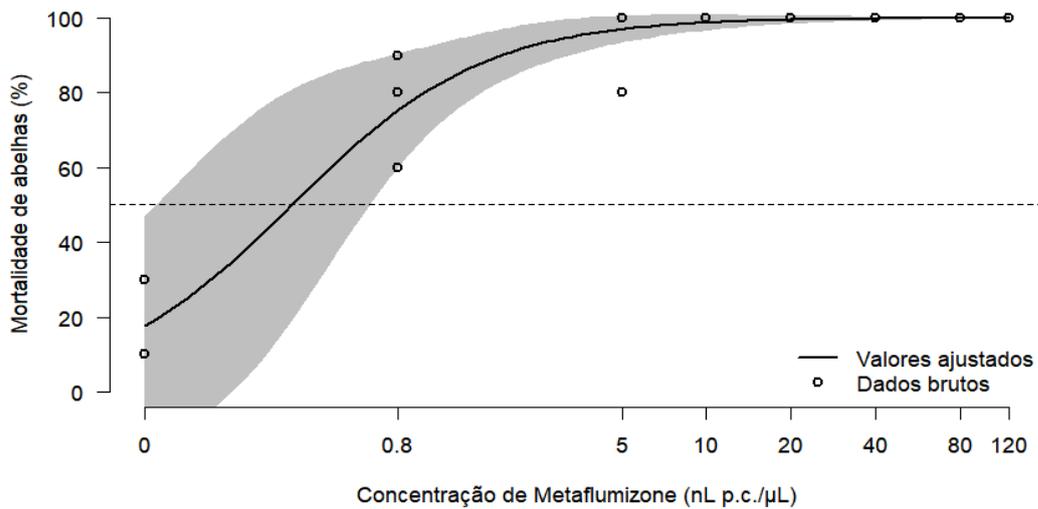


Figura 12 – Determinação da  $CL_{50}$  oral em 24 horas do inseticida metaflumizone para abelhas operárias de *Apis mellifera*.

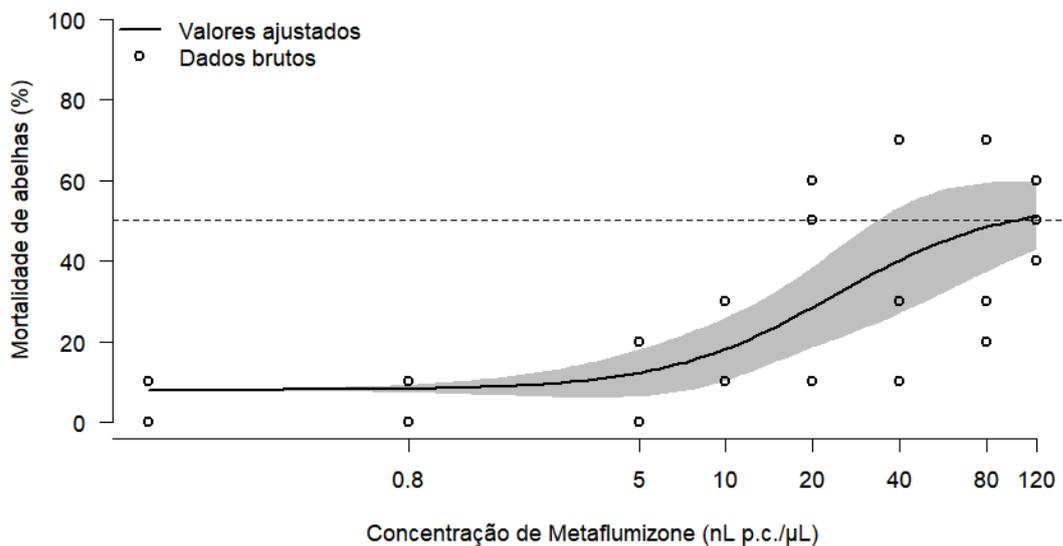
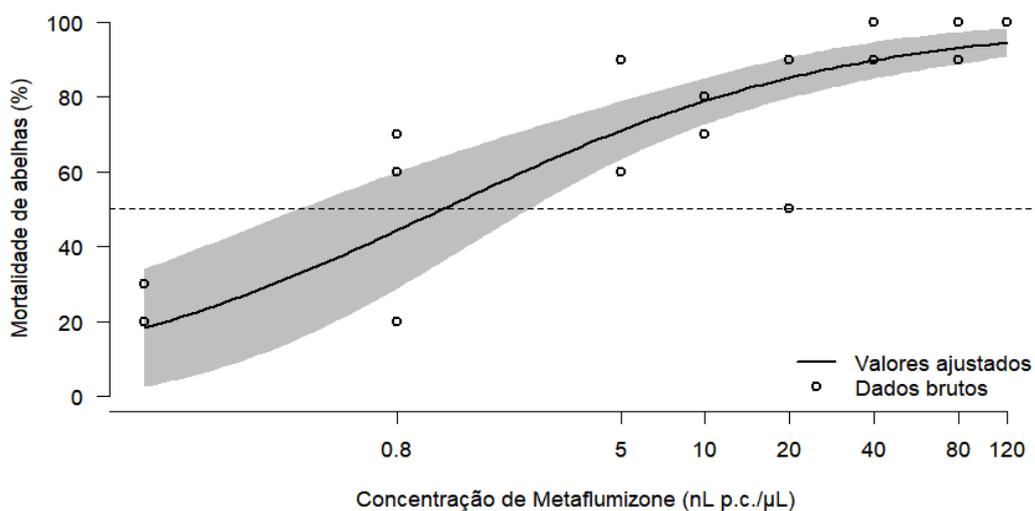


Figura 13 – Determinação da  $CL_{50}$  oral em 48 horas do inseticida metaflumizone para abelhas operárias de *Apis mellifera*.



#### 4.4 Discussão

O presente estudo avaliou a toxicidade dos pesticidas em formulação comercial Tiametoxam e Metaflumizone, estabelecendo suas respectivas  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  e evidenciou-se que ambos os produtos são tóxicos para a espécie de abelha *Apis mellifera*. Baseado na classificação de Johansen e Mayer (1990), que consideram inseticidas com  $DL_{50} < 2.000$  ng/abelha altamente

tóxicos para as abelhas, os dois produtos testados são considerados altamente tóxicos para *A. mellifera*.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que apontem a toxicidade aguda do metaflumizone, com valores de  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  para abelhas, sendo este estudo o primeiro que se propôs a tal fim. Baseado nos resultados obtidos com este produto é fundamental que mais investigações sejam feitas nesse sentido, para que se obtenham dados mais robustos com essa e outras espécies, já que o pesticida em questão foi considerado altamente tóxico para *A. mellifera*.

Para o tiametoxam existem valores de  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  na literatura, os quais atestam o poder extremamente tóxico que este produto exerce sobre as abelhas corroborando com o presente estudo, como mostrado por Iwasa et al. (2004) para *A. mellifera* com ( $DL_{50}$ ) = 29,9 ng i.a./ $\mu$ L; Decourtye e Devillers (2010) para *A. mellifera* com ( $CL_{50}$ ) = 5,0 ng i.a./abelha; Badiou-Bénéteau et al. (2012) para *A. mellifera* com ( $DL_{50}$ ) = 51,16 ng i.a./abelha; Oliveira et al. (2013) para *A. mellifera* com a concentração letal ( $CL_{50}$ ) = 4.28 ng i.a./ $\mu$ L. Porém a grande maioria dos trabalhos publicados utiliza nos testes o ingrediente ativo e não produto em sua formulação comercial e baseado nos resultados obtidos por esse estudo é preciso investigar melhor o papel dos adjuvantes presentes nas formulações dos pesticidas, pois há indícios que os mesmos tornam os produtos ainda mais tóxicos.

Queiroz et al. (2008) afirmaram que os aditivos ou adjuvantes, são substâncias inertes que compõem alguns agrotóxicos e tem por finalidade vencer as barreiras dos organismos alvo à penetração, modificando a atividade dos produtos aplicados bem como as características da pulverização, promovendo uma maior eficiência na aplicação. Mullin et al. (2016) alertou, em sua revisão de literatura, que as avaliações dos riscos toxicológicos dos pesticidas que abordam apenas os ingredientes ativos sem os adjuvantes, poderá negligenciar resultados importantes de toxicidade para os organismos não alvo, sobretudo as abelhas. Embora os mesmos sejam considerados materiais inertes, esses mesmos autores ainda afirmam que a falta de conhecimento e informações sobre suas composições, aliado a intensa junção desses produtos aos pesticidas comerciais e a pulverização intensa no período de floração, podem estar diretamente relacionados ao declínio de abelhas melíferas nos EUA.

Vários estudos que abordaram a extração dos ingredientes ativos dos pesticidas somados com seus adjuvantes, tem apontado diversos efeitos fisiológicos em organismos não-alvos (SURGAN et al., 2010; MULLIN et al., 2015). Essa afirmação contradiz a informação costumeiramente repassada de que os materiais inertes que compõem os pesticidas comerciais são biologicamente inofensivos.

Segundo o Ibama (Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis), o Actara® 250 WG possui classificação toxicológica III (medianamente tóxico) e classificação do potencial de periculosidade ambiental III (produto perigoso ao meio ambiente). Já o Verismo® possui classificação toxicológica I (extremamente tóxico) e classificação do potencial de periculosidade ambiental III (produto perigoso ao meio ambiente).

Diferindo do que estabeleceu o órgão competente citado acima com relação à classificação toxicológica, o tiametoxam apresentou uma toxicidade muito mais elevada para *A. mellifera* quando comparado ao metaflumizone, independentemente da via de exposição. Diversos estudos apontam o quão tóxico o tiametoxam é para as abelhas, afetando a neurofisiologia do sistema nervoso central, promovendo alterações celulares, modificações na atividade neurológica da acetilcolinesterase e habilidade de memória (WRIGHT et al., 2015; PENG e YANG, 2016; FRIOL et al., 2017; PAPACH et al., 2017; TAVARES et al., 2017).

Outro fator que torna o tiametoxam ainda mais nocivo aos polinizadores quando comparado ao metaflumizone é o fato dele ser um inseticida sistêmico, fazendo com que o mesmo seja encontrado em toda planta, inclusive nos recursos alimentares coletados pelas abelhas, enquanto o segundo possui ação de contato e ingestão. A persistência residual de inseticidas sistêmicos pode contaminar os alimentos coletados pelas abelhas por bastante tempo e serem armazenados nos ninhos (CHAUZAT et al., 2006; MULLIN et al., 2010; ORANTES-BERMEJO et al., 2010). Os recursos contaminados armazenados no ninho são utilizados para alimentar as crias e os adultos, acarretando em alterações comportamentais e fisiológicas nas abelhas, comprometendo assim a produtividade e a manutenção das colônias (ORANTES-BERMEJO et al., 2010; ZALUSKI et al., 2015).

Nas doses subletais esses danos também foram graves, pois as abelhas expostas principalmente ao tiametoxam apresentaram distúrbios de comportamento como: tremores, agitação, falta de interesse pelo alimento, culminando com a morte, o que demonstra que é fundamental que haja estudos avaliando os efeitos secundários das doses subletais de pesticidas.

Doses subletais podem comprometer diversos processos biológicos, como a progressão atípica do desenvolvimento larval, distúrbios de comportamento, tempo de sobrevivência, alterações no metabolismo celular e inibições enzimáticas, comprometendo assim a colônia tanto quanto a intoxicação por doses letais, embora os efeitos sejam observados após períodos mais longos de exposição (DESNEUX et al., 2007; TAVARES et al., 2015). A exposição das abelhas forrageiras a doses não letais de tiametoxam causa alta mortalidade devido à dificuldade de orientação a níveis que poderiam colocar uma colônia em risco de colapso (HENRY et al., 2012).

As diferenças de toxicidade ente os pesticidas testados, provavelmente aconteceram devido a características específicas de suas composições químicas. Segundo Wiesner e Kayser, (2000), o tiametoxam suscita um metabólito (N-desmetil-tiametoxam), que é muito mais tóxico que o próprio ingrediente ativo do produto. Existe uma diferença considerável nos níveis de toxicidade entre grupos de pesticidas, os quais possuem os radicais N-nitroguanidina ou N-ciano-amidina que estão ligadas a capacidade de algumas subfamílias das enzimas do citocromo P450, que não conseguem degradar com tanta eficiência as moléculas do tiametoxam e imidacloprido, com a mesma habilidade que tornam menos tóxicas as moléculas de outros inseticidas (MANJON et al., 2018).

É fundamental que mais estudos de toxicidade dos pesticidas em nível de campo e laboratoriais sejam incentivados, a fim de que se obtenha com mais precisão o real impacto e contribuição que esses produtos causam na redução populacional das abelhas. Com os inúmeros relatos de sumiço e perdas populacionais de abelhas atualmente vinculados ao uso maciço dos inseticidas neonicotinóides, têm concentrado os estudos em abelhas *Apis mellifera* (GODFRAY et al., 2014). *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). Porém, sabemos que não é razoável considerarmos uma única espécie de abelhas como modelo para a avaliação dos impactos e toxicidade dos pesticidas, devido a uma infinidade de diferenças comportamentais, de tamanho, alimentares e sociais que existem entre as abelhas *A. mellifera* e as nativas sem ferrão por exemplo.

Segundo Tomé et al. (2015) e Barbosa et al. (2015), é fundamental a inclusão de polinizadores nativos, sobretudo as abelhas sem ferrão da região neotropical nas avaliações de toxicidade de pesticidas. Segundo Cham et al. (2019), é questionável a utilização da *A. mellifera* L. por muitos países como referencial majoritário na avaliação do risco dos pesticidas para todas as espécies de abelhas, pois não existe certeza da quão viável é o uso dessas abelhas como substitutos fiéis das abelhas não *Apis*.

Devido a grande importância das abelhas em geral para a manutenção da biodiversidade e ao grande valor monetário que esses insetos geram seja com seus produtos (mel, cera, pólen, própolis, apitoxina e etc.) ou com o seu serviço de polinização, é fundamental que hajam mais estudos avaliando os impactos das formulações comerciais de pesticidas nas abelhas e os dados gerados podem ser utilizados 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 nativas e exóticas.

#### 4.5 Conclusão

Os produtos fitossanitários Actara<sup>®</sup> 250 WG e Verismo<sup>®</sup> SC são tóxicos para a espécie de abelha *Apis mellifera*.

Independentemente da via de exposição, o produto comercial com o ingrediente ativo do tiametoxam (Actara<sup>®</sup> 250 WG da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda), é muito mais tóxico para a espécie de abelha estudada, quando comparado ao produto metaflumizone (Verismo<sup>®</sup> SC da BASF S.A.).

## 5 Conclusão Geral

O presente trabalho demonstrou que os produtos fitossanitários utilizados são tóxicos para as espécies de abelhas *Scaptotrigona aff. depilis* e *Apis mellifera*, por vias tópica e oral.

As duas formulações do grupo químico dos neonicotinóides Actara<sup>®</sup> 250 WG e Evidence<sup>®</sup> 700 WG, foram mais eficientes na eliminação da população testada, baseado nos valores de letalidade obtidos, quando comparados ao Verismo<sup>®</sup> SC.

O Actara<sup>®</sup> 250 WG da Syngenta Proteção de Cultivos Ltda foi o mais tóxico dentre os três produtos testados.

É preciso que sejam realizados mais estudos sobre os impactos das formulações comerciais dos agroquímicos em populações de abelhas, pois na literatura há indícios de que os materiais inertes contidos nestes insumos potencializem os efeitos tóxicos, tornando-os ainda mais severos a esses insetos.

## REFERÊNCIAS

- ABEMEL, Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. **Relatórios Atuais**. Disponível em: [http://brazilletsbee.com.br/inteligencia\\_comercial\\_abemel\\_outubro\\_2015.pdf](http://brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_outubro_2015.pdf). Acesso em: 18 mar. 2017.
- ABRASCO, **Associação Brasileira de Saúde Coletiva**. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. 2015. Disponível em: [http://www.abrasco.org.br/dossie\\_agrotoxicos/wpcontent/uploads/2013/10/DossieAbrasc\\_o\\_2015\\_web.pdf](http://www.abrasco.org.br/dossie_agrotoxicos/wpcontent/uploads/2013/10/DossieAbrasc_o_2015_web.pdf). Acesso em: 10 jan. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BR). (2016). Regularização de Produtos Agrotóxicos. Monografias Autorizadas (F43 – Fipronil; I13 – Imidacloprido). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-deagrotoxicos/autorizadas>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- AIZEN, M. A.; HARDER, L. D. The global stock of domesticated honeybees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current Biology**. 19:915–918, 2009.
- ASHER, J. S.; PICKERING, J. 2018. **Discover life**: bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). Disponível em: [http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea\\_species](http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species). Acesso em: 30 nov. 2019.
- BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; CARVALHO, G. A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L. P. 2012. Development of bio-markers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide Thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 82:22–31, 2012.
- BARBOSA, W. F.; SMAGGHE, G.; GUEDES, R. N. C. Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. **Pest Management Science**. 71 (8), 1049–1053, 2015.
- BELZUNCES, L. P.; TCHAMITCHIAN, S.; BRUNET, J. L. Neural effects of insecticides in the honeybee. **Apidologie**, Versailles, v. 43, n. 3, p. 348-370, May 2012.
- BICKER, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research and Technique**. 45:174–183, 1999.
- 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.
- 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.
- 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 honeybees. **Bulletin of Insectology**. 56:63–67, 2003.

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**. 12, 321–331, 2011.

BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective. **Apidologie**, 40:410–416, 2009.

BUCHMANN, S. L.; NABHAN, G. P. **The Forgotten Pollinators**. Island Press; 1997.

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.

BURKLE, L. A.; MARLIN, J. C.; KNIGHT, T. M. Plant-pollinator interactions over 120 years: loss of species, co-occurrence, and function. **Science**, 339(6127), 1611-1615. 2013.

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.

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.

CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. Bees diversified in the age of eudicots. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. 280, 20122686, 2013.

CASTRO, M. S.; KOEDAM, D.; CONTRERA, F. A. L.; VENTURIERI, G. C.; PARRA, G. N.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; CAMPOS, L. O.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P.; PERUQUETTI, R. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Stingless bee. *In*: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; JONG, D. D. (eds) Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. **Holos**, Ribeirão Preto, pp 75–83, 2006.

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: Apoidea) **Microscopy Research and Technique**, 77:274–281, 2014.

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

CHAM, K. O.; NOCELLI, R. C. F.; BORGES, L. O.; VIANA-SILVA, F. E. C.; TONELLI, C. A. M.; MALASPINA, O.; MENEZES, C.; ROSA-FONTANA, A. S.; BLOCHTEIN, B.; FREITAS, B. M. et al. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental Entomology**. 48, 36–48, 2019.

CHAUZAT, M. P.; FAUCON, J. P.; MARTEL, A. C.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N. et al. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honeybees in France. **Journal of Economic Entomology**. 99: 253–262, 2006.

COOPER, J.; DOBSON, H. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**. 26:1337–1348, 2007.

CORNMAN, R. S.; TARPY, D. R.; CHEN, Y.; JEFFREYS, L.; LOPEZ, D.; PETTIS, J.S.; VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D. Pathogen webs in collapsing honeybee colonies. **PLoS ONE**, v.7, e43562, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0043562, 2012.

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.

COSTA, L. M.; GRELLA, T. C.; BARBOSA, R. A.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Determination of acute lethal doses (LD<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub>) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, vol 62, n. 4, p. 578-582, 2015.

CRESSWELL, J. E.; DESNEUX, N.; VAN ENGELSDORP, D. Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honeybees: 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. 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.

DECOURTYE, A.; ARMENGAUD, C.; RENOU, M.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, 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.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, 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.; DEVILLERS, J.; GENECQUE, E.; LE MENACH, K.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; PHAM-DELEGUE, 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.; LACASSIE, E.; PHAM-DELÈGUE, 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.

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 honeybee *Apis mellifera*. **Apidologie**, 45:626–636. INRA, DIB and Springer-Verlag France, 2014 DOI: 10.1007/s13592-014-0281-6, 2014.

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

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.

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.; THIELERT, W.; 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.

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

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

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. 2017.

FRIOL, P.S.; CATAE, A.F.; TAVARES, D.A.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. 2017. Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**. 185, 56–66, 2017.

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

GARIBALDI, L. A.; CARVALHEIRO, L. G.; LEONHARDT, S. D.; AIZEN, M. A.; BLAAUW, B. R.; ISAACS, R.; KHULMANN, M.; KLEIJN, D.; KLEIN, A. M.; KREMEN, C.; MORANDIN, L.; SCHEPER, J.; WINFREE, R. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**. 12, 439-447, 2014.

GARIBALDI, L. A.; CARVALHEIRO, L. G.; VAISSIÈRE, B. E.; GEMMILL-HERREN, B.; HIPÓLITO, J.; FREITAS, B. M.; NGO, H. T.; AZZU, N.; SÁEZ, A.; ÅSTRÖM, S.; AN, J.; BLOCHTEIN, B.; BUCHORI, D.; GARCÍA, F. J. C.; SILVA, F. O. S.; DEVKOTA, K.; RIBEIRO, M. F.; FREITAS, L.; GAGLIANONE, M. C.; GOSS, M.; IRSHAD, M.; KASINA, M.; PACHECO FILHO, A. J. S.; KIILL, L. H. P.; KWAPONG, P.; PARRA, G. N.; PIRES, C.; PIRES, V.; RAWAL, R. S.; RIZALI, A.; SARAIVA, A. M.; VELDTMAN, R.; VIANA, B. F.; WITTER, S.; ZHANG, H. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/291519386\\_Mutually\\_beneficial\\_pollinator\\_diversity\\_and\\_crop\\_yield\\_outcomes\\_in\\_small\\_and\\_large\\_farms](https://www.researchgate.net/publication/291519386_Mutually_beneficial_pollinator_diversity_and_crop_yield_outcomes_in_small_and_large_farms) [accessed: jan. 02 2020]. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. **Science**, v. 351, n. 6271, p. 388-391, 2016.

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.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.108, p.1-9, 2015a. DOI: 10.1093/jee/tov093, 2015a.

GODFRAY, H. C. J.; BLACQUIERE, T.; FIELD, L. M.; HAILS, R. S.; PETROKOFISKY, G. et al. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. 281 (1786), 20140558, 2014.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, 347: 1255957, 2015.

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

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: 24 ago. 2017.

HAGEN, M. et al. Biodiversity, species interactions and ecological networks in a fragmented world. **Advances in Ecological Research**, v. 46, p. 89-120, 2012.

HARDSTONE, M.C.; 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.

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. Stingless beekeeping in Australia: snapshot of an infant industry. **Bee World** 81, 116–125, 2000.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F.; AUPINEL, P. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honeybees. **Science**, 336, 350–351, 2012

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**. 2017. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro\\_2017\\_resultados\\_definitivos.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf). Acesso em: 03 mar. 2020.

IPBES. **Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production**. POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; GARIBALDI, L. A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN, A. J.; AIZEN, M. A.; CUNNINGHAM, S. A.; EARDLEY, C.; FREITAS, B. M.; GALLAI, N.; KEVAN, P. G.; KOVÁCS-HOSTYÁNSZKI, A.; KWAPONG, P. K.; LI, J.; LI, X.; MARTINS, D. J.; NATES-PARRA, G.; PETTIS, J. S.; RADER, R.; VIANA, B. F. (eds.). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 36 p. 2016.

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 honeybee, *Apis mellifera*. **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 *Scaptotrigona postica*. **Society of Chemical Industry** (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.3776, 2014.

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

- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. The probable consequences of the destruction of Brazilian stingless bees. *In: Várzea: diversity, development and conservation of Amazonia's whitewater flood plains*. Edited by Christine Padoch; José Márcio Ayres; Miguel Pinedo-Vasquez; Andrew Henderson, Section 6. Pages 393-403, 1999.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C.; ASSIS, M. G. P. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias estratégicas*, no. 12, pp. 20 – 41, 2010.
- 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.
- KLATT, B. K.; HOLZSCHUH, A.; WESTPHAL, C.; CLOUGH, Y.; SMIT, I.; PAWELZIK, E. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. B281, 20132440. (doi:10.1098/rspb.2013.2440) 2014.
- 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: Biological Sciences*, 274:303–313, 2007.
- LAMBERTH, C.; JEANMART, S.; LUKSCH, T.; PLANT, A. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. *Science* 341:742–746, 2013.
- LAURINO, D.; PORPORATO, M.; PATETTA, A.; MANINO, A. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honeybees: laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 64:107-113, 2011.
- LIMA, M. C.; ROCHA, S. A. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil. Brasília: *Ibama*, 88 p, 2012.
- LIU, Z.; WILLIAMSON, M. S.; LANSDELL, S. J.; DENHOLM, I.; HAN, Z.; MILLAR, N. S. Anionic 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* (Latreille, 1811). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89: 921–924, 2012.
- LUNARDI, J. S.; ZALUSKI, R.; ORSI, R. O. Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides Fipronil and imidacloprid in Africanized Honeybees (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, v. 64, n. 1, p. 50-56, 2017.
- MACIEIRA, O. J. D.; PRONI, E. A. Capacity of resistance to high and low temperatures in workers of *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae) during periods of summer and winter. *Revista Brasileira de Zoologia*. [online]. 2004, vol.21, n.4, pp.893-896, 2004.
- MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; SOUZA, T. F. Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 18.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, 4., 2010, Cuiabá. Resumos...Cuiabá: Confederação Brasileira de Apicultura, 2010. 1 CD-ROM.*

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CRUZ, A. S.; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. *In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS*, 8., 2008, Ribeirão Preto. **Anais... Ribeirão Preto: FUNPEC**, Universidade de São Paulo, 2008. p. 41–48.

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

MALERBO-SOUZA, D. T.; HALAK, A. J. Efeito da interação abelha-flor na produção de frutos em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Zootecnia Tropical** 31, 78-93, 2013.

MALERBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 40, 237-242, 2003.

MANJON, C.; TROCZKA, B. J.; ZAWORRA, M.; BEADLE, K.; RANDALL, E.; HERTLEIN, G.; SINGH, K. S.; ZIMMER, C. T.; HOMEM, R. A.; LUEKE, B.; REID, R.; KOR, L.; KOHLER, M.; BENTING, J.; WILLIAMSON, M. S.; DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; BASS, C.; NAUEN, R. Unravelling the Molecular Determinants of Bee Sensitivity to Neonicotinoid Insecticides. **Current Biology** 28(7):1137–1143.e5, 2018.

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 honeybee behaviour. 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.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. John Hopkins, Baltimore, MD. 2007.

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (BR)**. (2016). Defesa Agropecuária: Registro de agrotóxicos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/carta-de-servico-ao-cidadao/agrotoxicos/registro-agrotoxicos>. (accessed: 20 dec. 2019).

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (BR)**. Secretaria de Defesa Agropecuária. (2013). Instrução Normativa Conjunta nº 1., de 28 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a aplicação dos ingredientes ativos Imidacloprido, Clotianidina, Tiametoxam e Fipronil. Diário Oficial da União, 04 Jan 2013: 3: Seq 1:10.

MOORE, D. Honeybee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. **Journal of Insect Physiology** 47, 843-857, 2001.

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos da Geografia**, p. 26-40, 2003.

MULLIN, C. A.; CHEN, J.; FINE, J. D.; FRAZIER, M. T.; FRAZIER, J. L. The formulation makes the honeybee poison. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 120:27–35, 2015

MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honeybee health. **PLoS ONE** 5: e9754, 2010.

MULLIN, C. A.; FINE, J. D.; REYNOLDS, R. D.; FRAZIER, M. T. Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. **Frontiers in Public Health**.4:92 DOI: 10.3389/fpubh 00092. 2016.

NASCIMENTO, E. T.; PÉREZ-MALUF, R.; GUIMARÃES, R. A.; CASTELLANI, M. A. Diversidade de abelhas visitantes das flores de citrus em pomares de laranja e tangerina. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 33, 111-117, 2011.

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC)** (2006) Status of pollinators in North America. Washington, DC: National Academy of Sciences.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. **Editora NogueiraApis**, 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 honeybees? **PLoS Biology** 5: 1195–1199, 2007.

OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**. 28 doi: 10.1002/tox.21842, 2013.

OLIVER, T. H. et al. Interacting effects of climate change and habitat fragmentation on drought-sensitive butterflies. **Nature Climate Change**, 5(10), 941-945. 2015. doi:10.1038/nclimate2746.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, 120(3): 321-326, 2011.

ORANTES-BERMEJO, F. J.; PAJUELO, A. G.; MEGIAS, M. M.; FERNÁNDEZ-PÍÑAR, C. T. Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honeybee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. **Journal of apicultural research & bee world**. 48: 243–250, 2010.

ORTH, A. I. Declínio dos polinizadores no Brasil. In. Congresso brasileiro de apicultura, 13, Florianópolis. **Anais... Florianópolis: UFSC/FAASC/EPAGRI**, 2000.

PAPACH, A.; FORTINI, D.; GRATEAU, S.; AUPINEL, P.; RICHARD, F. J.; Larval exposure to thiamethoxam and American foulbrood: effects on mortality and cognition in the honeybee *Apis mellifera*. **Journal of apicultural research & bee world**. 56, 475–486. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1332541>., 2017.

PARK, M. G.; BLITZER, E. J.; GIBBS, J.; LOSEY, J. E.; DANFORTH, B. N. Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. B 282, 20150299, 2015.

PEDRO, S. R. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 61, 348-354, 2014.

PENG, Y. C.; YANG, E. C. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honeybee mushroom bodies. **Scientific Reports**. 6, 19298. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep19298>, 2016.

PETTIS, J. S.; DELAPLANE, K. Coordinated responses to honeybee decline in the USA. **Apidologie**, v.41, p.256-263, 2010. DOI: 10.1051/apido/2010013, 2010.

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.

PIRES, C. C. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, F. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perdas de colônia de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51(5):422-442, 2016.

PISA, L. W.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; DOWNS, C. A.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; MCFIELD, M.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; SETTELE, J.; SIMON-DELISO, N.; STARK, J. D.; VAN DER SLUIJS, J. P.; VAN DYCK, H.; WIEMERS, M. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**. 22, 68-102, 2015.

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; GARIBALDI, L. A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, 540: 220-229, 2016.

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

QUEIROZ, A. A.; MARTINS, J. A. S.; CUNHA, J. P. A. R. Adjuvantes e qualidade da água na aplicação de agrotóxicos. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 24, n. 4, p. 8-19, Out/Dez. 2008.

R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees: A risk assessment. **PLoS ONE**, 9: e94482. doi: 10.1371/journal.pone.0094482, 2014.

RAMIREZ, V. M.; AYALA, R.; GONZÁLEZ, H. D. Crop pollination by stingless bees. *In*: Vit, P.; PEDRO, S.; ROUBIK, D. (Eds). Pot-pollen in stingless bees melitology. **Springer, Cham**, pp. 139-153, 2018.

RICHARDS, J. H.; KOPTUR, S. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* L. (Rubiaceae). **American Journal of Botany**. 80, 31-40, 1993.

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.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R **PLoS ONE**, 10(12), e0146021, 2015.

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.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Impacts of pesticides on honeybees. *In*: E. D. Chambo (Ed.), **Beekeeping and bee conservation - Advances in research**, pp 77-97, 2016.

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

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.

SLAA, E. J.; CHAVES, L. S.; MALAGODI-BRAGA, K.; AND HOFSTEDÉ, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**. 37: 293-315, 2006.

SOARES, H. M.; JACOB, C. R. O.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Toxicity of imidacloprid of the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. DOI 10.1007/s00128-015-1488-6, 2015.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, 316: 970-972. doi: 10.1126/science.316.5827.970, 2007.

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.

SURGAN, M.; CONDON, M.; COX, C. Pesticide risk indicators: unidentified inert ingredients compromise their integrity and utility. **Environmental Management**. 45(4):834–41. doi:10.1007/s00267-009-9382-9, 2010.

TAVARES, D. A.; DUSSAUBAT, C.; KRETZSCHMAR, A.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O.; BÉRAIL, G.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P.; Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honeybee at post-embryonic stages. **Environmental Pollution**. 229, 386–393. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.092>, 2017.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**. 135, 370–378, 2015.

TEIXEIRA, S. P.; MARINHO, C. R.; PAULINO, J. V. A Flor: aspectos morfofuncionais e evolutivos. In: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E. A. M.; MACHADO, I. C. S. (ORG.). **Biologia da Polinização**. 1 ed. Brasília: Editora do Ministério do Meio Ambiente, v. 1, p. 45-70, 2014.

TOLEDO, V. D. A. A.; RUVOLOTAKASUSUKI, M. C. C.; BAITALA, T. V.; COSTA-MAIA, F. M.; PEREIRA, H. L.; HALAK, A. L.; CHAMBÓ, E. D.; MALERBO-SOUSA, D. T. Polinização por abelhas (*Apis mellifera* L.) em laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 40, 237-242, 2013.

TOMÉ, H. V. V.; BARBOSA, W. F.; CORRÊA, A. S.; GONTIJO, L. M.; MARTINS, G. F.; GUEDES, R. N. C. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology**. doi:10.1111/aab.12217, 2015.

TOMÉ, H.V.V.; BARBOSA, W.F.; CORRÊA, A.S.; GONTIJO, L.M.; MARTINS, G.F.; GUEDES, R.N.C. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology**. 167:186–196, 2015a.

TOMÉ, H. V. V.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A. P.; CAMPOS, L. A. O.; GUEDES, R. N. C. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PLoS ONE** 7(6): e38406, 2012.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**. v. 45, p. 247-268, 2005.

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.

VAN DER SLUIJIS, J. P.; SIMON-DELISO, N.; GOULSON, D.; MAXIM, L.; BONMATIN, J. M.; BELZUNCES, L. P. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, 5: 293-305. doi: 10.1016/j.co.sust.2013.05.007, 2013

VANBERGEN, A.J. The Insect Pollinators Initiative. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**. 11, 251-259. (doi:10.1890/120126), 2013.

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.

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

WIESNER, P.; KAYSER, H. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: relation to thiamethoxam action. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Hoboken, v. 14, n. 4, p. 221-230, 2000.

WRIGHT, G. A.; SOFTLEY, S.; EARNSHAW, H. Low doses of neonicotinoid pesticides in food rewards impair short-term olfactory memory in foraging-age honeybees. **Scientific Reports**. 5, 15322. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep15322>, 2015.

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

ZALUSKI, R.; KADRI, S. M.; ALONSO, D. P.; MARTINS RIBOLLA, P. E.; DE OLIVEIRA ORSI, R. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honeybees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 34(5):1062–1069, 2015.