

FELLIPE CHAVES NOMINATO

**ANÁLISE DO EFEITO DE INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES SOBRE A
ORIENTAÇÃO E COLETA DE ALIMENTO DE OPERÁRIAS DE *Apis
mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Rio Claro
2015

FELLIPE CHAVES NOMINATO

**ANÁLISE DO EFEITO DE INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES SOBRE A
ORIENTAÇÃO E COLETA DE ALIMENTO DE OPERÁRIAS DE *Apis
mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – Campus de Rio Claro, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Osmar Malaspina
Departamento de Biologia

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
UFSCar / Araras

Prof. Dr. Stephan Malfitano Carvalho
UFU / Uberlândia

Rio Claro, SP _____ de _____ de 2015

595.799 Nominato, Fellipe Chaves
N799a Análise do efeito de inseticidas neonicotinóides sobre a
orientação e coleta de alimento de operárias de *Apis mellifera*
L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) / Fellipe Chaves Nominato. -
Rio Claro, 2015
57 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina

1. Abelha. 2. Toxicidade. 3. Comportamento animal. 4.
Labirinto. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Análise do efeito de inseticidas neonicotinóides sobre a orientação e coleta de alimento de operárias de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE)

AUTOR: FELLIPE CHAVES NOMINATO

ORIENTADOR: Prof. Dr. OSMAR MALASPINA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA) , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. OSMAR MALASPINA

Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

Centro de Ciências Agrárias, UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, Araras/SP

Prof. Dr. STEPHAN MALFITANO CARVALHO

Instituto de Ciências Agrárias, UFU - Universidade Federal de Uberlândia/MG

Data da realização: 01 de julho de 2015.

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 Malaspina, 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 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, pelos ensinamentos com manejo de abelhas e parceira com outros trabalhos. E por sempre estar de bom humor e disposto a dar uma mão.

A Itamar, Marcela, Necis, Gleí, Andriago, Rafael, Matheus, Stephan, João, Paulo e a todos que passam/passaram constantemente nos corredores do CEIS. Onde fiz grandes amizades e obtive boas experiências. Além do apoio, com o qual sempre pude contar.

À República Nemelês e agregados: Henrique, Laura, Paulo, Raíssa, Rebeca, Alexandre, Carlos, Rafael, Claudia, Danilo, Igor, Thales, Irina e Alfredo, Eli, nesses 6 anos de república tivemos vários momentos felizes. E claro, as cachorras Yasha, Tocha e Lucy 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 um dos polinizadores economicamente mais valiosos 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 insetos-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 huanglongbing (HLB) e na cana de açúcar para o controle de diversas pragas. As aplicações normalmente são feitas por aviões e como resultado 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 efeitos, que por sua vez são dificilmente detectáveis, podem ser paralisia, desorientação ou mudanças comportamentais; porém podem comprometer toda a estrutura social da colônia. Por esta razão os objetivos desse projeto foram estudar a capacidade de orientação de abelhas *A. mellifera* e os efeitos dos inseticidas tiametoxam e acetamiprido via aplicação tópica utilizando o modelo experimental do labirinto, que reproduz as atividades de forrageamento em campo. Observou-se que as doses subletais ($DL_{50}/100$, $DL_{50}/10$ e DL_{50}) dos inseticidas tiametoxam e acetamiprido, aplicadas topicamente, causaram efeitos deletérios nos testes de labirinto. Para o tiametoxam, houve aumento nos tempos de vôo e coleta de alimento e pior performance para as três doses em relação ao grupo controle. Para o acetamiprido, houve aumento nos tempos de vôo e coleta de alimento, pior performance e menor quantidade de alimento coletada para as três doses em relação ao grupo controle. O método de análise do comportamento de vôo e coleta de alimento empregado, pode ser diretamente relacionado à atividade das abelhas forrageiras em campo, sendo uma importante ferramenta para estudos toxicológicos.

Palavras chaves: Abelha. Toxicidade. Comportamento animal. Labirinto.

ABSTRACT

The *Apis mellifera* bees has its great importance as one of the most economically valuable pollinators for crops worldwide, ensuring cross-pollination and increasing fruit yield. On the other hand, increasingly more agricultural chemicals developed in order to control weeds, fungi and insect pests to ensure productivity. Insecticides are used on a large scale in the state of São Paulo, in citrus crops to control huanglongbing (HLB) and sugar cane for the control various pests. Applications are usually made by aircraft and as a result a significant mortality is observed in apiaries near the plantations. Honey bees can come into contact with such chemical agente through their collection of water activities, plant resins, pollen and néctar. The resulting poisoning of this exposure can be lethal, which is readily detectable or cause effects on the physiology and insect behavior. These effects, which in turn are hardly detectable, can be palsy, disorientation or behavioral changes; but can compromise the entire social structure of the colony. For this reason the objectives of this project were to study the bee orientation capacity *A. mellifera* and the effects of thiamethoxam and acetamiprid insecticide via topical application using the experimental model of the maze, which reproduces the foraging activities in the field. It was observed that sublethal doses ($LD_{50}/100$, $LD_{50}/10$ and LD_{50}) of thiamethoxam and acetamiprid insecticides, applied topically, have caused deleterious effects in the maze tests. For thiamethoxam, there was an increase in flight times and food collection and worse performance for the three doses in compared to control group. For acetamiprid, there was an increase in flight times and food collection, worse performance and lower amount of food collected for the three doses in compared to control group. The method of analysis of the flight behavior and food collection employee, can be directly related to the activity of bees forage on the field, being an importante tool for toxicology studies.

Keywords: Bee. Toxicity. Animal behavior. Maze.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Preparação dos ingredientes ativos.....	18
4.1.1. Tiametoxam.....	18
4.1.2. Acetamiprido	18
4.2. Alimentador	18
4.3. Configuração do labirinto.....	19
4.4. Condicionamento.....	21
4.5. Testes comportamentais.....	23
4.6. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Tempo de vôo	25
5.1.1. Tiametoxam.....	25
5.1.2. Acetamiprido	25
5.2. Performance.....	30
5.2.1. Tiametoxam.....	30
5.2.2. Acetamiprido	32
5.3. Tempo de pouso	35
5.3.1. Tiametoxam.....	35
5.3.2. Acetamiprido	35
5.4. Tempo de coleta.....	39
5.4.1. Tiametoxam.....	39
5.4.2. Acetamiprido	39
5.5. Quantidade de alimento coletada.....	43
5.5.1. Tiametoxam.....	43
5.5.2. Acetamiprido	43
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

Os polinizadores são imprescindíveis para a polinização de 35% das culturas agrícolas de importância econômica, além também de promoverem a fecundação cruzada de áreas naturais (KLEIN et al., 2007). Dentre os agentes que promovem esse processo, destacam-se as abelhas, responsáveis por realizar 70% de toda a polinização. Por suas características sociais, adaptabilidade e número de indivíduos por colônia, a espécie *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) altamente eficaz nesse processo, aumentando a produtividade de diferentes culturas, além de produzirem substâncias de grande valor econômico, como o mel (MORSE; CALDERONE, 2000).

Recentemente, pesquisadores identificaram um fenômeno denominado “Colony Collapse Disorder” (CCD) inicialmente no Estados Unidos, onde apicultores chegaram a perder de 80 a 100% de suas colmeias (OLDROYD, 2007). As causas desta alta perda ainda não estão bem esclarecidas. Sabe-se apenas que, em muitos casos as operárias campeiras, encarregadas de coletar o néctar e o pólen, não conseguem retornar às colmeias, o que pode estar relacionado a perda da capacidade de vôo e a desorientação (OLDROYD, 2007).

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). Nesse contexto, as abelhas são constantemente expostas aos inseticidas utilizados para combater insetos-praga nas plantações presentes nas áreas onde forrageiam. Embora apenas uma classe de operárias que realizam a atividade de forrageamento entram em contato com tais produtos, toda a colônia poderá estar exposta a sua ação, pois os demais indivíduos se alimentam de pólen e néctar que podem estar contaminados.

Dentre os vários grupos de inseticidas, destacam-se os neonicotinóides que representam uma das classes de inseticida mais utilizada nas últimas três décadas nos campos de cultivo (TOMIZAWA e CASIDA, 2005). O tiametoxam, um neonicotinóide de segunda geração, 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 e abacaxi.

O tiametoxam é comercializado nas formulações: pó dispersível - Cruiser® (700g/Kg); granulado - Actara® 10 GR (10g/Kg); granulado dispersível - Actara® 250 WG (250g/Kg). O produto Cruiser® é utilizado para o tratamento de sementes, o Actara® 10 GR é utilizado em tratamento do solo e o Actara® 250 WG é utilizado em aplicações terrestres e aéreas. Dependendo do tipo de cultivo a diluição pode variar entre 500 e 1000 µg/mL (PEREIRA, 2010).

O acetamiprido também é um neonicotinóide sistêmico, largamente empregado tanto na agricultura quanto domesticamente contra uma variedade de insetos (BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005). O acetamiprido é comercializado nas seguintes formulações: concentrado solúvel - Convence® (200g/L); pó solúvel - Mospilan® (200g/Kg); pó molhável - Pirâmide® (700g/Kg). Com exceção do produto Pirâmide®, utilizado em tratamento de sementes, os demais são utilizados em aplicação terrestre e aérea por meio de pulverização. As concentrações podem variar de 50 µg/mL a 150 µg/mL dependendo do método de aplicação. Tais concentrações comercializadas no país são menores que as concentrações de acetamiprido capazes de causar problemas no comportamento das abelhas; porém, a menor dose que apresentou alteração no comportamento das abelhas (0,93 µg/abelha, ou seja, uma concentração de 0,93 mg/mL) é 6 vezes maior do que aquela aplicada no campo (PEREIRA, 2010).

Estudando o metabolismo do acetamiprido em operárias de *A. mellifera*, Brunet, Badiou e Belzunces (2005), verificaram que mais de 50% do princípio ativo foi metabolizado em diferentes partes do corpo do inseto (cabeça, tórax, abdome, hemolinfa, intestino médio e reto) em menos de 30 minutos, indicando uma meia-vida muito curta. Durante as primeiras horas os autores notaram maior frequência do acetamiprido nos tecidos ricos em receptores nicotínicos de acetilcolina: abdome, tórax e cabeça.

Contudo, além de controlar os insetos praga, estes compostos podem também afetar as abelhas. Além do efeito letal, os inseticidas podem apresentar efeitos subletais, que são dificilmente detectáveis, podendo influenciar tanto a fisiologia quanto o comportamento das abelhas, comprometendo o desenvolvimento e a estrutura social da colônia (PHAM-DELEGUE et al., 2002).

Para avaliação dos efeitos de doses subletais de inseticidas em *A. mellifera* podem ser realizados testes comportamentais, tal como a avaliação da capacidade de orientação em um labirinto. Tal método visa analisar a aprendizagem e memória, permitindo correlacionar com a capacidade de navegação para uma fonte de alimento (DECOURTYE et al., 2008).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo analisar a aprendizagem e navegação de campeiras de *A. mellifera* africanizada em labirinto e os efeitos de doses subletais (DL_{50} , $DL_{50}/10$ e $DL_{50}/100$) dos inseticidas tiametoxam e acetamiprido (administração tópica) sobre esse comportamento.

Especificamente foram analisados os seguintes parâmetros:

- I. Tempo de vôo (s) gasto pelas abelhas para atravessar o percurso do labirinto entre a entrada e o alimentador;
- II. Performance das abelhas no labirinto avaliando-se a decisão entre acertos e erros na escolha dos caminhos;
- III. Tempo (s) gasto pelas abelhas entre a chegada na área do alimentador e o pouso no mesmo;
- IV. Tempo de coleta (s) do alimento;
- V. Quantidade de alimento coletada (g) resultante da diferença entre as quantidades antes e depois da coleta.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *A. mellifera* é uma abelha eussocial, generalista, de ampla distribuição, tendo sido introduzida a partir de 1839 junto com os imigrantes europeus que aqui chegaram. São importantes produtoras de mel e cera principalmente (CRANE, 1992), além disso são importantes polinizadoras. A polinização, por sua vez, contribui para a manutenção das áreas de matas nativas (MALASPINA; ZACARIN, 2006) e é fundamental no incremento da produção de muitas culturas (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 e ao seu comportamento de forrageamento (COBERT et al., 1991).

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

Têm ocorrido muitos relatos de apicultores sobre a mortalidade súbita de suas abelhas em diversas regiões do país, como no interior dos estados de Piauí, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e no 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, Santa Rita do Passa Quatro, São Carlos e Tabatinga. Segundo informações obtidas junto aos apicultores, as perdas e/ou prejuízos foram cerca de 400 colmeias 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,b).

A diminuição da diversidade e do número de abelhas tem ocorrido provavelmente por causa da destruição de seus habitats causada pelo desmatamento e do uso indiscriminado de inseticidas (MALASPINA; ZACARIN, 2006). As abelhas podem ser consideradas insetos particularmente vulneráveis aos inseticidas, pois seu genoma apresenta uma deficiência no número de genes decodificando enzimas capazes de metabolizar tais produtos, quando comparados a outros insetos

(CLAUDIANOS et al., 2006).

Ainda não há mecanismo formal de monitoramento das populações de abelhas. Não é conhecido, por exemplo, se essas populações têm decrescido, como em outros países. Com a ausência de dados de monitoramento das abelhas, é difícil estimar o impacto que os inseticidas têm nessas populações. 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 poucos estudos relatam os efeitos de inseticidas no comportamento das abelhas. 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 a partir de diferentes experimentos dirigidos (McCABE et al., 2007), como o reflexo de extensão da probóscide (REP) (LAMBIN et al., 2001; PEREIRA, 2010; POLK et al., 2014), atividade de locomoção (raia) (PEREIRA, 2010), voo de retorno de uma fonte artificial de alimento para a colônia (PHAM-DELÈGUE et al., 2002) e labirinto (DECOURTYE et al., 2008; HAN et al., 2010).

Outros trabalhos ressaltam a importância de se utilizar também as modificações celulares e ultra-estruturas para avaliar a ação de doses subletais de inseticidas em abelhas, estudando-se morfologia tanto de indivíduos adultos, quanto de larvas (CATAE et al., 2014; CRUZ et al. 2010; FERREIRA et al., 2013; KAKAMAND; MAHMOUD; AMIN, 2008; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006; SOARES, 2009; SOUZA, 2009; TAVARES et al., 2015).

De forma geral, as abelhas mais velhas, a partir dos 20 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. 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 acordo com Lindauer (1952) as atividades de forrageamento (coleta de néctar, resinas,

pólen e água) se situam, em média, entre o vigésimo e o trigésimo dia de vida das abelhas. Nas atividades de coleta, bem como em outras formas de comportamento, as abelhas utilizam-se do seu complexo sistema de comunicação, em que empregam sinais mecânicos (danças), sonoros (sons típicos) e químicos (odor, feromônios) (MALASPINA, 1982).

Apesar de pequeno, o cérebro das abelhas dispõe de um riquíssimo repertório comportamental (CHAPMAN, 1998; MENZEL; GIURFA, 2001). Abelhas *A. mellifera* têm capacidade de navegações a longas distâncias usando referências como indicadores da fonte de coleta (néctar, pólen, resina e água), são extremamente eficientes em memorização e aprendizagem ao inspecionar possíveis locais de nidificação, possuem elevada capacidade sensorial, o que possibilita a elas identificar cores e odores e associá-los aos tipos florais (MENZEL; GIURFA, 2001; MENZEL et al. 2006).

Quase todas as subespécies de *A. mellifera* podem aumentar o atrativo de uma fonte de alimento suplementando o odor floral natural com o seu próprio odor, liberando a secreção da glândula de Nasanov. Essa marca de odor é especialmente importante nas fontes de alimento que não possuem cheiro e para a coleta de água (BUTLER; CALAM, 1969).

Estudos de Nuñez (1966) mostraram que as abelhas se tornam lentas quando vão coletar alimento com menos de 12% de concentração de sacarose. Os mesmos autores verificaram que altas concentrações de açúcar e altas temperaturas do ar determinam um maior volume das cargas transportadas, a temperatura do ar e a temperatura do xarope influenciaram na velocidade de ingestão do alimento. Verificou-se também que a atividade de vôo pela manhã é estreitamente ligada ao fluxo de néctar e, à tarde, é correlacionada com o fotoperiodismo. Com o aumento da velocidade do vento e da temperatura, que geralmente ocorre à tarde, a coleta de néctar é reduzida (NUÑEZ, 1966).

Alguns estudos têm relacionado a contaminação por pesticidas com a diminuição na capacidade em reconhecer uma fonte de alimento (BORTOLOTTI et al., 2003; DECOURTYE et al., 2004; PEREIRA, 2010; SILVA, 2014) e em se deslocar (LAMBIN et al., 2001; EL HASSANI et al., 2005; ALIOUANE et al., 2009).

O processo de forrageamento envolve a aprendizagem, memória, navegação, comunicação, o relógio interno e várias outras respostas flexíveis, tal como a capacidade de integrar os pontos de referência locais. A aprendizagem visual dos pontos de referência é de grande importância na orientação espacial e esta função é potencialmente afetada por agrotóxicos. Dentre as tarefas

realizadas pelas abelhas durante o voo de forrageamento, uma das principais é aprender e recordar muitos padrões visuais. Para isso, as campeiras utilizam pistas dos vários locais para navegar até uma fonte de alimento e retornar para o ninho. Essas pistas visuais são necessárias para definir a direção de voo e para se obter um mapeamento espacial do alvo quando a abelha estiver em sua vizinhança (DECOURTYE et al., 2008). Tomando-se isso, foram feitos trabalhos utilizando-se labirintos de diversos modelos, desde um simples tubo T, até labirintos contendo diversas caixas marcadas ou não com cores, para avaliar a capacidade de orientação das abelhas (DECOURTYE et al., 2008; HAN et al., 2010; ZHANG et al. 1996; ZHANG et al. 2000).

Para maximizar o investimento do forrageamento, a eficiência da capacidade de discriminação olfativa e todos os processos associativos devem funcionar corretamente. Interferências no sistema de transmissão nervoso afetarão o comportamento individual, que pode refletir de inúmeras maneiras sobre a manutenção da colônia.

Os inseticidas neonicotinóides podem ser classificados em dois grupos: um que possui o grupo funcional nitro e outro que tem o grupo funcional ciano. Os inseticidas com o grupo funcional nitro são os mais tóxicos, dentre eles estão, por exemplo, imidacloprido, clotianidina, tiametoxam, dinotefuram e nitempiram. Já os neonicotinóides que possuem o agrupamento ciano apresentam uma toxicidade menor, como por exemplo, acetamiprido e tiacloprido (IWASA et al., 2004).

Dentre os ingredientes ativos citados, o tiametoxam e o acetamiprido são inseticidas neonicotinóides que agem por contato e ingestão, possuem propriedade sistêmica, são agonista da acetilcolina e competem pelos receptores nicotínicos de acetilcolina na membrana pós-sináptica (FERNANDES-BUZZEIRO et al., 2005; BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005). A acetilcolina é degradada pela acetilcolinesterase, que a hidrolisa em acetato e colina, parando a atuação do neurotransmissor (BARROS et al., 2012). Porém, diferentemente da acetilcolina, as moléculas de tiametoxam e do acetamiprido não são degradadas pela acetilcolinesterase, levando a uma transmissão nervosa contínua, hiperexcitação e morte do inseto.

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), pois é nas neurópilas que estão as sinapses entre os diferentes grupos de neurônios aferentes e eferentes. Nas outras regiões do cérebro, os receptores localizam-se principalmente em regiões associadas ao processamento das informações mecanossensoriais, visuais e também daquelas referentes às funções de aprendizado

e memória (GAUTHIER, 2010).

Para isso o cérebro das abelhas está dividido em três regiões distintas, sendo elas o protocérebro, deutocerebro e tritocerebro. O protocérebro constitui a maior parte da massa cerebral, inclui os lobos ópticos, dois pares latero-dorsal de corpos pedunculados, a ponte cerebral e o corpo central. No protocérebro existem duas estruturas importantes do ponto de vista fisiológico, morfológico e também funcional: os lobos ópticos e corpos pedunculados, que exercem funções importantes para a manutenção da vida das abelhas.

Os lobos ópticos são extensões laterais do protocérebro, cada um, no inseto adulto, consiste de camadas internas conhecidas como lâmina, medula e lóbulo. Essas regiões são de grande importância, pois nelas existem receptores específicos para os estímulos enviados pelos fotorreceptores da camada externa, a retina. A lâmina, a medula e o lóbulo estão intercaladas com regiões de neurópilas, que nada mais são do que regiões que concentram uma grande quantidade de prolongamentos nervosos. As regiões de neurópila são denominadas de quiasma interno e quiasma externo e também são importantes, já que estão relacionadas com o mapa neural da visão (CHAPMAN, 1998; CRUZ-LANDIM et al., 1979; ROAT e CRUZ-LANDIM, 2010).

Os corpos pedunculados são estruturas conhecidas como centro de aprendizagem e memorização dos insetos, sendo os principais centros que guiam o comportamento do inseto adulto pela estimulação sensorial através de informações trazidas das antenas e dos olhos. Dessa forma, esta estrutura está relacionada com o sistema olfatório e com a aprendizagem visual e tem chamado a atenção de pesquisadores, pois pode ser usada como um possível modelo para estudos de neurociência.

Os elementos básicos dos corpos pedunculados são as células de Kenyon, os cálices e pedúnculos. As células de Kenyon formam um conjunto de 170.000 células em cada corpo pedunculado, representando 40% do total de neurônios do cérebro (CHAPMAN, 1998; FAHRBACH, 2006). Eles recebem informações de diferentes áreas do cérebro, como do lobo antenal e do lobo óptico e são estruturas essenciais para a associação e integração das informações recebidas (HAMMER e MENZEL, 1995). Nas abelhas os estímulos visuais e olfativos são largamente segregados para diferentes regiões, sugerindo que sejam processados por diferentes grupos de células de Kenyon (GRONENBERG, 2001).

Estudos realizados por Hourcade et al., 2010 demonstraram que quando a aprendizagem olfatória é estimulada, apenas a região do cálice dos corpos pedunculados apresenta um aumento

de densidade, indicando que esta região está diretamente envolvida com o olfato. Por ser um sentido extremamente importante para as abelhas, estudos tem demonstrado também um aumento nas ramificações das células de Kenyon associados ao processamento das informações sensoriais, melhorando a capacidade de interpretação (FARRIS et al., 2001).

No deuteroencéfalo estão localizados os centros olfatórios antenais e também os corpos celulares dos nervos motores dos músculos das antenas. Nas antenas das abelhas, localizam-se os principais órgãos sensoriais olfatórios, os quais são de essencial importância nas interações sociais.

O deuteroencéfalo das abelhas adultas é constituído por dois lobos laterais ao esôfago, onde estão localizados os centros olfatórios, que contêm as arborizações terminais dos axônios dos neurônios sensoriais das antenas e os corpos celulares dos nervos motores desses apêndices (CRUZ-LANDIM, 2009). Os lobos antenais são basicamente formados por neurópila, que contêm os prolongamentos das células sensoriais contidas na antena e os prolongamentos dos neurônios motores, que por sua vez estão organizados no próprio lobo. Essas estruturas são de suma importância, já que recebem estímulos provenientes das antenas.

Muitos dos caminhos neuronais que ligam as estruturas receptoras aos centros de processamento nos corpos pedunculados já foram identificados. Um desses caminhos é o que envolve a atividade do neurônio VUMmx1, que constitui o eixo de ligação entre a recompensa alimentar e o olfato (MENZEL; GIURFA, 2001). O VUMmx1 inerva o glomérulo do lobo antenal, a lateral do protocéfalo, os lábios e o anel basal do cálice dos corpos pedunculados, fazendo com que os estímulos olfatórios recebidos pela antena através dele sejam corretamente segregados ao longo do sistema nervoso central (SNC) até o cérebro das abelhas onde são processados (MENZEL et al., 1999).

A última estrutura é o tritocéfalo que é reduzido nos insetos (SNODGRASS, 1956), o terceiro e menor gânglio do cérebro composto por um par de lobos localizados ventralmente, ligados por uma comissura transversal (CHAPMAN, 1998; CRUZ-LANDIM, 2009). Do tritocéfalo partem conectivos motores e sensoriais que fazem a ligação entre o cérebro e os gânglios subesofageanos e frontal (CHAPMAN, 1998; CRUZ-LANDIM, 2009).

Para maximizar o investimento do forrageamento, as abelhas têm que apresentar uma eficiente capacidade de discriminação olfativa e todos os processos associativos devem funcionar corretamente. Interferências no sistema de transmissão nervoso afetarão o comportamento individual, que pode refletir de inúmeras maneiras sobre o funcionamento da colônia como um

todo.

A forma como as sinapses ocorrem entre os diferentes centros relacionados à recepção das informações sensoriais e o aprendizado envolvem diferentes neurotransmissores. A transmissão sináptica colinérgica é o principal sistema excitatório e está envolvido em processos de aquisição e recuperação das informações, mas principalmente à formação da memória de longo prazo.

As sinapses das fibras dos neurônios aferentes primários do sistema olfatório com os interneurônios são, provavelmente, colinérgicos, pois estudos envolvendo aprendizagem olfatória mostram forte atividade da acetilcolinesterase nas áreas dos glomérulos, onde também há uma maior expressão de receptores de acetilcolina (GAUTHIER, GRÜNWALD, 2012). Assim, os inseticidas neonicotinóides podem ter grande impacto no aprendizado e memória das abelhas, mesmo em dose subletais, e estarem relacionados a incapacidade de forrageamento, seja pela dificuldade de encontrar e memorizar a fonte de alimento, seja pela incapacidade de retornar à colônia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparação dos ingredientes ativos

4.1.1. Tiametoxam

O ingrediente ativo tiametoxam utilizado nos testes foi o Pestanal[®] (sigma Aldrich Brazil 99,6% de pureza). A solução principal, da qual foram feitas as diluições, constou da diluição de 10 mg do ingrediente ativo em 100 mL de acetona, resultando na concentração de 100 ng/ μ L. Até a sua utilização, a solução foi mantida em vidro âmbar e em câmara fria (3,0 °C).

As diluições administradas (DL₅₀, DL₅₀/10 e DL₅₀/100) foram preparadas utilizando acetona como solvente, e segundo Pereira (2010) adaptado. A dose subletal (DL₅₀) foi de 17 ng/abelha, sendo assim a DL₅₀/10 de 1,7 ng/abelha e a DL₅₀/100 de 0,17 ng/abelha.

4.1.2. Acetamiprido

O ingrediente ativo acetamiprido utilizado nos testes foi fornecido pela empresa Iharabras S.A. Indústrias Químicas. A solução principal, da qual foram feitas as diluições, constou da diluição de 5,0 mg do ingrediente ativo em 50,0 mL de acetona, resultando na concentração de 100 μ g/ μ L. Até a sua utilização, a solução foi mantida em vidro âmbar e em câmara fria (3,0 °C).

As diluições administradas (DL₅₀, DL₅₀/10 e DL₅₀/100) foram preparadas utilizando acetona como solvente, e segundo Pereira (2010) adaptado. A dose subletal (DL₅₀) foi de 9 μ g/abelha, sendo assim, a DL₅₀/10 de 0,9 μ g/abelha e a DL₅₀/100 de 0,09 μ g/abelha.

4.2. Alimentador

Um alimentador foi colocado sempre no mesmo local, dentro do apiário do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro. O alimento utilizado foi mel retirado das próprias colônias, o qual foi oferecido através de um becker de 30 mL emborcado em uma placa de petri e colocado sobre um suporte de 50 cm de altura. O frasco continha uma marca de cor verde (ZHANG et al., 1996; DECOURTYE et al., 2008), para que as abelhas associassem a cor com a fonte de

recompensa, havendo um treinamento *a priori* ao do labirinto (Figura 1). O alimentador ficava no local durante um dia, para que uma certa quantidade de abelhas, de várias colônias, ficassem condicionadas a voltar nos próximos dias.

Figura 1: Alimentador: frasco contendo mel como alimento, e marca verde para o treinamento.



4.3. Configuração do labirinto

O labirinto constituía-se de uma caixa de 4 x 5 quadrados idênticos, cada lado medindo 15 cm, com cada parede contendo apenas um orifício de 4 cm de diâmetro em seu centro, por onde as abelhas atravessavam. As caixas foram confeccionadas de acrílico branco opaco, coberto por uma tampa acrílica transparente. As abelhas voavam através de uma sequência de 9 caixas, nas quais 3 eram caixas de decisão e 6 de não-decisão, para atingir o alimentador posicionado no final do percurso. Uma caixa de não-decisão possuía apenas dois furos, por onde a abelha entraria por um e esperado que saísse pelo outro, o qual foi marcado com uma fita verde, idêntica à marca contida no frasco alimentador.

Uma caixa de decisão possuía 3 orifícios, a abelha entrava por um e decidia entre outros 2 (um contendo a marca verde que representa o caminho correto, e outro sem marca que representa o caminho errado, levando-a a um trajeto sem saída) para continuar o percurso, ou podendo até mesmo retornar pelo mesmo orifício. Cinco configurações do labirinto com percursos diferentes entre si foram utilizadas, onde a entrada e os caminhos corretos foram marcados com fita verde (Figuras 2 e 3).

A recompensa consistiu de um pequeno recipiente plástico contendo mel colocada dentro de um pote posicionado no fim de cada percurso do labirinto (Figura 4). Cada recipiente plástico contendo mel foi pesado antes e depois dos experimentos, em uma balança eletrônica, a fim de estimar a quantidade de alimento coletado por cada abelha (controle e contaminado).

Figura 2: Labirinto: entrada e alimentador (no final do percurso).



Figura 3: Entrada e os caminhos corretos continham a marca verde, idêntica à utilizada no frasco alimentador.



Figura 4: Alimentador posicionado no final de cada percurso, no qual foram quantificados os tempos de pouso e de coleta e a quantidade de alimento coletada.



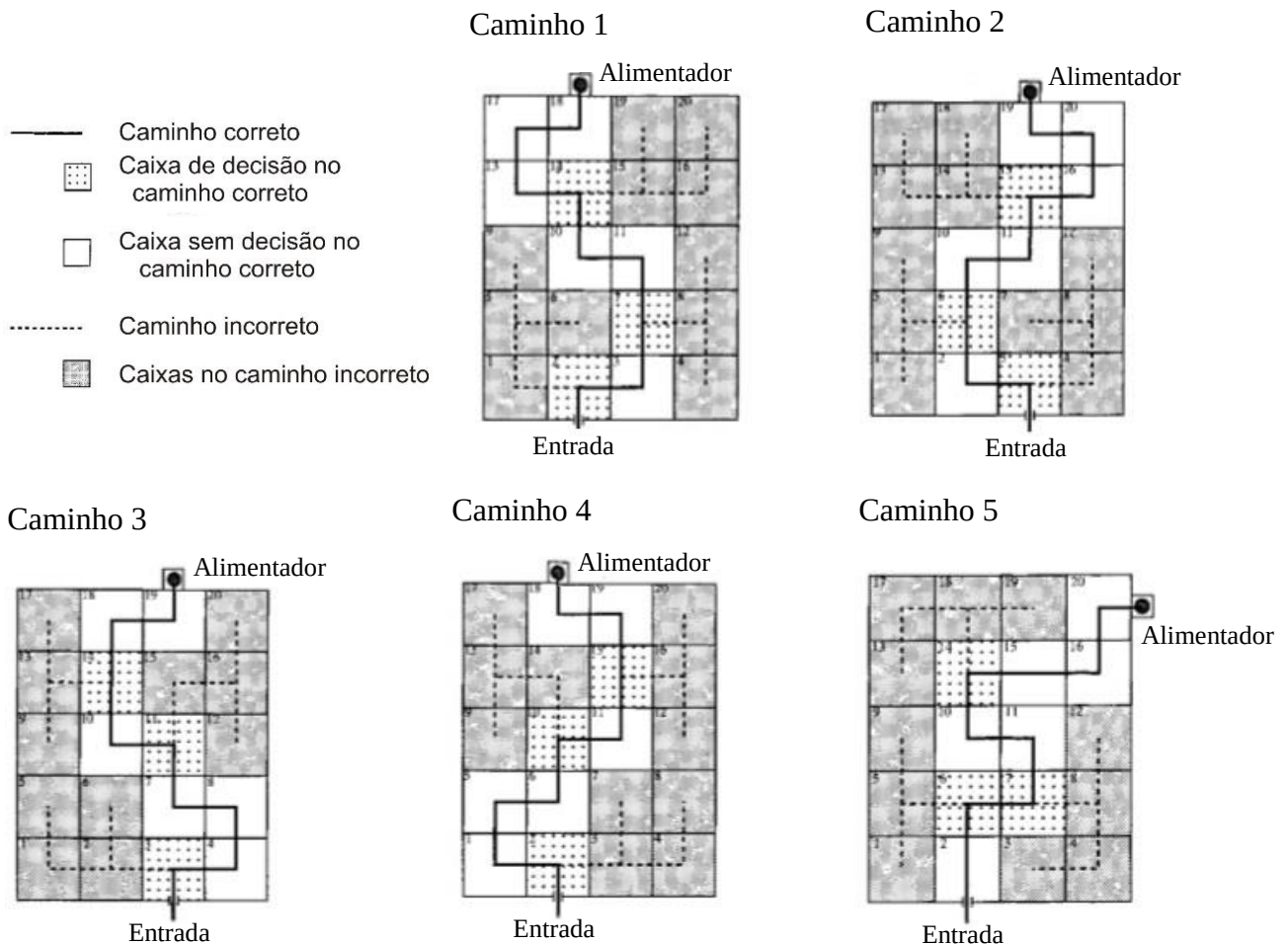
4.4. Condicionamento

A cada teste realizado, um dos cinco percursos foi utilizado para o condicionamento das abelhas (Figura 5). Após um dia do frasco contendo mel ter ficado no local, o labirinto era posto em seu lugar sempre com a entrada voltada para o mesmo lugar, e o frasco colocado dentro da primeira caixa do labirinto. Passado uma hora de permanência do frasco com mel na primeira caixa, este era transferido para a segunda caixa, também ficando nesta por uma hora, depois transferido para a terceira caixa por mais uma hora. Então o alimentador era deslocado para a quinta caixa durante o mesmo período, e finalmente este era posto no final do labirinto, no pote de recompensa. Durante esse processo, as abelhas rapidamente coletavam o alimento e eram liberadas das caixas por cima através da tampa (sem que retornassem pelo labirinto), logo estando de volta percorrendo

o labirinto até encontrarem novamente a fonte de alimento. Todas as abelhas que foram submetidas ao procedimento de condicionamento foram capturadas diretamente do pote de recompensa, com ajuda de uma pinça entomológica, e marcadas no dorso do tórax com diferentes cores de tinta atóxica (para identificação individual) e liberadas sem que retornassem pelo labirinto.

Antes dos testes era realizado o condicionamento no dia anterior. Feito o condicionamento, o labirinto era limpo com pano úmido e depois com álcool 70% para que se eliminasse quaisquer rastros que as abelhas pudessem ter deixado.

Figura 5: Percursos utilizados para o condicionamento e avaliação dos testes (Zhang et al., 1996 adaptado).



4.5. Testes comportamentais

Nos dias de testes, o labirinto era novamente posto no local e permitido que apenas uma abelha entrasse por vez. Para isso utilizou-se de um percurso diferente do utilizado para o condicionamento, a fim de analisar a aprendizagem de cada abelha em associar a fita verde com uma fonte de recompensa. Para medir o tempo de vôo (tempo gasto da entrada do labirinto até a entrada do alimentador – Figura 2) e a performance das abelhas no labirinto, foi utilizado uma câmera posicionada ao lado com visão por cima do labirinto, e as filmagens posteriormente analisadas. O tempo de pouso (tempo gasto da entrada do alimentador até o pouso no recipiente plástico contendo mel – Figura 4) e o tempo de coleta (tempo gasto para coletar o alimento no recipiente plástico – Figura 4)) foram cronometrados, e o alimentador foi pesado antes e depois da coleta em uma balança analítica. Todos os parâmetros foram medidos com os mesmos indivíduos, e os indivíduos expostos ao acetamiprido são diferentes dos expostos ao tiametoxam.

Os grupos controle consistiram na primeira passagem dentro do labirinto realizada por cada abelha. Assim que cada indivíduo entrava no pote contendo a tampa com mel, era identificada pelas cores das tintas e cronometrado o tempo que a abelha levou para pousar no recipiente plástico e o tempo que ela gastou coletando o alimento. Terminada a coleta, a abelha era capturada com auxílio de uma pequena rede e feita a contaminação tópica (usando uma micropipeta) com a aplicação de 1 μ L da solução contendo a substância a ser testada. A abelha era liberada, sem que fizesse o caminho inverso pelo labirinto, e a próxima vez que essa mesma abelha contaminada retornasse, foi analisada novamente, porém como sendo do grupo tratado. Desse modo, cada abelha passou pelo labirinto apenas duas vezes. A cada indivíduo que coletava alimento, o recipiente plástico era trocado por um outro também contendo mel, a fim de se analisar a quantidade de alimento coletada por cada uma.

As análises foram realizadas dentro do período de 1 hora e meia após a contaminação tópica. Abelhas que não retornaram ao labirinto nesse tempo foram analisadas apenas como sendo do grupo controle.

A análise da performance consistiu em 4 categorias (α_1 , α_2 , α_3 e α_4) de acordo com as tomadas de decisão da abelha:

- Abelhas que realizavam o percurso chegando diretamente na fonte de alimento (α_1);
- Abelhas que realizavam o percurso e chegavam na fonte de alimento com um ou mais retornos (a abelha deixava uma caixa pelo mesmo orifício que havia entrado) (α_2);
- Abelhas que realizavam o percurso cometendo um ou mais erros nas caixas de decisão, porém chegavam na fonte de alimento (α_3);
- Abelhas que não chegavam na fonte de alimento dentro de 5 minutos após terem entrado no labirinto (α_4).

Para as três doses testadas do tiametoxam e do acetamiprido foram analisadas 30 (trinta) abelhas. Ou seja, 90 (noventa) abelhas para o Tiametoxam e outras 90 para o Acetamiprido, totalizando 180 abelhas. Isso levando em consideração o número de abelhas antes da aplicação tópica desses ingredientes ativos, pois muitas delas não retornaram após a exposição dos inseticidas. Sendo que 58 abelhas voltaram ao labirinto depois da intoxicação com o tiametoxam e 41 abelhas com o acetamiprido.

4.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas no programa BioStat (AnalysSoft, 2008).

Para o tempo de voo, tempo para pousar na fonte, tempo de coleta do alimento e para a quantidade de alimento coletada utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Teste H) a fim de se comparar a magnitude das variações de amostras desiguais. Nos casos onde a estatística H obteve valor de p significativo, foi realizado o método Dunn para comparação da média dos postos.

Para a performance de cada abelha, utilizou-se o teste Binomial: Duas Proporções a fim de avaliar se a diferença de determinada categoria entre os grupos controle e tratado eram de tal grandeza que permitisse rejeitar a hipótese de nulidade. Foi avaliado apenas a presença ou não de cada categoria, ignorando a quantidade de retornos (α_2) e/ou erros nas caixas de decisão (α_3) que uma mesma abelha pudesse ter feito mais de uma vez.

5. RESULTADOS

Para tabular e analisar os dados, criou-se uma combinação de números relacionado a cada marca de tinta feita na abelha. Assim, para os testes com tiametoxam, as abelhas de 1 a 30 do grupo controle e DL₅₀/100 são diferentes das abelhas do grupo controle e DL₅₀/10 e também diferentes das abelhas do grupo controle e DL₅₀. Pois as amostras de cada diluição testada são independentes. O mesmo foi feito para o acetamiprido.

5.1. Tempo de vôo

5.1.1. Tiametoxam

Comparações entre os tempos de vôo dos grupos mostraram, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 48,3052$, $GL = 3$, $p < 0,0001$, n (controle) = 90, n (DL₅₀/100) = 18, n (DL₅₀/10) = 8 e n (DL₅₀) = 7), diferença significativa entre os grupos de abelhas expostas (DL₅₀/100, DL₅₀/10 e DL₅₀) e o grupo controle. Na comparação feita entre os grupos, realizada através do método Dunn, verificou-se que a diferença significativa ocorre entre o tempo de vôo do grupo controle e o tempo de vôo das abelhas dos grupos onde foi aplicada as doses de DL₅₀/100, DL₅₀/10 e DL₅₀ (Figura 6 e Tabela 1).

A média do tempo de vôo para o controle foi de 19 s. A média do tempo de vôo para DL₅₀/100 foi de 36 s. A média do tempo de vôo para DL₅₀/10 foi de 56 s. E a média do tempo de vôo para DL₅₀ foi de 119 s.

5.1.2. Acetamiprido

Comparações entre os tempos de vôo dos grupos mostraram, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 25,0946$, $GL = 2$, $p < 0,0001$, n (Controle) = 90, n (DL₅₀/100) = 5 e n (DL₅₀/10) = 5), diferença significativa entre os grupos de abelhas expostas (DL₅₀/100 e DL₅₀/10) e o grupo controle. Na comparação feita entre os grupos, realizada através do método Dunn, verificou-se que a diferença significativa ocorre entre o tempo de vôo do grupo controle e o tempo de vôo das abelhas dos grupos onde foi aplicada as doses de DL₅₀/100 e DL₅₀/10 (Figura 7 e Tabela 2). O

grupo da DL_{50} não entrou no teste devido a nenhuma abelha ter conseguido chegar na fonte de alimento.

A média do tempo de voo para o controle também foi de 19 s, como nos testes com tiametoxam. A média do tempo de voo para $DL_{50}/100$ foi de 117 s e a média do tempo de voo para $DL_{50}/10$ foi de 59 s. Não há média do tempo de voo para DL_{50} pois nenhuma abelha terminou todo o percurso do labirinto.

Tabela 1: Tempo de vôo (s) das abelhas de cada grupo das doses testadas do inseticida tiametoxam.

Controle		DL ₅₀ /100		Controle		DL ₅₀ /10		Controle		DL ₅₀	
Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)
1	5	1	49	31	63	32	28	61	10	64	106
2	19	2	16	32	13	33	137	62	32	65	61
3	9	7	43	33	12	37	51	63	28	67	83
4	43	8	21	34	23	47	41	64	9	70	96
5	18	10	28	35	7	50	50	65	18	72	97
6	28	11	30	36	11	57	63	66	49	76	298
7	17	12	58	37	12	59	30	67	11	77	97
8	9	14	54	38	17	60	51	68	18		
9	12	15	64	39	39			69	16		
10	7	17	48	40	28			70	8		
11	22	18	36	41	26			71	20		
12	16	19	29	42	31			72	34		
13	13	21	49	43	11			73	26		
14	8	24	23	44	13			74	7		
15	31	25	34	45	9			75	47		
16	19	27	19	46	10			76	13		
17	18	29	22	47	33			77	58		
18	24	30	41	48	8			78	16		
19	17			49	9			79	11		
20	12			50	12			80	24		
21	10			51	10			81	9		
22	9			52	19			82	9		
23	8			53	22			83	20		
24	37			54	46			84	8		
25	46			55	11			85	21		
26	34			56	14			86	29		
27	13			57	20			87	7		
28	25			58	17			88	44		
29	19			59	9			89	10		
30	41			60	15			90	10		
Médias = 19		36		19		56		20		119	

Tabela 2: Tempo de vôo (s) das abelhas de cada grupo das doses testadas do inseticida acetamiprido.

Controle		DL ₅₀ /100		Controle		DL ₅₀ /10		Controle		DL ₅₀	
Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)	Abelha	T. de vôo (s)
1	23	7	96	31	12	44	50	61	11		
2	9	10	43	32	26	50	35	62	14		
3	19	15	74	33	17	54	63	63	24		
4	19	27	299	34	23	59	71	64	33		
5	8	28	75	35	39	60	78	65	9		
6	25			36	9			66	19		
7	9			37	10			67	8		
8	11			38	42			68	48		
9	22			39	14			69	7		
10	30			40	21			70	37		
11	8			41	19			71	11		
12	7			42	17			72	29		
13	42			43	15			73	23		
14	37			44	8			74	20		
15	25			45	31			75	10		
16	19			46	35			76	44		
17	17			47	7			77	14		
18	8			48	9			78	23		
19	10			49	11			79	9		
20	24			50	18			80	18		
21	29			51	37			81	21		
22	9			52	20			82	35		
23	17			53	28			83	12		
24	19			54	10			84	31		
25	23			55	13			85	9		
26	27			56	9			86	8		
27	31			57	29			87	13		
28	28			58	12			88	10		
29	10			59	9			89	39		
30	11			60	8			90	52		
Médias = 19		117		18		59		21			

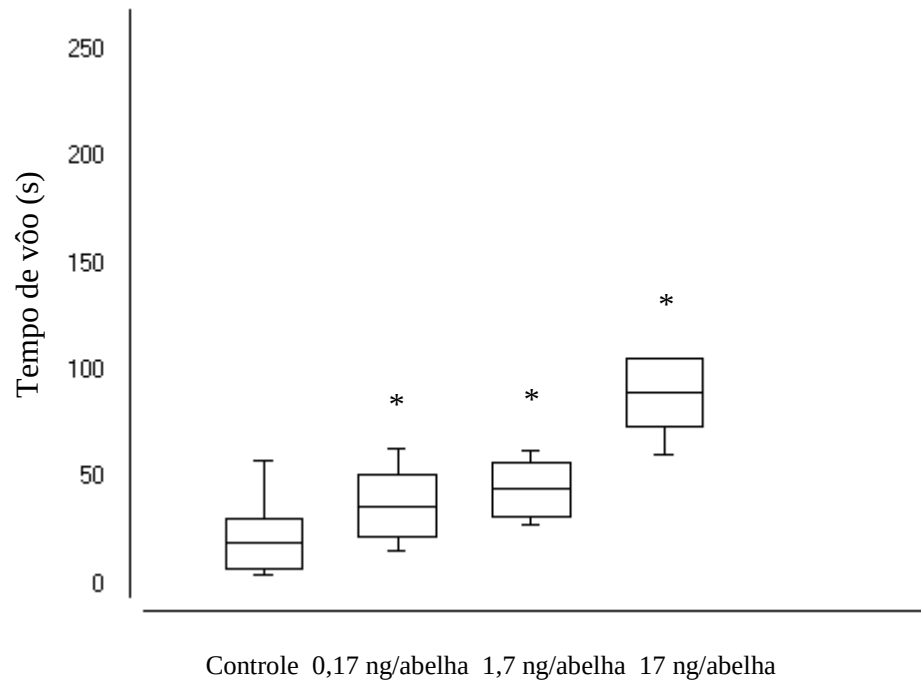


Figura 6: Tempo de voo (s) das abelhas em função dos tratamentos com tiametoxam durante o percurso no labirinto. * = diferença significativa em relação ao grupo controle.

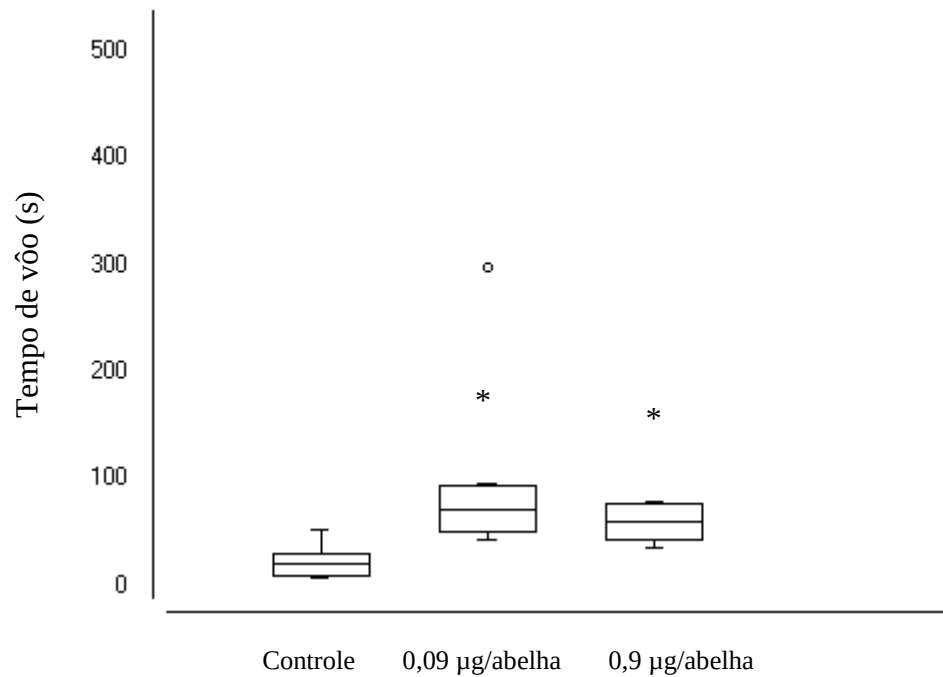


Figura 7: Tempo de voo (s) das abelhas em função dos tratamentos com acetamiprido durante o percurso no labirinto. * = diferença significativa em relação ao grupo controle.

5.2. Performance

5.2.1. Tiametoxam

Comparações entre os grupos expostos e controle de cada categoria mostraram, através do teste Binomial: Duas Proporções (para p unilateral $< 0,05$), que:

- **DL₅₀/100 (0,17 ng/abelha)** (Tabela 3)

α_1 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral $< 0,0001$);

α_2 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral $= 0,0501$);

α_3 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo expostos demonstrou-se significativa (p unilateral $= 0,0209$);

α_4 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral $= 0,0364$).

- **DL₅₀/10 (1,7 ng/abelha)** (Tabela 4)

α_1 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral $= 0,0002$);

α_2 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral $= 0,4515$);

α_3 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral $= 0,4388$);

α_4 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral $< 0,0001$).

- **DL₅₀ (17 ng/abelha)** (Tabela 5)

$\alpha 1$ – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral < 0,0001);

$\alpha 2$ – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral = 0,1509);

$\alpha 3$ - A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral = 0,0528);

$\alpha 4$ - A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral < 0,0001).

Tabela 3: Quantidade de abelhas que realizaram cada categoria antes e após a aplicação da dose de tiametoxam referente a DL₅₀/100, sendo que uma mesma abelha pode realizar mais de uma categoria. * = diferença significativa quando comparado ao controle (Teste Binomial: Duas Proporções, p unilateral < 0,05).

Grupos	Categorias			
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$
Controle (n = 30)	23	6	2	0
DL₅₀/100 (n = 22)	* 5	9	* 6	* 4

Tabela 4: Quantidade de abelhas que realizaram cada categoria antes e após a aplicação da dose de Tiametoxam referente a DL₅₀/10, sendo que uma mesma abelha pode realizar mais de uma categoria. * = diferença significativa quando comparado ao controle (Teste Binomial: Duas Proporções, p unilateral < 0,05).

Grupos	Categorias			
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$
Controle (n = 30)	25	3	2	0
DL₅₀/10 (n = 18)	* 6	2	0	* 10

Tabela 5: Quantidade de abelhas que realizaram cada categoria antes e após a aplicação da dose de Tiametoxam referente a DL_{50} , sendo que uma mesma abelha pode realizar mais de uma categoria. * = diferença significativa quando comparado ao controle (Teste Binomial: Duas Proporções, p unilateral < 0,05).

Grupos	Categorias			
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$
Controle (n = 30)	24	6	0	0
DL_{50} (n = 18)	* 0	6	3	* 11

5.2.2. Acetamiprido

Comparações entre os grupos expostos e controle de cada categoria mostraram, através do teste Binomial: Duas Proporções (para p unilateral < 0,05), que:

- **$DL_{50}/100$ (0,09 $\mu\text{g}/\text{abelha}$)** (Tabela 6)

$\alpha 1$ – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral < 0,0001);

$\alpha 2$ – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral = 0,4252);

$\alpha 3$ – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral = 0,0155);

$\alpha 4$ – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral < 0,0001).

- **DL₅₀/10 (0,9 µg/abelha)** (Tabela 7)

α1 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral < 0,0001);

α2 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral = 0,0828);

α3 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral = 0,2241);

α4 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral < 0,0001).

- **DL₅₀ (9 µg/abelha)** (Tabela 8)

α1 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral < 0,0001);

α2 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral = 0,2981);

α3 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto não se demonstrou significativa (p unilateral = 0,4517);

α4 – A diferença observada do grupo controle em relação ao grupo exposto demonstrou-se significativa (p unilateral < 0,0001).

Tabela 6: Quantidade de abelhas que realizaram cada categoria antes e após a aplicação da dose de acetamiprido referente a $DL_{50}/100$, sendo que uma mesma abelha pode realizar mais de uma categoria. * = diferença significativa quando comparado ao controle (Teste Binomial: Duas Proporções, p unilateral < 0,05).

Grupos	Categorias			
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$
Controle (n = 30)	26	3	1	0
$DL_{50}/100$ (n = 17)	* 1	2	* 4	* 12

Tabela 7: Quantidade de abelhas que realizaram cada categoria antes e após a aplicação da dose de acetamiprido referente a $DL_{50}/10$, sendo que uma mesma abelha pode realizar mais de uma categoria. * = diferença significativa quando comparado ao controle (Teste Binomial: Duas Proporções, p unilateral < 0,05).

Grupos	Categorias			
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$
Controle (n = 30)	26	3	1	0
$DL_{50}/10$ (n = 11)	* 2	3	0	* 6

Tabela 8: Quantidade de abelhas que realizaram cada categoria antes e após a aplicação da dose de acetamiprido referente a DL_{50} , sendo que uma mesma abelha pode realizar mais de uma categoria. * = diferença significativa quando comparado ao controle (Teste Binomial: Duas Proporções, p unilateral < 0,05).

Grupos	Categorias			
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$
Controle (n = 30)	24	4	2	0
DL_{50} (n = 13)	* 0	0	0	* 13

5.3. Tempo de pouso

Tempo gasto da entrada do alimentador até o pouso no recipiente plástico contendo mel (Figura 4).

5.3.1. Tiametoxam

Comparações entre os tempos para pousar na fonte de alimento dos grupos não mostraram, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 6,9327$, $GL = 3$, $p = 0,0741$, n (controle) = 90, n (DL₅₀/100) = 18, n (DL₅₀/10) = 8 e n (DL₅₀) = 7), diferença significativa entre os grupos de abelhas expostas (DL₅₀/100, DL₅₀/10 e DL₅₀) e o grupo controle (Figura 8 e Tabela 9).

A média do tempo de pouso para o controle foi de 2 s. A média do tempo de pouso para DL₅₀/100 foi de 2 s. A média do tempo de vôo para DL₅₀/10 foi de 1 s. E a média do tempo de vôo para DL₅₀ foi de 1 s.

5.3.2. Acetamiprido

Comparações entre os tempos para pousar na fonte de alimento dos grupos mostraram, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 8,7845$, $GL = 2$, $p = 0,0124$, n (controle) = 90, n (DL₅₀/100) = 5, n (DL₅₀/10) = 5 e n (DL₅₀) = 0), diferença significativa entre os grupos de abelhas tratadas (DL₅₀/100, DL₅₀/10 e DL₅₀) e o grupo controle. Na comparação feita entre os grupos, realizada através do método Dunn, verificou-se que a diferença significativa ocorre entre o tempo de pouso do grupo controle e o tempo de pouso do grupo onde foi aplicado a dose DL₅₀/100 = 0,09 µg/abelha (Figura 9 e Tabela 10).

A média do tempo de pouso para o controle foi de 2 s. A média do tempo de pouso para DL₅₀/100 foi de 2 s, e a média do tempo de vôo para DL₅₀/10 foi de 2 s. Não há média do tempo de vôo para DL₅₀ pois nenhuma abelha terminou todo o percurso do labirinto.

Tabela 9: Tempo de pouso (s) das abelhas de cada grupo das doses testadas do inseticida tiametoxam.

Controle		DL ₅₀ /100		Controle		DL ₅₀ /10		Controle		DL ₅₀	
Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)
1	1	1	3	31	1	32	1	61	1	64	1
2	1	2	2	32	9	33	2	62	1	65	1
3	3	7	3	33	1	37	1	63	1	67	1
4	6	8	2	34	1	47	2	64	2	70	3
5	1	10	2	35	1	50	2	65	1	72	2
6	1	11	1	36	1	57	2	66	4	76	1
7	2	12	138	37	2	59	2	67	1	77	2
8	1	14	1	38	3	60	1	68	2		
9	2	15	4	39	1			69	2		
10	2	17	2	40	1			70	1		
11	2	18	3	41	2			71	1		
12	1	19	1	42	1			72	6		
13	1	21	3	43	1			73	2		
14	1	24	1	44	2			74	4		
15	2	25	2	45	1			75	2		
16	3	27	3	46	1			76	2		
17	1	29	2	47	1			77	1		
18	4	30	7	48	1			78	2		
19	2			49	3			79	1		
20	2			50	2			80	2		
21	3			51	1			81	3		
22	1			52	1			82	2		
23	1			53	1			83	1		
24	1			54	2			84	1		
25	2			55	1			85	16		
26	1			56	2			86	2		
27	2			57	1			87	1		
28	2			58	1			88	18		
29	1			59	2			89	1		
30	2			60	2			90	1		
Médias =	2		10		1		1		2		1

Tabela 10: Tempo de pouso (s) das abelhas de cada grupo das doses testadas do inseticida acetamiprido.

Controle		DL ₅₀ /100		Controle		DL ₅₀ /10		Controle		DL ₅₀	
Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)	Abelha	T. de pouso (s)
1	2	7	2	31	2	44	1	61	95		
2	2	10	3	32	41	50	1	62	2		
3	1	15	3	33	1	54	4	63	1		
4	32	27	2	34	1	59	3	64	1		
5	1	28	2	35	1	60	2	65	1		
6	2			36	1			66	2		
7	1			37	2			67	1		
8	1			38	1			68	3		
9	2			39	1			69	3		
10	1			40	1			70	2		
11	1			41	3			71	2		
12	1			42	1			72	1		
13	1			43	2			73	1		
14	1			44	1			74	1		
15	3			45	1			75	1		
16	1			46	1			76	41		
17	1			47	2			77	1		
18	2			48	3			78	2		
19	1			49	3			79	2		
20	2			50	2			80	2		
21	1			51	1			81	1		
22	1			52	1			82	1		
23	1			53	1			83	1		
24	2			54	1			84	1		
25	3			55	1			85	2		
26	1			56	1			86	2		
27	2			57	2			87	2		
28	2			58	2			88	1		
29	1			59	2			89	2		
30	1			60	2			90	2		
Médias =	2		2		2		2		2		

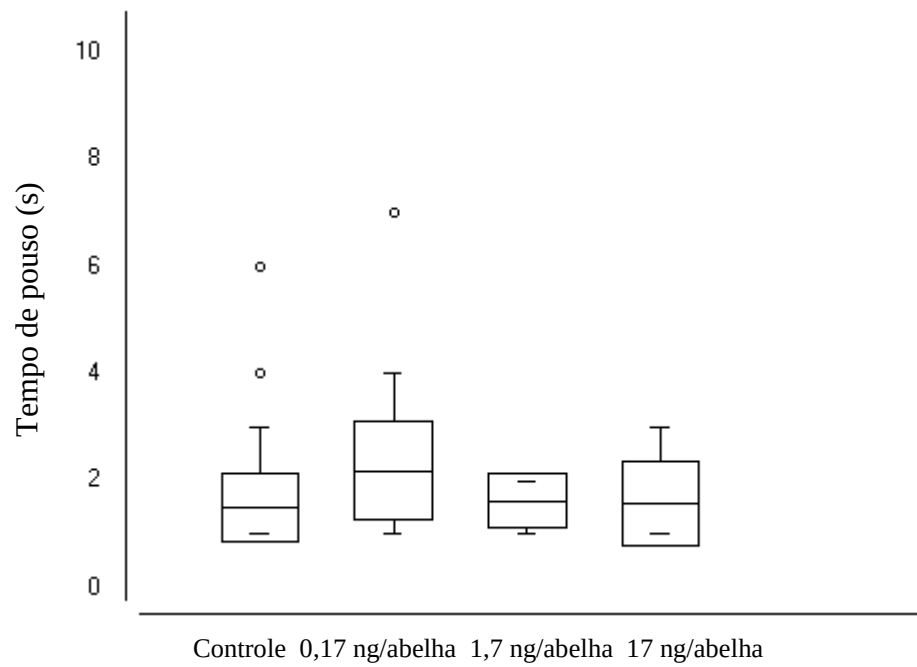


Figura 8: Tempo de pouso (s) das abelhas em função dos tratamentos com tiametoxam.

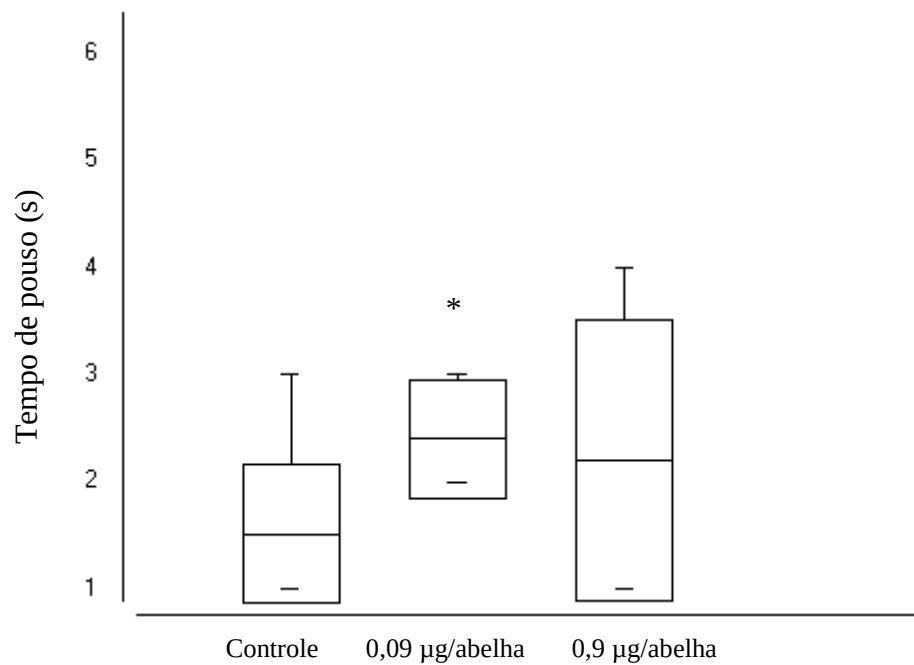


Figura 9: Tempo de pouso (s) das abelhas em função dos tratamentos com acetamiprido. * = diferença significativa em relação ao grupo controle.

5.4. Tempo de coleta

5.4.1. Tiametoxam

Comparações entre os tempos de coleta na fonte de alimento dos grupos mostraram, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 7,8737$, $GL = 3$, $p = 0,0487$, n (Controle) = 90, n (DL₅₀/100) = 18, n (DL₅₀/10) = 8 e n (DL₅₀) = 7), diferença significativa entre os grupos de abelhas expostas (DL₅₀/100, DL₅₀/10 e DL₅₀) e o grupo controle. Na comparação feita entre os grupos, realizada através do método Dunn, verificou-se que a diferença significativa ocorre entre o tempo de coleta do grupo controle e o tempo de coleta do grupo onde foi aplicado a dose DL₅₀ = 17,0 ng/abelha (Figura 10 e Tabela 11).

A média do tempo de coleta para o controle foi de 236 s. A média do tempo de coleta para DL₅₀/100 foi de 237 s. A média do tempo de coleta para DL₅₀/10 foi de 226 s, e a média do tempo de coleta para DL₅₀ foi de 341.

5.4.2. Acetamiprido

Comparações entre os tempos de coleta na fonte de alimento dos grupos mostraram, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 13,2086$, $GL = 2$, $p = 0,0014$, n (Controle) = 90, n (DL₅₀/100) = 5, n (DL₅₀/10) = 5 e n (DL₅₀) = 0), diferença significativa entre os grupos de abelhas expostas (DL₅₀/100, DL₅₀/10 e DL₅₀) e o grupo controle. Na comparação feita entre os grupos, realizada através do método Dunn, verificou-se que a diferença significativa ocorre entre o tempo de coleta do grupo controle e o tempo de coleta do grupo onde foi aplicado a dose DL₅₀/100 = 0,09 µg/abelha (Figura 11 e Tabela 12).

A média do tempo de coleta para o controle foi de 264 s. A média do tempo de coleta para DL₅₀/100 foi de 121 s. A média do tempo de coleta para DL₅₀/10 foi de 236 s. Não há média do tempo de vôo para DL₅₀ pois nenhuma abelha terminou todo o percurso do labirinto.

Tabela 11: Tempo de coleta (s) das abelhas de cada grupo das doses testadas do inseticida tiametoxam.

Controle		DL ₅₀ /100		Controle		DL ₅₀ /10		Controle		DL ₅₀	
Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)
1	182	1	153	1	168	2	186	1	294	4	292
2	90	2	144	2	122	3	151	2	163	5	312
3	194	7	217	3	178	7	192	3	187	7	393
4	187	8	178	4	167	17	176	4	139	10	205
5	169	10	185	5	144	20	207	5	86	12	352
6	192	11	404	6	166	27	298	6	302	16	250
7	154	12	305	7	189	29	311	7	401	17	586
8	177	14	229	8	194	30	287	8	417		
9	228	15	390	9	159			9	348		
10	181	17	292	10	130			10	242		
11	213	18	178	11	169			11	312		
12	232	19	195	12	263			12	540		
13	219	21	191	13	218			13	359		
14	201	24	235	14	229			14	366		
15	164	25	223	15	193			15	334		
16	125	27	269	16	284			16	297		
17	147	29	276	17	296			17	422		
18	176	30	207	18	235			18	363		
19	204			19	229			19	282		
20	228			20	212			20	288		
21	179			21	297			21	725		
22	192			22	281			22	320		
23	257			23	179			23	319		
24	153			24	206			24	279		
25	182			25	139			25	455		
26	229			26	174			26	295		
27	267			27	217			27	194		
28	225			28	171			28	212		
29	242			29	159			29	273		
30	199			30	224			30	344		
Médias = 193		237		199		226		318		341	

Tabela 12: Tempo de coleta (s) das abelhas de cada grupo das doses testadas do inseticida acetamiprido.

Controle		DL ₅₀ /100		Controle		DL ₅₀ /10		Controle		DL ₅₀	
Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)	Abelha	T. de coleta (s)
1	219	7	142	1	178	14	158	1	282		
2	147	10	149	2	168	20	89	2	195		
3	175	15	67	3	195	24	287	3	287		
4	176	27	125	4	191	29	334	4	191		
5	229	28	124	5	344	30	315	5	178		
6	283			6	370			6	168		
7	329			7	211			7	192		
8	348			8	149			8	219		
9	363			9	236			9	177		
10	327			10	320			10	305		
11	353			11	279			11	189		
12	281			12	133			12	392		
13	207			13	295			13	366		
14	295			14	402			14	1		
15	169			15	299			15	312		
16	191			16	207			16	242		
17	272			17	188			17	313		
18	329			18	242			18	540		
19	382			19	265			19	359		
20	177			20	287			20	250		
21	344			21	273			21	292		
22	272			22	148			22	422		
23	229			23	209			23	288		
24	301			24	231			24	334		
25	272			25	271			25	202		
26	145			26	185			26	176		
27	259			27	379			27	340		
28	330			28	294			28	207		
29	229			29	262			29	293		
30	371			30	341			30	178		
Médias = 266		121		251		236		276			

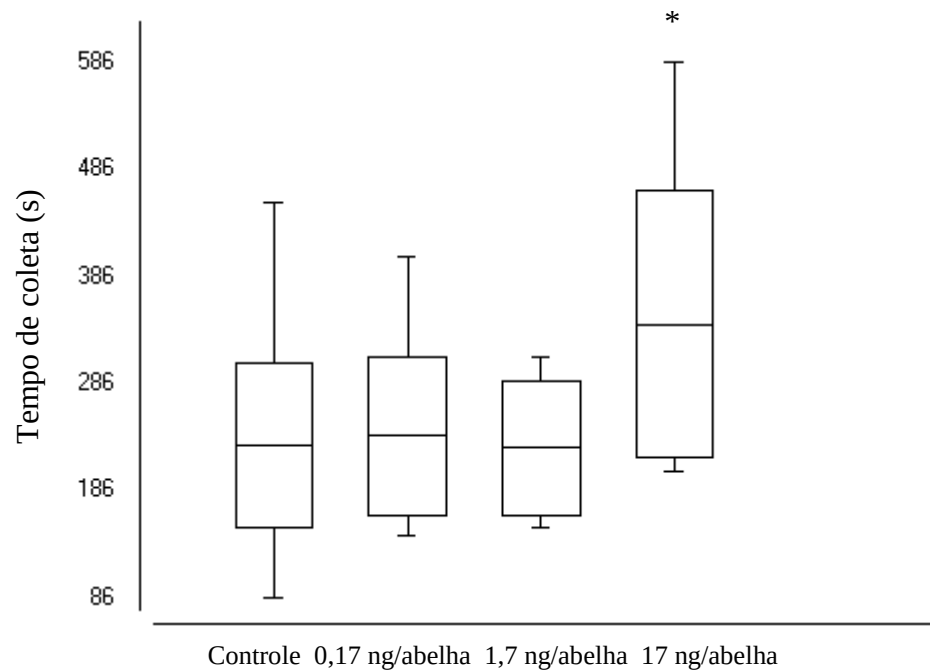


Figura 10: Tempo de coleta (s) das abelhas em função dos tratamentos com tiametoxam. * = diferença significativa em relação ao grupo controle.

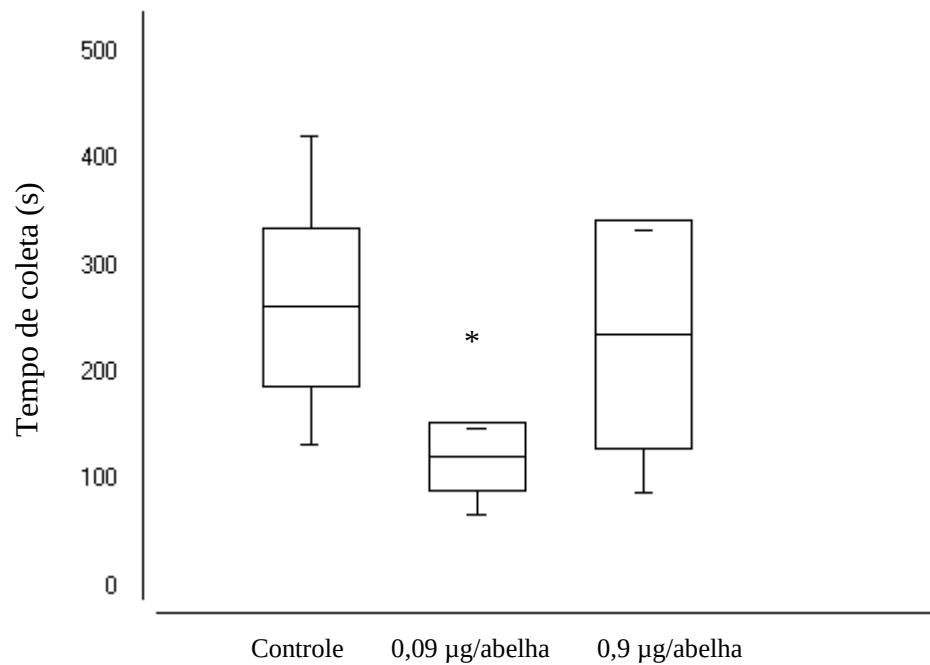


Figura 11: Tempo de coleta (s) das abelhas em função dos tratamentos com acetamiprido. * = diferença significativa em relação ao grupo controle.

5.5. Quantidade de alimento coletada

5.5.1. Tiametoxam

Análise comparativa entre as quantidades de alimento coletado na fonte de recompensa dos grupos mostraram, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 1,3592$, $GL = 3$, $p = 0,7151$, n (Controle) = 90, n ($DL_{50}/100$) = 18, n ($DL_{50}/10$) = 8 e n (DL_{50}) = 7), que não houve diferença significativa entre os grupos de abelhas expostas ($DL_{50}/100$, $DL_{50}/10$ e DL_{50}) e o grupo controle (Figura 12 e Tabela 13).

A média da quantidade de alimento coletada para o controle foi de 0,0490 g. A média da quantidade de alimento coletada para $DL_{50}/100$ foi de 0,0501 g. A média da quantidade de alimento coletada para $DL_{50}/10$ foi de 0,0510 g. E a média da quantidade de alimento coletada para DL_{50} foi de 0,0487 g.

5.5.2. Acetamiprido

Análise comparativa entre as quantidades de alimento coletado na fonte de recompensa dos grupos mostraram, através do teste de Kruskal-Wallis ($H = 15,7818$, $GL = 2$, $p = 0,0004$, n (Controle) = 90, n ($DL_{50}/100$) = 5, n ($DL_{50}/10$) = 5 e n (DL_{50}) = 0), que houve diferença significativa entre os grupos de abelhas expostas ($DL_{50}/100$, $DL_{50}/10$ e DL_{50}) e o grupo controle. Na comparação feita entre os grupos, realizada através do método Dunn, verificou-se que a diferença significativa ocorre entre a quantidade de alimento coletada do grupo controle e a quantidade de alimento coletada do grupo onde foram aplicadas as doses $DL_{50}/100 = 0,09 \mu\text{g/abelha}$ e $DL_{50}/10 = 0,9 \mu\text{g/abelha}$ (Figura 13 e Tabela 14).

A média da quantidade de alimento coletada para o controle foi de 0,0495 g. A média da quantidade de alimento coletada para $DL_{50}/100$ foi de 0,0329 g. E a média da quantidade de alimento coletada para $DL_{50}/10$ foi de 0,0326 g. Não há média do tempo de vôo para DL_{50} pois nenhuma abelha terminou todo o percurso do labirinto.

Tabela 13: Quantidade de alimento coletada (g) das abelhas de cada grupo das doses testadas do inseticida tiametoxam.

Controle		DL ₅₀ /100		Controle		DL ₅₀ /10		Controle		DL ₅₀	
Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)
1	0,0636	1	0,0517	31	0,0570	32	0,0438	61	0,0523	64	0,0332
2	0,0481	2	0,1039	32	0,0562	33	0,0407	62	0,0375	65	0,0569
3	0,0646	7	0,0597	33	0,0438	37	0,0502	63	0,0452	67	0,0543
4	0,0675	8	0,0274	34	0,0606	47	0,0511	64	0,0447	70	0,0439
5	0,0623	10	0,0365	35	0,0597	50	0,0576	65	0,0248	72	0,0517
6	0,0597	11	0,0507	36	0,0589	57	0,0498	66	0,0385	76	0,0382
7	0,0534	12	0,0483	37	0,0573	59	0,0603	67	0,0472	77	0,0631
8	0,0587	14	0,0456	38	0,0588	60	0,0547	68	0,0483		
9	0,0564	15	0,0521	39	0,0490			69	0,0491		
10	0,0307	17	0,0477	40	0,0477			70	0,0283		
11	0,0510	18	0,0398	41	0,0506			71	0,0295		
12	0,0531	19	0,0432	42	0,0534			72	0,0507		
13	0,0468	21	0,0418	43	0,0529			73	0,0532		
14	0,0547	24	0,0332	44	0,0522			74	0,0467		
15	0,0378	25	0,0451	45	0,0457			75	0,0481		
16	0,0365	27	0,0549	46	0,0432			76	0,0516		
17	0,0252	29	0,0529	47	0,0589			77	0,0453		
18	0,0487	30	0,0675	48	0,0516			78	0,0462		
19	0,0452			49	0,0479			79	0,0566		
20	0,0389			50	0,0475			80	0,0451		
21	0,0623			51	0,0564			81	0,0572		
22	0,0481			52	0,0582			82	0,0546		
23	0,0597			53	0,0414			83	0,0503		
24	0,0369			54	0,0453			84	0,0477		
25	0,0432			55	0,0407			85	0,0451		
26	0,0538			56	0,0379			86	0,0567		
27	0,0419			57	0,0467			87	0,0442		
28	0,0542			58	0,0398			88	0,0389		
29	0,0609			59	0,0421			89	0,0507		
30	0,0565			60	0,0420			90	0,0532		
Médias = 0,0506		0,0501		0,0502		0,0510		0,0462		0,0487	

Tabela 14: Quantidade de alimento coletada (g) das abelhas de cada grupo das doses testadas do inseticida acetamiprido.

Controle		DL ₅₀ /100		Controle		DL ₅₀ /10		Controle		DL ₅₀	
Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)	Abelha	Qtde. al. colet. (g)
1	0,0487	7	0,0252	31	0,0307	44	0,0510	61	0,0564		
2	0,0361	10	0,0468	32	0,0587	50	0,0117	62	0,0597		
3	0,0398	15	0,0254	33	0,0534	54	0,0293	63	0,0472		
4	0,0547	27	0,0365	34	0,0531	59	0,0361	64	0,0332		
5	0,0529	28	0,0311	35	0,0452	60	0,0349	65	0,0507		
6	0,0532			36	0,0569			66	0,0389		
7	0,0614			37	0,0531			67	0,0452		
8	0,0567			38	0,0359			68	0,0283		
9	0,0644			39	0,0421			69	0,0451		
10	0,0607			40	0,0582			70	0,0547		
11	0,0498			41	0,0439			71	0,0366		
12	0,0576			42	0,0520			72	0,0636		
13	0,0459			43	0,0593			73	0,0675		
14	0,0420			44	0,0521			74	0,0483		
15	0,0367			45	0,0402			75	0,0517		
16	0,0466			46	0,0430			76	0,0421		
17	0,0523			47	0,0522			77	0,0534		
18	0,0409			48	0,0461			78	0,0687		
19	0,0653			49	0,0591			79	0,0410		
20	0,0341			50	0,0427			80	0,0526		
21	0,0590			51	0,0418			81	0,0534		
22	0,0588			52	0,0523			82	0,0469		
23	0,0572			53	0,0576			83	0,0591		
24	0,0436			54	0,0533			84	0,0555		
25	0,0593			55	0,0481			85	0,0521		
26	0,0357			56	0,0312			86	0,0409		
27	0,0524			57	0,0544			87	0,0532		
28	0,0639			58	0,0450			88	0,0464		
29	0,0533			59	0,0497			89	0,0565		
30	0,0407			60	0,0556			90	0,0272		
Médias: 0,0507		0,0329		0,0488		0,0326		0,0492			

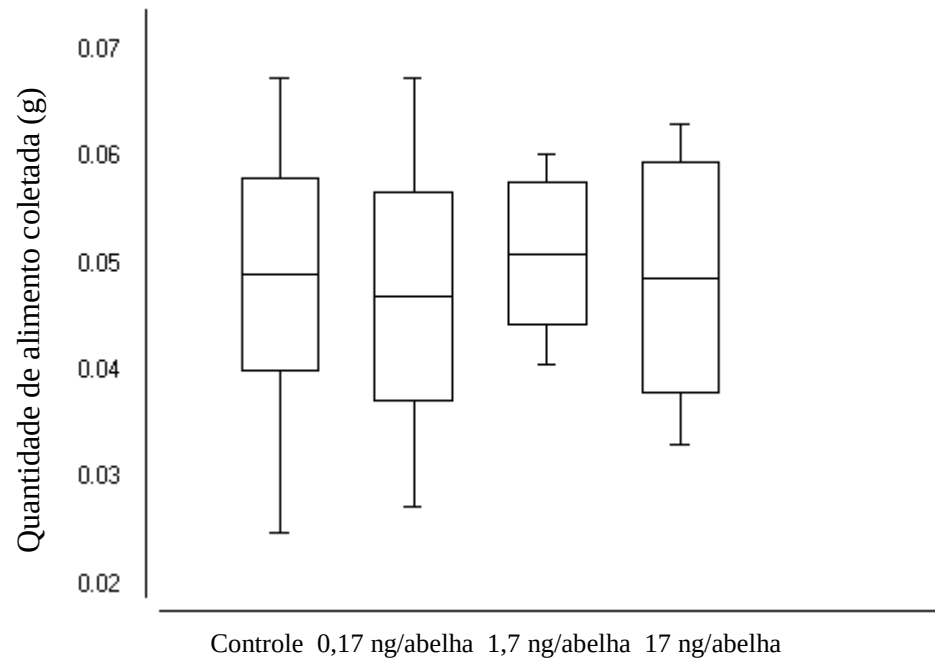


Figura 12: Quantidade de alimento coletada (g) pelas abelhas em função dos tratamentos com tiametoxam.

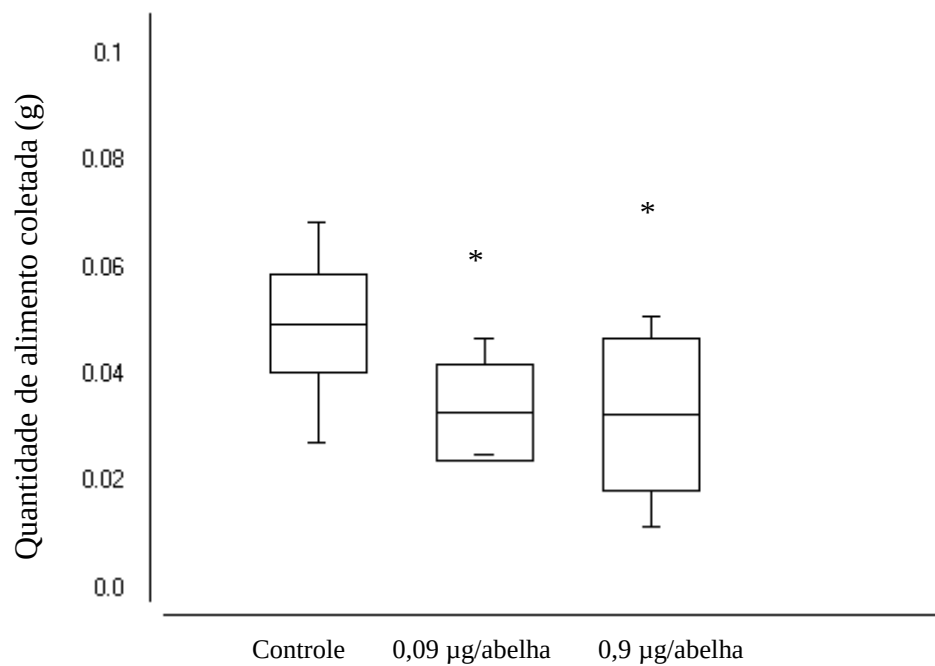


Figura 13: Quantidade de alimento coletada (g) pelas abelhas em função dos tratamentos com acetamiprido. * = diferença significativa em relação ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi possível verificar que as abelhas, em situação de vôo, podem associar uma marca visual a uma recompensa, e também através disso aprenderem a associar um trajeto correto em um labirinto, como um resultado já observado por Menzel et al. (1974), Zhang et al. (1996) e Decourtye et al. (2008). Esses autores verificaram também que as aplicações tópicas de inseticidas causaram grandes danos na navegação das abelhas dentro do labirinto, como maior tempo de vôo e maior quantidade de erros nas caixas de decisão.

Nos testes com tiametoxam, observou-se diferenças significativas no tempo de vôo no labirinto para as doses de 0,17, 1,7 e 17 ng/abelha, e também aumentaram as quantidades de retornos e/ou erros nas caixas de decisão. Segundo Pereira (2010) observou que esse mesmo ingrediente ativo prejudicou o comportamento de locomoção para a dose de 17 ng/abelha 1 hora após a aplicação tópica do ingrediente ativo, diminuindo a velocidade média para atravessar a raia. Essa mesma dose do tiametoxam prejudicou também a percepção das concentrações de sacarose do teste de REP 1 hora após a aplicação tópica. Esse mesmo autor notou que 4 horas após a aplicação das doses de 1,7 e 17 ng/abelha os comportamentos de locomoção e REP foram prejudicados, porém com um efeito menos acentuado quando comparado ao de 1 hora. E para os testes realizados 24 horas após a aplicação do tiametoxam, a dose de 17 ng/abelha prejudicou somente o comportamento de REP, em uma proporção menor que as dos testes de 1 e 4 horas.

O condicionamento olfativo do reflexo de extensão da probóscide (PER) é largamente utilizado em experimentos farmacológicos comportamentais. As abelhas podem ser condicionadas a um odor de sinalização como estímulo para prever a ocorrência de uma recompensa de sacarose. Emparelhando o odorante com a recompensa de sacarose cria uma associação entre os dois estímulos, levando abelhas para responder ao odor apresentado sozinho por uma extensão da probóscide. A memória para o odorante condicionado tem a duração de algumas horas após a aprendizagem de um simples julgamento e durante vários dias após a aprendizagem de vários julgamentos (GAUTHIER et al., 2012, p. 155).

Vários estudos demonstraram que aminas biogênicas são crucialmente envolvidas durante a aprendizagem. Além disso, o papel de neurotransmissores, como a acetilcolina foi identificado por meio de manipulações farmacológicas (GALIZIA et al., 2012). Desse modo, doses subletais de tiametoxam (inseticida que compete pelos receptores nicotínicos de acetilcolina) interferem

diretamente as redes neurais responsáveis pelo aprendizado olfativo, que se inicia nos nervos antenais, estendendo-se até os cálices e os pedúnculos através do neurônio VUMmx1.

O tiametoxam apresenta maior mortalidade por volta de 4 horas após a aplicação tópica (PEREIRA, 2010), nas primeiras horas após a aplicação, os metabólitos (que são responsáveis pela mortalidade) ainda se encontram em uma proporção mais baixa em relação ao composto principal, mas suficientemente prejudiciais aos comportamentos analisados logo após a aplicação. Sinais de intoxicação (voos descoordenados, quedas e rastejamento) foram observados enquanto as abelhas percorriam o labirinto.

Notou-se também que grande parte das abelhas condicionadas não retornaram ao labirinto após a aplicação tópica do inseticida. Isso, provavelmente devido elas terem perdidos a capacidade de navegação para voltarem ao ninho ou ao labirinto, e/ou devido o inseticida ter causado a mortalidade dessas abelhas.

Segundo Henry (2012), testando dose subletal de tiametoxam para avaliar o vôo de retorno à colônia de *A. mellifera* utilizando identificação de rádio frequência (RFID), notou-se alta mortalidade das abelhas forrageiras expostas em relação ao grupo controle de forrageiras. Este autor verificou no experimento conduzido que até 31,6% das abelhas expostas não retornaram à colônia, aumentando os riscos de colapso da mesma.

Nos testes com acetamiprido, observou-se diferenças significativas em todas as variáveis estudadas. As doses 0,09 e 0,9 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ causaram aumento no tempo de vôo em relação ao grupo controle. Essas mesmas doses (0,09, 0,9 e 9 $\mu\text{g}/\text{abelha}$) prejudicaram a performance, havendo maior número de retornos e erros nas caixas de decisão. A dose 0,09 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ causou aumento no tempo de pouso e no tempo de coleta, comparados ao grupo controle. As doses 0,09 e 0,9 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ fez com que as abelhas coletassem uma menor quantidade de alimento, quando comparadas com o grupo controle. Para a dose de 9 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ analisou-se apenas a performance, pois nenhuma abelha foi capaz de percorrer todo labirinto e entrar no alimentador. Um grande número de abelhas condicionadas, após a aplicação tópica das doses do inseticida, não retornou ao labirinto. Em especial, no grupo em que abelhas que receberam a dose DL_{50} (9 $\mu\text{g}/\text{abelha}$), apenas 13 retornaram e não conseguiram completar o labirinto.

Segundo o estudo de Pereira (2010), o acetamiprido, nas doses de 0,93 e 9,3 $\mu\text{g}/\text{abelha}$, prejudicaram na percepção de concentrações de sacarose 1 hora após a aplicação tópica desse ingrediente ativo. Já no teste de locomoção nesse mesmo período, a dose de 9,3 $\mu\text{g}/\text{abelha}$

comprometeu a velocidade com que as abelhas atravessavam a raia. Nos testes 4 horas após a aplicação, as doses 0,93 e 9,3 µg/abelha do acetamiprido comprometeram a velocidade das abelhas na locomoção dentro das raias. Verificou-se também alta mortalidade durante a primeira hora dos testes de REP e locomoção após aplicação tópica desse ingrediente ativo para as três doses analisadas (0,093, 0,93 e 9,3 µg/abelha).

Pereira (2010), verificou, através de resultados de testes de TL_{50} (tempo capaz de ocasionar a mortalidade de 50% da população, após a aplicação de uma determinada dose, segundo protocolo da OECD de 1998), que imediatamente após a aplicação dos neonicotinóides acetamiprido e tiametoxam, sinais visíveis de intoxicação das abelhas puderem ser observados como problemas de coordenação de movimentos, quedas, tremores e rastejamento. No caso do acetamiprido, a mortalidade pode ser registrada na primeira hora após a aplicação sendo que 50% das abelhas morreram com 1 hora e 30 minutos. Enquanto que nos testes com tiametoxam, a mortalidade começou a ser registrada na segunda hora após a aplicação e 50% das abelhas morreram com 3 horas e 50 minutos.

A mortalidade significativa ocorrida na primeira hora após a aplicação do acetamiprido sugere que esse é o principal agente tóxico responsável pelos sinais de intoxicação e consequente morte das operárias. Por ser rapidamente metabolizado, seus metabólitos apresentam pouca ou nenhuma toxicidade para as abelhas, sendo que mais de 50% é metabolizado por várias partes das abelhas (cabeça, tórax, abdome, hemolinfa, intestino médio e reto) em menos de 30 minutos, indicando uma meia-vida muito curta. Na primeira hora existe ainda uma maior quantidade do composto principal (maior toxicidade) em relação a seus metabólitos (menor toxicidade). Brunet, Badiou e Belzunces (2005) observaram que mais de 50% do acetamiprido é metabolizado em menos de 30 minutos em abelhas e Iwasa et al. (2004) também trabalhando com abelhas, verificaram que os produtos resultantes do metabolismo do acetamiprido não apresentam grande toxicidade. Quatro horas após a aplicação ainda existem quantidades tóxicas do ingrediente ativo, mas em um nível menor devido a uma maior metabolização, realizada pelas monoxigenases microsossomais (BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005) o que justifica a influência nos comportamentos analisados neste período. Aproximadamente 5% do acetamiprido aplicado inicialmente foi encontrado em abelhas 24 horas depois (BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005). Já a mortalidade observada após a aplicação tópica do tiametoxam, sugere uma ação tardia dos metabólitos, mesmo apresentando um DL_{50} menor quando comparado à dose subletal do

acetamiprido (PEREIRA, 2010).

No estudo de Decourtye et al. (2008), também foi possível notar que a administração do inseticida Fipronil via oral (solução de sacarose contendo o inseticida na concentração de 1 µg/kg) causou grandes danos, durante o período testado, na orientação das abelhas no labirinto, aumento no tempo de vôo e no número de abelhas que não atingiram a meta durante os 5 minutos de observação. E também o grande número de abelhas que não retornaram ao labirinto após a aplicação do inseticida via oral.

Em um tratamento crônico por 11 dias (aplicação tópica), Aliouane et al. (2009) observaram que o acetamiprido (1,0 e 0,1 µg/abelha) e tiametoxam (1,0 e 0,1 ng/abelha) não prejudicaram o comportamento de locomoção e de REP nos testes realizados no 12º dia. Quando tratadas oralmente, somente o tiametoxam (1,0 ng/abelha) apresentou comprometimento do REP.

Comparando-se os efeitos causados pela aplicação tópica dos inseticidas acetamiprido e tiametoxam realizado neste trabalho, é possível afirmar que o acetamiprido se mostrou mais nocivo. Isso porque seu tempo de ação no sistema nervoso dos insetos é imediata, o que pode justificar o pequeno número amostral nos grupos onde houveram tratamento com as doses subletais e a significativa quantidade de abelhas que não retornaram para o labirinto.

Os danos do tiametoxam podem ser ainda maiores do que os observados, pois a avaliação se procedeu poucos minutos após sua aplicação tópica, sendo que seu tempo de ação no sistema nervoso das abelhas é mais tardio quando comparado ao acetamiprido. Como observado por Pereira (2010), onde os testes realizados após 4 horas da aplicação tópica do tiametoxam apresentaram maiores comprometimentos nos comportamentos.

7. CONCLUSÃO

O método de análise do comportamento de vôo e coleta de alimento empregado com doses subletais dos inseticidas acetamiprido e tiametoxam é uma importante ferramenta para estudos toxicológicos, por ter confirmado os efeitos deletérios dos inseticidas sobre a capacidade das abelhas para encontrar uma rota.

Os resultados obtidos podem ser relacionados diretamente com a situação das forrageiras no campo. Pois em ambos os casos as abelhas usam marcas como pistas e devem percorrer uma rota até chegarem a um alvo, assim como voltar para o ninho. Então a marca colorida utilizada desempenhou um importante papel no reconhecimento do caminho.

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.
- BORTOLOTTI, L. et al. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 56, n. 1, p. 63-67, 2003.
- 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.
- BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. In vivo metabolic fate of [C-14]acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. **Pest Management Science**, Chichester, v. 61, n. 8, p. 742-748, 2005.
- BUTLER, C. G.; CALAM, D. H. Pheromones of the honey bee – The secretion of the Nassanoff gland of the worker. **Journal of Insect Physiology**. v. 15, p. 237-244, 1969.
- 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.
- CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**. v. 77, p. 274-281, 2014.
- 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.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. New York, Cambridge University Press, 1998.

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.

CRANE, E. The past and present status of beekeeping with stingless bees. **Bee World**, v. 73, n. 1 p. 29-42, 1992.

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

CRUZ-LANDIM, C.; CHAUD-NETTO, J.; GONÇALVES, L.S. Morphological alterations in the compound eyes of eye-color mutants of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.3, n.1, p.223-231, 1979.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo, Editora Unesp, 2009.

DECOURTYE, A. et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 57, n. 3, p. 410-419, 2004.

DECOURTYE, A. et al. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. **10th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group**, p. 75-83, 2008.

EL HASSANI, A. K. et al. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 30-39, 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.

FAHRBACH, S. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.209-232, 2006.

FARRIS, S.M.; ROBINSON, G.E.; DAVIS, R.L.; FAHRBACH, S.E. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**, v.414, n.1, p.97-113, 1999.

FERREIRA, R. A. C.; SILVA-ZACARIN, E. M. C.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C.; TOMOTAKE, M. E. M.; PEREIRA, A. M. Cellular response in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. **Micron**, v. 46, p. 57-65, 2013.

GALIZIA, C. G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. Honeybee Neurobiology and Behavior: A tribute to Randolph Menzel. New York: Springer, 2012.

GAUTHIER, M.; GRÜNEWALD, B. Neurotransmitter systems in the honey bee brain: functions in learning and memory. In: GALIZIA, C. G. et al. Honeybee Neurobiology and Behavior: A tribute to Randolph Menzel. New York: Springer, 2012. p. 155-170.

HAN, P. et al. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 8, p. 1612-1619, 2010.

HENRY, M. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, New York. v. 336, p. 348-350, 2012.

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.

KAKAMAND, F. A. KH.; MAHMOUD, T. T.; AMIN, A. B. M. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. **Journal of Dohuk University**, Dohuk, v. 11, n. 1, p. 144-151, 2008.

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.

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.

MALASPINA, O. **Análise de coleta de alimento e morfometria em abelhas africanizadas, caucasianas e em descendentes dos seus cruzamentos**. 1982. 91f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1982.

MALASPINA, O.; SILVA-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, 2008a.

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, 2008b.

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.; ERBER, J.; ANDMASUHR, T. Learning and memory in the honey bee. **Experimental Analysis of Insect Behavior**, ed. Barton Browne L., Springer-Verlag, New York, p. 195–217, 1974.

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

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.

OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **Plos Biology**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, 2007.

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-DELEGUE, 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.

POLK, T. J. et al. The effect of imidacloprid on sucrose sensitivity of the honey bee proboscis extension reflex. **Integrative and Comparative Biology Journals Dept.**, 2001 EVANS RD, CARY, NC 27513 USA: OXFORD UNIV PRESS INC, 2014. p. E332-E332.

ROAT, T.C.; CRUZ-LANDIM, C. Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: Neuroblasts proliferation and death. **Micron**, v.41, n.4, p.382-389, 2010.

SILVA, M.B. Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido sobre o comportamento das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica*. Monografia apresentada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas. 48 p. 2014

SHEPHERD, M.; BUCHMANN, S. L.; VAUGHAN, M. & BLACK, S. H. Pollinator conservation handbook. **The Xerces Society**. Portland, Oregon, 145p, 2003.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the honey bee**. Ithaca, New York, Comstock Publishing Associates, p.334, 1956.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do Imidaclopride, sobre o sistema nervoso de *Apis mellifera* africanizada, através da expressão da proteína FOS**. 2009. 43 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado e licenciatura - Ciências biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/121343>>.

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

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.

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.

ZHANG, S. W.; BARTSCH, K.; SRINIVASAN, M. V. Maze Learning by Honeybees. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 66, p. 267-282, 1996.

ZHANG, S. W.; MIZUTANI, A.; SRINIVASAN, M. V. Maze Navigation by Honeybees: Learning Path Regularity. **Learning Memory**, v. 7, p. 363-374, 2000.

Aluno: Fellipe Chaves Nominato

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Rio Claro
2015