

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

TOXICIDADE DE INSETICIDAS PARA ABELHAS *Apis mellifera* L.

THAÍS DE SOUZA BOVI

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU – SP

Abril -2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

TOXICIDADE DE INSETICIDAS PARA ABELHAS *Apis mellifera* L.

THAÍS DE SOUZA BOVI

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU - SP

Abril – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
- SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B783t Bovi, Thais de Souza, 1983-
Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.
/ Thais de Souza Bovi. - Botucatu : [s.n.], 2013
vii, 55 f. : il., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
2013

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Inclui bibliografia

1. Abelha. 2. Inseticidas. 3. Abelha - Comportamento.
4. Toxicidade - Testes. 5. *Apis mellifera* L. I. Orsi, Ri-
cardo de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

“Se as abelhas desaparecem da face da Terra, a humanidade seguirá o mesmo destino em um período de quatro anos.”

(Albert Einstein)

Dedico

Aos meus pais, Sérgio Roberto Bovi e Cleide Rangel de Souza Bovi, que são as pessoas mais importantes da minha vida, por quem agradeço todos os dias à oportunidade de ser filha. Pessoas de tamanha generosidade, que se entregaram ao amor e a educação dos filhos, fazendo o melhor que podiam a cada dia e nos dando sempre os exemplos mais sublimes de caráter, humanidade, lealdade, honestidade, amor... Pessoas que fizeram-me ser quem eu sou, apoiaram-me incondicionalmente em minha jornada, fizeram o que podiam e o que não podiam para alcançar os meus sonhos e acreditaram em minha capacidade. Pessoas que quero sempre encher de orgulho e dar o meu melhor. Amo vocês demais!!

Aos meus irmãos Gabriela e Juninho, meus primeiros e verdadeiros amigos, por todo amor, carinho e amizade, por iluminarem meus caminhos com a mais verdadeira felicidade do companheirismo.

Ao meu namorado Alexandre, por todo amor, carinho, tranquilidade, atenção e dedicação desses anos de cumplicidade. Muito obrigada por me apoiar e estar sempre ao meu lado!

Ao meu sobrinho Murillo, que me desperta os sentimentos mais puros e mesmo sem muito saber disso, e por existir, me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada por cada gracinha!!

Ao meu cunhado Fernando, por trazer tanta alegria à nossa família! Obrigada por participar da minha vida de forma tão especial!

Ao meu tio Luiz Carlos, sua esposa e seus filhos, por todo carinho, dedicação e incentivos transmitidos durante todos esses anos de estudo.

Aos animais, por todos eles, que transformaram a minha existência no momento o qual passei a reconhecê-los como iguais.

Agradeço

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade de estudar em um curso de excelência.

Ao CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador e amigo, Professor Doutor Ricardo de Oliveira Orsi, por ter me dado à oportunidade de ser sua orientada, por ter confiado e acreditado em mim, por todos os ensinamentos, pelo tempo a mim dedicado, atenção e paciência. Muito obrigada pela dedicação e compreensão, por me ajudar crescer pessoalmente e profissionalmente.

A todos os Professores da FMVZ/UNESP-Botucatu que participaram da minha formação, especialmente ao Professor Doutor Luiz Edivaldo Pezzato e à Professora Doutora Margarida Maria Barros, pelos ensinamentos recebidos em suas disciplinas e principalmente pelos recorrentes incentivos.

Ao Professor Doutor Edson Ramos de Siqueira e à Professora Doutora Simone Fernandes pela amizade, pelos ensinamentos e

por estarem sempre de portas abertas, dispostos a me ouvir, acolher, aconselhar e ensinar.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ/UNESP-Botucatu, Seila e Carlos, e ao secretário do Departamento de Produção Animal Renato, pelos serviços prestados.

Ao funcionário do setor de Apicultura Wilson Ricardo Moreno, por toda ajuda dispendida.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação, Adriana, Edson, Melina, Renata, Rodrigo e Samir, pela amizade, companheirismo, atenção, ajuda e é claro por todas as nossas confraternizações deliciosas.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram no acontecimento desta pesquisa e contribuíram para conclusão do mestrado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	01
Considerações iniciais.....	02
1. Abelhas <i>Apis mellifera</i> : histórico, castas e produtos.....	02
2. Importância da <i>Apis mellifera</i> para polinização.....	04
3. Agrotóxicos.....	07
3.1. Organofosforados.....	10
3.2. Piretróides.....	12
3.3. Carbamatos.....	15
3.4. Pirazóis.....	16
3.5. Neonicotinóides.....	18
Referências Bibliográficas.....	21
CAPÍTULO II.....	32
Resumo.....	33
Abstract.....	34
1. Introdução.....	35
2. Material e Métodos.....	36
2.1. Local do experimento e abelhas utilizadas.....	36
2.2. Agrotóxicos pesquisados.....	37
2.3. Testes de toxicidade.....	38
2.3.1. Teste de ingestão do agrotóxico.....	38
2.3.2. Teste de contato com o agrotóxico.....	38
2.4. Avaliação Comportamental.....	39
2.5. Análise dos Resultados.....	39
3. Resultados.....	39

4. Discussão.....	48
Agradecimentos.....	50
Referências.....	51
CAPÍTULO III.....	56
Implicações.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

	Página
Tabela 1. Grupos químicos dos inseticidas, nome comercial, e as doses utilizadas em $\mu\text{g}/\text{abelha}$ nos testes de contato e ingestão.....	37
Tabela 2. Médias e desvios padrão das doses letais (DL_{50}) dos inseticidas estudados para os testes de contato e ingestão de alimento contaminado ($\mu\text{g}/\text{abelha}$), para abelha <i>Apis mellifera</i> africanizadas.....	39
Tabela 3. Médias e desvios padrão do número de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após o teste de contato e ingestão com diferentes doses de Acefato.....	42
Tabela 4. Médias e desvios padrão do número de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após o teste de contato e ingestão com diferentes doses de Carbaril.....	43
Tabela 5. Médias e desvios padrão do número de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após o teste de contato e ingestão com diferentes doses de Cipermetrina.....	44
Tabela 6. Médias e desvios padrão do número de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após o teste de contato e ingestão com diferentes doses de Deltametrina.....	45

Tabela 7. Médias e desvios padrão do número de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após o teste de contato e ingestão com diferentes doses de Fipronil.....	46
---	-----------

Tabela 8. Médias e desvios padrão do número de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após o teste de contato e ingestão com diferentes doses de Imidacloprido.....	47
--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS**CAPÍTULO I**

	Página
Figura 1. Estrutura química do Acefato.....	11
Figura 2. Estrutura química da Cipermetrina.....	12
Figura 3. Estrutura química da Deltametrina.....	13
Figura 4. Estrutura química do Carbaril.....	15
Figura 5. Estrutura química do Fipronil.....	16
Figura 6. Estrutura química do Imidacloprido.....	19

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Abelhas *Apis mellifera*: histórico, castas e produtos.

Acredita-se que as abelhas surgiram há 30 milhões de anos, e que seu surgimento esteja intimamente ligado à evolução das plantas angiospermas (Pirani; Cortopassi-Laurino, 1993; Tautz, 2010). Durante o desenvolvimento da vida na Terra havia insetos, semelhantes às vespas atuais, que visitavam as flores para coletar néctar, a sua principal fonte de energia, e caçavam pequenos animais como fonte de proteína. Quando algumas dessas vespas substituíram a proteína animal de sua dieta pela proteína vegetal, isto é, passaram a consumir pólen, também iniciaram uma história de vida própria. Dessas vespas originaram-se as abelhas (Pirani; Cortopassi-Laurino, 1993).

A interação entre seres humanos e abelhas da espécie *Apis mellifera* L. é muito antiga. Gravuras em cavernas datadas de 7.000 anos a.C., mostram o homem colhendo mel de ninhos silvestres. A colheita era feita de modo extrativista, sem qualquer cuidado com a fragilidade dos ninhos, causando injúrias à longevidade dos enxames (Crane, 1999). Com o passar dos anos, e devido à demanda por mel, as abelhas foram sendo cultivadas pelo homem, e gradativamente, tecnologias foram inseridas nessa atividade. Deste modo, atualmente, a criação de abelhas *Apis mellifera* L. é denominada apicultura, e é realizada de modo racional, ou seja, busca o aproveitamento de seus produtos com o uso de tecnologias que visam manter a integridade dos enxames.

A *Apis mellifera* L. originou-se na África e, em seguida, em pelo menos dois eventos diferentes e anteriores à chegada do *Homo sapiens*, migraram para Ásia e Europa, diferenciando-se em pelo menos duas dúzias de subespécies fisiologicamente, comportamentalmente e morfológicamente distintas. O cultivo das abelhas pelo homem, no entanto, também minou diferentes subespécies por meio de hibridação intraespecífica, especialmente em regiões como o Continente Americano, onde *Apis mellifera* L. não era nativa (Parker et al., 2010).

No Brasil, as abelhas chegaram no século XIX junto com a imigração europeia. Foi no ano de 1839 que o Padre Antônio Carneiro trouxe para o Rio de Janeiro as primeiras abelhas europeias da subespécie *Apis mellifera mellifera* (abelhas pretas). Em 1879, imigrantes alemães trouxeram para o Rio Grande do Sul as abelhas *Apis mellifera*

ligustica. Outras subespécies também foram trazidas por imigrantes europeus, disseminando-se, assim, as abelhas *Apis mellifera* L. por todo território brasileiro (Wiese, 2005).

Desde a entrada das abelhas *Apis mellifera* L. a apicultura nacional tem apresentado crescente desenvolvimento, favorecido pela extensão da área brasileira, floradas diversificadas e clima propício que possibilitam elevada produção e manejo durante todo o ano (Couto; Couto, 2002). Porém, foi com a introdução da abelha *Apis mellifera scutellata* (abelha africana), em 1956, que a apicultura nacional obteve significativo avanço tecnológico e produtivo. Em 1957, 26 enxames, com suas respectivas rainhas africanas, escaparam e acasalaram, naturalmente, com as abelhas europeias, gerando populações poli-híbridas, denominadas abelhas africanizadas. Essas abelhas dispersaram-se por toda América do Sul (com exceção do Chile) e América Central, chegando ao México em 1986 e ao sul da Califórnia em 1994 (Mello et al., 2003).

Um enxame de abelhas *Apis mellifera* L. é constituído, em média, por milhares de abelhas operárias, algumas centenas de zangões e apenas uma abelha rainha. Essas três diferentes castas apresentam um nível extraordinário de organização para o trabalho. Cabe a abelha rainha a manutenção da coesão do enxame, a cópula com o zangão durante o voo nupcial e a postura diária de milhares de ovos, garantindo o nascimento de novos indivíduos. O zangão é o responsável por fecundar a abelha rainha. E a maior parte dos trabalhos da colmeia é responsabilidade das abelhas operárias, que dividem as tarefas de acordo com sua idade fisiológica. Do 1° ao 3° dia de vida fazem a limpeza de qualquer sujidade que exista dentro da colmeia. Do 4° ao 12° dia alimentam as larvas, produzem geleia real e alimentam a rainha, providenciam a criação de novas rainhas, caso seja necessário. Do 13° ao 18° dia produzem cera e constroem os favos. Do 19° ao 20° dia ficam de guarda no alvado, defendendo seu território contra qualquer invasão. E, finalmente, do 21° dia em diante as abelhas operárias fazem os serviços externos no campo, colhem resinas, pólen, néctar e água, os quais são recursos de manutenção dos enxames e tornam-se produtos importantes para a produção apícola (Weise, 2005).

Atualmente, além do mel, outros produtos também podem ser obtidos por meio da apicultura, como o pólen, a própolis, a geleia real, a cera e o veneno. Além de

fornecer todos os produtos citados, as abelhas ainda contribuem ao meio ambiente com seus serviços de polinização. Por possuírem hábito generalista, ou seja, visitam uma ampla variedade de flores, as abelhas *Apis mellifera* L. polinizam as mais variadas culturas, sendo considerada a principal espécie polinizadora de culturas agrícolas no mundo, capazes de forragear uma área de 712 ha. É, portanto a espécie mais indicada para a polinização de culturas de interesse comercial (Seeyle, 1985; Whitfield et al., 2006).

2. Importância da *Apis mellifera* para polinização

Ao forragear as plantas, em busca de alimento (pólen e néctar), as abelhas operárias campeiras promovem a reprodução cruzada dos vegetais, aumentando o vigor das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e melhorando a produção de frutos e sementes (Couto; Couto, 2002). A polinização trata-se de um processo fundamental para a perpetuação das mais variadas espécies vegetais. Nesse sentido, a presença de polinizadores é imprescindível para o sucesso da reprodução das plantas em qualquer ecossistema, incluindo os agrícolas (Chambó et al., 2010). Em torno de 75% das espécies vegetais existentes são dependentes de agentes polinizadores (água, vento, animais, etc); no entanto, as abelhas são consideradas os principais polinizadores, sendo responsáveis por realizar a reprodução cruzada de 73% de todas as espécies vegetais cultivadas no mundo (Ricketts et al., 2008).

Nesse contexto, o homem desenvolveu técnicas que lhe permitiram aproveitar o serviço de polinização das abelhas. Através da apicultura migratória, grande número de enxames pode ser transportado para as culturas de interesse econômico, onde melhoram consideravelmente a produção dos frutos (Souza et al., 2007). A natureza e a extensão desses benefícios podem variar entre as culturas, os quais vão desde aumento em quantidade e qualidade de frutos e/ou sementes, como também da diversidade genética entre vegetais (Breeze et al., 2011).

Embora algumas culturas sejam totalmente independentes da polinização promovida por insetos, ou seja, são auto-férteis, como a colza (*Brassica napus*) e pepino (*Cucumis sativus*), outras, no entanto, são dependentes de polinizadores para sua frutificação, como por exemplo, a maçã (*Mallus comunis*) e o melão (*Cucumis melo*);

portanto, na ausência de polinizadores essas culturas tornam-se improdutivas (Potts et al., 2010; Breeze et al., 2011).

Muitos trabalhos relatam os benefícios da polinização promovida por abelhas em diversas culturas. Trindade et al. (2004) mostraram que a presença de abelhas *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro é muito importante, sendo que na sua ausência não houve produção. Malerbo-Souza et al. (2003) observaram alta atratividade da flor de laranjeira (*Citrus* spp.) para as abelhas melíferas e que a polinização realizada por elas influenciou quantitativamente e qualitativamente a produção de laranjas, sendo os frutos avaliados mais pesados, menos ácidos e com maior quantidade de sementes por gomos. Neste mesmo trabalho, verificaram que a polinização por abelhas *Apis mellifera* em cultura de café (*Coffea arabica* L., var. Novo Mundo) provocou aumento quantitativo na produção de grãos. Chiari et al. (2005) estudaram a polinização por abelhas em cultura de soja (*Glycine max* L. Merrill), e constataram que o tratamento com os polinizadores aumentaram a produção de sementes e o número de vagens em 50,64% e 61,38%, respectivamente, quando comparados ao tratamento sem a presença das abelhas melíferas.

Oz et al. (2009), pesquisaram a polinização por abelhas *Apis mellifera* em cultura de girassol (*Helianthus annuus* L.) tendo registrado aumento de 206 a 226% no rendimento de sementes quando comparado com tratamentos sem a presença de abelhas. Ish-Am; Lahav (2011) em trabalho comparativo da polinização promovida pelo vento e por abelhas *Apis mellifera* em cultura de abacate (*Persea americana* Mill), verificaram correlação altamente positiva entre produção de frutas e densidade de abelhas na cultura, enquanto que apenas a presença de vento não resultou em nenhuma correlação.

Devido aos muitos benefícios gerados aos frutos, a polinização das culturas comerciais feita por abelhas *Apis mellifera* resulta em valores importantes para a economia agrícola mundial. Potts et al. (2010) descreveram a polinização promovida por abelhas como um importante insumo agrícola. Os autores relataram que em 2005 o valor econômico global da polinização por insetos gerou cerca de 153 bilhões de euros (9,5% do valor total da produção agrícola mundial). Nos Estados Unidos a polinização por *Apis mellifera* gerou US\$ 14,6 bilhões e, no Reino Unido, estimou-se o ganho de 400 milhões de euros por ano com os serviços de polinização (Breeze et al., 2011).

Em números globais, desde 1961, as áreas ocupadas com culturas dependentes da polinização por abelhas aumentaram em 300%, enquanto o número mundial de colmeias aumentou 45%, no mesmo período. Esses dados demonstram que a demanda mundial por polinização cresce mais que a oferta de polinizadores, sugerindo que a ausência destes pode limitar a produção agrícola no futuro, trazendo sérios prejuízos econômicos e ainda causar declínio paralelo de muitas espécies vegetais (Aizen; Harder, 2009).

Embora seja constatado um aumento global no número de colmeias de abelhas *Apis mellifera* L., em termos regionais, observa-se a diminuição desses polinizadores. Em determinadas regiões esse desaparecimento das abelhas é bem documentado. Na Europa, dentro do período que compreende de 1985 a 2005, observou-se a perda de 25% das colônias de *Apis mellifera* L., sendo que na Espanha, dados decorrentes da última década apontam perdas de 80%. Nos Estados Unidos os dados apontam severas perdas; entre os anos de 1947 a 2005, o número de colônias decresceu 59% (Bernal et al., 2010; Potts et al., 2010).

Muitos fatores podem ser associados ao declínio das abelhas *Apis mellifera* L., um único fator não pode ser responsável por todas as perdas observadas (Pereira, 2010). Dentre eles, pode-se destacar: 1- queimadas e desmatamento de áreas com vegetação nativa para implantação e/ou expansão de cidades ou áreas agrícolas, intensificando a agricultura e levando a perda do habitat das abelhas; 2- uso inadequado de práticas de cultivo, como a utilização abusiva de agrotóxicos, principalmente nas áreas de monoculturas, sendo este último o fator mais impactante para os polinizadores. A implementação desse método de cultivo elimina consideravelmente muitas espécies de plantas nativas, as quais fornecem néctar, pólen, locais de descanso, nidificação e reprodução aos insetos (Freitas et al., 2009). Normalmente, as monoculturas florescem por um curto período de tempo, reduzindo a disponibilidade de alimento e promovendo queda no número e diversidade de polinizadores (Larsen et al., 2005).

Outro fator que é vinculado à perda dos polinizadores é a DCC (Colony Collapse Disorder ou em português “Distúrbio de Colapso das Colônias”), caracterizada por grande perda de abelhas operárias, sem a presença de abelhas mortas no interior ou nas proximidades da colmeia, presença de alimento dentro do ninho e abandono das crias. A DCC foi relatada pela primeira vez por apicultores dos Estados Unidos no inverno de

2006-2007, os quais perderam em média 45% de suas colmeias (Cox-Foster et al., 2007). A DCC também foi identificada na Alemanha, Suíça e Península Ibérica (Souza, 2009). Desde então, muito se especula sobre as causas que levam ao aparecimento da DCC nas colmeias. Acredita-se que muitos fatores estressantes atuam sozinhos ou em conjunto, enfraquecendo a colônia (Pereira, 2010). As explicações vão desde radiação emitida por telefones celulares, culturas geneticamente modificadas, pragas, doenças ocasionadas por vírus e bactérias, fatores ambientais e uso abusivo de agrotóxicos, sendo essa última explicação a que recebeu mais atenção da ciência mundial (Ratnieks; Carreck, 2010). Mullin et al. (2010) relataram haver uma associação direta entre a exposição das abelhas aos agrotóxicos, a ocorrência da DCC e o declínio dos polinizadores. Segundo Souza (2009), uma das hipóteses ao surgimento da DCC é a intoxicação das abelhas por inseticidas, cada vez mais utilizados na agricultura.

3. Agrotóxicos

A ocupação dos campos de cultivo por uma única espécie vegetal favorece o aparecimento de pragas e doenças, o que torna a agricultura moderna cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos (Coutinho et al., 2005). Estes produtos podem entrar na cadeia solo-água-planta, representando uma perigosa fonte direta e indireta de contaminação para as abelhas e outros seres vivos. A apicultura, no entanto, é uma atividade dependente das plantas cultivadas ou da mata local como fonte de néctar e pólen, ficando as abelhas expostas aos poluentes que são liberados no ambiente em que vivem, causando intoxicação e contaminação de seus produtos. Com isso, devido a dependência da produção agrícola por agrotóxicos, novos defensivos surgem para aumentar a produtividade das culturas, e podem estar relacionados com a CCD (Pereira, 2010).

Os agrotóxicos cumprem o papel de proteger as culturas agrícolas das pragas, doenças e plantas daninhas. Entretanto, quando disseminados no ambiente, podem causar sérios danos, levando até mesmo à alteração da dinâmica natural de pressão de seleção exercida sobre os organismos, tendo como consequência, mudanças no ecossistema afetado (Spadotto, 2006). Apesar da seriedade dessa afirmação, os agrotóxicos são encontrados hoje em diversas partes do planeta, em locais onde não

foram diretamente aplicados, como também em águas superficiais, subterrâneas, pluviais (Vighi; Funari, 1995), na atmosfera (mesmo distante de áreas agrícolas) (Laabs et al., 2002), orvalho, neve do ártico e névoa do oceano (Glotfelty et al., 1987). Esses fenômenos ocorrem devido ao transporte do agrotóxico pelo vento durante a aplicação. No entanto, a ausência de vento também pode ser prejudicial pelo fato das gotas muito finas ficarem presas no ar devido a estabilidade atmosférica, dispersando-se até vários quilômetros do local da aplicação, sendo, muitas vezes, somente removidas da atmosfera pela ação da chuva (Spadotto, 2006).

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Em 2006 atingiu o patamar de terceiro maior consumidor mundial, e em 2008 assumiu a liderança, superando os Estados Unidos (Lira, 2010). Neste mesmo ano, o Brasil consumiu 730 milhões de toneladas de agrotóxicos (Nocelli et al., 2010).

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (SINDAG), as vendas de agrotóxicos em 2011 aumentaram 10% em relação ao ano de 2010, impulsionadas principalmente pelas culturas de soja, cana, milho, algodão, café e pastagem. Dentro do segmento dos herbicidas, o consumo cresceu nos mercados de cana-de-açúcar, soja, algodão, milho, feijão e pastagem; no segmento dos fungicidas o crescimento ocorreu nos mercados das culturas de café, soja, algodão, trigo e feijão; e para os inseticidas a maior venda foi para culturas de soja, cana-de-açúcar, algodão, café e citros.

Dentre os principais tipos de agrotóxicos utilizados na agricultura, os mais consumidos são os herbicidas, seguidos dos inseticidas, fungicidas e acaricidas (Jardim; Andrade, 2009). Embora os herbicidas sejam mais utilizados, em geral a toxicidade deste grupo de substâncias é inferior à dos inseticidas (Delgado; Paumgarten, 2004).

De modo geral, os inseticidas (aproximadamente 90%) são neurotóxicos, ou seja, danificam o sistema nervoso central, especificamente na transmissão dos impulsos nervosos pelas células nervosas (Pereira, 2010).

A condução do impulso nervoso ao longo das células nervosas é dependente da concentração dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- ; entretanto, para os estímulos nervosos serem propagados de uma célula para outra (sinapses) é necessária a ação de neurotransmissores. A acetilcolina e o ácido gama-aminobutírico (GABA) são os principais neurotransmissores dos insetos (Dowson, 1977).

A enzima acetilcolinesterase interrompe a transmissão dos impulsos nervosos por meio da hidrólise da acetilcolina em colina e acetato (Guiloski et al., 2010). Os inseticidas das classes dos organofosforados e carbamatos são inibidores da acetilcolinesterase, ocasionando acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, sendo o sistema nervoso superestimulado, ocorrendo impulsos contínuos e descontrolados, levando a hiperexcitação do sistema nervoso central e morte do animal (Lira, 2010).

Os inseticidas neonicotinóides atuam na propagação do impulso nervoso. Essas substâncias competem com a acetilcolina. E, ao contrário da ligação natural da acetilcolina com seu receptor, a ligação entre os neonicotinóides e os receptores de acetilcolina é irreversível, já que os neonicotinóides são insensíveis à ação da enzima acetilcolinesterase. A ativação dos receptores de acetilcolina é prolongada de modo anormal, causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos. Os sintomas da intoxicação por neonicotinóides são semelhantes aos causados por carbamatos e organofosforados, incluindo tremores, colapso do sistema nervoso e morte (Faria, 2009).

O GABA é o neurotransmissor mais importante do sistema nervoso central, pois cerca de 30% das sinapses neurais dos insetos são GABAérgicas (Mohler et al., 2004). Os inseticidas pirazóis competem com o GABA, impedindo a transmissão do impulso nervoso normal, resultando em atividade neural excessiva, paralisia e morte do inseto (Manrique, 2009).

Alguns inseticidas, como os piretróides, atuam alterando as propriedades de propagação do íon Na^+ , o qual é essencial para a geração e propagação do impulso nervoso, causando, assim, sintomas de envenenamento como hiperexcitação, ataxia, convulsões, hipersensibilidade, tremores e paralisias (Soderlund et al., 2002).

O uso desses inseticidas no campo se deve a sua rápida ação no combate às pragas, por atuarem em locais ultra-sensíveis, que mesmo o menor dano pode resultar em efeitos letais (Pereira, 2010). Gill et al. (2012) afirmaram que a exposição simultânea à diferentes inseticidas podem gerar efeitos combinatórios das substâncias, com consequências ainda mais graves aos enxames. Deste modo, diversos autores associaram essas classes de inseticidas ao desaparecimento das abelhas *Apis mellifera*.

Um método clássico para avaliar a toxicidade de substâncias tóxicas às abelhas é por meio da determinação da DL_{50} (dose letal média capaz de exterminar 50% de uma

população) (Pereira, 2010). Métodos oficiais de condução desses testes são descritos por protocolos da OECD (1998). Nesses testes, agrotóxicos podem ser aplicados topicamente ou oralmente, e a mortalidade é registrada 24 e/ou 48 horas após o início das aplicações (Pereira, 2010).

Comumente, observa-se na literatura, diferenças nos valores de DL_{50} obtidos para um mesmo agrotóxico; essas diferenças podem ser atribuídas a diversos fatores que influenciam os testes, como a variabilidade genética de cada população de abelha testada, variações climáticas locais e manipulação do pesquisador (Pereira, 2010).

Segundo Johansen; Mayer (1990), agrotóxicos com DL_{50} inferior a $2\mu\text{g}/\text{abelha}$ são considerados extremamente tóxicos às abelhas *Apis mellifera*.

3.1. Organofosforados

Os inseticidas organofosforados compõem uma das classes mais importantes usadas no controle de pragas, juntamente com os carbamatos e piretróides, e respondem por cerca de 40% do mercado de agrotóxicos. São ésteres derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosfínico e fosforâmídico (Lira, 2010).

Os organofosforados apresentam toxicidade variável de baixa à alta para animais superiores e são, normalmente, bem mais tóxicos para vertebrados do que os organoclorados. Esses agrotóxicos causam severos danos ao sistema nervoso dos indivíduos contaminados, inibindo irreversivelmente a ação da enzima acetilcolinesterase (Coutinho et al., 2005). Neste tipo de inibição as enzimas são definitivamente inativadas, destruindo seus grupos funcionais essenciais, sendo progressiva, ou seja, aumentando com o tempo, até atingir seu máximo (Lira, 2010).

A toxicidade dos agrotóxicos organofosforados às abelhas *Apis mellifera* L. é relatada por diversas pesquisas. Smirle (1993) verificou que esses inseticidas interferem na divisão de trabalho da colmeia, diminuindo a longevidade do enxame em até 20%. Pettis et al. (2004), aplicaram diferentes doses do organofosforado Coumafós em realeiras contendo larvas de abelha rainha; aquelas que receberam a dose de 1000 mg/kg não se desenvolveram, 50% das realeiras tratadas com 100mg/kg foram rejeitadas pelas operárias e o restante apresentou baixo peso corporal. Guez et al. (2005) observaram que o inseticida organofosforado Metil Paration, aplicado

topicamente na dose de 0,010µg/abelha, causou diminuição da frequência de visitação à fonte de alimento. Freitas; Pinheiro (2010) relataram que os organofosforados afetam a habilidade das abelhas em comunicar às outras abelhas da colmeia o local da fonte de alimento por meio da “dança do oito”, por impedir a orientação do ângulo.

Pertencente ao grupo dos organofosforados, o inseticida Acefato é classificado como altamente perigoso ao meio ambiente; mesmo assim é utilizado na proteção contra pragas de muitas culturas agrícolas, como algodão, amendoim, batata, brócolis, citros, couve, couve-flor, crisântemo, fumo, melão, pimentão, repolho, rosa, soja e tomate, e ainda é utilizado no tratamento de sementes de algodão e feijão destinadas ao plantio (Mapa, 2012).

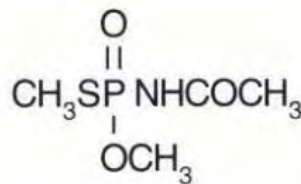


Figura 1: Estrutura química do Acefato

Fonte: Anvisa, 2012

Alguns autores demonstraram a toxicidade do inseticida Acefato às abelhas *Apis mellifera*. Batista et al. (2009) expuseram abelhas operárias à dose de 7,5µg do inseticida Acefato por meio de contato, pulverização e alimento contaminado. Os autores verificaram, em todos os tratamentos, que após 24h de exposição, mais de 90% das abelhas contaminadas foram mortas, concluindo que o Acefato foi altamente tóxico. Danka et al. (1992) forneceram xarope de açúcar contaminado com inseticida para 16 colmeias de abelhas *Apis mellifera*; ao final de 3 semanas apenas 6 colmeias sobreviveram aos tratamentos.

Johansen; Mayer (1990) testaram a dose letal média do agrotóxico Acefato às abelhas *Apis mellifera*, encontrando o valor de DL₅₀ 1,2µg/abelha, mostrando a alta toxicidade desta substância.

3.2. Piretróides

Os inseticidas da classe dos piretróides são derivados sintéticos das piretrinas, que são ésteres tóxicos isolados das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas. As piretrinas naturais são instáveis à luz solar e ao sol, o que diminui sua eficácia no controle de pragas da agricultura e outros insetos. As piretrinas sintéticas foram originadas com o intuito de obter substâncias com maior estabilidade e potencial inseticida. Assim foram feitas mudanças na estrutura química desses compostos, adicionando-se átomos de nitrogênio, enxofre e átomos de halogênios (Chen; Wang, 1996).

Atualmente, os piretróides são inseticidas largamente utilizados, devido ao fato de apresentarem características favoráveis, como por exemplo, baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental, efetividade contra um largo espectro de insetos e necessidade de baixas quantidades para exercerem sua ação. No entanto, ensaios laboratoriais demonstraram que os piretróides são muito tóxicos para peixes, abelhas, camarões e lagostas, podendo agir em espécies não alvo, devido a erros durante a aplicação nas culturas (Santos et al., 2007).

Os piretróides são neurotoxinas lipofílicas, rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal após a administração oral, ou pelo trato respiratório por meio da inalação de pó ou spray. Após absorvidos, os piretróides espalham-se por todo corpo. A toxicidade e o mecanismo de ação do piretróide dependerão de sua estrutura química (Soderlund et al., 2002).

A Cipermetrina e a Deltametrina são dois exemplos de piretróides comumente utilizados em culturas de interesse comercial (Figuras 2 e 3):

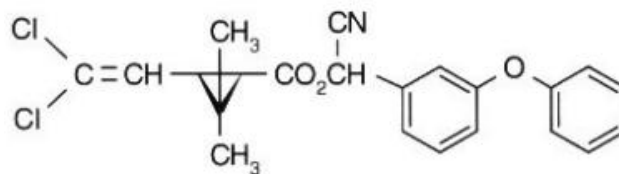


Figura 2: Estrutura química da Cipermetrina

Fonte: Anvisa, 2012

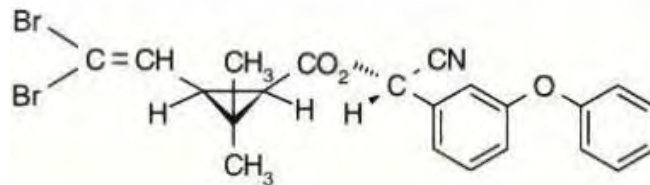


Figura 3: Estrutura química da Deltametrina

Fonte: Anvisa, 2012

Os piretróides sintéticos podem ser estruturalmente divididos em dois grupos segundo a ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupo ciano (CN) na porção fenoxibenzil (Santos et al., 2007). A Cipermetrina e a Deltametrina são piretróides tipo II (Decourtye et al., 2004). Essas substâncias agem preferencialmente no sistema nervoso central, induzindo sintomas de intoxicação; em ratos observa-se hipersensibilidade, salivação abundante, agitação das patas anteriores, movimentos de escavar e tremores periódicos (Santos et al., 2007).

A Cipermetrina e Deltametrina são utilizadas em muitas culturas de interesse comercial. A Cipermetrina é aplicada na área foliar das culturas de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate; também é aplicada no solo, na cultura do fumo. A Deltametrina é utilizada nas partes aéreas das culturas de abacaxi, algodão, alho, ameixa, amendoim, arroz, batata, berinjela, brócolis, café, caju, cebola, citros, couve, couve-flor, crisântemo, eucalipto, feijão, feijão-vagem, figo, fumo, gladiolo, maçã, melancia, melão, milho, pastagem, pepino, pêssego, pimentão, repolho, soja, sorgo, tomate e trigo (Mapa, 2012).

Devido a grande variedade de culturas em que a Cipermetrina e a Deltametrina são aplicadas, a contaminação das abelhas *Apis mellifera* com essas substâncias é muito comum. Assim, diversos autores relataram os efeitos desses piretróides na fisiologia, comportamento e sobrevivência das abelhas.

Decourtye et al. (2004) investigaram os efeitos da Deltametrina em abelhas operárias, e verificaram que o inseticida diminuiu a atividade de forrageamento, além de apresentar efeito letal para abelhas operárias. Carvalho et al. (2009) constataram que a

pulverização de Deltametrina em abelhas (na concentração de 50mL de Deltametrina em 100 mL de água), fez com que os insetos ficassem no fundo das gaiolas com movimentos desordenados e trêmulos, características atribuídas ao efeito de choque denominado “*knock down*”, o qual também é caracterizado por agir com rapidez, causar paralisia e mortalidade dos indivíduos contaminados. Esses mesmos autores observaram que abelhas tratadas com alimento contaminado e abelhas que entraram em contato com superfícies contaminadas com Deltametrina, tiveram letalidade registrada de 67% e 64%, respectivamente, demonstrando a toxicidade deste piretróide às abelhas *Apis mellifera*. Dai et al. (2010), verificaram que a Deltametrina, em doses subletais reduziu a fecundidade da abelha rainha e diminuiu o ritmo de desenvolvimento das abelhas jovens até a idade adulta. Doses subletais de Deltametrina afetam a coordenação e a musculatura das abelhas, comprometendo o retorno à colmeia (Freitas; Pinheiro, 2010).

Taylor et al. (1987) avaliaram o efeito do piretróide Cipermetrina no aprendizado de abelhas melíferas, por meio do condicionamento clássico de reflexo de extensão da probóscide, e constataram que as abelhas contaminadas com o agrotóxico aprenderam em um ritmo mais lento e tiveram apenas 60% de respostas positivas, enquanto o tratamento controle apresentou 90%. Bendahou et al. (1999) verificaram aumento na taxa de reposição de rainhas em colônias de abelhas *Apis mellifera* tratadas com dietas contendo doses subletais de Cipermetrina, provavelmente devido à interferência do inseticida sobre a capacidade das abelhas identificarem o feromônio liberado pela rainha.

Alguns autores determinaram valores de dose letal média da Deltametrina para as abelhas. Smart; Stevenson (1982) encontraram valor para DL₅₀ de contato igual a 0,051µg/abelha. O relatório da European Commission (2002) registrou DL₅₀ de ingestão = 0,079µg /abelha e de contato igual a 0,0015µg/abelha.

Os resultados de DL₅₀ de ingestão para Cipermetrina variam de 0,020 a 0,160µg/abelha (Bendahou et al., 1999; European Comission, 2005). As DL₅₀ de contato variam entre 0,020 a 0,124µg/abelha (European Comission, 2005; Carrasco-Letelier et al., 2012).

3.3. Carbamatos

Os agrotóxicos da classe dos carbamatos são ésteres do ácido carbâmico. A ação tóxica dessa classe de inseticidas está associada à inibição da acetilcolinesterase de maneira reversível (Guiloski et al., 2010).

A inibição enzimática do tipo reversível leva à formação de um complexo em um sistema em equilíbrio, no qual a enzima apresenta um grau definido de inibição, que depende da concentração e dos reagentes no meio (inibidor- inseticida e substrato- acetilcolina), permanecendo constante a partir de um determinado tempo. Como o processo é reversível, a simples adição de maior quantidade de substrato (acetilcolina) pode deslocar o equilíbrio de modo a favorecer a formação enzima-substrato, diminuindo a probabilidade do inibidor ligar-se à enzima (Lira, 2010).

Contudo, mesmo os carbamatos sendo inibidores reversíveis da acetilcolinesterase, as intoxicações por essas substâncias podem ser igualmente graves como os organosforados (Funasa, 2003).

Entre os principais compostos carbamatos encontra-se o agrotóxico Carbaril (1-naftil metilcarbamato), inseticida de largo espectro, usado para controlar mais de 100 espécies em culturas (como citrus, nozes e tomate), gramados e florestas, sendo também usado como moluscicida e acaricida (Garbellini; Uliana, 2007).

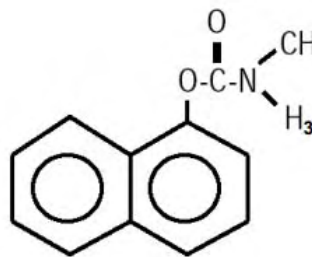


Figura 4: Estrutura química do Carbaril

Fonte: Anvisa, 2012

Nation et al. (1986) submeteram abelhas melíferas à exposição crônica por carbamatos via dieta artificial, e constataram que os inseticidas afetaram a divisão de trabalho nas colmeias. Helson et al. (1994) estudaram a toxicidade do Carbaril a quatro

espécies de abelhas da ordem Hymenoptera e superfamília Apoidea (*Apis mellifera*, *Andrena erythronii*, *Megachile rotundata* e *Bombus terricola*), e concluíram que a *Apis mellifera* é mais susceptível ao carbaril quando comparada com as outras espécies, devido apresentarem o menor valor para DL₅₀. Akca et al. (2009) fizeram um estudo para examinar a toxicidade de sete inseticidas (Lambda-cialotrina, Furatiocarbe, Carbaril, Carbosulfan, Benfurocarbe, Metiocarbe e Azadiractina) às abelhas *Apis mellifera*; além de apresentar efeito nocivo aos animais testados, o Carbaril mostrou efeitos tóxicos mais rapidamente que os outros inseticidas.

Embora existam poucas pesquisas na literatura, nacional e internacional, que demonstrem os efeitos causados pelo Carbaril em abelhas *Apis mellifera* L., alguns autores encontraram resíduos desse inseticida no mel, cera e pólen, evidenciando o contato das abelhas com esse agrotóxico. Khan et al. (2004) encontraram resíduos de Carbaril em amostras de mel provenientes de colmeias de *Apis mellifera* na Índia. Mullin et al. (2010) encontraram, entre os anos de 2007 e 2008, em apiários de 23 estados Norte-Americanos, altos níveis de Carbaril na cera e no pólen, inferindo que a presença desses venenos contribuem para o declínio dos polinizadores.

3.4. Pirazóis

O Fipronil é um inseticida que pertence à classe dos pirazóis, os quais são compostos heterocíclicos aromáticos (Neto et al., 2008).

A elevada toxicidade dessa substância para as abelhas é devida sua alta afinidade pelos receptores dos insetos quando comparado aos receptores GABA de mamíferos, o que resulta em maior toxicidade para os primeiros que para os últimos (Martins, 2009).

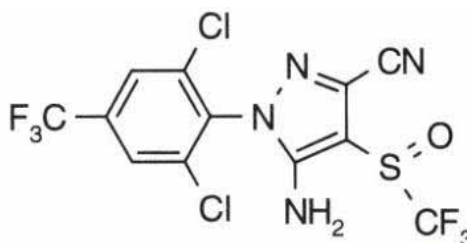


Figura 5: Estrutura química do Fipronil

Fonte: Anvisa, 2012

Em países europeus, como a França, o inseticida Fipronil foi proibido por apresentar alta toxicidade para muitos animais, especialmente às abelhas, causando baixas de até 40% nos apiários franceses (Souza, 2009). Contudo, no Brasil, o Fipronil ainda é muito utilizado em culturas de batata, cana-de-açúcar, milho, algodão, arroz, eucalipto, soja, cevada, feijão, pastagens e trigo (Mapa, 2012).

Diversos autores demonstraram a toxicidade do Fipronil para as abelhas *Apis mellifera* L. Hassani et al. (2005) estudaram a influência de doses subletais de fipronil na aprendizagem olfativa de abelhas *Apis mellifera* L., e verificaram redução significativa à dose de 0,001 µg/abelha, aplicada topicamente. Os autores evidenciaram que o neurotransmissor GABA está intimamente relacionado com a percepção olfativa das abelhas. Abelhas recém-nascidas expostas a doses subletais de Fipronil (0,0001 e 0,00001µg/abelha), por contato e ingestão, apresentaram comprometimento na aprendizagem olfatória; aquelas tratadas com 0,0001 µg/abelha morreram após 7 dias de exposição e com 0,00001µg/abelhas ingeriram mais água que os outros tratamentos e apresentaram seus movimentos comprometidos, permanecendo muito tempo imóvel (Aliouane et al., 2009).

Existem trabalhos que demonstraram efeitos sinérgicos da contaminação simultânea por agentes químicos (Fipronil) e biológicos em abelhas *Apis mellifera*, cujos autores enfatizaram que a combinação desses fatores torna-se muito severa, e que está intrinsecamente ligada ao declínio da população de abelhas observado nos últimos anos. Vidau et al. (2011) e Aufavre et al. (2012) realizaram pesquisas com abelhas infectadas simultaneamente com doses subletais de Fipronil e com o parasita *Nosema ceranae*. Constataram efeito sinérgico dos estressores (químico e biológico) na sobrevivência das abelhas, principalmente em recém-nascidas.

O plantio de culturas com sementes tratadas com Fipronil também demonstraram efeitos negativos para abelhas. Bernal et al. (2011) verificaram que as colmeias que coletaram pólen de girassol plantado com sementes tratadas com Fipronil ficaram mais susceptíveis ao ácaro *Varroa destructor*, sugerindo que a combinação desses agentes patológicos pode aumentar o risco de morte das colônias infectadas.

Cruz et al. (2010) em busca de maior compreensão da toxicologia desse inseticida, estudaram as alterações morfológicas em abelhas tratadas com doses

subletais do Fipronil, verificando morte das células do intestino médio em abelhas alimentadas com 0,1 e 1 µg/g.

O comportamento de locomoção das abelhas é uma atividade importante para o forrageamento em busca de recursos para a colônia. Souza (2009) estudou os efeitos do inseticida Fipronil no comportamento de locomoção de abelhas tratadas topicamente com doses letais e subletais, verificando que apenas o grupo tratado com 0,001 µg/abelha de Fipronil (dose letal) diferiu. Contudo, Hassani et al. (2005) não encontraram diferenças significativas na atividade locomotora de abelhas tratadas com doses subletais de Fipronil (0,001, 0,0005 ou 0,0001 µg/abelha, aplicadas topicamente ou por ingestão).

Valores de DL₅₀ de ingestão do inseticida Fipronil em abelhas melíferas variam de 0,00327 a 0,013 µg/abelha (Mayer; Lunden, 1999; Decourtye, 2002; Souza, 2009); e as DL₅₀ de contato encontradas estão entre 0,000157 a 0,013 µg/abelha (Mayer; Lunden, 1999; Tingle et al. 2003; Souza, 2009).

3.5. Neonicotinóides

Os neonicotinóides representam o principal grupo de inseticidas lançado nas últimas três décadas. Assim como a nicotina, os neonicotinóides atuam como agonistas da acetilcolina. Entretanto, ao contrário da nicotina eles são seletivos dentro da classe Insecta, ou seja, a afinidade entre os receptores colinérgicos e neonicotinóides é muito maior em insetos que em mamíferos, sendo o produto mais tóxico para os primeiros (Carvalho, 2008).

O Imidacloprido é um exemplar do grupo dos inseticidas neonicotinóides. Desde sua introdução nos anos 1990, seu uso aumentou consideravelmente (Blaquière et al., 2012). Atualmente, talvez seja o inseticida mais utilizado no mundo no controle de pragas e doenças agrícolas (Freitas; Pinheiro, 2010). No Brasil, o Imidacloprido é registrado para uso em grande número de culturas, podendo ser utilizado em sementes de algodão, amendoim, arroz, aveia, cevada, feijão, milho, soja e trigo. Também é aplicado na área foliar de abacaxi, abóbora, abobrinha, alface, algodão, alho, almeirão, batata, berinjela, brócolis, cebola, chicória, citros, couve, couve-flor, crisântemo, feijão,

fumo, gérbera, girassol, jiló, melancia, melão, pepino, pimentão, repolho, soja, sorgo e tomate, e ainda no solo das culturas de cana-de-açúcar, café, fumo e uva (Mapa, 2012).

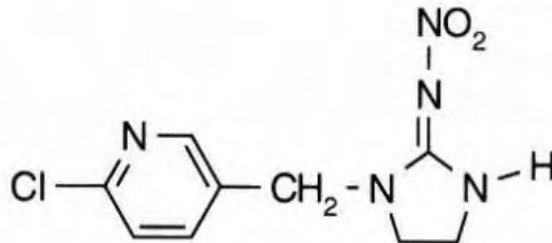


Figura 6: Estrutura Química do Imidacloprido

Fonte: Anvisa, 2012.

A aplicação do Imidacloprido em sementes e nas áreas foliares das culturas deixa resíduos no pólen e néctar; dessa maneira, as abelhas melíferas estão potencialmente expostas a essa perigosa contaminação (Blacquièrre et al., 2012).

A literatura internacional traz inúmeras pesquisas demonstrando os malefícios que os neonicotinóides em geral causam às abelhas melíferas. Isto significa que existe uma grande preocupação mundial com esses produtos tóxicos, os quais vêm sendo cada vez mais utilizados por diversos países, e certamente estão associados ao sumiço das abelhas pelo mundo.

Muitos trabalhos tratam dos efeitos causados por doses subletais dos inseticidas. Esses estudos são de fundamental importância para a compreensão da interferência desses produtos tóxicos no desempenho comportamental e na vitalidade das abelhas. Os neonicotinóides são caracterizados por afetar a mobilidade das abelhas, causar tremores, movimentos descoordenados e hiperatividade (Blacquièrre et al., 2012).

Com o intuito de contribuir como ferramenta no monitoramento dos efeitos de doses subletais do Imidacloprido Skerl; Gregorc (2010) fizeram avaliações histológicas nas glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias, verificando que o inseticida induziu uma necrose extensa após 48 horas do tratamento, com 50% das células em apoptose e aumento gradativo para 100% após 72 horas. Gregorc; Ellis (2011) investigaram as células do intestino médio de larvas de *Apis mellifera* L. e observaram 66% de morte celular apoptótica em larvas que receberam alimento contaminado com o inseticida. Heylen et al. (2011) constataram que o consumo de alimento com doses subletais de

Imidacloprido causou diminuição no volume das glândula hipofaríngeas em abelhas operárias após 7 dias de tratamento.

Schmuck et al. (2001) estudaram o efeito da exposição crônica de doses subletais de Imidacloprido, via dieta, e constataram que 0,004 μ g/abelha afetou o ciclo de postura de ovos da rainha e a quantidade de larvas e pupas de *Apis mellifera*. Lambin et al. (2001), por meio do teste de locomoção, verificaram que abelhas tratadas topicamente com 0,0025 μ g/abelha apresentaram atividade locomotora significativamente diminuída. Decourtye et al. (2004) relataram que o Imidacloprido reduziu a percepção olfativa e a atividade de voo em abelhas operárias expostas a doses subletais. O Imidacloprido também afetou o tempo de desenvolvimento de larvas até a fase adulta, quando houve consumo de alimento contaminado na dose de 5 μ g (Decourtye et al., 2005). Shneider et al. (2012) observaram redução significativa de voo e da atividade de forrageamento em abelhas melíferas operárias tratadas com alimento contaminado com dose subletal de 0,0015 μ g/abelha.

Valores de DL₅₀ de contato do inseticida Imidacloprido para abelhas melíferas variam entre 0,00125 a 0,013 μ g/abelha (Mayer; Lunden, 1999; Schmuck et al., 2001; Tingle et al. 2003; Decourtye et al., 2004) . Enquanto que os valores para DL₅₀ de ingestão estão entre 0,000157 a 0,041 μ g/abelha (Mayer; Lunden, 1999; Lambin et al., 2001; Decourtye, 2002).

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram determinar a DL₅₀ de contato e ingestão dos inseticidas Acefato, Carbaril, Cipermetrina, Deltametrina, Fipronil e Imidacloprido, e quantificar possíveis alterações comportamentais em *Apis mellifera* africanizadas.

A presente pesquisa resultou no artigo intitulado “**Toxicidade de inseticidas para *Apis mellifera* L.**”, o qual será submetido à revista *Apidologie*, conforme as suas regras de publicação.

Referências Bibliográficas

AIZEN, M.A.; HARDER, L.D. The global stock of domesticated honeybees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current Biology**, v.19, p.915-918, 2009.

AKCA, I.; et al. Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.3, p.436-440, 2009.

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

ANVISA – Agência Nacional de vigilância sanitária. Índice monográfico. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>. Acesso em: 16 out. 2012.

AUFAVRE, J.; et al. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. **Scientific Reports**, v.2, n.326, p.1-7, 2012.

BATISTA, A.P.M.; et al. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados em citros para *Apis mellifera*. **Revista Ciência Rural**, v.39, n.4, p.955-961, 2009.

BENDAHOU, N.; FLECHE, C.; BOUNIAS, M. Biological and biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary cypermethrin (Cymbush) on honeybee colonies (Hymenoptera:Apidae). **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v.44, p.147-153, 1999.

BERNAL, J.; et al. Overview of pesticides in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. **Journal of Economy Entomology**, v.103, n.6, p.1964-1971, 2010.

BERNAL, J.; et al. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. **Pest Management Science**, v.67, n.10, p.1320-1331, 2011.

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

BREEZE, T.D.; et al. Pollination services in the UK: How important are the honeybees? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.142, p.137-143, 2011.

CARRASCO-LETELIER, L.; MENDOZA-SPINA, Y.; BRANCHICCELA, M.B. Acute contact toxicity test of insecticides (Cipermetrina 25, Lorsban 48E, Thionex 35) on honeybees in the southwestern zone of Uruguay. **Chemosphere**, v.88, p.439-444, 2012.

CARVALHO, S.P.L. **Toxicidade de inseticidas neonicotinóides sobre psíldeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e o parasitóide *Tamarixia radiata* (Waterson) (Hymenoptera: Eulophidae)**. 2008. 59f. Tese (Doutorado) – Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

CHAMBÓ, E.D.; et al. Aplicação de inseticida e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera* L.) no girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.5, n. 1, p.37-42, 2010.

CHEN, Z.; WANG, Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v.754, p.367-395, 1996.

CHIARI, W.C.; TOLEDO, V.D.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Pollination of soybean (*Glycine max* L. Merrill) by honeybees (*Apis mellifera* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.1, p.31-36, 2005.

COUTINHO, C.F.B.; et al. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Revista Toxicologia Meio Ambiente**, v.15, p.65-72, 2005.

COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 191p.

COX-FOSTER, D.L. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, Washington, v.318, p.283-287, 2007.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1.ed. New York: Routledge, 1999. 682p.

CRUZ, A.D.; et al. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, v.26, n.2, p.165-176, 2010.

DAI, P.; WANG, Q.; SUN, J. Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development on the honeybee *Apis mellifera* Ligustica. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.29, n.3, p.644-649, 2010.

DANKA, R.G.; WILLIAMS, J.L.; SUGDEN, E.A. Field-tests of an acephate baiting system designed for eradicating undesirable honeybees (Hymenoptera Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n.4, p.1104-1111, 1992.

DECOURTYE A. **Etude de l'impact des produits phytopharmaceutiques sur la survie et l'apprentissage associatif chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.)**. 2002. PhD Thesis University Paris, X.I., d'Orsay, 2002.

DECOURTYE, A.; et al. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v.48, p.242–250, 2005.

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

DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, p.180-186, 2004.

DOWSON, R.J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pesticide Science**, v.8, n.6, p.651-660, 1977.

EUROPEAN COMMISSION. Review report for the active substances cypermethrin 2005 Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/listcypermethrin.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2012.

FARIA, A.B.C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.5, n.2, p.345-358, 2009.

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

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

FUNASA. Guia de Vigilância Epidemiológica: Intoxicações por Agrotóxicos 2003. Disponível em <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0515H.htm>> Acesso em 06/out. de 2012.

GILL, R.J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N.E. Combined pesticide exposure severely affects individual – and colony – levels traits in bees. **Nature**, v.491, p.105-109, 2012.

GLOTFELTY, D.E.; SEIBER, J.N.; LILJEDAHN, L.A. Pesticides in fog. **Nature**, v.325, p.602-605, 1987.

GREGORC, A.; ELLIS, J. Cell death in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.99, p.200-207, 2011.

GUEZ, D.; ZHANG, S.W.; SRINIVASSAN, M.V. Methyl Parathion modifies foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, v.14, p.431-437, 2005.

GUILOSKI, I.C.; et al. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Revista Acadêmica, Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v.8, n. 4, p.461-468, 2010.

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

HELSON, B.V.; BARBER, K.N.; KINGSBURY, P.D. Laboratory toxicology of 6 forestry insecticides to 4 species of bee (Hymenoptera, Apoidea). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.27, n.1, p.107-114, 1994.

HEYLEN, K.; et al. The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v.42, n.1, p.103-116, 2011.

ISH-AM, G.; LAHAV, E. Evidence for a major role honeybees (*Apis mellifera*) rather than wind during avocado (*Persea americana* Mill) pollination. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.86, n.6, p.589-594, 2011.

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v.32, n.4, p.996-1012, 2009.

JOHANSEN, C.A.; MAYER, D.F. **Pollinator protection: a bee & pesticide handbook**. 1.ed. Wicwas Press, Cheshire. 1990. 212p.

KHAN, M.S.; KUMARI, B.; ROHILLA, H.R. Analysis of insecticide residues in honeys from apiary (*Apis mellifera*) and wild honey bee (*Apis dorsata* and *Apis florea*) colonies in India. **Journal of Apicultural Research**, v.43, n.3, p.79-82, 2004.

LAABS, V.; et al. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. **Journal of Environment Quality**, v.31, p.1636-1648, 2002.

LAMBIN, M.; et al. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.48, p.129–134, 2001.

LARSEN, T.H.; WILLIAMS, N.W.; KREMEN, C. Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. **Ecology Letters**, v.8, p.538-547, 2005.

LIRA, A.F. **Estudo da cinética de inibição anticolinesterásica por dialquilfosforamidatos**. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Exatas, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

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**, v.40, p.237-242, 2003.

MANRIQUE, W.G. **Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guaru (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático**. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Agrofit, Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitário. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofitcons/principalagrofitcons>>. Acesso em: 30 set. 2012.

MARTINS, A.P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrados em dose única a ratos**. 2009. 86f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

MELLO, M.H.S.H.; SILVA, E.A.; NATAL, D. Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.2, p.237-241, 2003.

MOHLER, H.; et al. Specific GABA (A) circuits in brain development and therapy. **Biochemycal and Pharmacology**, v.15, n.8, p. 1685-1690, 2004.

MULLIN, C.A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.L. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. **Plos One**, v.5, n.3, 2010.

NATION, J.L.; et al. Influence of upon honeybees of chronic exposure to very low levels of selected inseticides in their diet. **Journal of Apicultural Research**, v. 25, p.170-177, 1986.

NETTO, A.V.G.; FREM, R.C.G.; MAURO, A.E. A química supramolecular de complexos pirazólicos. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1208-1217, 2008.

NOCELLI, R.C.; et al. Risco de Pesticidas sobre as abelhas. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>>. Acesso em 26 fev. 2013.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, Acute Oral and Contact Toxicity test, n.214, 1998.

OZ, M.; et al. Effects of honeybee (*Apis mellifera*) pollination on seed set in hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.). **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.6, p. 1037-1043, 2009.

PARKER, R.; et al. Ecological Adaptation of diverse Honey Bee (*Apis mellifera*) populations. **Plos One**, v.5, n.6, p.1-12, 2010.

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

PETTIS, J.S.; COLLINS, A.M.; WILBANKS, R. Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v.35, n.6, p.605-601, 2004.

PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. 1.ed. São Paulo: Edusp/Fapesp, 1993. 49p.

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

RATNIEKS, F.L.W.; CARRECK, N.L. Clarity on honey bee collapse? **Science**, v.327, p.152, 2010.

RICKETTS, T.H.; et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, v.11, p.499-515, 2008.

SANTOS, M. A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretróides – Uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.3, p. 339-349, 2007.

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

SCHNEIDER, C.W.; et al. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **Plos One**, v.7, n.1, 2012.

SEELEY, T.D. **Honeybee ecology**: a study of adaptation in social life. Princeton: Princeton University Press, 1985. 192p.

SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. Mercado de Defensivos: Câmara Temática de Insumos Agropecuários, Janeiro a Outubro/2011. Disponível em: < http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php>. Acesso em: 07 out. 2012.

SKERL, M.I.S.; GREGORC, A. Heat shock proteins and cell death in situ localization in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. **Apidologie**, v.41, n.1, p.73-86, 2010.

SMART, L.E.; STEVENSON, J.H. Laboratory estimation of toxicity of pyrethroid insecticides to honeybees - relevance to hazard in the field. **Bee World**, v.63, n.4, p.150-152, 1982.

SMIRLE, M.J.. The influence of colony population and brood rearing intensity on the activity of detoxifying enzymes in worker honey bees. **Physiological Entomology**, v.18, p.420-424, 1993.

SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v.171, n.1, p.3-59, 2002.

SOUZA, D.L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; CALDAS PINTO, M.S. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.8, p.1-7, 2007.

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

SPADOTTO, C.A. Abordagem Interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, 2006. Disponível em: <<http://www.fmr.edu.br/npi/003.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

TAUTZ, J. **O fenômeno das abelhas**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 288p.

TAYLOR, K.S.; WALLER, G.D.; CROWDER, L.A. Impairment of a classical conditioned response of the honey bee (*Apis mellifera* L.) by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides. **Apidologie**, v.18, p.243-252, 1987.

TINGLE, C.C.; et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.176, p.1–66, 2003.

TRINDADE, M.S.A; et al. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, n.1, p.1-11, 2004.

VIDAU, C.; et al. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **Plos One**, v.6, n.6, p.1-8, 2011.

VIGUI, M.; FUNARI, E. **Pesticide risk in ground water**. 1.ed. Boca Raton, USA: Lewis Publishers Inc., 1995, 275p.

WHITFIELD, C.W.; et al. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. **Science**, v.314, p.642–645, 2006.

WIESE, H. **Apicultura: Novos Tempos**. 2ª.ed. Guaíba: Agrolivros, 2005, 378p.

CAPÍTULO II

TOXICIDADE DE INSETICIDAS PARA *Apis mellifera* L.

Resumo: Este trabalho teve por objetivos estabelecer a Dose Letal (DL_{50}) de inseticidas em abelhas campeiras de *Apis mellifera* africanizadas e verificar a ocorrência de alterações comportamentais. O experimento foi desenvolvido no Setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Fazenda Experimental Lageado, UNESP, Campus de Botucatu. Foram utilizadas abelhas campeiras e testados os agrotóxicos Acefato, Cipermetrina, Deltametrina, Carbaril, Fipronil e Imidacloprido, por meio de testes de contato ($2\mu\text{L}$ na região dorsal do tórax) e ingestão (1 mL de mel), ambos contendo as diferentes doses dos inseticidas. O controle dos testes de contato e ingestão receberam apenas água destilada e mel, respectivamente. Após 30, 60, 90, 120 e 150 minutos do início dos testes quantificou-se o número de abelhas com alterações comportamentais. Para cálculo da DL_{50} , 24 horas após o início dos testes, os resultados foram submetidos à análise Probit, utilizando-se o programa BioStat. Os dados de alteração de comportamento foram analisados por meio do teste de Tukey para comparação entre médias ($P < 0,05$). As DL_{50} de contato e ingestão ($\mu\text{g}/\text{abelha}$) foram, respectivamente, Acefato $0,0037 \pm 0,0012$ e $0,0147 \pm 0,0045$; Carbaril $0,2456 \pm 0,1254$ e $0,3633 \pm 0,1680$; Cipermetrina $0,0004 \pm 0,0001$ e $0,0103 \pm 0,0087$; Deltametrina $0,0042 \pm 0,0021$ e $0,0486 \pm 0,01$; Fipronil $0,0080 \pm 0,0021$ e $0,2316 \pm 0,0626$; Imidacloprido $0,0308 \pm 0,0218$ e $0,1079 \pm 0,0375$. Os testes de contato para Acefato, Carbaril, Cipermetrina e Deltametrina e os testes de ingestão para Carbaril, Fipronil e Imidacloprido mostraram alterações comportamentais significativas, em relação ao controle. Conclui-se que todas as substâncias foram prejudiciais às abelhas, devido aos baixos valores de DL_{50} obtidos, e a ocorrência de alterações comportamentais.

Palavras-chave: abelhas/ agrotóxicos/ alterações comportamentais/ dose letal.

TOXICITY OF INSECTICIDES TO *Apis mellifera* L.

Abstract: This research aimed to establish the lethal dose (LD₅₀) of insecticides in africanized foraging bees *Apis mellifera* and verify the occurrence of behavioral changes. The research was conducted in the Sector of Apiculture, Veterinary Medicine and Animal Science University, Lageado Experimental Farm, UNESP, Botucatu. Were used foraging bees and tested the pesticides Acephate, Cypermethrin, Deltamethrin, Carbaryl, Fipronil and Imidacloprid through contact test (2µL in dorsal region of the chest) and food intake (1mL of honey), both containing different doses of pesticides. The control group test of contact and food intake received only distilled water and honey, respectively. After 30, 60, 90, 120 and 150 minutes of the test starting were quantified the numbers of bees with behavioral changes. For calculation of LD₅₀, 24 hours after the starting of tests, the results were submitted to Probit analysis using the program BioStat. Data behavioral changes were analyzed by Tukey test for comparison of means (P<0.05). The LD₅₀ of contact and food intake (µg/bee) were, respectively, Acephate 0.0037±0.0012 and 0.0147±0.0045; Carbaryl 0.2456±0.1254 and 0.3633±0.1680; Cypermethrin 0.0004±0.0001 and 0.0103±0.0087; Deltamethrin 0.0042±0.0021 and 0.0486±0.01; Fipronil 0.0080±0.0021 and 0.2316±0.0626; Imidacloprid 0.0308±0.0218 and 0.1079±0.0375. The tests contact to Acephate, Carbaryl, Cypermethrin and Deltamethrin and the food intake tests for Carbaryl, Fipronil and Imidacloprid showed significant behavioral changes, compared to control. It can be concluded that all the substances were harmful to bees, due to low LD₅₀ values obtained, and the occurrence of behavioral changes.

Keywords: bees/ behavioral changes/ lethal dose/ pesticides.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* L. são insetos sociais importantes para a economia agrícola mundial. Além de produzirem mel, pólen, própolis, cera e veneno, elas ainda contribuem ao meio ambiente com seus serviços de polinização, sendo, a *Apis mellifera* L. considerada a principal espécie polinizadora de culturas agrícolas no mundo (Whitfield, et al., 2006). Ao forragear as plantas em busca de recursos (pólen, néctar, resinas e água), as abelhas campeiras promovem a reprodução cruzada dos vegetais, aumentando o vigor das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e melhorando a produção de frutos e sementes (Couto; Couto, 2002).

Segundo Potts et al. (2010) a polinização promovida pelas abelhas em 2005 gerou cerca de 153 bilhões de euros (9,5% do valor total da produção agrícola mundial). Nos Estados Unidos a polinização por *Apis mellifera* L. gerou US\$ 14,6 bilhões e no Reino Unido estimou-se, por ano, um ganho de 400 milhões de euros com os serviços de polinização (Breeze et al., 2011).

Entretanto, atualmente, é registrado severo declínio das abelhas melíferas em diversas regiões do planeta. Na Europa, por exemplo, de 1985 a 2005, observou-se a perda de 25% das colônias de *Apis mellifera* L., sendo que na Espanha, dados decorrentes da última década, apontam perdas de 80% do total de suas colmeias. Nos Estados Unidos, os dados apontam severas perdas, com decréscimo de 59% no número de colônias, entre os anos de 1947 a 2005 (Bernal et al., 2010; Potts et al., 2010).

Segundo Freitas et al. (2009), tal perda pode ser atribuída a diversos fatores, como queimadas, desmatamentos, doenças, uso abusivo de agrotóxicos (principalmente em monoculturas) e o Distúrbio de Colapso das Colônias (DCC), o qual é caracterizado por grande perda de abelhas operárias, sem a presença de abelhas mortas no interior ou nas proximidades da colmeia, presença de alimento dentro do ninho e abandono das crias. Mullin et al. (2010) relataram haver uma associação direta entre a exposição das abelhas aos agrotóxicos, ocorrência do DCC e declínio dos polinizadores.

Dentre os principais tipos de agrotóxicos utilizados na agricultura, os mais consumidos são os herbicidas, seguidos dos inseticidas, fungicidas e acaricidas (Jardim; Andrade, 2009). Embora os herbicidas sejam mais utilizados, em geral a toxicidade deste grupo de substâncias é inferior à dos inseticidas (Delgado; Paumgarten, 2004).

Aproximadamente, 90% dos inseticidas são neurotóxicos, podendo ocasionar efeitos letais às abelhas (Pereira, 2010). Entre os sintomas de envenenamento por inseticidas observam-se alterações comportamentais, hiperexcitação, ataxia, convulsões, tremores e paralisias (Soderlund et al., 2002).

Pesquisas demonstraram toxicidade dos inseticidas para as abelhas *Apis mellifera* L., evidenciando os prejuízos causados aos enxames, como por exemplo, interferência na divisão de trabalho da colmeia, diminuição da longevidade do enxame, interferência na comunicação e aprendizado, no desenvolvimento da rainha, diminuição da atividade de forrageamento, alterações na atividade de locomoção e morfológicas (Decourtye et al., 2004; Pettis et al., 2004; Hassani et al., 2005; Cruz et al., 2010; Freitas; Pinheiro, 2010; Gill et al., 2012). Além disso, Gill et al. (2012) afirmaram que a exposição simultânea à diferentes inseticidas utilizados nos campos de cultivos podem gerar efeitos combinatórios das substâncias, com consequências ainda mais graves aos enxames.

Sendo assim, o conhecimento da toxicidade de inseticidas às abelhas *Apis mellifera* L. é de extrema importância para nortear diretrizes de controle em seu uso, aliadas à preocupação de preservação ambiental. A presente pesquisa teve por objetivos estabelecer as DL₅₀ de contato e ingestão dos inseticidas Acefato (organofosforado), Cipermetrina e Deltametrina (piretróides), Carbaril (carbamato), Fipronil (pirazol) e Imidacloprido (neonicotinóide) em abelhas campeiras de *Apis mellifera* africanizadas e verificar a ocorrência de alterações comportamentais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento e abelhas utilizadas

O experimento foi desenvolvido no Setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizado na Fazenda Experimental Lageado, UNESP, Campus de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22° 49' de latitude sul e 48° 24' de longitude Oeste, com clima tipo Cfa e altitude média de 623 metros.

Foram utilizadas abelhas *Apis mellifera* africanizadas, com mais de 20 dias de

idade, provenientes de cinco colmeias padronizadas quanto ao número de quadros de crias e alimento, contendo rainha jovem, acasalada livremente. Os alvados (entrada da colmeia) foram fechados por um período de dez minutos e colhidas abelhas que retornavam do campo, consideradas campeiras, em coletores de madeira contendo tela para aeração. Estas abelhas foram conduzidas ao laboratório para a realização dos testes de toxicidade.

2.2. Inseticidas pesquisados

Foram utilizados seis agrotóxicos da classe dos inseticidas (Tabela 1), cujas doses foram estabelecidas por meio de experimentos prévios de nosso laboratório.

Tabela 1: Grupos químicos dos inseticidas, nome comercial e as doses utilizadas em $\mu\text{g}/\text{abelha}$ nos testes de contato e ingestão.

Inseticida/ Grupo Químico	Nome Comercial/ Empresa	Contato ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)	Ingestão ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)
Acefato (organofosforado)	Orthene 750 Br (Arysta)	0,00; 0,0009; 0,0018; 0,0038; 0,0075; 0,0151	0,00; 0,005; 0,01; 0,021; 0,042; 0,084
Carbaril (carbamato)	Pó 400 Madepó (Dipil)	0,00; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8	0,00; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0
Cipermetrina (piretróide)	Commanche 200 EC (FMC Química do Brasil)	0,00; 0,00008; 0,00016; 0,00033; 0,00066; 0,0013	0,00; 0,003125; 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05
Deltametrina (piretróide)	Keshet 25 EC (Milênia Agrociências S.A.)	0,00; 0,0005; 0,001; 0,002; 0,004; 0,008	0,00; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2
Fipronil (pirazol)	Regent 800 WG (BASF)	0,00; 0,002; 0,004; 0,008; 0,016; 0,032	0,00; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8
Imidacloprido (neonicotinóide)	Appalus 200 SC (Consagro Agrobusiness)	0,00; 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08	0,00; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4

2.3. Testes de toxicidade

2.3.1. Teste de ingestão do inseticida

A DL_{50} é a dose letal capaz de exterminar 50% de uma população (OECD, 1998). Nesse trabalho foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Miranda et al. (2003), com modificações. Para isto, 10 abelhas campeiras foram anestesiadas em refrigerador (4°C). Em seguida, foram colocadas em caixas de madeira contendo telas nas laterais (25,0 x 15,0 x 10,0 cm) onde foi fornecido 1 mL de mel em alimentador (2cm x 1 cm) contendo as diferentes doses dos inseticidas; após três horas o alimento contaminado foi substituído por outro sem contaminação. De acordo com Thompson; Hunt (1999), a vesícula nectarífera das *Apis mellifera* tem volume de 50µL, portanto as diluições do alimento com inseticidas foram calculadas para que em 50µL contivesse as doses estimadas de cada princípio ativo. As abelhas permaneceram em temperatura ambiente. Um grupo controle recebeu apenas mel. Após 24h foi contabilizado o número de abelhas mortas em cada tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados utilizados para os cálculos da DL_{50} .

2.3.2. Teste de contato com o inseticida

A DL_{50} foi determinada através da metodologia descrita em Miranda et al. (2003). Para isto, 10 abelhas adultas, com mais de 20 dias de idade, foram anestesiadas em refrigerador (4°C). Em seguida, receberam 2µL das diferentes concentrações dos inseticidas, com auxílio de micropipetador, na região dorsal do tórax. Após a aplicação do agrotóxico, as abelhas foram transferidas para caixas plásticas (18,0 x 8,0 x 6,0 cm) e mantidas em temperatura ambiente registrada. O grupo controle recebeu apenas água destilada, utilizada para dissolver os inseticidas. Após 24h foi contabilizado o número de abelhas mortas em cada tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados utilizados para os cálculos da DL_{50} .

2.4. Avaliação comportamental

Após início dos testes de contato e ingestão dos inseticidas, foi contado durante 30, 60, 90, 120 e 150 minutos, o número de abelhas que apresentaram alterações comportamentais, tais como tremores, falta de coordenação motora, movimentos desordenados e hiperexcitabilidade.

2.5. Análise dos resultados

Para cálculo da DL_{50} , os resultados de mortalidade após 24h do início dos testes de contato e ingestão foram submetidos à análise Probit, utilizando-se o programa BioStat. Os dados de alteração de comportamento foram analisados por meio do teste de Tukey para comparação das médias, com nível de 5% de significância (Zar, 1996).

3. RESULTADOS

As DL_{50} obtidas nos testes de contato e ingestão para os agrotóxicos analisados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Médias e desvios padrão das doses letais (DL_{50}) inseticidas estudados para os testes de contato e ingestão de alimento contaminado ($\mu\text{g}/\text{abelha}$), para abelha *Apis mellifera* africanizadas.

Agrotóxico	DL_{50} contato	DL_{50} ingestão
Acefato	0,0037±0,0012	0,0147±0,0045
Carbaril	0,2456±0,1254	0,3633±0,1680
Cipermetrina	0,0004±0,0001	0,0103±0,0087
Deltametrina	0,0042±0,0021	0,0486±0,0100
Fipronil	0,0080±0,0021	0,2316±0,0626
Imidacloprido	0,0308±0,0218	0,1079±0,0375

Os resultados dos testes de contato mostraram que os inseticidas Fipronil e Imidacloprido não causaram alterações significativas às doses estudadas. O Acefato apresentou reações comportamentais apenas após 120 minutos, na dose 0,0151 μ g/abelha. Para o Carbaril isso ocorreu com a dose 0,2 μ g/abelha, a partir de 30 minutos. No caso da Cipermetrina as alterações tornaram-se significativas a partir de 60 minutos, na menor dose estudada (0,0008 μ g/abelha); e com a Deltametrina, na dose de 0,008 μ g/abelha, após 90 minutos.

Nos testes de ingestão com os inseticidas Acefato, Cipermetrina e Deltametrina não houve reações comportamentais significativas. O Carbaril apresentou reações comportamentais após 90 minutos, na dose de 1 μ g/abelha e, o Fipronil e Imidacloprido, a partir de 120 minutos, nas doses 0,8 μ g/abelha e 0,025 μ g/abelha, respectivamente. (Tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

Tabela 3: Médias e desvios padrão do número de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após os testes de contato e ingestão com diferentes doses de Acefato.

		ACEFATO (Organofosforado)										
		Doses de contato ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)					Doses de ingestão ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)					
Tempo (minutos)	0,00	0,0009	0,0018	0,0038	0,0075	0,0151	0,00	0,0005	0,01	0,021	0,042	0,084
30	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,6 \pm 1,2 a	1,0 \pm 1,0 a	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
60	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a	1,0 \pm 0,0 a	2,0 \pm 1,7 a	1,6 \pm 0,6 a	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,6	0,3 \pm 0,6	0,7 \pm 1,5
90	0,0 \pm 0,0 a	1,0 \pm 0,0 a	1,3 \pm 1,2 a	2,0 \pm 1,0 a	1,0 \pm 1,7 a	3,0 \pm 1,0 a	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 1,0	2,3 \pm 2,0	1,3 \pm 1,5	2,6 \pm 2,5	0,7 \pm 1,5
120	0,0 \pm 0,0 a	1,0 \pm 1,0 ab	1,6 \pm 1,2 ab	2,3 \pm 1,5 ab	3,0 \pm 1,0 ab	4,0 \pm 1,7 b	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 1,0	2,6 \pm 2,0	1,3 \pm 1,5	2,6 \pm 1,2	2,0 \pm 2,0
150	0,0 \pm 0,0 a	1,3 \pm 1,5 a	1,0 \pm 1,7 a	2,3 \pm 2,0 a	3,3 \pm 1,15 a	4,3 \pm 2,8 a	0,0 \pm 0,0	2,3 \pm 1,5	2,0 \pm 1,7	3,3 \pm 2,8	4,0 \pm 3,0	3,6 \pm 4,0

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4: Médias e desvios padrão do número de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após os testes de contato e ingestão com diferentes doses de Carbaril.

CARBARIL (Carbamato)												
Tempo (minutos)	Doses de contato ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)						Doses de ingestão ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)					
	0,00	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	0,00	0,0625	0,125	0,25	0,5	1,0
30	0,0 \pm 0,0 a	2,3 \pm 1,2 bc	1,0 \pm 1,0 ab	3,6 \pm 0,6 c	1,6 \pm 0,6abc	1,0 \pm 1,0 ab	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a
60	0,0 \pm 0,0 a	1,6 \pm 1,5 ab	1,3 \pm 1,2ab	3,6 \pm 0,6 b	2,0 \pm 1,0 ab	2,0 \pm 1,0 ab	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a
90	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6 ^a	2,0 \pm 0,0 a	2,6 \pm 0,6 a	1,3 \pm 0,6 a	1,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,6 ab	0,3 \pm 0,6 ab	0,3 \pm 0,6 ab	0,0 \pm 0,0 a	1,3 \pm 1,6 b
120	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6 a	1,0 \pm 1,0 a	1,6 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,6ab	0,3 \pm 0,6ab	0,3 \pm 0,6 ab	0,3 \pm 0,6 ab	2,0 \pm 1,0 b
150	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6 a	1,0 \pm 1,0 a	1,6 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6ab	0,7 \pm 0,6 ab	0,7 \pm 0,6 ab	1,0 \pm 1,0 ab	3,0 \pm 1,7 b

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5: Médias e desvios padrão do número de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após os testes de contato e ingestão com diferentes doses de Cipermetrina.

CIPERMETRINA (Piretróide)												
Tempo (Minutos)	Doses de contato (µg/abelha)						Doses de ingestão (µg/abelha)					
	0,00	0,00008	0,00016	0,00033	0,00066	0,0013	0,00	0,003125	0,00625	0,0125	0,025	0,05
30	0,0±0,0 a	0,0±0,0 a	0,7±0,6 a	1,0±0,0 a	1,0±1,0 a	0,3±0,6 a	0,0±0,0	0,7±1,2	0,00±0,00	0,7±1,2	0,7±1,2	0,7±1,2
60	0,0±0,0 a	4,0±1,0 b	0,7±0,6 a	1,6±1,2 a	0,7±0,6 a	0,7±1,2 a	0,0±0,0	0,7±1,2	1,0±1,7	1,6±1,5	2,0±2,0	1,6±1,5
90	0,0±0,0 a	4,0±1,0 b	0,7±1,2 a	0,0±0,0 a	1,0±1,0 a	1,6±1,5 ab	0,0±0,0	1,0±1,0	1,0±1,7	1,3±1,5	0,3±0,6	1,0±1,7
120	0,0±0,0 a	4,0±1,0 b	1,0±1,0 a	0,0±0,0 a	1,3±1,2 a	1,0±1,0 a	0,0±0,0	0,7±1,2	0,7±1,2	0,3±0,6	1,3±0,6	1,6±2,0
150	0,0±0,0 a	04,0±1,0 b	1,0±1,0 a	0,0±0,0 a	1,3±1,2 a	1,0±1,0 a	0,0±0,0	0,3±0,6	0,7±1,2	0,3±0,6	2,3±1,3	1,3±1,5

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6: Médias e desvios padrão do número de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após os testes de contato e ingestão com diferentes doses de Deltametrina.

DELTAMETRINA (Piretróide)												
Tempo (minutos)	Doses de contato ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)						Doses de ingestão ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)					
	0,00	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,00	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2
30	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,8 \pm 1,0 a	0,0 \pm 0,0	0,5 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,3 \pm 2,5	0,0 \pm 0,0
60	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	1,5 \pm 1,7 a	0,5 \pm 0,6 a	1,8 \pm 1,3 a	0,0 \pm 0,0	1,5 \pm 1,2	0,0 \pm 0,0	0,8 \pm 1,0	2,3 \pm 3,8	0,3 \pm 0,5
90	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	1,0 \pm 1,2a	1,8 \pm 1,0 ab	3,8 \pm 2,2 b	0,0 \pm 0,0	1,8 \pm 1,5	0,0 \pm 0,0	1,3 \pm 1,0	1,5 \pm 2,3	1,5 \pm 2,3
120	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,5 \pm 1,0 a	0,8 \pm 1,0 ab	2,5 \pm 1,2 b	2,5 \pm 0,6 b	0,0 \pm 0,0	3,8 \pm 3,0	0,8 \pm 1,0	2,3 \pm 1,3	2,3 \pm 1,7	2,5 \pm 2,6
150	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,5 \pm 1,0 ac	1,25 \pm 1,5ab	2,8 \pm 1,0 b	2,5 \pm 1,2 bc	0,0 \pm 0,0	4,0 \pm 4,0	1,0 \pm 2,0	2,3 \pm 1,7	2,5 \pm 2,08	3,0 \pm 2,4

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7: Médias e desvios padrão do número de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após os testes de contato e ingestão com diferentes doses de Fipronil.

FIPRONIL (Pirazol)												
Tempo (minutos)	Doses de contato ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)						Doses de ingestão ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)					
	0,00	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,00	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
30	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,5	0,3 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a
60	0,0 \pm 0,0	0,5 \pm 1,0	0,5 \pm 1,0	0,3 \pm 0,5	0,3 \pm 0,5	0,3 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	3,3 \pm 5,8 a
90	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,5	0,3 \pm 0,5	1,0 \pm 0,8	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	1,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,6 a	0,0 \pm 0,0 a	4,3 \pm 5,0 a
120	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,5	0,3 \pm 0,5	1,0 \pm 0,8	1,3 \pm 0,5	1,3 \pm 0,9	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	1,0 \pm 0,0 a	1,3 \pm 0,6 a	0,7 \pm 1,2 a	5,3 \pm 2,8 b
150	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,5	0,5 \pm 1,0	1,3 \pm 0,5	1,5 \pm 0,6	1,5 \pm 1,2	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,6 a	0,7 \pm 0,6 a	1,3 \pm 0,6 a	3,0 \pm 3,4 ab	7,0 \pm 1,0 b

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8: Médias e desvios padrão do número de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com alteração comportamental, ao longo do tempo, após os testes de contato e ingestão com diferentes doses de Imidacloprido.

IMIDACLOPRIDO (Neonicotinóide)												
Tempo (minutos)	Doses de contato ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)						Doses de ingestão ($\mu\text{g}/\text{abelha}$)					
	0,00	0,005	0,01	0,02	0,04	0,08	0,00	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
30	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,6	1,0 \pm 1,7	1,0 \pm 1,7	1,0 \pm 1,7	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6 a	1,0 \pm 1,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,6 a	0,7 \pm 0,6 a
60	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,6	1,0 \pm 1,7	1,0 \pm 1,7	1,6 \pm 2,0	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a	0,3 \pm 0,6 a
90	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,6	0,7 \pm 0,6	0,3 \pm 0,6	0,7 \pm 0,6	0,3 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6 a	0,0 \pm 0,0 a	0,3 \pm 0,6 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a
120	0,0 \pm 0,0	0,7 \pm 1,2	0,3 \pm 0,6	1,0 \pm 1,0	0,7 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6 b	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a
150	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 1,0	1,0 \pm 1,0	0,7 \pm 0,6	0,7 \pm 1,2	1,0 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0 a	0,7 \pm 0,6 b	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a	0,0 \pm 0,0 a

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem ao nível de 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Os valores de DL_{50} de contato encontrados nessa pesquisa para os inseticidas Acefato e Carbaril foram menores que os verificados por Johansen; Mayer (1990), que estimaram ser $1,2\mu\text{g}/\text{abelha}$ e $1,5\mu\text{g}/\text{abelha}$, respectivamente.

O Acefato é um inseticida organofosforado que causa severos danos ao sistema nervoso central dos indivíduos contaminados, inibindo irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase, o que ocasiona hiperexcitabilidade neuronal (Funasa, 2003). Os inseticidas da classe dos carbamatos, como o Carbaril, inibem a ação acetilcolinesterase de modo reversível; no entanto, a intoxicação por essas substâncias pode ser igualmente grave, comparados aos organofosforados (Funasa, 2003). Esses sintomas de toxicidade foram evidenciados neste trabalho pelas alterações comportamentais observadas após 30 e 90 minutos de contato e ingestão, respectivamente, com o Carbaril, e após 120 minutos de contato com o Acefato.

Os valores de DL_{50} de ingestão encontrados na literatura para a Cipermetrina variam entre $0,008$ a $0,1600\mu\text{g}/\text{abelha}$, e para a Deltametrina de $0,0015$ a $0,079\mu\text{g}/\text{abelha}$. A DL_{50} de contato está entre $0,020$ a $0,160\mu\text{g}/\text{abelha}$ para Cipermetrina e de $0,0015$ a $0,051\mu\text{g}/\text{abelha}$ para Deltametrina (Smart; Stevenson 1982; Helson, 1994; Bendahou et al., 1999; European Commission, 2005). Os resultados obtidos para Deltametrina correspondem ao relatado por outros autores. No caso da Cipermetrina, apenas a DL_{50} de ingestão corrobora as outras pesquisas; o resultado de contato foi menor que o verificado na literatura.

A Cipermetrina e a Deltametrina, além de causarem mortalidade em *Apis mellifera* L., comprometem a atividade de forrageamento, diminuem a fecundidade da rainha, alteram a coordenação motora, causam tremores musculares e comprometem a aprendizagem (Decourtye et al., 2004; Freitas; Pinheiro, 2010; Dai et al., 2010). Os testes de contato com esses inseticidas apresentaram alterações comportamentais significativas, a partir de 90 e 60 minutos para Deltametrina e Cipermetrina, respectivamente.

Os valores de DL_{50} de ingestão para o Fipronil encontrados na literatura variam entre $0,00327$ a $0,013\mu\text{g}/\text{abelha}$ (Mayer; Lunden, 1999; Decourtye, 2002); e de $0,000157$ a $0,013\mu\text{g}/\text{abelha}$ para contato (Mayer; Lunden, 1999; Tingle et al., 2003).

Dessa forma, a DL_{50} de contato obtida nessa pesquisa esteve dentro do intervalo proposto na literatura, enquanto o valor de ingestão foi maior que o verificado em pesquisas anteriores.

O Fipronil é altamente tóxico às abelhas, devido competir com o GABA (ácido gama-aminobutírico), um neurotransmissor do sistema nervoso central, impedindo a transmissão do impulso nervoso normal, resultando em atividade neural excessiva, paralisia e morte (Mohler et al., 2009). Efeitos negativos como alterações fisiológicas e morfológicas, comprometimento da aprendizagem olfativa e letalidade, são alguns prejuízos que o Fipronil pode causar às *Apis mellifera* (Hassani et al., 2005; Aliouane, 2009; Cruz et al., 2010). A ingestão dessa substância, pelos animais testados, promoveu alterações comportamentais significativas a partir de 120 minutos.

Para o Imidacloprido os valores para DL_{50} de ingestão em abelhas melíferas variam de 0,00157 a 0,013 μ g/abelha (Mayer; Lunden, 1999; Lambin et al., 2001; Decourtye, 2002); e para contato, entre 0,000157 a 0,041 μ g/abelha (Mayer; Lunden, 1999; Schmuck et al., 2001; Tingle et al. 2003; Decourtye et al., 2004). Assim, o valor encontrado para contato situa-se dentro do intervalo proposto por outros autores; enquanto o de ingestão foi maior ao observado em pesquisas anteriores.

Os neonicotinóides competem com o neurotransmissor acetilcolina, promovendo sintomas semelhantes aos causados por carbamatos e organofosforados, incluindo tremores, colapso do sistema nervoso e morte (Faria, 2009).

Nos testes de ingestão com o Imidacloprido, assim como nos testes de contato com a Cipermetrina, as alterações comportamentais foram significativas na menor dose utilizada. Estes resultados podem ser explicados devido à presença e à ação de metabólitos que atuam no organismo do inseto. Desta forma, doses maiores favoreceriam a ação de enzimas desintoxicadoras, reduzindo ou retardando os efeitos tóxicos que poderiam aparecer nas abelhas. Por outro lado, doses menores demorariam mais para ativar o sistema enzimático, promovendo o aparecimento de efeitos tóxicos (Pereira, 2010).

Suchail et al. (2000) observaram que, após a exposição oral ao Imidacloprido em operárias de abelhas melíferas, a cinética da mortalidade sofreu um atraso quando foram oferecidas doses maiores, sugerindo que padrões metabólicos podem estar envolvidos com a toxicidade deste neonicotinóide.

As variações nos valores de DL_{50} encontradas neste estudo, em comparação a outras pesquisas com os mesmos inseticidas, podem ser atribuídas à influência de fatores como variabilidade genética de cada população de abelhas estudada, variações ambientais dos locais de origem das populações, execução da metodologia empregada e diferença na capacidade de desintoxicação de um enxame para o outro (Suchail et al., 2001), bem como, as diferentes formulações comerciais de insetidas com o mesmo princípio ativo, os quais variam quanto ao tipo e quantidade dos ingredientes inertes.

De acordo com Johansen; Mayer (1990), agrotóxicos que apresentam DL_{50} inferior a $2\mu\text{g}/\text{abelha}$ são considerados extremamente tóxicos às abelhas *Apis mellifera*.

Dessa maneira, conclui-se que os inseticidas avaliados nessa pesquisa foram considerados extremamente tóxicos às abelhas campeiras de *Apis mellifera* africanizadas, por apresentarem valores de DL_{50} abaixo de $2\mu\text{g}/\text{abelha}$ e promoverem alterações comportamentais significativas durante os testes de contato e/ou ingestão.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

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

Bendahou, N.; Fleche, C.; Bounias, M. (1999) Biological and biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary cypermethrin (Cymbush) on honeybee colonies (Hymenoptera:Apidae). *Ecotoxicological and Environmental Safety*, v.44, p.147-153.

Bernal, J.; et al. (2010) Overview of pesticides in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economy Entomology*, v.103, n.6, p.1964-1971.

Breeze, T.D.; et al. (2011) Pollination services in the UK: How important are the honeybees? *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.142, p.137-143.

Couto, R.H.N.; Couto, L.A. (2002) *Apicultura: manejo e produtos*. Jaboticabal: FUNEP, 191p.

Cruz, A.D.; et al. (2010) Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biology and Toxicology*, v.26, n.2, p.165-176.

Dai, P.; Wang, Q.; Sun, J. (2010) Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development on the honeybee *Apis mellifera* Ligustica. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.29, n.3, p.644-649.

Decourtye A. (2002) Etude de l'impact des produits phytopharmaceutiques sur la survie et l'apprentissage associatif chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). PhD Thesis University Paris, X.I., d'Orsay.

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

Delgado, I.F.; Paumgarten, F.J.R. (2004) Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.20, p.180-186.

European Commission. Review report for the active substance cypermethrin. 2005. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_cypermethrin.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2012.

Faria, A.B.C. (2009) Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, v.5, n.2, p.345-358.

Freitas, B.M.; et al. (2009) Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, v.40, p.332-346.

Freitas, B.M.; Pinheiro, J.N. (2010) Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis*, v.14, n.1, p.282-298.

Funasa. Guia de Vigilância Epidemiológica: Intoxicações por Agrotóxicos 2003. Disponível em <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE0515H.htm>> Acesso em 06/out. de 2012.

Gill, R.J.; Ramos-Rodriguez, O.; Raine, N.E. (2012) Combined pesticide exposure severely affects individual – and colony – levels traits in bees. *Nature*, v.491, p.105-109.

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

Helson, B.V.; Barber, K.N.; Kingsbury, P.D. (1994) Laboratory toxicology of 6 forestry insecticides to 4 species of bee (Hymenoptera, Apoidea). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.27, n.1, p.107-114.

Jardim, I.C.S.F.; Andrade, J.A. (2009) Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – Um enfoque às maçãs. *Química Nova*, v.32, n.4, p.996-1012.

Johansen, C.A.; Mayer, D.F. (1990) *Pollinator protection: a bee & pesticide handbook*. 1.ed. Wicwas Press, Cheshire, 212p.

Lambin, M.; et al. (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v.48, p.129–134.

Mayer, D.F.; Lunden, J.D. (1999) Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. *Journal of Apicultural Research*. Cardiff, v.38, n.4, p.191-197.

Miranda, J. E; et al. (2003) Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) to pellitorine, na amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Apidologie*, v.34, p. 409-415.

Mohler, H.; et al. (2004) Specific GABA (A) circuits in brain development and therapy. *Biochemycal and Pharmacology*, v.15, n.8, p. 1685-1690.

Mullin, C.A.; Frazier, M.; Frazier, J.L. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *Plos One*, v.5, n.3.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, Acute Oral and Contact Toxicity test, n.214, 1998.

Pereira, A.M. Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas. 2010. 125f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

Pettis, J.S.; Collins, A.M.; Wilbanks, R. (2004) Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, v.35, n.6, p.605-601.

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

Schmuck, R.; et al. (2001) Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science*, v.57, p.225-238.

Smart, L.E.; Stevenson, J.H. (1982) Laboratory estimation of toxicity of pyrethroid insecticides to honeybees - relevance to hazard in the field. *Bee World*, v.63, n.4, p.150-152.

Soderlund, D. M. et al. (2002) Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, v.171, n.1, p.3-59.

Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L.P. (2000) Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Pensacola, v.19, n.7, p.1901-1905.

Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L.P. (2001) Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Pensacola, v.20, n.11, p.2482-2486.

Thompson, H.M.; Hunt, L.V. (1999). Extrapolating from honeybees to bumble bees in pesticide risk assessment. *Ecotoxicology*, v.8, p.147-166.

Tingle, C.C.; et al. (2003) Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v.176, p.1–66.

Whitfield, C.W.; et al. (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, v.314, p.642–645.

Zar, J. H. (1996) *Bioestatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 718p.

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES

A atividade apícola tem crescido e se desenvolvido ao longo dos anos. Muitos são os produtos que podem ser explorados, e que trazem benefícios aos seus produtores e consumidores. Além do mais, as abelhas *Apis mellifera* L. imperam numa atividade extremamente importante à produtividade de muitas culturas agrícolas, a polinização cruzada dos vegetais.

Quando as abelhas visitam as culturas em busca de recursos para sua colônia e, conseqüentemente, promovem a polinização entomofílica, podem entrar em contato com agrotóxicos que protegem as culturas contra pragas e doenças. No entanto, tais defensivos são deletérios às abelhas, promovendo injúrias graves ao indivíduo e ao enxame.

Dessa maneira, este estudo avaliou os riscos que os agrotóxicos Acefato, Carbaril, Cipermetrina, Deltametrina, Fipronil e Imidacloprido oferecem às abelhas melíferas, evidenciando alterações no comportamento dos indivíduos contaminados e ainda a dose letal média capaz de induzir mortalidade em 50% da população testada (DL₅₀).

Todos os inseticidas utilizados mostraram ser extremamente prejudiciais às abelhas campeiras de *Apis mellifera* africanizadas; dessa forma, não se recomenda a aplicação dessas substâncias em áreas de cultivo de abelhas, devido ao fato de baixas dosagens causarem expressiva mortalidade e alterações comportamentais que podem comprometer o desenvolvimento dos enxames, além da possibilidade de contaminação dos produtos apícolas.

Espera-se que esse trabalho possa contribuir com a avaliação dos impactos da utilização de inseticidas às abelhas melíferas, e ainda trazer informações que possam contribuir no entendimento do declínio dos polinizadores registrado nos últimos anos.

No entanto, mais estudos são fundamentais para o desenvolvimento dos métodos de avaliação dos riscos, impactos ecológicos e econômicos do uso dos defensivos agrícolas, em geral, sobre a fauna polinizadora.