
Ciências Biológicas Integral

Fellipe Chaves Nominato

Estudo da ação do inseticida Tiametoxam na sobrevivência e no comportamento de operárias de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) em diferentes idades



Rio Claro
2012

FELLIPE CHAVES NOMINATO

**ESTUDO DA AÇÃO DO INSETICIDA TIAMETOXAM NA
SOBREVIVÊNCIA E NO COMPORTAMENTO DE OPERÁRIAS DE *Apis
mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE) EM DIFERENTES IDADES**

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientador: Prof. Dr. Andriago Monroe Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro, como requisito para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2012

595.799 Nominato, Fellipe Chaves
N813e Estudo da ação do inseticida Tiametoxam na sobrevivência e no comportamento de operárias de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera : Apidae) em diferentes idades / Fellipe Chaves Nominato. - Rio Claro : [s.n.], 2012
43 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Co-Orientador: Andriago Monroe Pereira

1. Abelha. 2. Inseticida. 3. Tiametoxam. 4. Comportamento. 5. Dose letal. 6. Dose subletal. 7. *Apis mellifera*. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Aos meus pais, Segismundo Nominato Neto e
Magda Chaves Almeida Nominato, e ao meu
irmão Victor Chaves Nominato, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Osmar, pela orientação e oportunidade de trabalho no Centro de Estudos de Insetos Sociais. Além da confiança depositada em mim, tornando possível meu ingresso no mundo da ciência.

Ao Dr. Andrigo, pela co-orientação e grande apoio na realização deste trabalho. Obrigado pela compreensão, paciência, apoio e amizade.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) e ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, seus professores e funcionários, por permitirem a utilização de suas instalações para a execução deste trabalho.

Ao técnico do Biotério, Antônio Sérgio Pascon, pela ajuda nas coletas e ensinamentos com manejo de abelhas. E por sempre estar de bom humor e disposto a dar uma mão.

A Itamar, Marcela, Rafael, Stephan, João, Rafael (Socorro), Paulo (Shao) e a todos que passam constantemente nos corredores do CEIS. Onde fiz grandes amizades e obtive boas experiências. Além do apoio, com o qual sempre pude contar.

Aos meus tios Cristina e Humberto e primas Júlia e Luísa, pela grande ajuda de vocês no meu primeiro ano de faculdade, muito obrigado por sempre estarem dispostos nos momentos que mais precisei de apoio.

À República Nemelés e agregados: Henrique (Tosse), Laura (Japa do Mar), Paulo, Raíssa, Rebeca, Alexandre (Shao), Carlos (Birdman), Rafael (Gandi), Claudia, Danilo (Jesus), Eli (Mocinha), nesses 3 anos e meio de república tivemos vários momentos felizes. E claro, as cachorras Tocha, Lucy e Yasha que sempre me fazem feliz.

Aos melhores amigos lá das Minas Gerais, Marcos, Vilson, Leandro, Dalton, Diego, Agnaldo, Thiago, Vitor, Eurípedes, Dão, Isadora, Vitória, é excelente estar com vocês.

Aos meus pais, Segismundo e Magda, ao meu irmão Victor, aos meus avós Mundim, Tita, Remy e Aparecida, tios e primos, obrigado pelo apoio que sempre me deram antes mesmo de ingressar na faculdade e por preocuparem-se comigo, apoiando para que seguisse em frente. Serei eternamente grato.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e oportunidade de experiência na ciência.

RESUMO

A abelha *Apis mellifera* tem sua grande importância por ser o polinizador economicamente mais valioso para as culturas em todo o mundo, garantindo a polinização cruzada e aumentando a produtividade de frutos. Por outro lado, a agricultura cada vez mais desenvolve produtos químicos a fim de controlar plantas daninhas, fungos e inseto-praga para garantir a produtividade. Os inseticidas são utilizados em grande escala no interior do estado de São Paulo, nas culturas de citrus para o controle do greening. As aplicações normalmente são feitas por aviões e como resultado do efeito deriva, uma mortandade expressiva é observada em apiários próximos das plantações. As abelhas melíferas podem entrar em contato com tal agente químico através de suas atividades de coleta de água, resinas vegetais, pólen e néctar. A intoxicação resultante desta exposição pode ser letal, o que é facilmente detectável, ou causar efeitos na fisiologia e no comportamento do inseto. Esses, que por sua vez são dificilmente detectáveis, como paralisia, desorientação ou mudanças comportamentais; porém podem comprometer toda a estrutura social da colônia, por esta razão objetivou-se estudar os efeitos do inseticida Tiametoxam no comportamento de abelhas *A. mellifera*. Indivíduos recém-emergidos e com 10 dias de idade de *A. mellifera* foram testados. Aplicações de 1µl de Tiametoxam, diluído em acetona, foram feitas no lado dorsal do tórax com um microaplicador. Preliminarmente, observou-se a DL_{50} vinte e quatro horas após o tratamento tópico. Verificou-se que a DL_{50} para abelhas africanizadas recém-emergidas é 8 ng/abelha, e para abelhas africanizadas com 10 dias de idade é 18 ng/abelha. Os comportamentos foram analisados 1 hora após a aplicação do inseticida com doses que correspondem a DL_{50} , $DL_{50}/10$, $DL_{50}/50$ e $DL_{50}/100$, além do grupo controle. No teste de reflexo de extensão da probóscide, houve comprometimento do comportamento nas doses de 8 e 18 ng/abelha, em operárias recém-emergidas e operárias com 10 dias de idade, respectivamente. E no comportamento de locomoção houve alteração apenas na dose de 18 ng/abelha, em operárias com 10 dias de idade. Os métodos utilizados mostraram-se como uma importante ferramenta para estudos toxicológicos. O inseticida afetou a sobrevivência e comportamentos das abelhas testadas, e também apresentou efeitos deletérios em doses pequenas. Ressaltando a importância do estudo para novas pesquisas e preservação das abelhas.

Palavras chaves: Tiametoxam; Comportamento; Dose Letal; Dose Subletal; *Apis mellifera*.

ABSTRACT

The bee *Apis mellifera* has a great importance because it is the most economically valuable pollinator for crops worldwide, ensuring cross-pollination and increasing fruit yield. Moreover, agriculture increasingly develops chemicals to control weeds, fungi and insect pests to ensure productivity. Insecticides are used on a large scale in the state of São Paulo, in cultures of citrus for control of greening. Applications are usually made by aircraft and as a result of the effect derives a significant mortality is observed in apiaries near the plantations. Honey bees can get in contact with such chemical agent through their activities of water harvesting, plant resins, pollen and nectar. Intoxication resulting from this exposure can be lethal, which is easily detectable, or cause effects on the physiology and behavior of the insect. These, in turn are hardly detectable, such as paralysis, disorientation, behavioral changes, but can compromise the entire social structure of the colony, therefore aimed to study the effects of the insecticide Thiamethoxam behavior of honeybees *A. mellifera*. Newly emerged individuals and with 10 days of age were tested. Applications of 1 μ L de Thiamethoxam, diluted in acetone, were made on the dorsal thorax with a microapplicator. Preliminarily, it was observed LD₅₀ twenty four hours after topical treatment of Thiamethoxam. It was found that the LD₅₀ for newly emerged honeybees is 8 ng/bee and for honeybees with 10 days of age is 18 ng/bee. The behaviors were analyzed 1 hour after application of insecticide at doses corresponding to LD₅₀/100, LD₅₀/50, LD₅₀/10 and LD₅₀, besides the control group. In the test reflex proboscis extension, there was impairment of behavior at doses of 8 and 18 ng/bee workers in newly emerged workers and 10 days of age, respectively. And in locomotor behavior was no change only at a dose of 18 ng/bee workers at 10 days of age. The methods used were as an important tool for toxicological studies. The insecticide affecting survival and behavior of the bees tested, as well as deleterious effects in small doses. Underscoring the importance of the study for further research and conservation of bees.

Keywords: Thiamethoxam; Behavior; Lethal Dose; Sublethal Dose; *Apis mellifera*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Coleta das abelhas	17
4.2. Preparação do ingrediente ativo	17
4.3. Determinação da DL ₅₀ para 24 horas	18
4.4. Testes comportamentais.....	20
4.4.1. Reflexo da Extensão da Probóscide (REP).....	20
4.4.2. Atividade de locomoção	22
4.5. Análise estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Determinação da DL ₅₀	24
5.1.1. Recém-emergidas	24
5.1.2. Operárias com 10 dias de idade.....	24
5.2. Testes comportamentais.....	27
5.2.1. Reflexo da Extensão da Probóscide.....	27
5.2.2. Teste de locomoção.....	30
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os polinizadores são imprescindíveis para a polinização de 35% das culturas agrícolas de importância econômica, além também de promoverem a polinização de áreas naturais/florestas (KLEIN et al., 2007). Dentre os polinizadores, destacam-se as abelhas sociais *Apis mellifera* por serem altamente eficazes, apresentarem produtos de grande valor econômico, além de aumentarem a produção agrícola (MORSE e CALDERONE, 2000).

Recentemente, cientistas identificaram um fenômeno denominado “colony collapse disorder” (CCD) nos Estados Unidos, onde apicultores chegaram a perder de 80 a 100% de suas colmeias (OLDROYD, 2007). As causas desta alta mortalidade ainda não estão bem esclarecidas. Sabe-se apenas que, em muitos casos as operárias campeiras, encarregadas de coletar o néctar e o pólen, pela perda da capacidade de vôo ou por desorientação, não conseguem retornar às colméias (OLDROYD, 2007).

Dentre os vários grupos de inseticidas, destaca-se os neonicotinoides que representam uma das classes de inseticidas mais utilizada nas últimas três décadas nos campos de cultivo (TOMIZAWA e CASIDA, 2005). O Tiametoxam, um neonicotinoide de segunda geração e fabricado/comercializado pela Syngenta Proteção de Cultivos LTDA com o nome comercial de Actara[®], tem ação sistêmica, podendo ser aplicado tanto por via terrestre quanto aérea, este produto é utilizado em diversas culturas, como: citros, café, cana-de-açúcar, arroz, abacaxi.

Tomando-se que os inseticidas sistêmicos, em particular, se difundem ao longo de todos os tecidos vegetais de acordo com o desenvolvimento da planta, eventualmente néctar e pólen podem ser contaminados (RORTAIS et al., 2005, *apud* HENRY, 2012). Nesse contexto, as abelhas são constantemente vítimas do uso de inseticidas para combater insetos-praga nas plantações presentes nas áreas onde forrageiam. E embora apenas uma classe de operárias que realizam a atividade de forrageamento entra em contato com tais produtos, toda a colônia está exposta a sua ação, pois os demais indivíduos se alimentam de pólen e néctar que podem estar contaminados (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).

Contudo, além de controlar os insetos-praga este composto pode também afetar as abelhas. Além do efeito letal, os inseticidas podem apresentar efeitos subletais, que é dificilmente detectável, podendo influenciar tanto a fisiologia quanto no comportamento das abelhas, comprometendo o desenvolvimento e a estrutura social da colônia (PHAM-DELÈGUE et al.,

2002).

Para avaliação dos efeitos de doses subletais de inseticidas podem ser realizados testes comportamentais, tais como: condicionamento de extensão da probóscide e atividade locomotora. Tal método visa reproduzir em laboratório a interação entre abelhas e uma fonte de alimento, permitindo correlações entre comportamento e mecanismos fundamentais do processo de aprendizagem (MENZEL, 1993; MENZEL; MÜLLER, 1996).

O Brasil, mesmo sendo um dos países de maior diversidade de espécies, apresenta poucos estudos a respeito sobre esse tema. Na UNESP, Rio Claro, encontra-se um dos primeiros grupos de pesquisa brasileiro realizando pesquisa no assunto. Assim sendo, esse trabalho é de grande relevância na geração de conhecimento, para a melhor compreensão dos efeitos toxicológicos de inseticidas largamente utilizados nos sistemas agrícolas, sobre o comportamento das abelhas e para preservação desses importantes polinizadores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) foram introduzidas no Brasil em 1956 no Horto de Camaquã na Região de Rio Claro – SP com o intuito de se executar um programa de melhoramento genético que fosse capaz de aumentar a produção de mel do país, associado a uma baixa agressividade. Entretanto, devido a uma manipulação incorreta ocorreu a enxameação de 26 colônias. Isto levou ao início de um processo de cruzamentos naturais com as abelhas de origem européia que haviam sido trazidas pelos imigrantes a partir de 1840, propiciando a formação de um híbrido, que foi chamado de abelha africanizada, *Apis mellifera*. Pouco a pouco, os apicultores se conscientizaram que estas abelhas poderiam ser controladas e exploradas com êxito (SOARES, 1998). Atualmente, a apicultura brasileira se caracteriza por ser mais moderna, atualizada e com uma significativa preferência dos apicultores (TOLEDO et al. 2004).

A. mellifera (Hymenoptera: Apidae) são importantes produtoras de mel e cera principalmente (BROMENSHENK et al., 1996). Além disso, são importantes polinizadoras de diversos cultivos. A polinização, por sua vez, contribui para a manutenção das plantas nativas (MALASPINA e ZACARIN, 2006) e é fundamental na condução de muitas culturas agrícolas (WILLIAMS et al., 1991; SHEPHERD et al., 2003). Embora muitos grupos de insetos sejam conhecidos como polinizadores, as abelhas constituem, provavelmente, o grupo mais importante em quantidade e diversidade (BAWA et al., 1985), o que está relacionada à sua dependência das flores para obtenção de recursos alimentares, ao seu comportamento de forrageamento e constância floral (CORBET et al., 1991).

Apesar dos benefícios proporcionados pelas abelhas ao homem, tem havido um decréscimo no número de espécies de abelhas, provavelmente por causa da destruição de seus habitats causada pelo desmatamento, e do uso indiscriminado de inseticidas para proteger uma variedade de cultivos comerciais (MALASPINA e ZACARIN, 2006). As abelhas podem ser consideradas um inseto particularmente vulnerável aos inseticidas, pois seu genoma tem poucos genes decodificando enzimas capazes de metabolizar tais produtos quando comparados a outros insetos (CLAUDIANOS et al. 2006).

O uso de inseticidas é o principal método de controle de pragas no Brasil, entretanto, tem sido ecologicamente incorreto, levando a problemas como resistência de certas pragas aos mesmos, deflagração de pestes secundárias, efeitos antagônicos em organismos não alvos,

geração de resíduos e perigos diretos a aqueles indivíduos onde se aplicaram os inseticidas. (RAMALHO et al., 1996).

No Brasil, não há mecanismo formal de monitoramento das populações de abelhas produtoras de mel. Não é conhecido, por exemplo, se essa população tem decrescido, como em outros países. Em 2006, apicultores dos Estados Unidos sofreram com declínios das populações de abelhas produtoras de mel expostas aos inseticidas e espécies parasitas (*Varroa jacobsoni*), tal evento ficou conhecido como “Colony Collapse Disorder” (CCD) (RUCKER et al., 2012). Com a ausência de dados de monitoramento das abelhas no Brasil, é difícil estimar o impacto que os inseticidas têm nas populações de abelhas. Estudos sugerem que a exposição a certos inseticidas em níveis recomendados pela EMBRAPA/CNPQ para o controle de pragas teria levado a decréscimos das populações de abelhas brasileiras no nordeste (ABRAMSON et al., 1999). Também não existem muitos estudos relatando os efeitos de inseticidas no comportamento das abelhas produtoras de mel. Uma das influências da toxicidade dos inseticidas no comportamento é verificada no sistema motor e em seu aprendizado (ABRAMSON et al., 1999), que por sua vez tem sido estudado amplamente, a partir de diferentes experimentos dirigidos (McCABE et al., 2007).

Nesse contexto, o desaparecimento de várias espécies de abelhas dos campos de cultivo vem preocupando muitos pesquisadores mundialmente. O “Colony Collapse Disorder” (CCD) foi identificado também na Alemanha, Suíça e Península Ibérica. Contudo as causas desta alta mortalidade ainda não estão bem esclarecidas, sendo uma das hipóteses a intoxicação das abelhas por inseticidas, cada vez mais utilizados na agricultura.

No Brasil, principalmente nas regiões Sudeste e Centro Oeste, o sumiço das abelhas começa a ser motivo de preocupação (GUIMARÃES, 2007), pois se acredita que no Brasil esse fenômeno seja decorrente do intenso uso de inseticidas nas plantações e de infecções por patógenos. Contudo, o CCD ainda não foi oficialmente constatado no Brasil (GUIMARÃES, 2007).

As abelhas campeiras não são as únicas expostas aos inseticidas, abelhas nutridoras recém-emergidas e larvas que se alimentam de pólen e néctar estocado nos favos também estão sendo expostas aos agrotóxicos. A divisão de cada tarefa está relacionada com a idade do indivíduo e com a necessidade da colônia, com o componente genético e com fatores ambientais (CALDERONE; PAGE, 1992). De forma geral, as abelhas mais velhas, com idade média de 37,9

dias, realizam as atividades de coleta, enquanto as mais novas são encarregadas de trabalhos dentro da colônia, como por exemplo: atender a cria (média de idade de 12,6 dias), atender a rainha (média de idade de 17,1 dias), construir favos (média de idade de 15,2 dias) e montar guarda (média de idade de 19,0 dias) (WINSTON, 2003). Desse modo, as larvas em todo o seu desenvolvimento e as operárias que executam o trabalho dentro da colônia podem entrar em contato com esses produtos.

É provável que a concentração dessa exposição possa variar, sendo que a quantidade de compostos químicos, a persistência dos resíduos e a frequência de sua aplicação nas plantações não são informações suficientes para estipular com precisão essa concentração, uma vez que os compostos químicos podem ser acumulados por um longo tempo no interior da colônia, onde estão sujeitos aos processos de degradação/concentração (CHAUZAT et al., 2006).

No Brasil, recentemente têm ocorrido muitos relatos de apicultores sobre a mortalidade súbita de suas abelhas em diversas regiões do país, como no interior do Piauí, no interior do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e no interior Estado de São Paulo. Os relatos ocorridos no Estado de São Paulo estão localizados na região central do estado, nas cidades de Rio Claro, São Paulo, Pirassununga, Araras, Mogi Mirim, Piracicaba, Brotas, Boa Esperança do Sul, São Rita do Passa Quatro, São Carlos e Tabatinga. Segundo informações obtidas junto aos apicultores, às perdas e/ou prejuízos foram cerca de 400 colméias para cada caso. Para o caso da cidade de Boa Esperança do Sul, foi verificada a presença de Tiametoxam (0,04 mg/kg/abelha) em operárias mortas e coletadas no apiário nas proximidades da plantação de citros (MALASPINA et al., 2008 a e b).

Dentre os vários tipos de inseticidas, os neonicotinoides são uma das classes mais importantes de inseticidas das últimas três décadas e são usados para controlar insetos-praga. O Tiametoxam faz parte deste grupo químico, sendo usado como inseticida em diversas culturas, como por exemplo, citros, café, cana-de-açúcar, arroz, abacaxi, entre outras, atuando de modo sistêmico na planta e podendo ser aplicado via aérea ou via terrestre. Além disso, de acordo com o cadastro de produtos formulados do Sistema Agrofit, o classifica como mediantemente tóxico e perigoso ao meio ambiente.

Tiametoxam é um inseticida que age por contato e ingestão, possui ação sistêmica, e a molécula mimetiza a acetilcolina e compete pelos receptores nicotínicos de acetilcolina na membrana pós-sináptica (FERNANDES-BUZZERIO et al., 2005, *apud* MAEZUKA, 2008).

A grande parte dos inseticidas e acaricidas (aproximadamente 90%) são neurotóxicos, ou seja, atuam no sistema nervoso central podendo agir na voltagem-dependente dos canais de sódio como o DDT e os piretróides, nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) como os policlorocicloalcanos e Fipronil e no sistema colinérgico como inibidores da acetilcolinesterase representados pelos organofosforados e metilcarbamatos, ou como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina como os nicotinóides e neonicotinóides (CASIDA; QUISTAD, 1998, TOMIZAWA; CASIDA, 2003). O grande uso desses inseticidas se deve a sua rápida ação no combate às pragas e por atuar em locais ultra-sensíveis que mesmo o menor dano pode resultar efeitos letais (CASIDA; QUISTAD, 2004). A seleção de inseticidas com baixos danos aos mamíferos e potencialmente eficazes para pragas é o requerimento essencial para segurança e efetividade dos pesticidas.

Os neonicotinóides são os mais novos e a maior classe de inseticidas desenvolvidos nas últimas três décadas. Representam de 11 a 17% do faturamento anual do mercado de inseticida (em torno de US\$ 1 bilhão). São prontamente absorvidos pelas plantas e agem contra um número variado de insetos pragas como sugadores, afídeos, moscas brancas, tripses, minadores de folhas, besouros e alguns lepidópteros e são efetivos no tratamento de sementes. São principalmente utilizados como sistêmicos de plantas, ou seja, quando aplicados nas sementes, solo ou folhagens eles se deslocam no interior da planta promovendo uma proteção a longo prazo contra tais insetos-pragas (FORD; CASIDA, 2008, MAIENFISCH et al., 2001, TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Por serem sistêmicos, os neonicotinóides podem ser translocados para o pólen e o néctar, que podem ser coletados pelas abelhas forrageiras e serem levados à colônia e armazenados para alimentar os indivíduos que a integram.

Os neonicotinóides agem principalmente nas regiões da neurópila dos lobos antenais, que são estruturas cerebrais formadas por prolongamentos dos neurônios olfatórios que recebem os estímulos captados pela antena (MAIENFISCH et al., 2001).

A maneira clássica para avaliar o efeito letal de um inseticida é através da determinação da toxicidade aguda medida pela DL_{50} , ou seja, a dose capaz de induzir 50% de mortalidade em animais testados, ou pela CL_{50} que é a concentração capaz de induzir a mortalidade de 50% da população testada.

Os procedimentos para a determinação da DL_{50} (dose capaz de ocasionar a mortalidade de 50% da população) é um método laboratorial, com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda por

contato de inseticidas e outras substâncias químicas em abelhas domésticas operárias adultas, são testes baseados principalmente no protocolo da Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção de Plantas (EPPO) que visam avaliar os efeitos colaterais dos produtos para proteção de plantas e abelhas.

Atkins et al. (1981, *apud* DEVILLERS, 2002) classificaram os inseticidas de acordo com sua toxicidade aguda em abelhas: altamente tóxicos ($DL_{50} < 2 \mu\text{g/abelha}$). Neste caso, grandes perdas são esperadas se estes produtos forem utilizados quando as abelhas estiverem presentes; moderadamente tóxicos ($DL_{50} = 2 \text{ a } 11 \mu\text{g/abelha}$). Estes produtos podem ser utilizados próximos as abelhas desde que a dosagem, tempo de exposição e método de aplicação estiverem corretos; relativamente não-tóxicos ($DL_{50} > 11 \mu\text{g/abelha}$) que podem ser utilizados próximos as abelhas com mínimo de dano.

O Tiametoxam é comercializado no Brasil pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda nas formulações: pó dispersível - Cruise® (700g/kg); granulado - Actara® 10 GR (10g/kg); granulado dispersível - Actara® 250 WG (250g/kg). O produto Cruise® é utilizado para o tratamento de sementes, o Actara® 10 GR é utilizado em tratamento terrestre e o Actara® 250 WG é utilizado em aplicações terrestres e aéreas (BRASIL, 2008).

Segundo Pereira (2010), testes fazendo-se aplicação tópica do inseticida Tiametoxam em *A. mellifera* forrageiras mostraram uma DL_{50} no valor de 17 ng/abelha. Levando em consideração que, dependendo do cultivo e diluição dos produtos Actara® 10 GR e Actara® 250 WG, tais produtos podem atingir a concentração de aplicação variando entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, valores os quais excedem o valor da DL_{50} para abelhas em 29,4 e 58,8 vezes, respectivamente (PEREIRA, 2010).

Para obter eficientemente alimento das flores, insetos coletores de néctar aprendem a associação entre o alimento e indicadores florais, como o odor floral, cor e forma, que são memorizados e posteriormente associados com a recompensa alimentar (MENZEL, 1999). Conhecendo o odor do alimento durante o forrageamento facilita o retorno àquela proveitosa parte floral (von FRISCH, 1919).

Estudos clássicos do condicionamento do olfato de várias espécies de insetos têm sido relatados (TAKEDA, 1961; BITTERMAN et al., 1983; LALOI et al., 1999; WATANABE et al., 2003; DALY e SMITH, 2000; KAISER et al., 2003; CHABAUD et al., 2006), mostrando que eles todos são capazes de associar um odor com uma recompensa (McCABE, 2007).

O aprendizado associativo das operárias estudado pelo condicionamento do REP pode apresentar um valor ecológico significativo por se tratar de um pré-requisito para o sucesso do forrageamento de toda colônia (DECOURTYE et al., 2005).

O condicionamento do olfato dos insetos em condições controladas de laboratório, como a resposta à extensão da probóscide, permite estudos quantitativos de habilidades cognitivas sob condições controladas, capacitando correlações posteriores entre comportamento e os mecanismos fundamentais do processo de aprendizagem (MENZEL, 1999). Em sociedades de insetos com alto grau de organização isso ajuda a entender análises do comportamento social, assim como transferência de informações e comunicação entre eles (FARINA et al., 2005; GRÜTER et al., 2006) por causa da habilidade de algumas espécies de transferir associações gustativas nos diferentes contextos comportamentais (GERBER et al. 1996; SANDOZ et al. 2000; CHAFFIOL et al., 2005).

Abelhas podem ser treinadas para associar um odor com uma recompensa de sacarose. A obtenção de solução de sacarose ocorre a partir do toque das antenas das abelhas, o que instiga a extensão da probóscide (FRINGS, 1944), que por sua vez, é um mecanismo para estudo do limiar de respostas às concentrações de açúcar, como aquelas encontradas no néctar (PAGE Jr et al., 1998). Este reflexo e sua variação podem ser direta ou indiretamente, resultado de variação no genótipo e dos líquidos que as forrageadoras coletam (PANKIW et al., 1998), já que algumas abelhas respondem a água isolada e outras ao aumento das concentrações de açúcar. Esse fato demonstra que as abelhas forrageadoras são capazes de perceber diferenças nas concentrações de açúcar do néctar e conseqüentemente ajustarem seu comportamento de forrageamento e recrutamento. As respostas correlacionam com os tipos de materiais coletados (pólen, néctar ou água), estabelecendo uma demonstração de como as variações das respostas podem levar a uma divisão de trabalho (PAGE Jr et al., 1998).

O condicionamento da probóscide é um confiável e sensível indicador para a determinação dos efeitos de toxinas no aprendizado de abelhas européias (TAYLOR et al., 1987; MAMOOD e WALLER 1990; STONE et al., 1997).

Neste panorama, estudos comportamentais em insetos não alvos, tais como as abelhas, associando-se aos testes de toxicidade, são de grande importância para a elucidação da ação desses compostos nos insetos polinizadores, além de fornecer subsídios para a avaliação de como esses organismos estão respondendo a perturbações dos ecossistemas contaminados.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo determinar a DL_{50} do inseticida Tiametoxam em operárias de *A. mellifera* recém-emergidas e operárias com 10 dias de idade, bem como avaliar os efeitos de doses subletais deste inseticida no reflexo da extensão da probóscide (REP) e na atividade motora destas abelhas em condições de laboratório.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das abelhas

Para as análises propostas, indivíduos recém-emergidos de *A. mellifera* foram coletados diretamente de favos de 3 colônias, com condições fisiológicas adequadas, livre de doenças e com uma rainha em franca postura no apiário do Departamento de Biologia, UNESP - Rio Claro. A coleta dos favos fez-se somente durante a estação quente, entre Setembro e Maio. Primeiramente, para os testes com operárias recém-emergidas, 2 favos contendo em sua maioria pupas prestes à eclosão foram coletados de uma colônia por vez e armazenados em estufa B.O.D. a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ com $70\% \pm 5\%$ de umidade relativa. Após 24 horas, todas as abelhas recém-emergidas foram coletadas para os testes. As abelhas não utilizadas foram devolvidas para a colônia. Dessa forma obteve-se certeza que todas as abelhas tinham a mesma idade.

Para os experimentos com operárias com 10 dias de idade utilizaram-se as mesmas colônias e favos também contendo em sua maioria pupas prestes à eclosão foram coletados entre Setembro e Maio. Os favos foram mantidos em estufa B.O.D. a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ com $70\% \pm 5\%$ de umidade relativa e, após 24 horas, as abelhas emergidas foram coletadas e marcadas na parte dorsal do tórax com tinta branca atóxica e devolvidas para a colônia logo em seguida. Após 10 dias foram novamente coletadas a fim de realizar os experimentos. Procedeu-se de tal forma para se coletar as abelhas diretamente na colônia e para garantir que possuísem 10 dias de idade.

Todos os testes foram realizados nos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

4.2. Preparação do ingrediente ativo

A solução principal, da qual foram feitas as diluições, constou da diluição de 0,01 g do ingrediente ativo em 100 mL de acetona, resultando na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Até a sua utilização, a solução foi mantida em vidro âmbar e em câmara fria ($3,0^{\circ}\text{C}$).

4.3. Determinação da DL₅₀ para 24 horas

Os procedimentos para a determinação da DL₅₀ (dose capaz de ocasionar a mortalidade de 50% da população) seguiram o protocolo da OECD (1998).

Para cada concentração testada e para o grupo controle, 3 repetições de 20 operárias, foram transferidas para potes plásticos com volume de 500 mL perfurados na região da tampa para que ocorresse circulação de ar. Em cada pote existia um recipiente contendo algodão previamente umedecido e outro recipiente contendo pasta cândi para que as abelhas se alimentassem *ad libitum* (figura 1).

Nas abelhas do grupo experimental foi feita uma aplicação tópica (com auxílio de uma micropipeta) de 1 µL da solução contendo a substância a ser testada na parte dorsal do tórax e transferidas para os potes plásticos. Já as abelhas do grupo controle receberam 1 µL de acetona. No caso das abelhas com 10 dias de idade, tal aplicação foi feita na parte inferior do tórax, já que na parte dorsal havia marcação prévia.

Todos os testes foram conduzidos em estufas bacteriológicas (B.O.D.) com temperatura de 32,5°C ± 1,0 e com 70% ± 5 de umidade relativa.

Inicialmente foi realizado um teste piloto para determinar as doses a serem utilizadas nos testes.

Na Tabela 1 encontram-se as concentrações obtidas a partir da solução principal para determinar a DL₅₀ do Tiametoxam sobre as operárias recém-emergidas de *A. mellifera*. Na Tabela 2 encontram-se as concentrações obtidas a partir da solução principal para determinar a DL₅₀ do Tiametoxam sobre as operárias com 10 dias de idade de *A. mellifera*. Encontram-se também descritas as doses aplicadas nas abelhas, já que foi aplicado 1 µL da solução.

Tabela 1. Concentrações obtidas e respectivas doses de Tiametoxam aplicadas nas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* para determinação da DL₅₀ (24 horas).

Concentração	Dose
1 µg/mL	1,0 ng/abelha
5 µg/mL	5,0 ng/abelha
10 µg/mL	10,0 ng/abelha
15 µg/mL	15,0 ng/abelha
20 µg/mL	20,0 ng/abelha
25 µg/mL	25,0 ng/abelha
30 µg/mL	30,0 ng/abelha

Tabela 2. Concentrações obtidas e respectivas doses de Tiametoxam aplicadas nas operárias com 10 dias de idade de *A. mellifera* para determinação da DL₅₀ (24 horas).

Concentração	Dose
5 µg/mL	5,0 ng/abelha
10 µg/mL	10,0 ng/abelha
15 µg/mL	15,0 ng/abelha
20 µg/mL	20,0 ng/abelha
25 µg/mL	25,0 ng/abelha
30 µg/mL	30,0 ng/abelha
35 µg/mL	35,0 ng/abelha



Figura 1: Procedimento para determinação da DL_{50} utilizando-se potes plásticos, tampa com algodão umedecido e tampo com pasta cãndi.

4.4. Testes Comportamentais

Para a realização dos testes, doses subletais (DL_{50} , $DL_{50}/10$, $DL_{50}/50$, $DL_{50}/100$) do ingrediente ativo foram aplicadas topicamente no tórax de *A. mellifera*. As abelhas receberam 1 μ L da solução sendo que o grupo controle recebeu somente acetona.

As avaliações comportamentais foram realizadas 1 hora após a aplicação do ingrediente ativo, pois a partir desse tempo houve grande mortalidade das abelhas recém-emergidas do grupo DL_{50} .

4.4.1. Reflexo da Extensão da Probóscide (REP)

As operárias foram presas em tubos de plástico (ponteiras cortadas de pipeta) de modo a permitir o livre movimento das antenas e das peças bucais. Para avaliar o reflexo de extensão da probóscide foram oferecidas concentrações crescentes de sacarose para as operárias de ambas as idades (Mc CABE et al., 2007; PAGE; ERBER; FONDRK, 1998; PANKIW; WADDINGTON; PAGE, 1999).

Antes do início do bioensaio propriamente dito, foi oferecida às abelhas somente água

para verificar existência de pré-sensibilização. Em seguida, usou-se a série de concentrações 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 e 50.0 % (peso/peso) de solução de sacarose. Entre cada solução foi apresentada água como controle. Em cada concentração, a proporção de abelhas que apresentaram extensão da probóscide foi registrada.

Cada solução de sacarose foi aplicada na antena da abelha uma única vez, através de uma zaragatoa embebida na solução, em intervalos de 3 minutos. Considerou-se uma resposta positiva somente quando as abelhas estenderem completamente suas probóscides (figura 2). Após a extensão foi permitido que a abelha se alimentasse por 3 segundos. A ausência de apenas uma resposta entre as concentrações foi tolerada. As abelhas que apresentaram ausência de resposta em concentrações consecutivas, ou as que responderam na primeira apresentação de água não foram consideradas para análise (PEREIRA, 2010).

Foi realizado a comparação das proporções de respostas de extensão da probóscide nos grupos experimentais e controle para cada solução de sacarose apresentada, ou seja, foi analisada a proporção de abelhas que responderam a concentração de 0,1%, depois as abelhas que responderam a concentração de 0,3% e sequencialmente até finalizar com as abelhas que responderam a concentração de 50,0%.

Em cada teste, foram utilizadas aproximadamente 80 abelhas para cada uma das quatro concentrações (DL_{50} , $DL_{50}/10$, $DL_{50}/50$, $DL_{50}/100$) mais o grupo controle, para cada um dos dois grupos de idade das abelhas, resultando em 640 abelhas aproximadamente (figura 3).



Figura 2: Teste de Reflexo da Extensão da Probóscide. Imagem esquerda não houve resposta (oferecido água), imagem direita houve resposta (oferecido sacarose 50%).



Figura 3: Conjunto de abelhas para realização do teste de reflexo de extensão da probóscide para recém-emergidas.

4.4.2. Atividade de locomoção

O teste de atividade motora foi feito em uma caixa de madeira (50 x 30 x 4 cm). Na parte frontal foi colocado um vidro para permitir a visualização das abelhas. A caixa também

apresentava 6 divisões internas formando raias de 50 x 5 x 4 cm (figura 4). Após a aplicação das doses do princípio ativo as abelhas foram liberadas nestas divisões através de aberturas na parte inferior. A caixa foi posicionada verticalmente e na parte superior foi colocada uma lâmpada fluorescente o que levou as abelhas subirem em direção a ela devido a fototaxia positiva (LAMBINI et al., 2001) motivo pelo qual os testes foram realizados em ambiente com ausência de luz. Uma tela de nylon foi colocada após a marca de 50 cm para impedir que as abelhas chegassem até a lâmpada (PEREIRA, 2010).

No teste com recém-emergidas foram utilizadas 16 abelhas para cada uma das 4 concentrações (DL_{50} , $DL_{50}/10$, $DL_{50}/50$, $DL_{50}/100$) mais o grupo controle. E no teste com operárias de 10 dias de idade foram utilizadas 37 abelhas para cada uma das 4 concentrações mais o grupo controle, totalizando 265 abelhas. Simultaneamente eram liberadas 6 abelhas e seu comportamento filmado. Posteriormente, foi estimada a velocidade de cada abelha para percorrer os 50 centímetros (PEREIRA, 2010).



Figura 4: Raia utilizada para os testes de atividade locomotora (PEREIRA, 2010).

4.5. Análise estatística

Para a determinação da DL_{50} os dados foram analisados através do método Probit

(FINNEY, 1952) utilizando o programa BioStat (AnalysSoft, 2008).

No teste de avaliação do reflexo de extensão da probóscide foi realizada inicialmente uma comparação entre os grupos de abelhas experimentais (DL_{50} , $DL_{50}/10$, $DL_{50}/50$, $DL_{50}/100$ e o grupo controle) através do teste do qui-quadrado para cada uma das concentrações de sacarose. Nos casos em que ocorreu diferença significativa foi feito, posteriormente, um teste análogo ao teste de Dunnett, onde houve as transformações das proporções em arcseno, para verificar qual dose aplicada diferiu do grupo controle (ZAR, 1999).

No teste de locomoção foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal – Wallis, já que os dados apesar de apresentarem distribuição normal, não apresentaram variâncias homogeneas (ZAR, 1999). Nos casos em que ocorreu significância nos resultados, foi realizado o teste de Dunn para verificar qual concentração do princípio ativo que apresentava diferença significativa em relação ao grupo controle.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da DL_{50}

5.1.1. Recém-emergidas

Os dados de mortalidade observados no bioensaio, após 24 horas para cada uma das doses testadas foram submetidos à análise Próbit, obtendo-se uma DL_{50} no valor de 7,85 ng/abelha com um intervalo de confiança de 7,25 a 8,47 ng/abelha (tabela 3 e figura 5).

5.1.2. Operárias com 10 dias de idade

Os dados de mortalidade observados no bioensaio, após 24 horas para cada uma das doses testadas foram submetidos à análise Próbit, obtendo-se uma DL_{50} no valor de 17,76 ng/abelha com um intervalo de confiança de 15,76 a 20,11 ng/abelha (tabela 4 e figura 6).

Tabela 3: Resultado da análise Próbit para a determinação da DL_{50} em 24 horas do Tiametoxam aplicado em recém emergidas de *A. mellifera*.

N	α	β	χ^2	GL	DL_{50}	Intervalo de Confiança	
						Inferior	Superior
60	1,0821	4,3771	3,9171	5	7,854	7,2541	8,4727

N: número de indivíduos; α : coeficiente de regressão; β : coeficiente angular; χ^2 : qui-quadrado; GL: graus de liberdade; DL_{50} , Intervalo de Confiança Inferior e Superior = ng/abelha.

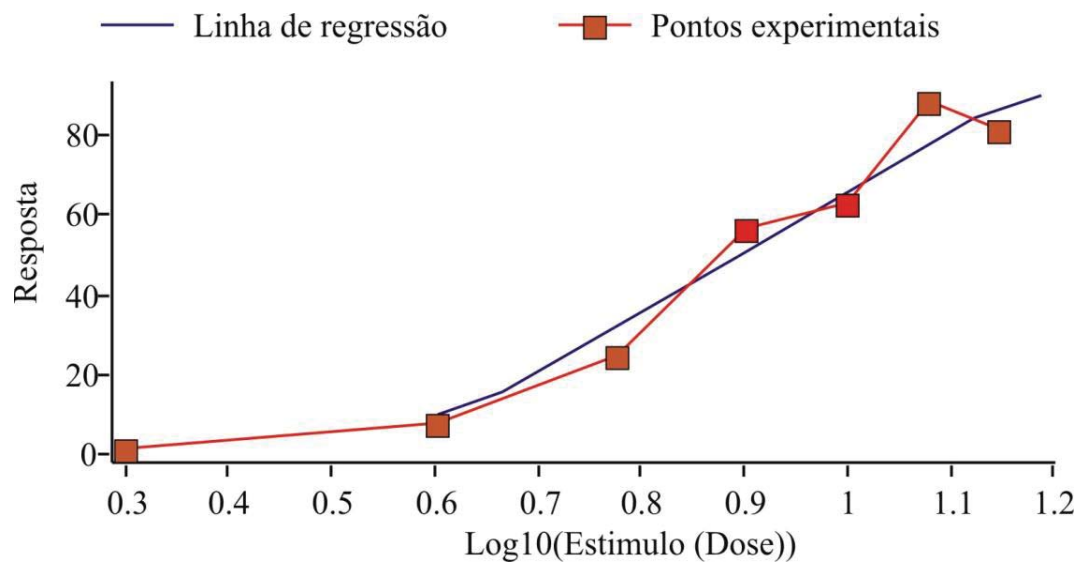


Figura 5: Regressão realizada pela análise próbit a partir da mortalidade registrada para a determinação da DL_{50} 24 horas após a aplicação tópica do Tiametoxam.

Tabela 4: Resultado da análise Próbit para a determinação da DL_{50} em 24 horas do Tiametoxam aplicado em nutridoras de 10 dias de *A. mellifera*.

N	α	β	χ^2	GL	DL_{50}	Intervalo de Confiança	
						Inferior	Superior
54	1,33	2,937	2,4199	4	17,7648	15,7685	20,1191

N: número de indivíduos; α : coeficiente de regressão; β : coeficiente angular; χ^2 : qui-quadrado; GL: graus de liberdade; DL_{50} , Intervalo de Confiança Inferior e Superior = ng/abelha.

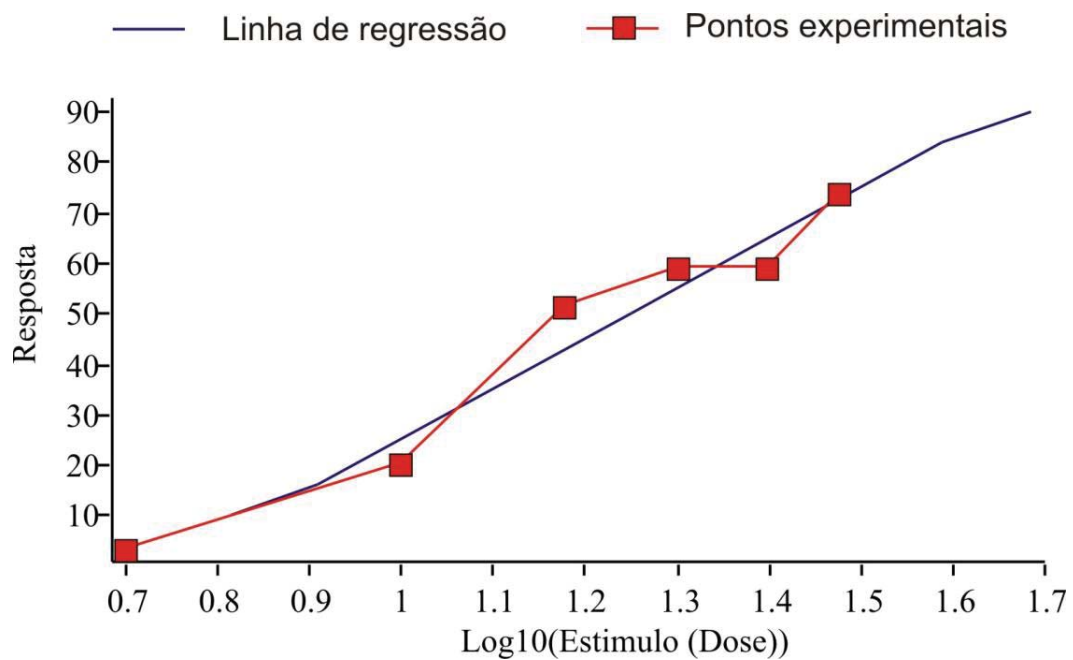


Figura 6: Regressão realizada pela análise próbit a partir da mortalidade registrada para a determinação da DL_{50} 24 horas após a aplicação tópica do Tiametoxam.

5.2. Testes comportamentais

5.2.1. Reflexo da Extensão da Probóscide

- **Operárias recém-emergidas**

Os resultados obtidos, através do teste estatístico análogo ao Dunnet, mostram que o grupo de abelhas o qual recebeu a dose de 8 ng/abelha apresentou diferença estatística significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentrações de 1,0; 3,0; 10,0; 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 5 e figura 7).

- **Operárias com 10 dias de idade**

Os resultados obtidos, através do teste estatístico análogo ao Dunnet, mostram que o grupo de abelhas o qual recebeu a dose de 18 ng/abelha apresentou diferença estatística significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentrações de 1,0, 3,0, 10,0 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 6 e figura 8).

Tabela 5: Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Tiametoxam e grupo controle 1 hora após a aplicação. * = diferença significativa quando comparada com o grupo controle.

Sacarose (%)	Dose do princípio ativo (ng/abelha)				
	Controle (n= 78)	0,08 (n= 79)	0,16 (n= 80)	0,8 (n= 80)	8 (n= 58)
0,1	2,56	1,27	2,5	2,5	0
0,3	1,28	6,33	7,5	12,5	0
1,0	28,2	30,4	25	42,5	1,72*
3,0	67,9	69,6	63,8	68,8	17,2*
10,0	94,9	79,7	86,3	73,8	22,4*
30,0	96,2	88,6	95	90	36,2*
50,0	89,7	87,3	88,8	85	27,6*

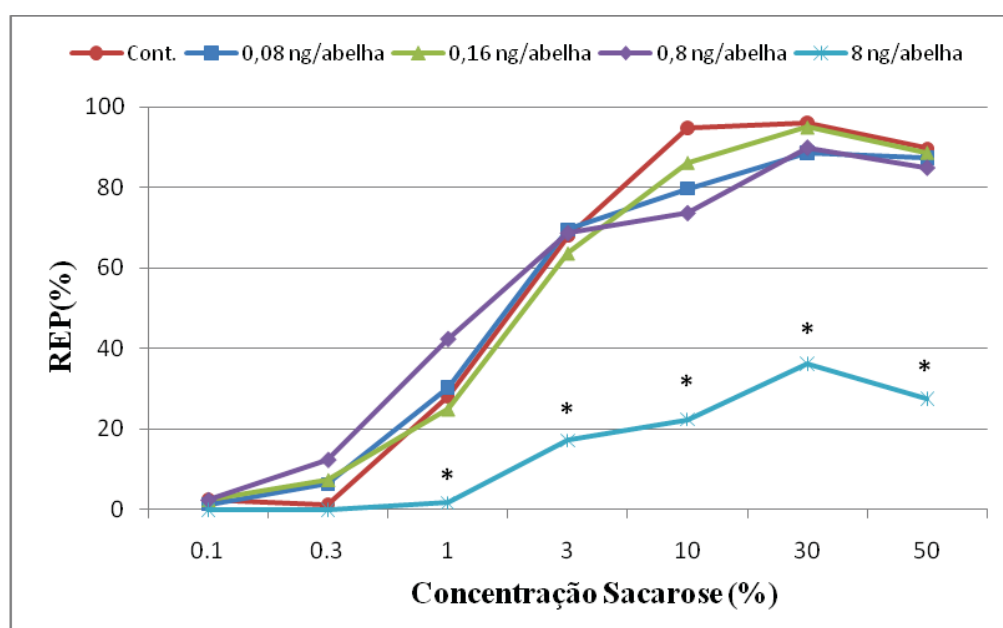


Figura 7: Proporção de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) durante a apresentação das diferentes concentrações de sacarose. As curvas representam o grupo controle e as demais doses de Tiametoxam aplicados topicamente 1 hora antes do teste. * = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Dunnet, $p < 0,05$).

Tabela 6: Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Tiametoxam e grupo controle 1 hora após a aplicação. * = diferença significativa quando comparada com o grupo controle.

Sacarose (%)	Dose do princípio ativo (ng/abelha)				
	Controle (n= 74)	0,18 (n= 70)	0,36 (n= 75)	1,8 (n= 74)	18,0 (n= 65)
0,1	0	0	0	0	0
0,3	2,7	0	4,0	0	0
1,0	4,05	1,43	5,33	2,7	4,62
3,0	9,46	14,3	8,0	4,05	4,61
10,0	41,9	40,0	32,0	35,1	23,07
30,0	59,5	55,7	53,3	52,7	35,4*
50,0	74,3	61,4	58,7	60,8	40,0*

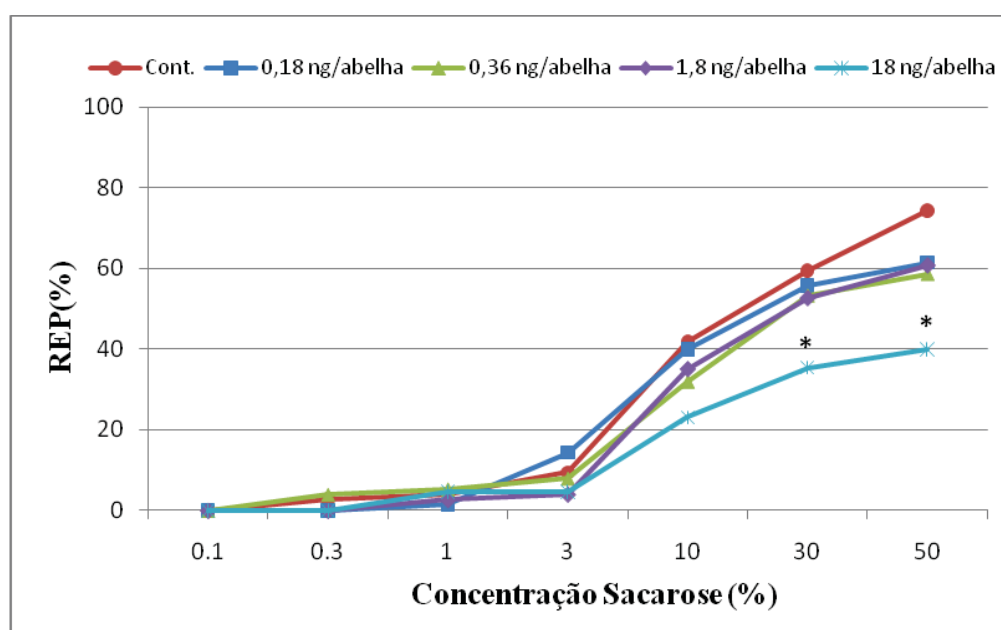


Figura 8: Proporção de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) durante a apresentação das diferentes concentrações de sacarose. As curvas representam o grupo controle e as demais doses de Tiametoxam aplicados topicamente 1 hora antes do teste. * = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Dunnet, $p < 0,05$).

5.2.2. Teste de locomoção

- **Operárias recém-emergidas**

Comparando as velocidades médias dos grupos de abelhas no teste realizado 1 hora após a aplicação tópica do inseticida, verificou-se, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 10,7047$, $GL = 4$, $p = 0,0301$, $n = 16$), que não houve diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL_{50} , $DL_{50}/10$, $DL_{50}/50$, $DL_{50}/100$ e grupo controle) (figura 9).

- **Operárias com 10 dias de idade**

Comparando as velocidades médias dos grupos de abelhas no teste realizado 1 hora após a aplicação tópica do inseticida, verificou-se, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 24,6340$, $GL = 4$, $p < 0,0001$, $n = 37$), diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL_{50} , $DL_{50}/10$, $DL_{50}/50$, $DL_{50}/100$ e grupo controle). Na comparação feita entre os grupos, realizada através do método de Dunn, verificou-se que a diferença significativa ocorre entre a velocidade média das abelhas do grupo controle e a velocidade média das abelhas do grupo onde foi aplicada a dose de 18 ng/abelha (figura 10).

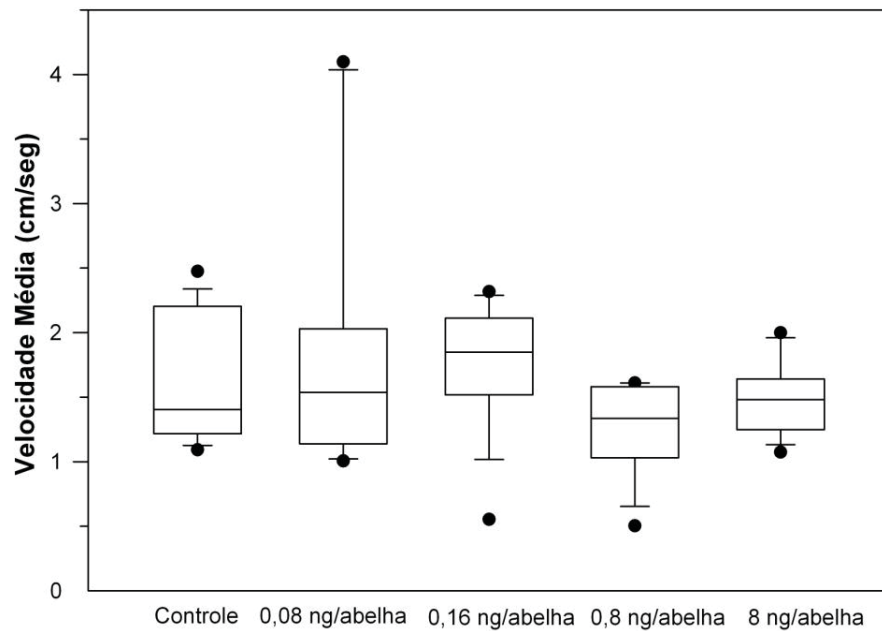


Figura 9: Velocidade média das abelhas. Os Box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Tiametoxam aplicado topicamente 1 hora antes do teste.

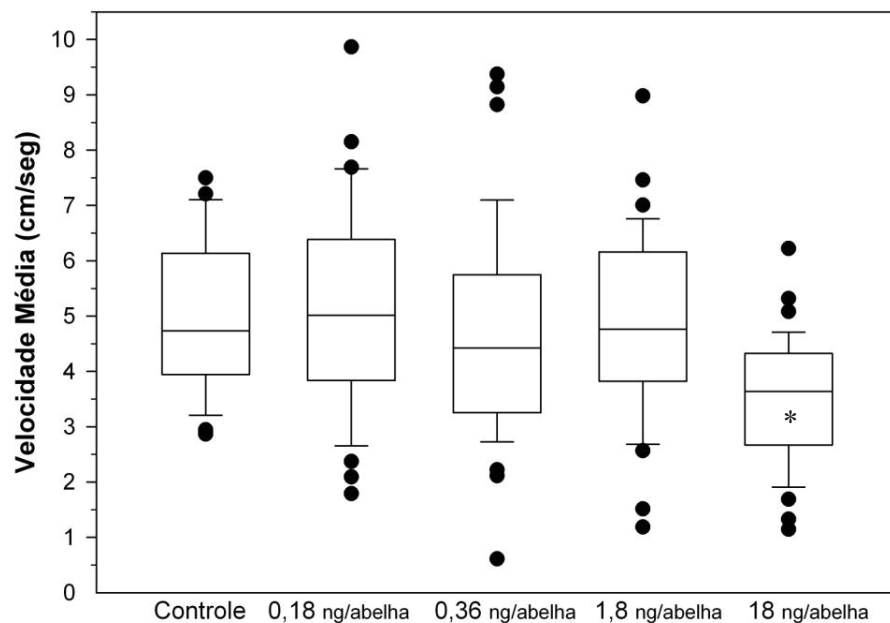


Figura 10: Velocidade média das abelhas. Os Box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Tiametoxam aplicado topicamente 1 hora antes do teste. * = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn, $n = 37$, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho verificou-se a DL_{50} para abelhas operárias recém-emergidas no valor de 8 ng/abelha, e para abelhas operárias com 10 dias de idade no valor de 18 ng/abelha. Pereira (2010) obteve para o mesmo inseticida o valor de 17 ng/abelha para abelhas adultas. Tais resultados tão próximos podem ser devido às abelhas de 10 dias de idade já apresentarem características fisiológicas semelhantes às abelhas adultas, reagindo igualmente as doses aplicadas de Tiametoxam.

Levando em consideração as diversas variações relatadas da atividade de enzimas responsáveis pela desintoxicação em abelhas e outros insetos, além de também haver diferenças entre indivíduos de sexo e idades diferentes, pode-se sugerir que os diferentes valores de DL_{50} encontrados para recém-emergidas e abelhas de 10 dias de idade no presente trabalho foi influenciado por diferenças na atividade enzimática.

Segundo Gilbert e Wilkinson (1974), utilizando-se preparações de intestino médio, não foram observadas diferenças significativas na atividade enzimática de oxidases microssomais (epoxidase, hidroxilase e 0-demeth-ylase) entre zangões e operárias, porém mostraram uma variação na capacidade de metabolizar diferentes substratos empregados. Essas enzimas são conhecidas por desempenhar um papel importante na desintoxicação de inseticidas. Estudos *in vitro* para avaliar a atividade microssomal da oxidase entre larvas de zangões e larvas de operárias de *A. mellifera* também exibiram diferenças (GILBERT e WILKINSON, 1974). As mesmas respostas na atividade microssomal da oxidase durante o desenvolvimento da abelha parecem semelhantes aos reportados para vários outros holometábolos, tais como mosca doméstica (YU et al. *apud* GILBERT e WILKINSON, 1974) e lagarta “southern armyworm” (*Spodoptera eridania* (Stoll), Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) (KRIEGER et al. *apud* GILBERT e WILKINSON, 1974).

Variações na capacidade de desintoxicação também foram encontradas em estudo entre colônias de *A. mellifera*. Smirle e Winston (1987) constataram diferenças nas taxas de atividade enzimática em colônias distintas, onde indivíduos de colônias que possuíam maior nível de atividade enzimática tinham maior resistência ao diazinon.

A capacidade de desintoxicação diminuiu em abelhas operárias mais velhas e foi associada com a perda de proteínas do intestino médio. Porém, na análise da atividade específica

das enzimas por miligrama de proteína (glutathione S-transferases e oxidases de funções mistas), apresentaram níveis crescentes de atividade em abelhas recém-emergidas à abelhas forrageiras de *A. mellifera*. Indicando que as abelhas adultas compensam a perda de proteínas através do aumento da atividade dessas enzimas (SMIRLE e WINSTON, 1988).

Os valores de DL_{50} obtidos para Tiametoxam relatados por alguns autores, como Iwasa et al. (2004) no valor de 29,9 ng/abelha, e Senn et al. (1998 *apud* IWASA et al., 2004) no valor de 24 ng/abelha. Essa diferença observada entre os valores obtidos neste trabalho com os valores registrados por esses autores pode ser resultado de diversos fatores que podem influenciar tais testes, como a variabilidade genética de cada população de abelha testada, as variações ambientais dos locais de origens dessas populações e até mesmo a manipulação durante a execução da metodologia empregada.

Na relação entre dose e mortalidade pode ser observada uma taxa de mortalidade crescente quando aumenta a concentração do inseticida. Tal comportamento pode estar relacionado com a presença e ação de vários metabólitos. Com baixas doses ocorre ação de poucos metabólitos que atuam juntamente com o composto inicial sendo responsável pela alta mortalidade. Doses maiores podem desencadear a ação de enzimas desintoxicadoras que reduzem a mortalidade das abelhas (PEREIRA, 2010).

Hideo (2003) estimou a CL_{50} do inseticida Tiametoxam para toxicidade oral, obtendo os valores de: $4,70 \times 10^{-5}$, $7,40 \times 10^{-5}$, $8,14 \times 10^{-5}$, $10,10 \times 10^{-5}$ mg/mL para recém-emergidas com idades de 7, 14 e 21 dias, respectivamente. Para toxicidade por contato os valores obtidos foram: 3,21, 3,50 e 4,51 mg/mL para as mesmas idades. Na comparação com os resultados obtidos nesse trabalho, verifica-se que as concentrações usadas estão bem abaixo da CL_{50} , para micrograma aplicado no tórax do indivíduo em cada teste.

Abelhas adultas de *A. mellifera* marcadas com microchip expostas a dose não letal (1,34 ng) de Tiametoxam provocaram alta mortalidade devido à falha no retorno para colmeia, em níveis que poderiam colocar a colônia em risco de colapso (HENRY et al., 2012).

Laurino et al. (2011) observaram que o Tiametoxam (Actara® 25 WG), através de testes de ingestão, mostrou-se letal para abelhas *A. mellifera* adultas até 72 horas do início do teste. Além de ter causado 100% de mortalidade das abelhas testadas dentro de 6 horas na concentração de 0,5 ppm, a qual é 200 vezes menor do que a utilizada no campo. O produto também causou mortalidade estatisticamente significativa até 0,1 ppm, uma concentração 1000 vezes menor do

que a utilizada no campo. E através de testes de contato, o mesmo produto mostrou-se 100% letal às 6 horas após aplicação na concentração de 100 ppm, e às 72 horas na concentração de 10 ppm, e até mesmo na concentração de 2 ppm o inseticida apresentou mortalidade estatisticamente significativa.

Analisando as DL_{50} , quando feito tratamento tópico de diversos inseticidas neonicotinoides em *A. mellifera*, nota-se uma ampla variação quanto à dose. Como por exemplo: Imidacloprido – 17,9 ng/abelha; Clotianidina – 21,8 ng/abelha; Dinotefuram – 75,0 ng/abelha; Nitenpiram – 138,0 ng/abelha; Acetamiprido – 7,1 µg/abelha e Tiacloprido – 14,6 µg/abelha (IWASA et al.2004, *apud* PEREIRA, 2010).

• Inseticida e Comportamento

Nos testes com Tiametoxam, o ingrediente ativo interferiu no comportamento no período analisado. Para as operárias recém-emergidas a dose de 8 ng/abelha prejudicou a percepção das concentrações no teste de REP 1 hora após a aplicação do ingrediente ativo (tabela 5 e figura 3). E para as operárias com 10 dias de idade a dose de 18 ng/abelha alterou a percepção das concentrações no teste de REP 1 hora após a aplicação do ingrediente ativo (tabela 6 e figura 4). Pereira (2010) relatou comprometimento do comportamento no teste de REP 1, 4 e 24 horas após a aplicação tópica do Tiametoxam, na dose de 17 ng/abelha, em abelhas operárias adultas. Além disso, Pereira (2010) também verificou comprometimento da atividade locomotora nos testes realizados 1 e 4 horas após a aplicação tópica do Tiametoxam, na dose de 17 ng/abelha, em abelhas adultas.

Assim como observado por El Hassani et al. (2008), na análise da influência de doses subletais de Tiametoxam no comportamento de aprendizagem olfativa, realizado 3 horas após o tratamento tópico e oral com o Tiametoxam nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 ng/abelha, foi constatado que o ingrediente ativo não provocou qualquer alteração no comportamento das abelhas tratadas em relação ao controle. O ingrediente ativo Tiametoxam, nessas mesmas doses, também não provocou qualquer alteração nos comportamentos de REP e locomoção.

Segundo Aliouane et al. (2009), após realizar tratamento crônico por 11 dias com aplicação tópica do inseticida Tiametoxam (1,0 e 0,1 ng/abelha), observaram que não prejudicou o comportamento de locomoção e nem o reflexo de extensão de probóscide nos testes realizados

no 12º dia. Já no teste com tratamento oral o inseticida comprometeu apenas o comportamento de REP na dose de 1,0 ng/abelha.

Simulações de atividade de campo em laboratório feitas com o neonicotinoide Imidacloprido em colônias de *Bombus terrestris* mostraram significativa redução na taxa de nascimento e também queda de 85% na produção de novas rainhas, dada a escala de uso dos neonicotinoides, sugere-se que eles podem ter um impacto negativo considerável sobre as populações de abelhas selvagens do gênero *Bombus* em todo o mundo desenvolvido.

7. CONCLUSÃO

Os métodos de análise dos comportamentos empregados com doses subletais do inseticida apresentaram-se como importante ferramenta para estudos toxicológicos. Vale ressaltar que a determinação do valor da DL_{50} , valor referência para que não se tenha dúvida da utilização de doses subletais. As análises a priori são fundamentais, pois os valores descritos na literatura são variáveis que, provavelmente, são devidos a diversos fatores, tais como a variabilidade genética da população testada, da metodologia empregada e até mesmo as condições ambientais.

O inseticida Tiametoxam além de afetar na sobrevivência das operárias recém-emergidas e com 10 dias de idade de *Apis mellifera*, também apresentou efeitos deletérios quando presentes em pequenas doses.

Para as operárias recém-emergidas, a dose correspondente à DL_{50} (8 ng/abelha) prejudicou o comportamento de reflexo de extensão da probóscide no teste 1 hora após a aplicação do ingrediente ativo. No teste de atividade locomotora, estatisticamente, as doses correspondentes à DL_{50} , $DL_{50}/10$, $DL_{50}/50$ e $DL_{50}/100$, em relação ao grupo controle, não apresentaram efeito prejudicial.

Para as operárias com 10 dias de idade, a dose correspondente à DL_{50} (18 ng/abelha) prejudicou tanto o comportamento de reflexo de extensão da probóscide quanto a atividade motora no teste realizado 1 hora após a aplicação do ingrediente ativo.

Contudo, considerando a real importância das abelhas como polinizadores não só de culturas, mas também de plantas nativas, tal estudo mostrou-se de grande importância para a preservação desses indivíduos, verificando que o inseticida Tiametoxam nas doses testadas prejudica a atividade apícola; também foi possível notar que as abelhas recém-emergidas foram mais sensíveis à exposição do produto do que as abelhas com 10 dias de idade. Os resultados obtidos podem ser extrapolados para outras abelhas, como as abelhas nativas, podendo ser utilizado como respaldo científico em políticas visando a preservação de polinizadores, bem como da biodiversidade em geral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, I. S.; AQUINO, F. S.; RAMALHO, J. M.; PRICE, J. M. The Effect of Insecticides on Learning in the Africanized Honey Bee (*Apis mellifera* L). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 37, p. 529-535, 1999.

ALIOUANE, Y. et al. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from longterm trends in crop production. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 9, p. 1579-1588, 2009.

ANALYSTSOFT BioStat 2008: programa de análise estatística. [S. I.]: AnalystSoft, 2008. Disponível em: <<http://www.analystsoft.com/pt/>>. Acesso em: 14 jun. 2012.

BAWA, K. S.; BULLOCK, S. H.; PERRY, D. R.; COVILLE, R. E. & GRAYUM, M.H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest tree. II pollination systems. **American Journal Botany**. v. 72, p. 346-356, 1985.

BITTERMAN, M. E.; MENZEL, R.; FIETZ, A. ; SCHÄFER, S. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of Comparative Psychology**. v. 97, p. 107-119, 1983.

BRASIL. Índice monográfico T48: Tiametoxam. 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c70ae8804745977ca05df43fbc4c6735/Microsoft+Word+-+T48+-+Tiametoxam.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

BROMENSHENK, J. J.; B. LIGHTHART, B.; MCGRAW II, R. L.; LOESER, M. R.; BIRCH, B. & BOWMAN, P. J. Real-time monitoring of MPCA hazards to honeybees in a microbial containment flight chamber. pp. 361-375. In: M. A. Levin & J. S. Angle (eds.), **Biotechnology Risk Assessment: USEPA/USDA/Environment**. Canada/Agriculture and Agri-Food Canada: University of Maryland Biotechnology Institute. 1996.

CALDERONE, N. W.; PAGE, R. E. Effects of interactions among genotypically diverse nestmates on task specialization by foraging honey-bees (*Apis mellifera*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**. New York, v. 30, n. 3-4, p. 219-226, 1992.

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

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. **Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 29, n. 2, p. 81-86, 2004.

CHABAUD, M. A.; DEVAUD, J. M.; PHAM-DELÈGUE, M. H.; PREAT, T.; KAISER, L. Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Comparative Physiology A**. v. 192, p. 1335-1348, 2006.

CHAFFIOL, A.; LALOI, D.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Prior classical olfactory conditioning improves odour-cued flight orientation of honey bees in a wind tunnel. **The Journal of Experimental Biology**. v. 208, p. 3731-3737, 2005.

CHAUZAT, M.P. et al. A survey of Pesticide Residues in Pollen Loads by Honeybees in France. **Journal of Economic Entomology**. v. 99, p. 253-262, 2006.

CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A .; BERENBAUM, M.R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**. v. 15, p. 615-636, 2006.

COBERT, S. A.; WILLIAMS, I. H.; OSBORNE, J. L. Bees and pollination of crops and wild flowers in the European Community. **Bee World**, North Road Cardiff, v. 2, p. 47-59, 1991.

DALY, K. C.; SMITH, B. H. Associative olfactory learning in the moth *Manduca sexta*. **Journal of Experimental Biology**. v. 203, p. 2025-2038, 2000.

DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: DEVILLERS, J.; PHAMDELÈGUE, M. H. (Eds). **Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. P. 56-66.

DECOURTYE, A. et al. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 48, n. 2, p. 242-250, 2005.

EL HASSANI, A. K. et al. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 54, n. 4, p. 653-661, 2008.

EMBRAPA/CNPA. Recomendações técnicas para cultivo do algodoeiro herbáceo de sequeiro e irrigado nas regiões nordeste e norte do Brasil. Circular Técnica, 17, Campina Grande, Paraíba, Brazil, p. 27, 1993.

FARINA, W.M.; GRÜTER, C.; DÍAZ, P. C. Social learning of floral odours inside the honeybee hive. **Proceeding of the Royal Society B**. v. 272, p. 1923-1928, 2005.

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

FRINGS, H. The loci of olfactory end-organs in the honeybee. *Apis mellifera* Linn. **Journal of Experimental Zoology**. v. 97, p. 123-134, 1994.

FORD, K. A.; CASIDA, J. E. Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 21, p. 10168-10175, 2008.

GERBER, B.; GEBERZAHN, N.; HELLSTERN, F.; KLEIN, J.; KOWALSKY, O.; WÜSTENBERG, D.; MENZEL, R. Honey bees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. **Animal Behaviour**. v. 52, p. 1079-1085, 1996.

GILBERT, M D.; WILKINSON, C. F. Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 4, p. 56-66, 1974.

GRÜTER, C.; ACOSTA, L. E.; FARINA, W. M. Propagation of olfactory information within the honeybee hive. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v.60, n. 5, p. 707-715, 2006.

GUIMARÃES, M. Colméias às moscas: síndrome misteriosa causa sumiço de abelhas na América e Europa. Pesquisa FAPESP, v. 137, julho, 2007.

HENRY, M. et al. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Scienceexpress**. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org>>. Acesso em: 18 ago. 2012.

HIDEO, H. J.; COLLA RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C.; DE ALENCAR A. T. V. Evaluation of the use of the inhibition esterases activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide thiamethoxam pesticide residues. **Sociobiology**, v. 42, n 3, p. 693-699, 2003.

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

KAISER, L.; PEREZ-MALUF, R.; SANDOZ, J. C.; PHAM-DELEÈGUE, M.H. Dynamics of odour learning in *Leptopilina boulardi*, a hymenopterous parasitoid. **Animal Behaviour**. v. 66, p. 1077-1084, 2003.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

LAMBIN, M.; ARMENGAUD, C.; RAYMOND, S.; GAUTHIER, M. Imidacloprid-Induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 48, p. 129 – 134, 2001.

LALOI, D.; SANDOZ, J. C.; PICARD-NIZOU A. L.; MARCHESI, A.; POUVREAU, A.; TASÉI, J. N., POPPY, G.; PHAM-DELEÈGUE, M.H. Olfactory conditioning of the proboscis extension reflex in the bumble bee. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 90, p. 123-129, 1999.

LAURINO, D. et al. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. **Bulletin of Insectology**. v. 64, p. 107-113, 2011.

MAEZUKA, V. D. **Eficácia de Thiamethoxam na forma de spike no controle de *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) em mini-crisântemos (*Dendranthema* sp. - Asteraceae) e *Myzaphis rosarum* (Hemiptera: Aphididae) em mini-rosas (*Rosa chinensis* - Rosaceae).** 2008. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MAIENFISCH, P. et al. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, Chichester, v. 57, n. 10, p. 906-913, 2001^a.

MAIENFISCH, P. et al. The Discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, Chichester, v. 57, n. 2, p. 165-176, 2001^b.

MALASPINA, O.; ZACARIN E. C. M. S. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Science**. v. 23 (3-4), p. 303-309, 2006.

MALASPINA, O.; SOUZA, T.F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. In: 17º Congresso Brasileiro de Apicultura, Belo Horizonte, MG. Anais...Belo Horizonte/CBA, CD, 2008.

MALASPINA, O.; SOUZA, T.F.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; CRUZ, A.S.; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In. Encontro de abelhas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP. Anais...Ribeirão Preto, CD, 2008.

MAMOOD, A. N.; WALLER, G. D. Recovery of learning responses by honeybees following a sublethal exposure to permethrin. **Physiological Entomology**. v. 15, p. 55-60, 1990.

McCABE, S. I.; HARTFELDER, K.; SANTANA, W. C.; FARINA W.M. Odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in two stingless bee species in comparison to Africanized honeybees. **Journal of Comparative Physiology A**. v. 193, p.1089-1999, 2007.

MENZEL, R. Associative learning in honey-bees. **Apidologie**, Les Ulis, v. 24, n. 3, p. 157-168, 1993.

MENZEL, R. Memory dynamics in the honeybee. **Journal of Comparative Physiology A**. v. 185, p. 323-340, 1999.

MENZEL, R.; MÜLLER, U. Learning and memory in honeybees: From behavior to neural substrates. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 19, p. 379-404, 1996.

MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Culture**, Ithaca, New York, Mar. 2000. Disponível em: <<http://www.utahcountybeekeepers.org/Other%20Files/Information%20Articles/Value%20of%20Honey%20Bees%20as%20Pollinators%20-%202000%20Report.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2012.

- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline 214: Guidelines for the testing of chemicals: Honeybees, Acute contact toxicity test. 1998. Disponível em: <<http://puck.sourceoecd.org/vl=1619398/cl=20/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s15/p1>>. Acesso em: 7 fev. 2011.
- OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **Plos Biology**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, 2007.
- PAGE Jr., R. E., ERBER, J.; FONRK M. K. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Comparative Physiology A**. v. 182, p. 489-500, 1998.
- PANKIW, T.; PAGE Jr., R. E. The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Comparative Physiology A**. v. 185, p. 207-213, 1999.
- PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e comportamento de abelhas**. 2010. 124f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2010.
- PHAM-DELÈGUE, M. H, et al. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, Les Ulis, v. 33, n. 5, p. 425-432, 2002.
- RAMALHO, F.S.; SANTOS, R. F. Impact of the introduction of the cotton boll weevil in Brazil. PROCEEDINGS OF THE WOLD COTTON RESEARCH CONFERENCE- 1. Brisbane, Austrália, pp 62-70, 1996.
- RUCKER, R. R.; THURMAN, W. N. Colony Collapse Disorder: the market response to bee disease. PERC Policy Series: Bozeman, n. 50, 2012.
- SANDOZ, J.C.; LALOI, D.; ODOUX, J. F.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. **Animal Behaviour**. v. 59, p. 1025-1034, 2000.
- SHEPHERD, M.; BUCHMANN, S. L.; VAUGHAN, M. & BLACK, S. H. Pollinator conservation handbook. **The Xerces Society**. Portland, Oregon, 145p, 2003.
- SMIRLE, M. J.; WINSTON, M. L. Intercolony variation in pesticide detoxification by the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 80, n. 1, p. 5-8, 1987.
- SMIRLE, M. J.; WINSTON, M. L. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. **Canadian Journal of Zoology**. v. 66, p. 138-142, 1988.

SOARES, A.E.E. Manejo de caixas iscas e suas implicações com a prevenção de acidentes. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1998. Salvador, BA. Anais... Salvador:CBA/ FAABA. p. 61-65, 1998.

STONE, J. C.; ABRAMSON, C. I.; PRICE, J. M. Task dependent effects of dicofol (Kelthane) on learning in the honey bee (*Apis mellifera*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 58, p. 177-183, 1997.

TAKEDA, K. Classical conditioned response in the honeybee. **Journal of Insect Physiology**. v. 6, p. 168-179, 1961.

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

TOLEDO, V. A. A.; CHIARI, W. C.; COSTA, H.M.; LOPES, T. S.; TOLEDO, T. C. S. A. ; MELLO A. I. P.; SALES, P. J. P.; MIRANDA, S. B. Zootecnia-Apicultura: uma Inter-relação para Estimular o Desenvolvimento Sustentável e a Segurança da Comunidade. In: 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2004, Belo Horizonte, MG. Anais... Belo Horizonte, 2004.

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

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

von FRISCH, K. Über den Geruchssinn der Bienen und seine blütenbiologische Bedeutung. **Zool. Jahrb. Phys.** v. 37, p. 1-238, 1919.

WATANABE, H.; KOBAYASHI, Y.; SAKURA, M.; MATSUMOTO, Y.; MIZUNAMI, M. Classical olfactory conditioning in the cockroach *Periplaneta americana*. **Zoological Science** v. 20, p. 1447-1454, 2003.

WILLIAMS, I.H.; CORBET, S. A. & OSBORNE, J. L. Beekeeping, wild bees and pollination in the European Community. **Bee World**. v. 72 (4), p. 170-180, 1991.

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Tradução de Carlos A. Osowski. Magister, Porto Alegre, 2003. 276 p.

Aluno: Fellipe Chaves Nominato

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientador: Dr. Andriago Monroe Pereira

Rio Claro
2012