

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ZOOLOGIA)**

---

**EFEITOS DE INSETICIDAS NA SOBREVIVÊNCIA E NO  
COMPORTAMENTO DE ABELHAS**

**ANDRIGO MONROE PEREIRA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Agosto - 2010**

ANDRIGO MONROE PEREIRA

**EFEITOS DE INSETICIDAS NA SOBREVIVÊNCIA E NO  
COMPORTAMENTO DE ABELHAS**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Ciências  
Biológicas (Zoologia).

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Co-orientador: Prof. Dr. José Chaud-Netto

Rio Claro  
Agosto 2010



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ANDRIGO MONROE PEREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), DO(A) INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO.**

Aos 23 dias do mês de agosto do ano de 2010, às 13:30 horas, no(a) Sala 15 - Bloco Didático I - Instituto de Biociências, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO do(a) Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro, Prof. Dr. OSMAR MALASPINA do(a) Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro, Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI do(a) Universidade Federal de São Carlos, Prof. Dr. DEJAIR MESSAGE do(a) Polo Regional de Desenv. Tecnol. dos Agronegócios do Vale do Paraíba, Prof. Dr. ADEMILSON ESPENCER EGEA SOARES do(a) Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de ANDRIGO MONROE PEREIRA, intitulado "Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas". Após a exposição, o discente foi argüido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO

Prof. Dr. OSMAR MALASPINA

Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

Prof. Dr. DEJAIR MESSAGE

Prof. Dr. ADEMILSON ESPENCER EGEA SOARES

Aos meus pais, Sebastião Célio e Maria do Carmo, e ao meu irmão Juliano, que me ensinaram o verdadeiro sentido e valor da palavra família.

Dedico...

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Odair, que pela orientação e companheirismo sempre soube conciliar profissionalismo e amizade. Pela confiança depositada em mim e por me mostrar os verdadeiros meandros do mundo da ciência, indicando caminhos, possibilidades e oportunidades. Acima de tudo, agradeço pela compreensão, paciência e amizade.

Ao Professor Chaud, grande mestre e sempre presente em toda minha vida acadêmica. Professor de um coração gigante, sempre muito prestativo e atencioso cujos ensinamentos levarei por toda minha vida.

Ao Professor Osmar, pela ajuda na a realização dos experimentos.

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.

A professora Maria da Conceição (DEMAC) pela grande ajuda nas análises estatísticas.

Ao técnico do Biotério, Sérgio Pascon que sempre me ajudou nas coletas e manutenção das abelhas. Pessoa de um ótimo e contagiante humor e claro, um grande amigo.

A Itamar, Marcela, Aline, João, Rafael, Fabiana, Amanda, Sandra, Eduardo, Daniel, Carlos, Chaves, Rafael (Socorro) e a todos que neste período passaram pelos laboratórios de abelhas e formigas do CEIS. Morando há onze anos em Rio Claro, pude conhecer muitas pessoas e, com absoluta certeza, fazer grandes amizades. A todos esses amigos agradeço com todo carinho pelos momentos sérios e descontraídos, de trabalho e diversão, dentro e fora da faculdade e tenham certeza que a contribuição de vocês para a realização deste trabalho foi enorme, senão fundamental.

Ao Paulo, *mininu di'um coração danadu di grande*, a Bibi e ao Bob (e a pequena Luiza) pessoas que guardo com todo carinho no coração. Obrigado pelo convívio mas principalmente pela amizade.

A Nathalia, essa pessoa maravilhosa que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando, agradeço pelo amor, companheirismo, carinho, atenção e também pelas revisões e sugestões que simplesmente foram essenciais na fase de finalização. Minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Sebastião Célio e Maria do Carmo, meu irmão Juliano e todos meus familiares que sempre estiveram do meu lado entendendo, apoiando, incentivando e também patrocinando meus sonhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Conselho do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) pela concessão da bolsa e grande experiência durante a representação discente.

A Deus....

De tudo fica um pouco.  
Do teu medo. Do teu asco.  
Dos gritos gagos. Da rosa  
Ficou um pouco.

(...)

Se de tudo fica um pouco,  
mas por que não ficaria  
um pouco de mim?

(...)

Fica sempre um pouco de tudo.  
Às vezes um botão. Às vezes um rato.

(Carlos Drummond de Andrade, *Resíduo*)

Os meus sinceros agradecimentos a todos.

## ÁPORO

Um inseto cava  
cava sem alarme  
perfurando a terra  
sem achar escape.

Que fazer, exausto,  
em país bloqueado,  
enlace de noite  
raiz e minério?

Eis que o labirinto  
(oh, razão, mistério)  
presto se desata:

em verde, sozinha,  
antieuclidiana,  
uma orquídea forma-se.

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* são insetos ecologicamente e economicamente importantes. Elas asseguram a polinização de diversas plantas contribuindo para a manutenção da biodiversidade. Seu valor econômico resulta não somente de seus produtos diretos mas também pela ativa polinização que exercem em culturas. A polinização feita por animais é importante para a reprodução sexuada de muitas culturas e para a maioria das plantas nativas, as quais também podem ser importantes como fonte de calorias e micronutrientes para os seres humanos. Além do mais, o declínio no número de polinizadores pode acarretar uma redução concomitante no número de espécies vegetais. A abelha *A. mellifera*, destaca-se como polinizador economicamente mais valioso para culturas em todo o mundo. Por outro lado, a agricultura moderna cada vez mais depende do uso de produtos químicos para controlar plantas daninhas, fungos e insetos-praga para assegurar a produtividade. Abelhas melíferas podem entrar em contato com tais agentes químicos devido suas atividades de coleta de água, resinas vegetais, pólen e néctar. A intoxicação resultante desta exposição pode ser letal, o que é facilmente identificável, ou causar efeitos na fisiologia e no comportamento do inseto. Tais efeitos, ocasionados por doses subletais, são difíceis de serem mensurados, como paralisia, desorientação ou mudanças comportamentais; porém, podem comprometer toda a estrutura social da colônia. Visando um melhor conhecimento dos efeitos de doses subletais de inseticidas em abelhas, estudou-se a ação dos ingredientes ativos Acetamiprido, Tiametoxam e Fipronil na sobrevivência e nos comportamentos de reflexo de extensão da probóscide e da atividade locomotora em operárias de *A. mellifera*. Preliminarmente, observou-se a  $DL_{50}$  vinte e quatro horas após o tratamento tópico do Acetamiprido, Tiametoxam e Fipronil foram registrados os valores de 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ , 17  $\text{ng}/\text{abelha}$  e 1,9  $\text{ng}/\text{abelha}$  respectivamente. Também estimou-se uma  $TL_{50}$  nos valores de 1,4 horas, 3,8 horas e 19,8 horas para Acetamiprido, Tiametoxam e Fipronil respectivamente. Os comportamentos foram analisados 1, 4 e 24 horas após a aplicação dos inseticidas com doses que correspondem a  $DL_{50}$ ,  $DL_{50}/10$  e  $DL_{50}/100$ . No comportamento de reflexo de extensão da probóscide, houve comprometimento do comportamento nas seguintes situações: Acetamiprido nas doses de 0,93 e 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  nos testes realizados 1 e 4 horas após a aplicação; Tiametoxam na dose de 17  $\text{ng}/\text{abelha}$  nos testes de 1, 4 e 24 horas; a dose de 1,7  $\text{ng}/\text{abelha}$  também influenciou no teste de 4 horas; Fipronil na dose de 1,9  $\text{ng}/\text{abelha}$  no teste de 24 horas. Já no comportamento de locomoção houve as seguintes alterações: Acetamiprido na dose de 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  no teste realizado 1 hora após a aplicação e nas doses 0,93 e 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  no teste de 4 horas;

Tiametoxam na dose de 17 ng/abelha nos testes de 1 e 4 horas; Fipronil na dose de 1,9 ng/abelha nos testes de 4 e 24 horas. Constatou-se que o maior comprometimento dos comportamentos ocorreu nas análises feitas próximas aos períodos determinados pela TL<sub>50</sub>. A formação de possíveis metabólitos tóxicos pode estar relacionada com o tempo de ação de cada inseticida. No campo, além de provocarem danos individuais, tais alterações podem ser extremamente nocivas para toda a colônia, considerando que todos os indivíduos estão interligados por relações de eussocialidade.

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

## ABSTRACT

Honey bees *Apis mellifera* are ecologically and economically important insects. They ensure the pollination of many wild flowers, and thus contributing to plant biodiversity. Their economic value derives not only from their direct products but also from their pollinating activity in crop plants. Animal pollination is important to sexual reproduction of many crops and the majority of wild plants, which can also be important for providing calories and micronutrients for humans. Furthermore, the decline of pollinating species can lead to a parallel decline in number of plant species. *A. mellifera* stands out as the most economically valuable crop pollinator in the world. Modern agriculture increasingly depends on the use of chemicals substances to control weeds, fungi and insect pests to ensure high yields. Honey bees may frequently become exposed to such chemicals as a consequence of their foraging activities collecting water, natural resins, pollen and nectar. Intoxication resulting from this exposure can be lethal, which is easily identifiable, or cause effects on the physiology and insect behavior. These effects, caused by sublethal doses are difficult to measure (such as paralysis, disorientation or behavioral changes), and can compromise the entire social structure of the colony. To improve the knowledge about the effects of insecticides sublethal doses effects in honey bees, we studied the action of the active ingredients Acetamiprid, Thiamethoxam and Fipronil on survival and behavior of the proboscis extension reflex (PER) and locomotor activity in workers of *A. mellifera*. Twenty-four hours after topic application, the LD<sub>50</sub> values of Acetamiprid, Thiamethoxam and Fipronil were 9,3 µg/bee, 17 ng/bee and 1,9 ng/bee, respectively. We also estimated a LT<sub>50</sub> with values of 1,4 hours, 3,8 hours and 19,8 hours to Acetamiprid, Thiamethoxam and Fipronil respectively. The behaviors were analyzed 1, 4 and 24 hours after topical application of active ingredients at doses corresponding to LD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>/10 and LD<sub>50</sub>/100. The behavior of the proboscis extension reflex was impaired in the followings situations: Acetamiprid with the doses of 0,93 and 9,3 µg/bee in 1 and 4 hours tests; Thiamethoxam with the dose of 17 ng/bee in 1 and 24 hours tests and with the doses of 1,7 and 17 ng/bee in 4 hours test; Fipronil with the dose of 1,9 ng/bee in 24 hours test. The behavior of locomotion activity was impaired in the following experimental conditions: Acetamiprid with the dose of 9,3 µg/bee in 1 hour test and the doses of 0,93 and 9,3 µg/bee in 4 hours tests; Thiamethoxan with the dose of 17 ng/bee in 1 and 4 hours tests; Fipronil with dose of 1,9 ng/bee in 4 and 24 hours tests. The greater impairment was found when the analyses were made close to the periods determined by LT<sub>50</sub>. The formation of possible toxic metabolites may be related to the time of action for each insecticide. In the

field, such changes may cause damage not only to the individual but for the entire colony, considering that all individuals are interconnected by relations of eusociality.

Keywords: Acetamiprid; Thiamethoxan; Fipronil; Behavior; Lethal Dose; Sublethal Dose;  
*Apis mellifera*.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Coleta das abelhas .....	35
4.2. Preparação dos ingredientes ativos.....	35
4.2.1. Acetamiprido .....	35
4.2.2. Tiametoxam.....	35
4.2.3. Fipronil .....	36
4.3. Determinação da DL <sub>50</sub> para 24 horas .....	36
4.4. Determinação da TL <sub>50</sub> .....	40
4.5. Testes comportamentais .....	40
4.5.1. Reflexo de extensão da probóscide (REP) .....	40
4.5.2. Atividade de locomoção .....	41
4.6. Análise estatística .....	43
5. RESULTADOS .....	45
5.1. Determinação da DL <sub>50</sub> .....	45
5.1.1. Acetamiprido .....	45
5.1.2. Tiametoxam.....	46
5.1.3. Fipronil .....	47
5.2. Determinação da TL <sub>50</sub> .....	48
5.2.1. Acetamiprido .....	48
5.2.2. Tiametoxam.....	49
5.2.3. Fipronil .....	50
5.3. Testes comportamentais .....	51
5.3.1. Reflexo de extensão da probóscide (REP) .....	51
5.3.1.1. Acetamiprido .....	51
5.3.1.2. Tiametoxam.....	60
5.3.1.3. Fipronil .....	69
5.3.2. Teste de locomoção .....	78
5.3.2.1. Acetamiprido .....	78

5.3.2.2. Tiametoxam .....	80
5.3.2.3. Fipronil .....	82
6. DISCUSSÃO .....	84
6.1. Ingrediente ativo X Toxicidade .....	87
6.2. Ingrediente ativo X Tempo.....	92
6.3. Ingredientes ativos X Comportamento .....	97
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	103
8. CONCLUSÕES .....	104
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	106

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas em geral são insetos importantes no ponto de vista ecológico, pois asseguram a polinização de diversas flores contribuindo para a manutenção da biodiversidade. As abelhas melíferas especificamente também apresentam uma elevada importância econômica, pois além da exploração de seus principais produtos diretos como o mel, a cera, a própolis e a geléia real também são utilizadas em manejo para atividade polinizadora em culturas comerciais

Estima-se que 86% dos cultivares na Europa dependem da polinização realizada pelas abelhas e que somente nos EUA sua atividade foi responsável por US\$ 14 bilhões (GALLAI et al., 2009; MORSE; CALDERONE, 2000).

A agricultura moderna é cada vez mais depende do uso de produtos químicos para controlar plantas daninhas, fungos e insetos pragas para assegurar a produtividade. E é neste contexto que as abelhas melíferas podem ficar expostas a tais agentes químicos devido suas atividades de coleta de água, resina de plantas, pólen e néctar (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; THOMPSON, 2003;).

Mesmo considerando que apenas indivíduos de uma classe particular de operárias, as que realizam a atividade de forrageamento, entram 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. Esses produtos podem apresentar um efeito letal ou subletal, que é dificilmente detectável, que pode influenciar tanto a fisiologia quanto no comportamento das abelhas comprometendo assim toda estrutura social da colônia (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).

A intoxicação por inseticidas pode ser determinada através do efeito letal que o produto causa ao entrar em contato com o indivíduo e também através de efeitos mais sutis, relacionados, por exemplo, com a fisiologia ou comportamento das abelhas (como paralisia, desorientação ou mudanças comportamentais) que são bem menos detectáveis, mas podem afetar toda população (DECOURTYE et al., 2004; GUEZ; ZHANG; SRINIVASAN, 2005; HAYNES, 1988; PHAM-DELÈGUE et al., 2002; vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

Quando é observada a diminuição de abelhas, sem mortalidade aparente, uma das hipóteses a ser analisada é a intoxicação por doses subletais de inseticidas. Esses produtos podem prejudicar o vôo de retorno ao ninho ou a informação dada pela forrageira para as outras operárias, através da dança e do som. A medição de tais parâmetros podem ser

ferramentas valiosas para obtenção de dados sobre efeitos comportamentais devido à exposição a agrotóxicos (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).

Outro método para avaliar o efeito de doses subletais de inseticidas é através do estudo do condicionamento do reflexo de extensão da probóscide. Tal método, que visa reproduzir em laboratório a interação entre a abelha e uma fonte de alimento, é bastante utilizado em estudos com *A. mellifera* e leva em consideração o processo de memorização da abelha a um determinado estímulo odorífero e tem-se mostrado eficiente nos estudos sobre os efeitos dos produtos no comportamento deste inseto (DECOURTYE et al., 2005).

Soma-se o fato de que as abelhas melíferas apresentam um baixo número de enzimas desintoxicadoras quando comparadas a outros insetos (CLAUDIANOS et al., 2006). Os Apoidea constituem um grupo extremamente diversificado, e as abelhas de diferentes grupos taxonômicos apresentam diferentes vulnerabilidades aos inseticidas (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

Recentemente vários países têm reportado uma queda acentuada no número de colônias de abelhas melíferas. Diversas podem ser as causas listadas para tal desaparecimento já que não são encontradas abelhas mortas. Porém os resultados não se apresentam de forma satisfatória. Acredita-se que não exista um único fator atuando nesta síndrome, mas um conjunto de fatores internos como problemas nutricionais, a presença de parasitas e doenças e externos como a predação, condições climáticas desfavoráveis e até mesmo o uso de inseticidas como os neonicotinoides que somados desencadeiam um processo que culmina com o enfraquecimento da colônia e morte da mesma (OLDROYD, 2007).

Apesar da toxicidade dos neonicotinoides e pirazóis ser bem documentada em diversos organismos terrestres e aquáticos, pouco se sabe sobre seus efeitos fisiológicos e comportamentais em doses subletais nas abelhas melíferas que, durante a atividade de forrageamento, pode entrar em contato com esses produtos.

Alguns países como a França têm considerado esses produtos pela excessiva mortalidade observada em seus apiários, que se torna mais evidente após a florada de determinadas culturas cujas sementes foram tratadas com essas substâncias.

Os testes de avaliação de efeitos de tais produtos em organismos não alvos e pertencentes à fauna local mostram-se de grande importância pois podem conduzir discussões sobre a comercialização desses produtos dentro dos países.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade de inseticidas modernos em operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) – abelha africanizada. Para tal foram analisados os ingredientes ativos: Acetamiprido, Tiametoxam e Fipronil. Basicamente dois parâmetros foram considerados:

1. Efeito agudo – análises toxicológicas realizadas segundo protocolos internacionais, porém utilizando abelhas africanizadas e em condições climáticas brasileiras;
2. Efeito crônico - utilização de subdosagens dos ingredientes ativos e avaliação das alterações provocadas nos comportamentos básicos da manutenção da colméia.

Especificamente, foram analisados os seguintes aspectos para cada um dos ingredientes ativos utilizados:

- I. Estabelecimento da  $DL_{50}$  em 24 horas para as operárias campeiras pela aplicação tópica;
- II. Estabelecimento da  $TL_{50}$  para as operárias campeiras pela aplicação tópica;
- III. Existência de alteração na habilidade do reflexo de extensão da probóscide das operárias após administração tópica de doses subletais dos ingredientes ativos ( $DL_{50}$ ,  $DL_{50}/10$  e  $DL_{50}/100$ ), avaliados nos tempos 1, 4 e 24 horas após a aplicação;
- IV. Ocorrência de alteração na atividade motora nas operárias após administração tópica de doses subletais dos ingredientes ativos ( $DL_{50}$ ,  $DL_{50}/10$  e  $DL_{50}/100$ ), avaliados nos tempos 1, 4 e 24 horas após a aplicação.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

O mel foi o único adoçante disponível para os povos africanos, do Oriente Médio e civilizações européias, e a demanda por este produto levou a domesticação das abelhas pelos egípcios por volta do ano 2600 aC. Esta prática foi passada para os gregos em 650 AC, que transmitiu para os romanos (150 aC) que por fim atingiu toda Europa medieval. Foram os descendentes dos europeus medievais que difundiram a apicultura e também foram responsáveis pela distribuição das abelhas ao redor do mundo (RANSOME, 1937 apud vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

O mel deixou de ser o adoçante mais utilizado pelos europeus após o desenvolvimento das técnicas de refinamento do açúcar a partir da beterraba e da cana (VOORHIES, 1933 apud vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010). Porém o mel continua sendo uma importante *commodity* internacional com uma produção mundial estimada em 1,49 milhão de toneladas em 2008, um aumento de 120 % desde 1961 (FAO, 2009; vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

A polinização feita por animais é importante para a reprodução sexuada de muitas culturas e para a maioria das plantas nativas, as quais podem ser importantes também por providenciar calorias e micronutrientes para o ser humano (SUNDRIYAL; SUNDRIYAL, 2004). Esta polinização contribui para a reprodução de mais de 90% de aproximadamente 250,000 espécies de angiospermas (KEARNS; INOUYE; WASER, 1998).

Do total de 115 principais culturas praticadas pelo homem, 87 apresentam dependência pela polinização animal. Levando-se em consideração o consumo alimentar humano, 35% advêm de culturas com dependência de polinização animal, porém considerando-se apenas o consumo de frutas e sementes, os polinizadores são essenciais para 13 culturas (KLEIN et al., 2007).

Nem toda polinização animal é providenciada pelas abelhas melíferas, e em muitas culturas elas não são os polinizadores mais eficientes, porém elas permanecem como o mais importante e mais valioso polinizador mundial de monoculturas (DELAPLANE; MAYER, 2000; WATANABE, 1994).

A produção de 84% das espécies cultiváveis na Europa depende diretamente de insetos polinizadores, especialmente das abelhas (GALLAI et al., 2009). Diversas espécies de abelhas tem se tornado uma ferramenta importante para o manejo, sendo alugadas ou compradas por agricultores para aumentar a fauna polinizadora local (FREE, 1993; DAG; ZIPORI; PLESER, 2006). Esta prática sugere que não existem polinizadores nativos suficientes que garantam a

polinização de todas as culturas durante o ano. Soma-se o fato de que a abundância e diversidade de abelhas nativas bem como a abundância de abelhas melíferas estão declinando e algumas espécies estão claramente em risco (OLDROYD, 2007; STOKSTAD, 2007).

Na ausência de abelhas nativas, o manejo de colônias de abelhas melíferas é frequentemente a única solução para os agricultores garantirem sua produção. Comparadas com o manejo de abelhas nativas, as abelhas melíferas apresentam várias vantagens (preço, transporte, versatilidade), mas para algumas culturas elas não são os polinizadores mais efetivos (KLEIN et al., 2007).

A biologia das abelhas melíferas também as torna bem preparadas para a polinização comercial. São generalistas, visitam uma ampla variedade de flores e são capazes de polinizar uma cultura numa área de 6.360 ha. Adiciona-se a isto a grande habilidade de comunicar a localização das fontes alimentares (SEELEY, 1985).

Aproximadamente um terço da alimentação humana está relacionado com a polinização mediada por animais, principalmente abelhas (KASINA et al., 2009; KLEIN et al., 2007). Em 2005 o valor da polinização feita por insetos na produção mundial de alimentos foi de 153 bilhões de euros destacando os legumes, frutas e óleos comestíveis o que representa 9,5% do valor da produção agrícola mundial (GALLAI et al., 2009).

A polinização realizada por abelhas melíferas nos EUA gerou commodities próximas a US\$ 14,6 bilhões (MORSE; CALDERONE, 2000), enquanto que as abelhas nativas são responsáveis por US\$ 3,07 bi de frutas e legumes produzidos nos EUA (LOSEY; VAUGHAN, 2006).

Plantações não dependentes da polinização por animais representam a maior fonte de calorias da dieta humana (KLEIN et al., 2007). Enquanto a área total cultivada tem crescido mundialmente nos últimos 46 anos, a proporção de terras dedicadas à produção de culturas não dependentes de polinizadores tem diminuído consideravelmente quando comparada aos cultivares dependentes de polinizadores (AIZEN et al., 2008). Em parte, esta mudança é motivada pelo fato de culturas dependentes de polinizadores terem um maior valor de mercado do que as não dependentes (GALLAI et al., 2009). Entre os anos de 1961 e 2006, a agricultura dependente de polinizadores tem crescido próximo de 62% (AIZEN et al., 2009). Esta razão de crescimento ultrapassa o crescimento global de manejo de abelhas melíferas, sugerindo que polinizadores poderão limitar a produção agrícola no futuro (AIZEN; HARDER, 2009).

A perda de todos os polinizadores poderia reduzir a produção agrícola em torno de 8% (AIZEN et al., 2009), enquanto que determinadas plantações podem diminuir mais de 90 %

sem a presença de abelhas (SOUTHWICK; SOUTHWICK, 1992). Porém, como muitas culturas não são 100% dependentes dos insetos para polinização, algumas perdas poderiam ser compensadas pelo aumento da área cultivada. Em países em desenvolvimento, este aumento corresponderia em torno de 42% da área cultivada (AIZEN et al., 2009). Além do mais, o declínio no número de polinizadores pode acarretar um paralelo declínio no número de espécies vegetais (BIESMEIJER et al., 2006).

De 1961 a 2007, o número de colônias de *A. mellifera* para manejo aumentou em torno de 64%. Em contra partida, nem todas as regiões do globo tem demonstrado este aumento. Neste mesmo período as colônias decresceram na Europa (-26,5%) e América do Norte (-49,5%), enquanto que grandes crescimentos têm sido observados na Ásia (426%), África (130%), América do Sul (86%) e Oceania (39%) (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

Muitos fatores podem estar relacionados com a perda de colônias nos EUA e na Europa. Um único fator não pode ser o responsável por todas as perdas. Estes fatores podem ocorrer simultaneamente e até influenciar mutuamente (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010). Salienta-se o fato de que muitas doenças relacionadas com as abelhas melíferas (bactérias, fungos, vírus, microsporídeo), parasitas (ácaros), predadores (ursos, aves, homens) e pragas (besouros, mariposas) podem afetar sua produtividade e também sua sobrevivência (MORSE; FLOTTUM, 1997).

O ácaro *Varroa destructor* é o ectoparasita mais prejudicial para as abelhas melíferas em todo o mundo (ROSENKRANZ; AUMEIER; ZIEGELMANN, 2010). Tanto as fêmeas do ácaro quanto sua prole se alimentam das pupas de abelhas causando danos pela ingestão da hemolinfa, resultando uma severa deficiência nutricional para seu desenvolvimento (GAREDEW; SCHMOLZ; LAMPRECHT, 2004). Porém o nível de infestação nas colônias tem-se reduzido com o passar dos anos (BOECKING; GENERSCH, 2008). Muitas doenças transmitidas por vírus têm sido relatadas já que o sistema imune está prejudicado pela presença do ácaro (YANG; COX-FOSTER, 2005), destacando-se o vírus da deformação das asas e o vírus da paralisia aguda (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010) e o vírus Kashmir (SHEN et al., 2005). Outro vírus encontrado nas abelhas, mas sem uma correlação clara com a presença de ácaros é o vírus israelense da paralisia aguda (COX-FOSTER et al., 2007).

Embora nem sempre apresentem sintomas evidentes, as infecções causadas pelo microsporídeo *Nosema* spp. estão relacionadas com as mais importantes perdas econômicas para a apicultura (FRIES, 2010). Tanto o *N. apis* quanto o *N. ceranae* são transmitidos horizontalmente entre as abelhas pela ingestão de esporos no ambiente, germinando no

ventrículo, causando inflamação e danos nas células epiteliais do intestino (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

A cria ensacada americana, causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, é altamente contagiosa e se espalha rapidamente pela colônia, entre as colônias e entre os apiários. Colônias infectadas são queimadas para prevenir futuras infecções (GENERSH, 2010). Já a cria ensacada européia é causada pela bactéria *Melissococcus plutonius* e considerada menos virulenta (FORSGREN, 2010). No ano de 2000, nos EUA, atribui-se a perda de US\$ 5 milhões devido a infecções causadas por estas bactérias (EISCHEN; GRAHAM; COX, 2005).

Somam-se fatores não patogênicos que podem influenciar a dinâmica populacional de uma colônia como, por exemplo, o uso de inseticidas possivelmente perigosos para as abelhas, resíduos de antibióticos para tratamento de doenças, qualidades das rainhas e fatores climáticos (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010). Muitas colônias recebem tratamentos químicos para prevenção das diversas doenças e parasitas e entre as substâncias destacam-se os piretroides e organofosforados. Apicultores, devido às resistências a estes produtos, têm aumentado as doses ou utilizado um cocktail destes produtos. Estes produtos podem, de certa maneira, contribuir para a intoxicação das abelhas (OLDROYD, 2007).

A CCD (Colony Collapse Disorder) é uma condição da colônia que primeiro foi relatada nos EUA no outono de 2006. As colônias apresentam sintomas claramente diferentes dos demais sintomas clássicos de doenças, o que inclui a total ausência de abelhas mortas na colônia ou apiário, a rápida perda de abelhas adultas e a falta de cleptoparasitas apesar da presença de mel e pólen nas colônias. Acredita-se que diversos fatores estressantes, atuando sozinhos ou em conjunto, contribuem para o enfraquecimento da colônia e permitam a ação de patógenos oportunistas (COX-FOSTER; vanENGELSDORP, 2009). A mortalidade de abelhas após a estação do inverno é comum, porém em 2007, apicultores chegaram a perder de 80 a 100% de suas colônias (OLDROYD, 2007).

A agricultura moderna é cada vez mais depende do uso de produtos químicos para controlar plantas daninhas, fungos e insetos pragas para assegurar a produtividade. Abelhas melíferas podem ficar expostas a estes agentes químicos devido suas atividades de forrageamento (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; THOMPSON, 2003). Com isso novas classes de inseticidas surgem para aumentar a produtividade das culturas, e podem estar relacionadas com o CCD (OLDROYD, 2007).

A grande parte dos inseticidas e acaricidas (aproximadamente 90%) são neurotóxicos, ou seja, atuam no sistema nervoso central podendo agir nos canais de sódio voltagem-dependente como o DDT e os piretroides, nos receptores do ácido  $\gamma$ -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 nicotinoides e neonicotinoides (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 em 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.

A nicotina (clássica agonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina) foi usada por séculos para o controle de insetos sugadores apesar da baixa eficiência e alta toxicidade para os humanos. Já os neonicotinoides são também agonistas dos receptores de acetilcolina sendo mais tóxicos para os insetos e porém mais seguros para mamíferos, provendo um bom exemplo de seletividade de inseticida (YAMAMOTO et al., 1995).

Os neonicotinoides 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 (ELBERT; NAUEN; LEICHT, 1998 apud NAUEN et al., 2003; FORD; CASIDA, 2008; MAIENFISCH et al., 2001a; MATSUDA et al., 2001; TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

Neonicotinoides e nicotinoides apresentam estruturas semelhantes, porém diferentes estados de protonação em pH fisiológico. O neonicotinoide não é protonado (e apresenta um agrupamento negativo nitro ou ciano) o que confere seletividade aos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos, enquanto que os nicotinoides são catiônicos e consequentemente seletivos aos receptores de mamíferos (TOMIZAWA; LEE; CASIDA, 2000; TOMIZAWA; CASIDA, 2005; TOMIZAWA et al., 2003).

Os atuais neonicotinoides e seus anos de patente são os heterocíclicos Nitiazina (1977), Imidacloprido (1985), Tiacloprido (1985) e Tiametoxam (1992) e os acíclicos Nitempiram (1988), Acetamiprido (1989), Clotianidina (1989) e Dinotefuram (1984) (TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

Assim como os piretroides os neonicotinoides apresentam uma maior seletividade para os insetos do que para os mamíferos, ao contrário dos organoclorados, organofosforados e metilcarbamatos. Os neonicotinoides agem nos receptores nicotínicos da acetilcolina dos insetos (receptores nicotínicos de acetilcolina) e dos mamíferos (particularmente subtipos  $\alpha 4\beta 2$  (TOMIZAWA; CASIDA, 2003, 2005).

Quando neonicotinoide é metabolizado, seus subprodutos podem aumentar ou diminuir sua atividade dependendo do composto e de sua especificidade com o receptor de acetilcolina (TOMIZAWA; CASIDA, 2003, 2005).

O Acetamiprido (N1-[(6-cloro-3-piridil)methyl]-N2-cyano-N1-methylacetamidine; figura 1) é um neonicotinoide sistêmico largamente empregado tanto na agricultura quanto domesticamente contra uma variedade de insetos (BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005).

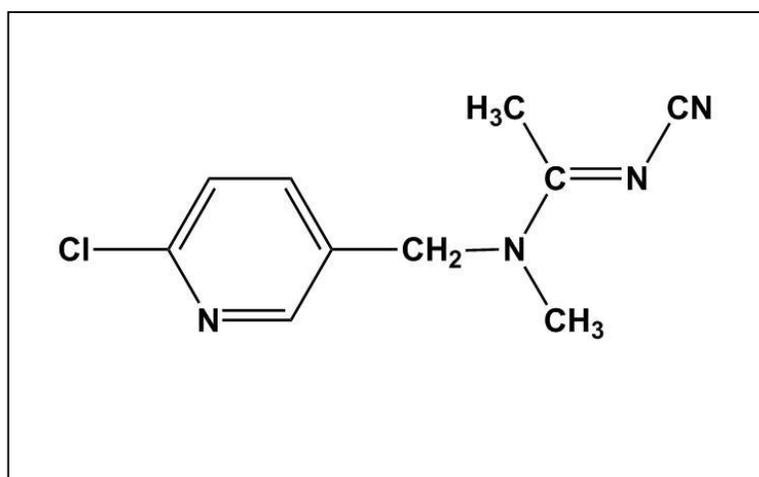
Os maiores metabólitos do Acetamiprido nas plantas são os *N*-demetil Acetamiprido, 6-cloro-3-piridilmetanol e o ácido 6-cloro-nicotínico (TOKIEDA et al., 1997). Porém, Iwasa et al. (2004) observaram que tais metabólitos não são altamente tóxicos quando aplicados topicamente nas abelhas na dose de 50  $\mu$ g/abelha.

Brunet, Badiou e Belzunces (2005) estudaram o metabolismo do Acetamiprido em operárias de *A. mellifera*. Operárias adultas receberam oralmente Acetamiprido contendo radioisótopo. Os autores verificaram que mais de 50% do Acetamiprido 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 bastante curta. Foram encontrados sete metabólitos: N<sup>1</sup>-(6-cloro-3piridil)metil-N<sup>2</sup>-cianoacetamidina (IM 2-1), N<sup>1</sup>-(6-cloro-3piridil)metil-N<sup>1</sup>-metilacetamidina (IM 1-3), N-metil-(6-cloro-3piridil)metilamina (IM 1-4), (6-cloro-3piridil)metanol (IM 0), ácido 6-cloronicotinoico (IC 0) e mais dois metabólitos que não puderam ser identificados chamados de U1 e U2. Os metabólitos IC 0, IM 1-4, U1 e U2 foram os mais abundantes e o menos expressivo foi o IM 0. Durante as primeiras horas os autores verificaram maior frequência do Acetamiprido nos receptores nicotínicos de acetilcolina do abdome, tórax e cabeça. Resultados similares obtidos com Imidacloprido estudado também em abelhas (SUCHAIL et al., 2004).

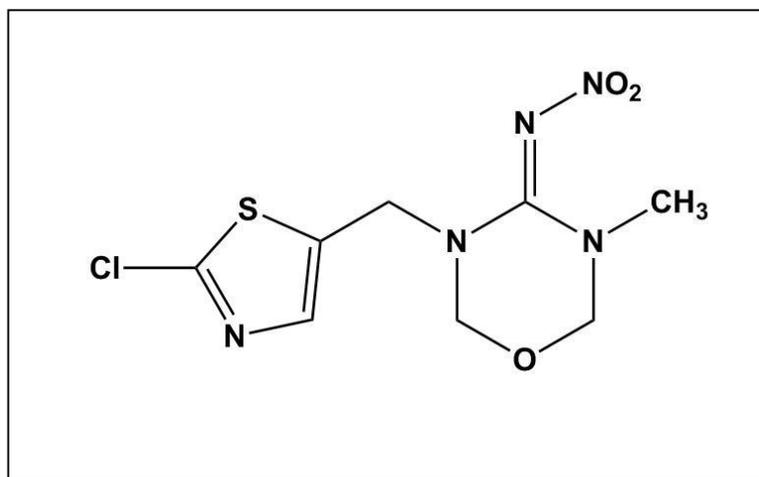
O Acetamiprido pode ser utilizado na aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, feijão, melancia, melão, tomate e trigo; aplicação em sementes de algodão; aplicação em troncos de café e citrus (ANVISA, 2008a). Esse produto é comercializado no Brasil pela Iharabras S.A. Indústrias Químicas nas seguintes formulações: concentrado solúvel - Convence<sup>®</sup> (200g/L); pó solúvel - Mospilan<sup>®</sup> (200g/kg); pó molhável - Pirâmide<sup>®</sup> (700g/Kg).

A Bayer CropScience apresenta um único produto: Saurus<sup>®</sup> (200g/kg) - pó solúvel. Com exceção do produto Pirâmide<sup>®</sup>, utilizado em tratamento de sementes, os demais são utilizados em aplicação terrestre e aérea por meio de pulverização.

O neonicotinoide Tiametoxam (3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine; figura 2), da mesma forma que os demais neonicotinoides apresenta amplo espectro de atuação contra insetos praga (principalmente sugadores) sendo utilizado tanto para tratamento foliar quanto no tratamento de sementes (TOMIZAWA; CASIDA, 2005) e apresenta uma importante característica sistêmica (MAIENFISCH et al., 2001b).



**Figura 1.** Estrutura química do Acetamiprido.



**Figura 2.** Estrutura química do Tiametoxam.

Tiametoxam é o neonicotinoide que apresenta a menor afinidade aos receptores de acetilcolina nos insetos. No entanto a eficiência biológica do Tiametoxam é comparável a de outros neonicotinoides (WIESNER; KAYSER, 2000). Os mesmos autores constataram que o metabólito *N*-desmetil-tiametoxam apresenta uma afinidade aos receptores de acetilcolina dos insetos na ordem de 1000 vezes maior que o próprio Tiametoxam. Porém, estudando o metabolismo do Tiametoxam em plantas produtoras de algodão, Nauem et al. (2003) verificaram a formação do neonicotinoide Clotianidina, como o principal metabólito enquanto que *N*-desmetil-tiametoxam foi encontrado em baixíssimas quantidades. Os mesmos autores também verificaram as mesmas proporções ao analisarem o metabolismo do Tiametoxam em larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), sugerindo que a Clotianidina desempenha um papel importante entre os metabólitos do Tiametoxam.

Por outro lado, Wiesner e Kayser (2000) trabalhando com afídeos (*Aphis craccivora* e *Myzus persicae*) e Kagabu et al. (2005) trabalhando com baratas (*Periplaneta americana*) concluíram que a toxicidade do Tiametoxam é devida a sua própria ação atuando em um sítio específico diferente dos outros neonicotinoides.

O Tiametoxam pode ser empregado pela aplicação direta no solo nas culturas de abacaxi, abobrinha, alface, arroz, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, citros, feijão-vagem, fumo, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, repolho, tomate e uva; aplicação em sementes de algodão, amendoim, arroz, batata, feijão, milho, soja e trigo; aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, amendoim, arroz, batata, cana-de-açúcar, cebola, citros, crisântemo, ervilha, eucalipto, feijão, fumo, melancia, melão, milho, morango, pastagens, pepino, repolho, sorgo, tomate, trigo e soja (ANVISA, 2008b). Ele é comercializado no Brasil pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda nas formulações: pó dispersível - Cruise<sup>®</sup> (700g/kg); granulado – Actara<sup>®</sup> 10 GR (10g/kg); granulado dispersível - Actara<sup>®</sup> 250 WG (250g/kg). O produto Cruise<sup>®</sup> é utilizado para o tratamento de sementes, o Actara<sup>®</sup> 10 GR é utilizado em tratamento terrestre e o Actara<sup>®</sup> 250 WG é utilizado em aplicações terrestres e aéreas.

Iwasa et al. (2004) observaram que o neonicotinoide Imidacloprido é em torno de 400 vezes mais tóxico que o Acetamiprido. Esta diferença pode ser explicada pela menor afinidade aos receptores nicotínicos de acetilcolina que o Acetamiprido apresenta quando comparado ao Imidacloprido (TOMIZAWA; LEE; CASIDA, 2000; TOMIZAWA; CASIDA, 2003).

Os principais metabólitos do Imidacloprido identificados em mamíferos e plantas são 5-hydroxy-imidacloprido, 4,5-dihydroxy-imidacloprido, ácido 6-cloronicotínico, olefina,

guanidina e derivados de uréia (SUCHAIL et al., 2004). Alguns dos metabólitos do Imidacloprido apresentam toxicidade para invertebrados, principalmente os derivados de olefina e 5-hydroxy-imidacloprido. Contra espécies de afídeos e *Bemisia tabaci*, a olefina e o 5-hydroxy-imidacloprido são, respectivamente, 16 e 10 vezes mais ativo do que o Imidacloprido propriamente dito (NAUEN et al., 1999).

Suchail et al. (2004) estudaram o metabolismo do Imidacloprido em operárias adultas de *A. mellifera*. Operárias receberam oralmente Imidacloprido contendo radioisótopo. Os autores verificaram que o Imidacloprido foi metabolizado em diversas partes da abelha e apresentou uma meia-vida de 5 horas. Foram encontrados cinco metabólitos: 4/5-hidroxi-imidacloprido, 4,5-dihidroxi-imidacloprido, olefina, ácido 6-cloronicotínico, e derivados de uréia, sendo estes dois últimos os mais abundantes. O rápido aparecimento dos metabólitos nas diversas partes da abelha sugere a existência de metabolismo do Imidacloprido não somente no intestino médio, que é o principal local de metabolismo, mas também em outros compartimentos das abelhas (SUCHAIL et al., 2004).

Todos os metabólitos nas abelhas resultam da biotransformação do Imidacloprido realizada pelas oxidases de função mista. Estas enzimas permitem a conversão do Imidacloprido em metabólitos mais hidrofílicos, que são mais rapidamente excretados, através de diversas reações incluindo hidroxilação, epoxidação e outras oxidações (SUCHAIL et al., 2004).

O inseticida Imidacloprido e seus metabólitos são extremamente tóxicos para abelhas. Frequentemente estes produtos têm sido relatados como responsáveis pela depreciação de várias colônias. Uma alta mortalidade à baixas concentrações pode ser explicada pela alta toxicidade dos seus metabólitos (FAUCON et al., 2005). Diversas alterações comportamentais têm sido relatadas em abelhas melíferas expostas a diversas concentrações de Imidacloprido: mudanças na atividade de forrageio e coleta de alimento (COLIN; LE CONT; VERMANDERE, 2001) e perda de comunicação da localização da fonte alimentar e orientação no vôo de retorno ao ninho (DECOURTYE et al., 2001). Pelo fato de ser considerado um inseticida sistêmico, acredita-se que o Imidacloprido possa migrar dentro do néctar da mesma forma que outros inseticidas como o Dimetoato e Aldicarbe (TASEI; LERIN; RIPAUT, 2000). Pesquisas apontam a presença do composto no néctar de diversas plantas entre elas o girassol e a canola (SCHMUCK et al., 2001).

A toxicidade tópica de inseticidas neonicotinoides em abelhas melíferas pode ser classificada em dois grupos baseados na presença do agrupamento nitro ou do agrupamento ciano. Os inseticidas com agrupamento nitro são os mais tóxicos com Imidacloprido

apresentando uma  $DL_{50}$  no valor de 17,9 ng/abelha, Clotianidina com valor de 21,8 ng/abelha e Tiametoxam com 29,9 ng/abelha. Já os neonicotinoides que apresentam o agrupamento ciano apresentam uma toxicidade menor sendo que Acetamiprido apresenta um valor de 7,1  $\mu$ g/abelha e o Tiacloprido 14,6  $\mu$ g/abelha (IWASA et al., 2004). Stark, Jepson e Mayer (1995) e Suchail et al. (2004) observaram que a  $DL_{50}$  do Imidacloprido variou de 6,7 a 23,8 ng/abelha. Senn et al. (1998 apud IWASA et al., 2004) estimou a  $DL_{50}$  do Tiametoxam em 24 ng/abelha e Elbert et al. (2000 apud IWASA et al., 2004) reportou que o Tiacloprido apresenta uma  $DL_{50}$  no valor de 24,2  $\mu$ g/abelha.

Os canais de cloro em insetos são ativados por uma variedade de transmissores (acetilcolina, GABA, glutamato, licina, histamina e serotonina) em diferentes tecidos de diferentes grupos taxonômicos e apresentam estruturas similares aos receptores de acetilcolina com a presença de diversas subunidades (RANGANATHAN; CANNON; HORVITZ, 2000). Apresentam também proteínas transmembrana que causam a ativação do canal e inicia a entrada de íons cloro, o que hiperpolariza o potencial de membrana. Portanto, a abertura do canal de cloro acaba por estabilizar o potencial de membrana (BLOOMQUIST, 2003).

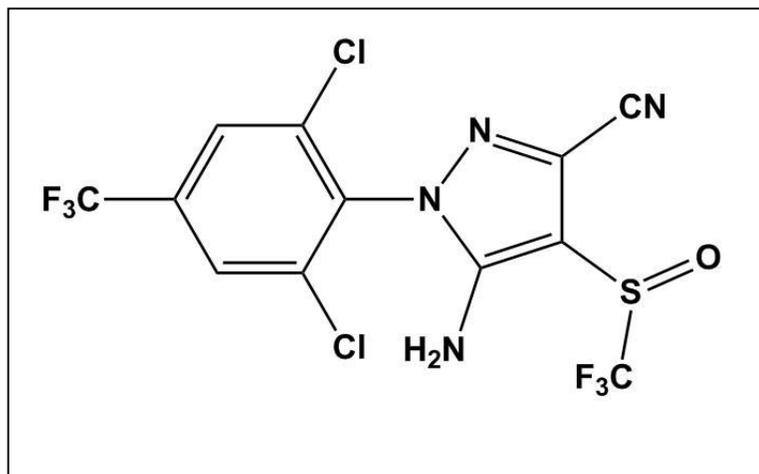
Fipronil (5-amino-1[2,6-dicloro-4-(trifluormetil)fenil]-4-[(trifluormetil)sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila; figura 3), representa uma classe de inseticida (fenilpirazóis) atuante como bloqueador nos receptores ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) dos canais de cloro dos insetos (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993; HAINZL; COLE; CASIDA, 1998). É efetivo no controle de diversas pragas economicamente importantes: bicudos, brocas, baratas, gafanhotos, carrapatos e pulgas em seus estágios larvais ou adultos (AAJOUND; RAVANEL; TISSUT, 2003; GUNASEKARA et al., 2007; HAINZL; COLE; CASIDA, 1998) e apresenta um valor de mercado mundial estimado em 150 milhões de dólares (BUCKINGHAM et al., 2005). O Fipronil apresenta uma maior seletividade aos insetos do que aos mamíferos, comparado com a primeira geração de inseticidas bloqueadores dos canais de cloro como os clorados ciclodienos e outros policlorocicloalcanos (BLOOMQUIST, 2003; CASIDA; PULMAN, 1994 apud HAINZL; COLE; CASIDA, 1998). Fipronil é eficiente em baixas concentrações contra insetos que são resistentes a outros inseticidas como os piretroides, organofosforados e carbamatos (STEVENS; HELLIWELL; WARREN, 1998).

Os sítios ativados por glutamato dos canais de cloro que existem especificamente nos invertebrados, mas não nos vertebrados, são reconhecidos como outro alvo crucial para o Fipronil (HOROSZOK et al., 2001; IKEDA et al., 2003; ZHAO et al., 2004, 2005). Estes autores também observaram que o metabólito sulfona bloqueia tanto os receptores GABA quanto os de glutamato.

Fipronil pode ser formulado como sólido, spray, líquido ou como produto granulado, sendo que Ngim e Crosby (2001) observaram que a formulação granulada foi a mais persistente no meio ambiente com uma meia vida de 125 horas em meio aquoso e 438 horas no solo. Os produtos de degradação do Fipronil no solo resultam da exposição a luz produzindo o fotoproduto desulfenil, oxidação produzindo sulfona, hidrólise produzindo amida e processo de redução com a formação de sulfido. A meia vida do Fipronil e seus metabólitos no solo indicam que são persistentes, com a degradação variando de 111 – 350 dias dependendo das condições do solo, sendo o desulfenil e o sulfido os metabólitos mais abundantes (NGIM; CROSBY, 2001; GUNASEKARA et al., 2007). A degradação do desulfenil por ação microbiana é de 630 a 693 dias dependendo do tipo de solo, indicando que o maior metabólito do Fipronil é persistente no solo (GUNASEKARA et al., 2007).

O desulfenil, embora não seja um metabólito propriamente dito, é o principal fotoproduto em plantas e no solo e, quando testado em ratos e moscas, mostra ser tão potente quanto (e até mesmo maior) o próprio Fipronil (HAINZL; CASIDA, 1996), sendo mais tóxico e mais potente bloqueador dos canais de cloro do que o próprio Fipronil e seu metabólito sulfona (HAINZL; COLE; CASIDA, 1998).

Estudos *in vivo* e *in vitro* do metabolismo mostraram que o Fipronil é convertido pelas monooxigenases microsossomais em sulfona, que é o principal metabólito formado em insetos e mamíferos (DURHAM; SIEGFRIED; SCHARF, 2002; HAINZL; COLE; CASIDA, 1998; SCHARF et al., 2000;). A sulfona apresenta uma toxicidade semelhante ao produto principal agindo de forma competitiva no sítio de ligação do GABA (HAINZL; COLE; CASIDA, 1998).



**Figura 3.** Estrutura química do Fipronil.

Estudos utilizando inibidor do citocromo P450, o butóxido de piperonil (PBO), que provoca a inibição da formação de sulfona, têm revelado resultados diversos. Quando tratado com butóxido de piperonil, a toxicidade de Fipronil aumenta em camundongos (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003; HAINZL; COLE; CASIDA, 1998) e moscas (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993; HAINZL; CASIDA, 1996), resultado que indica que a conversão em sulfona é um processo de desintoxicação. Entretanto, em outros estudos, após o tratamento com butóxido de piperonil, a toxicidade do Fipronil diminui em baratas (VALLES; KOEHLER; BRENNER, 1997) e lagartas de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) (SCHARF; SIEGFRIED, 1999) indicando que a conversão em sulfona não é um processo de desintoxicação. Diversos trabalhos indicam que o metabólito sulfona é mais tóxico que o Fipronil. Outros mostram que os efeitos toxicológicos e neurológicos dos dois são semelhantes (ZHAO et al., 2005).

Fang et al. (2008) observaram que os metabólitos sulfido e sulfona apresentam uma toxicidade maior que o Fipronil quando aplicados topicamente em larvas de *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). A diferença na suscetibilidade destas larvas ao Fipronil (118,5 vezes mais tóxico para *S. inferens*) é sugerida pelos autores devido a diferença na permeabilidade pela cutícula, como também diferenças no metabolismo. As diferentes respostas em diversas linhagens de moscas domésticas também foram atribuídas a diferentes permeabilidades do Fipronil (KRISTENSEM; JESPERSEN; KNOOR, 2004).

O Fipronil apresentou alta eficiência contra larvas de mosquito *Aedes aegypti* com uma  $CL_{50}$  (24 horas) de 17,7  $\mu\text{g/L}$ . Seus metabólitos também se mostraram altamente tóxicos com sulfido e sulfona apresentando uma  $CL_{50}$  de 3,19  $\mu\text{g/L}$  (AAJOUND; RAVANEL; TISSUT, 2003). Colônias de formigas *Solenopsis invicta* são eliminadas dentro de 8 a 11 semanas utilizando iscas granuladas com Fipronil na concentração de 3-30  $\mu\text{g/mg}$  (COLLINS; CALLCOT, 1998). Costa e Rust (1999) reportaram uma mortalidade maior que 93% em colônias de *Linepithema humile* em menos de uma semana, com mortalidade das rainhas em menos de 4 semanas após entrar em contato com o Fipronil (5 ppm).

O Fipronil é altamente tóxico para organismos aquáticos podendo apresentar bioacumulação. Por exemplo, em concentrações em pptr (ng/L), Fipronil afeta o camarão *Americamysis Bahia* e em ppb afeta *Daphnia pulex* e *Lepomis macrochirus* (GUNASEKARA et al., 2007).

O inseticida Fipronil é muito eficiente em baixas concentrações contra numerosos insetos pragas de culturas (BALANÇA; DE VISSCHER, 1997). Entretanto este inseticida é

tóxico para insetos não alvo e sua  $DL_{50}$  para abelhas é muito baixa: 4 ng/abelha (TINGLE et al., 2003) e 6,2 ng/abelha (DECOURTYE, 2002 apud El HASSANI et al., 2005).

O Fipronil não provoca inibição da alimentação em abelhas mesmo em altas concentrações (FRANC; CADIERGUES, 1998; GAHLHOFF; MILLER; KOEHLER, 1999; LE PATOUREL, 2000; MAYER; LUNDEN, 1999). Isto explicaria porque abelhas podem absorver doses relativamente altas deste inseticida, conseqüentemente, mais tóxicas (COLIN et al., 2004).

O Fipronil pode ser aplicado no solo nas culturas de batata, cana-de-açúcar e milho; aplicação foliar nas culturas do algodão, arroz, cana-de-açúcar, eucalipto, milho e soja; aplicação em sementes de algodão, arroz, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo; aplicação foliar em mudas de eucalipto; aplicação no controle de formigas e cupins; aplicação na água de irrigação para o arroz irrigado (ANVISA, 2008c). Ele é comercializado no Brasil pela Basf S.A. em diversas formulações: isca granulada – Blitz<sup>®</sup> (0,03g/kg) usado como formicida com aplicação terrestre; suspensão concentrada - Standak<sup>®</sup> (250 g/L) usado no tratamento de sementes; granulado – Regent<sup>®</sup> 20 G (20g/kg) com aplicação no solo; granulado dispersível - Regent<sup>®</sup> 80 WG (800 g/kg) com aplicação terrestre e aérea; suspensão concentrada - Klap<sup>®</sup> (200g/L) com aplicação terrestre e aérea.

Quando se analisa os riscos que um inseticida pode causar em determinado inseto, inicialmente deve-se levar em consideração a biologia de tal organismo. No caso das abelhas, além de sua biologia, sua organização social também deve ser considerada. O comportamento social implica na divisão de trabalho executado pelos diversos membros da colônia. A realização de tais atividades está relacionada com a idade do indivíduo, com o componente genético e com fatores ambientais (CALDERONE; PAGE, 1992). Frequentemente, abelhas jovens estão envolvidas com atividades dentro da colônia (alimentação larval, limpeza e construção de células), seguido pela atividade de guarda sendo que as mais velhas realizam atividade de forrageamento (SEELEY, 1982).

As abelhas forrageiras não são as únicas que estão expostas aos pesticidas, mas também aquelas que exercem atividades no interior da colônia e os indivíduos imaturos que são alimentados com pólen e néctar estocados. Isto significa que os diferentes estágios larvais e os adultos de várias fases da vida ou que executam diferentes atividades podem entrar em contato com esses produtos. A concentração e a duração da exposição a determinado produto também pode variar. A quantidade de produtos químicos, a persistência dos resíduos e a frequência de aplicação nas culturas não são as únicas informações que devem ser avaliadas já que os produtos podem ser acumulados por longos períodos dentro da colméia. Por esta razão,

a determinação dos efeitos letais e subletais fazem-se necessários (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).

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  $LC_{50}$  que é a concentração capaz de induzir a mortalidade de 50% da população testada. Protocolos oficiais têm sido desenhados para realização de tais testes, como o protocolo da OECD (1998). Nesses testes, os inseticidas são administrados tópicamente ou oralmente a fim de representar os diferentes tipos de exposição que ocorre no campo e a mortalidade é registrada 24 e/ou 48 horas após a exposição. A absorção através do tegumento da abelha é a base para a toxicidade tópica. As propriedades físico-químicas dos inseticidas e sua formulação são largamente responsáveis pelos danos causados por este modo de entrada. A ingestão de pólen e néctar contaminado oferece outra rota de entrada. O trato digestivo pode se tornar alterado ou paralisado, prejudicando a alimentação ou cessando as funções do intestino (DEVILLERS, 2002). 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.

Enquanto o efeito letal é facilmente determinado, outros efeitos mais sutis, relacionados, por exemplo, com a fisiologia ou comportamento das abelhas, como paralisia, desorientação ou mudanças comportamentais, são menos detectáveis, mas podem afetar toda população (DECOURTYE et al., 2004; GUEZ; ZHANG; SRINIVASAN, 2005; HAYNES, 1988; PHAM-DELÈGUE et al., 2002; vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

Em contraste do envenenamento direto pelas abelhas que é aparentemente fácil de ser observado, efeitos subletais dos inseticidas em abelhas e em outros polinizadores são muito mais difíceis de serem demonstrados. Entretanto eles recebem um crescente aparato científico nos últimos anos. Tais efeitos frequentemente se tornam evidentes após a exposição prolongada. Podem afetar vários estágios da vida e níveis organizacionais das abelhas, desde a fisiologia celular ou o sistema imune de um único indivíduo até afetar toda a vida da colônia como os comportamentos de aprendizagem e comunicação (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

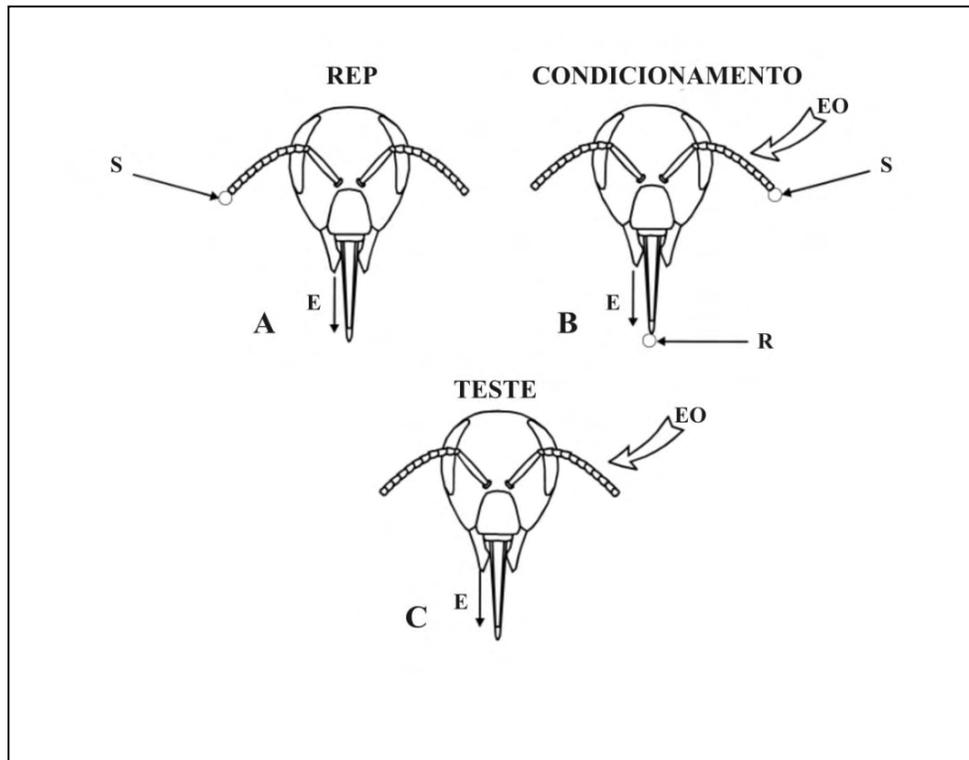
Pham-Delègue et al. (2002) detalha diversos estudos comportamentais em abelhas para avaliar os efeitos de doses subletais de inseticidas. Entre eles o monitoramento de atividade de abelhas na entrada da colônia, onde a quantificação é também importante para a prática da apicultura. Vários mecanismos foram desenhados para a contagem de abelhas: utilização de pulsos elétricos, sinais fotoelétricos, aparatos mecânicos para distinguir os vôos de entrada e saída da colônia, contadores eletrônicos, uso de sensores com luz infravermelha, sensores para discriminar a direção do movimento da abelha e análise das informações com uso de softwares específicos. Estes constituem equipamentos adequados para levantamentos das atividades das colônias em condições de campo e laboratório e detectar as perdas de abelhas devido a predadores, patógenos ou envenenamentos. Outro comportamento que pode ser estudado é o comportamento de orientação realizado pela análise do vôo de retorno de uma fonte artificial de alimento para a colônia. Neste caso, o tempo gasto no percurso pode ser utilizado como parâmetro (PHAM-DELÈGUE et al., 2002). Comportamentos como comunicação pela dança, vôos de retorno, orientação e eficácia durante visitas às flores são conhecidos por serem afetados por inseticidas em doses subletais (COX; WILSON, 1984; JOHANSEN; MAYER, 1990; SCHRICKER; STEPHEN, 1970; VANDAME et al., 1995).

Outro comportamento utilizado em testes para verificar a ação de inseticidas é o do reflexo de extensão da probóscide (REP) em resposta ao estímulo da sacarose. Quando a antena de uma abelha é estimulada com uma solução de sacarose a uma determinada concentração, por reflexo, esta abelha estende sua probóscide na expectativa de se alimentar (figura 4 A) (PAGE; ERBER; FONDRK, 1998; PANKIW; PAGE, 1999; SCHEINER, 2004). As abelhas são expostas à concentrações crescentes de sacarose sendo que a menor concentração que a abelha estende sua probóscide é considerada o limiar de sensibilidade à sacarose (Mc CABE et al., 2007; PAGE; ERBER; FONDRK, 1998). Este comportamento desempenha importante papel na divisão de trabalho de uma colônia (PAGE; ERBER; FONDRK, 1998; PANKIW; PAGE, 2000). Por este motivo diversos autores têm estudado a ação de doses subletais de inseticidas no desempenho deste comportamento (ALIOUANE et al. 2009; LAMBIN et al., 2001; EL HASSANI et al, 2005, 2008).

O condicionamento do reflexo de extensão da probóscide também vem sendo utilizado para verificar a influência de inseticidas no comportamento das abelhas, mas neste caso visa o aprendizado olfatório. Quando uma abelha pousa em uma flor, ela está sujeita a um processo de condicionamento onde as características florais (cheiro, cor, forma) são memorizados sendo posteriormente associados com a recompensa alimentar (néctar e pólen) (MENZEL, 1993; MENZEL; MÜLLER, 1996). Em condições laboratoriais, o aprendizado olfatório pode

ser estudado usando o bioensaio baseado no condicionamento do reflexo de extensão da probóscide aplicado em operárias (TAKEDA, 1961).

O bioensaio foi detalhado por Bitterman et al. (1983) e Sandoz, Roger e Pham-Delègue (1995). Ele consiste em uma fase inicial de condicionamento onde um estímulo condicionante (isto é, algum odor floral) é apresentado simultaneamente a um estímulo não condicionante (solução de açúcar em contato com antena, tarso ou peças bucais) seguido de uma recompensa (a abelha se alimenta da solução). Em seguida, uma fase de extinção é aplicada onde somente o estímulo condicionante é aplicado. As abelhas podem entrar em contato com substâncias tóxicas em diversas fases do processo do condicionamento: anterior ao início do bioensaio, durante a fase de condicionamento ou entre a fase de condicionamento e a fase de extinção (figuras 4 B e C) (PHAM-DELÈGUE et al., 2002).



**Figura 4.** Reflexo de extensão da probóscide e condicionamento. A: teste do REP com apresentação da sacarose (S) e consequente extensão da probóscide (E). B: condicionamento do REP pela apresentação do estímulo odorífero (EO) e simultânea apresentação da sacarose (S). Após a extensão da probóscide (E) é oferecida a recompensa (R). C: teste de condicionamento onde somente a apresentação do estímulo odorífero (EO) leva a extensão da probóscide (E) (modificado de DECOURTYE; PHAM-DELÈGUE, 2002).

Ao pousar em uma flor, a operária estende sua probóscide como reflexo, pois receptores gustativos localizados no tarso, antenas e partes da boca são estimulados pelo néctar. Esse reflexo induz a memorização da fonte. Desta forma, o reflexo de extensão da probóscide (REP) reproduz o que realmente acontece na interação inseto-planta. (MENZEL; GREGGERS; HAMMER, 1993). Conseqüentemente, o processo de aprendizagem individual é importante para um efetivo acompanhamento das atividades de forrageamento. 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 REP tem sido reproduzido com muito sucesso em condições artificiais, e tem se tornado uma importante ferramenta no estudo de vários aspectos do processo de aprendizado olfatório (BITTERMAN et al., 1983; SANDOZ; ROGER; PHAM-DELÈGUE, 1995).

Decourtye et al. (2005) utilizando Fipronil, Deltametrina, Endosulfan e Prochloraz, El Hassani et al. (2005) utilizando Fipronil, Abramsom et al. (1999) utilizando Endosulfan, Deltametrina, Cyfluthrin e Carbaril verificaram que o aprendizado olfativo de *A. mellifera* foi prejudicado após a administração de tais inseticidas

O condicionamento do REP com operárias de abelhas melíferas também tem sido usado para investigar os efeitos comportamentais de vários inseticidas (ABRAMSON et al., 1999; ABRAMSON; BOYD, 2001; ABRAMSON et al., 2004; DECOURTYE; LACASSIE; PHAM-DELÈGUE, 2003; MAMOOD; WALLER, 1990; STONE; ABRAMSON; PRICE, 1997; TAYLOR; WALLER; CROWDER, 1987; WEICK; THORN, 2002).

Diversos trabalhos têm enfatizado o efeito de inseticidas no tamanho da população e na produção de mel e cera (WALLER et al., 1984), na redução da média de vida das abelhas (MACKENZIE; WINSTON, 1989), mudança no comportamento forrageiro (GARY; LORENZEN, 1989) e redução da área de cria (WEBSTER; PENG, 1989). A redução da área de cria é uma maneira indireta de medir a suscetibilidade dos estágios imaturos aos inseticidas. A mortalidade dos adultos, o abandono e a remoção da cria e a diminuição da postura podem contribuir para esta perda, mascarando os verdadeiros efeitos dos inseticidas nos diferentes estágios de desenvolvimento que precedem a emergência do adulto (DAVIS, 1989). Figueiredo et al. (1996) observaram que o organofosforado DDVP (20 µg/µL), com exceção da Est1, provocou inibição de todas as esterases das larvas de 5º instar. Mas este fato não impediu o desenvolvimento ontogenético dos indivíduos. Entretanto, quando foi aplicada

a solução nas pré-pupas, estas foram severamente afetadas, não ocorrendo a transformação em pupas, sendo observada a morte de todos os indivíduos tratados.

Thompson (2003) também realizou uma ampla revisão bibliográfica envolvendo trabalhos realizados para verificar a ação de inseticidas em vários comportamentos de abelhas melíferas como a divisão de trabalho, forrageamento, desenvolvimento da colônia, atividade larval, reconhecimento entre operárias e repelência.

Outros trabalhos, porém ressaltam a importância de se utilizar também as modificações celulares e ultra-celulares para avaliar a ação de doses subletais de inseticidas em abelhas (CRUZ et al., 2010; FERREIRA, 2010; KAKAMAND; MAHMOUD; AMIN, 2008; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006; SOUZA, 2009).

O uso indiscriminado de inseticidas pelo mundo levou as agências regulatórias a prescreverem o limite residual máximo permitido destes produtos na maioria dos alimentos. No entanto tais limites não existem para o mel. O mel, sendo um produto natural derivado das plantas e manufaturado pelas abelhas pode ser contaminado por inseticidas em vários níveis (AL-RIFAI; AKEEL, 1997). Com intuito de verificar a qualidade do mel na Índia, Khan et al. (2004) analisaram o mel produzido por *A. mellifera*, *A. dorsata* e *A. florea*. Os autores constataram que 83% dos exemplares de mel estavam contaminados por inseticidas organoclorados. Grandes concentrações de inseticidas foram mais frequentes no mel de *A. mellifera*, que apresentou organoclorados e organofosforados, o que não foi verificado no mel das outras espécies. Os autores justificam que esta diferença está relacionada com os diferentes recursos florais visitados por estas abelhas. Enquanto *A. florea* e *A. dorsata* visitam flores selvagens com mais frequência, a *A. mellifera* visita as plantações e culturas onde os inseticidas são mais comumente aplicados.

Em muitos países, um quadro jurídico tem sido implantado para proteger as abelhas e outros polinizadores dos efeitos negativos dos pesticidas e outros produtos químicos. Os mais importantes são os *European Council Directive 91/414* na Europa e o *Federal Insecticide Fungicide and Rodenticide Act* nos EUA (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

Os efeitos adversos ocasionados pela aplicação de pesticidas retomam para o início dos anos 1900, quando a aspersão do arsênico em árvores frutíferas foi listada como uma das cinco razões para o número de colônias na Califórnia estarem diminuindo. A aspersão na agricultura foi largamente utilizada nos anos 1960 e 1970, o que causou grandes danos nas abelhas, com uma diminuição de 48% do número de colônias no estado do Arizona. No estado da Califórnia, 62,500 colônias por ano (11,5%) foram perdidas devido a ação de

inseticidas. Apesar de muitas destas colônias terem sido repostas, o custo para a indústria foi significativo. Em 1962, um estudo feito pelos apicultores de Washington concluiu que 3,2% do investimento na apicultura foram perdidos devido aos inseticidas (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

Em 2008, no sul da Alemanha, mais de 11 mil colônias de *A. mellifera* sofreram severos danos devido ao envenenamento causado por uma nuvem tóxica que se espalhou após plantação de sementes de milho tratadas com neonicotinoides, através do uso de máquinas pneumáticas. A nuvem se espalhou pelos apiários e para outras plantas que estavam sendo visitadas pelas abelhas. O tratamento de sementes de milho com neonicotinoide (Clotianidina) tinha se tornado obrigatório (por decreto) no sul da Alemanha para prevenção da broca *D. virgifera*. Como consequência do acidente, o registro de Clotianidina na Alemanha foi cancelado e os ingredientes não podem ser vendidos nem usados (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010). Erickson et al. (1997) também relataram que o uso de inseticidas em culturas de milho está relacionada com a perda de 90% das colônias de *A. mellifera* em alguns apiários nos EUA.

Em um estudo recente na França, resíduos de diversos pesticidas, incluindo inseticidas neonicotinoides e seus metabólitos, foram detectados em colônias de abelhas melíferas. Embora nenhuma correlação direta entre a mortalidade das colônias tenha sido observada, efeitos sinérgicos entre os pesticidas e outros fatores afetando a saúde da colônia não podem ser descartadas (CHAUZAT et al., 2009).

Malaspina et al. (2010) relataram a mortalidade de diversas colônias em algumas cidades do interior do estado de São Paulo. Após a análise das abelhas mortas em um laboratório especializado em resíduos de pesticidas, os pesquisadores verificaram a presença de Tiametoxam no material coletado.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Coleta das abelhas**

As abelhas utilizadas nos testes consistiram de operárias adultas de *A. mellifera* coletadas de 3 colônias mantidas no apiário do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro. As colônias escolhidas apresentavam condições fisiológicas normais, livre de doenças e uma rainha em franca postura. As operárias foram coletadas diretamente dos favos que não apresentavam indivíduos imaturos sendo descartados zangões e operárias recém emergidas. Após a coleta, as operárias foram acondicionadas em potes plásticos com 1 litro de volume onde foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> (aproximadamente 15 segundos). 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 dos ingredientes ativos**

#### **4.2.1. Acetamiprido**

O ingrediente ativo Acetamiprido utilizado nos testes foi fornecido pela empresa Iharabras S.A. Indústrias Químicas. A solução mãe, a partir da qual todas as demais concentrações foram feitas, constou da diluição de 5,0 g do ingrediente ativo em 50,0 mL de acetona, ou seja, na concentração de 100 mg/mL. Até a sua utilização, a solução foi mantida em vidro âmbar e em câmara fria (3,0 °C).

#### **4.2.2. Tiametoxam**

O ingrediente ativo Tiametoxam utilizado nos testes foi fornecido pela empresa Syngenta. A solução principal, a partir da qual todas as demais concentrações foram feitas, constou da diluição de 0,01 g do ingrediente ativo em 100 mL de acetona, resultando na concentração de 100 µg/mL. Até a sua utilização, a solução foi mantida em vidro âmbar e em câmara fria (3,0 °C).

### 4.2.3. Fipronil

O ingrediente ativo Fipronil utilizado nos testes foi cedido pela empresa Basf. A solução principal, a partir da qual todas as demais concentrações foram feitas, constou da diluição de 0,001 g do ingrediente ativo em 100 mL de acetona, formando uma concentração de 10 µg/mL. Até a sua utilização, a solução foi mantida em vidro âmbar e em câmara fria (3,0 °C).

### 4.3. Determinação da DL<sub>50</sub> para 24 horas

Os procedimentos para a determinação da DL<sub>50</sub> (dose capaz de ocasionar a mortalidade de 50% da população) e TL<sub>50</sub> (tempo capaz de ocasionar a mortalidade de 50% da população, após a aplicação de uma determinada dose) seguiram o protocolo da OECD (1998).

Para cada concentração testada e para o grupo controle, 3 repetições de 10 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 cãndi para que as abelhas se alimentassem *ad libitum*.

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 (figura 5).

A partir da primeira hora após a aplicação da solução contendo os ingredientes ativos foram contabilizadas as abelhas mortas para cada concentração ao final de 24 horas. 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 (figura 6).

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



**Figura 5:** Aplicação de 1  $\mu$ l de solução na parte dorsal do tórax de uma operária.



**Figura 6:** Operárias de *A. mellifera* em potes plásticos acondicionados em B.O.D.

### Acetamiprido

Na tabela 1 encontram-se as concentrações obtidas a partir da solução principal para determinar a DL<sub>50</sub> do Acetamiprido sobre as operárias 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 Acetamiprido aplicadas nas operárias de *A. mellifera* para determinação da DL<sub>50</sub> (24 horas).

Concentração	Dose
0,75 mg/mL	0,75 µg/abelha
1,00 mg/mL	1,00 µg/abelha
2,25 mg/mL	2,25 µg/abelha
5,00 mg/mL	5,00 µg/abelha
7,50 mg/mL	7,50 µg/abelha
10,0 mg/mL	10,0 µg/abelha
12,50 mg/mL	12,50 µg/abelha
15,00 mg/mL	15,00 µg/abelha
15,50 mg/mL	15,50 µg/abelha
20,00 mg/mL	20,00 µg/abelha

### Tiametoxam

Na tabela 2 encontram-se as concentrações obtidas a partir da solução principal para determinar a DL<sub>50</sub> do Tiametoxam sobre as operárias de *A. mellifera*. Encontram-se também descritas as doses aplicadas nas abelhas, já que foi aplicado 1 µL da solução.

## Fipronil

Na tabela 3 encontram-se as concentrações obtidas a partir da solução principal para determinar a DL<sub>50</sub> do Fipronil sobre as operárias de *A. mellifera*. Encontram-se também descritas as doses aplicadas nas abelhas, já que foi aplicado 1 µL da solução.

**Tabela 2.** Concentrações obtidas e respectivas doses de Tiametoxam aplicadas nas operárias de *A. mellifera* para determinação da DL<sub>50</sub> (24 horas).

Concentração	Dose
10,0 µg/mL	10,0 ng/abelha
15,0 µg/mL	15,0 ng/abelha
20,0 µg/mL	20,0 ng/abelha
25,0 µg/mL	25,0 ng/abelha
30,0 µg/mL	30,0 ng/abelha
35,0 µg/mL	35,0 ng/abelha
40,0 µg/mL	40,0 ng/abelha

**Tabela 3.** Concentrações obtidas e respectivas doses de Fipronil aplicadas nas operárias de *A. mellifera* para determinação da DL<sub>50</sub> (24 horas).

Concentração	Dose
1,25 µg/mL	1,25 ng/abelha
1,50 µg/mL	1,50 ng/abelha
1,75 µg/mL	1,75 ng/abelha
2,00 µg/mL	2,00 ng/abelha
2,25 µg/mL	2,25 ng/abelha
2,50 µg/mL	2,50 ng/abelha
2,75 µg/mL	2,75 ng/abelha
3,00 µg/mL	3,00 ng/abelha

#### 4.4. Determinação da TL<sub>50</sub>

Em um grupo de 30 abelhas (com cinco repetições) foi aplicado topicamente 1 µL de solução na concentração estabelecida pela DL<sub>50</sub> para cada um dos ingredientes ativos avaliados. No grupo controle foi aplicado somente acetona. Após a aplicação, as abelhas foram acondicionadas em potes plásticos de 500 mL contendo algodão umedecido e pasta cãndi e transferidas para B.O.D. com temperatura de 32,5°C e com 70% de umidade relativa.

A partir da primeira hora após a aplicação da solução contendo os ingredientes ativos, as abelhas mortas foram contabilizadas, de hora em hora por um período de 24 horas.

#### 4.5. Testes comportamentais

Para a realização dos testes, doses subletais (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10 e DL<sub>50</sub>/100) dos ingredientes ativos foram aplicadas topicamente no tórax de *A. mellifera*. As abelhas receberam 1 µL da solução sendo que o grupo controle recebeu somente acetona. Testes anteriores demonstraram ausência de diferença estatisticamente significativa entre abelhas que receberam aplicação de acetona e aplicação de água, motivo pelo qual esta última aplicação não foi utilizada nos testes comportamentais.

As avaliações comportamentais foram realizadas 1, 4 e 24 horas após a aplicação dos ingredientes ativos, sendo que os grupos de abelhas são independentes em cada período.

##### 4.5.1. Reflexo de extensão da probóscide (REP)

Após a aplicação do ingrediente ativo nos tempos, de 1, 4 e 24 horas, as operárias foram presas em tubos plásticos (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 (Mc CABE et al., 2007; PAGE; ERBER; FONDRK, 1998; PANKIW; PAGE, 1999; PANKIW; WADDINGTON; PAGE, 1999).

Antes do início do bioensaio propriamente dito, foi oferecida somente água para as abelhas para verificar existência de pré-sensibilização. Em seguida, foi oferecida a série de concentrações de 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. Uma resposta foi considerada positiva somente quando as abelhas estenderam completamente suas probóscides. Após a extensão foi permitido que a abelha se alimentasse por 3 segundos (figuras 7 e 8). 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.

Foi realizada 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 50,0%.

Também foi analisada a mortalidade de abelhas durante a execução teste.

Em cada teste, foram utilizadas aproximadamente 100 abelhas para cada uma das três concentrações ( $DL_{50}$ ,  $DL_{50}/10$  e  $DL_{50}/100$ ) mais o grupo controle, para cada um dos três períodos, resultando em 400 abelhas (aproximadamente) para cada ingrediente ativo por período.

#### **4.5.2. 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 9). Após a aplicação das doses dos princípios ativos 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 a subirem em direção a ela devido a fototaxia positiva (LAMBIN 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.

Em cada teste, foram utilizadas 36 abelhas para cada uma das 3 concentrações ( $DL_{50}$ ,  $DL_{50}/10$  e  $DL_{50}/100$ ) mais o grupo controle, para cada um dos três períodos, totalizando 144

abelhas por ingrediente ativo por período. Simultaneamente eram liberadas 6 abelhas e seu comportamento filmado. Posteriormente, foi estimada a velocidade de cada abelha para percorrer os 50 centímetros.



**Figura 7:** Apresentação de uma solução de sacarose para uma abelha. A = Antenas; SC = Solução de sacarose.



**Figura 8:** Abelha apresentando reflexo de extensão da probóscide após ter sido estimulada na antena com uma solução de sacarose. P = Probóscide.

#### 4.6. Análise estatística

Para a determinação da  $DL_{50}$  e  $TL_{50}$  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 ( $DL_{50}$ ,  $DL_{50}/10$ ,  $DL_{50}/100$  e grupo controle) através do teste do qui-quadrado para cada uma das concentrações de sacarose. Nos casos em que ocorreu diferença significativa foi feito um teste *a posteriori* análogo ao teste de Dunnett, onde houve as transformações das proporções em arcoseno, para verificar qual dose aplicada diferiu do grupo controle (ZAR, 1999).



**Figura 9:** Caixa utilizada no teste de locomoção. R = raias; L = lâmpada; E = entradas; T = tela de nylon; — = 5 cm

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 homogêneas (ZAR, 1999). Nos casos em que ocorreu significância nos resultados, foi realizado um teste *a posteriori* utilizando o método Dunn para verificar qual concentração do princípio ativo que apresentava diferença significativa em relação ao grupo controle.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Determinação da DL<sub>50</sub>

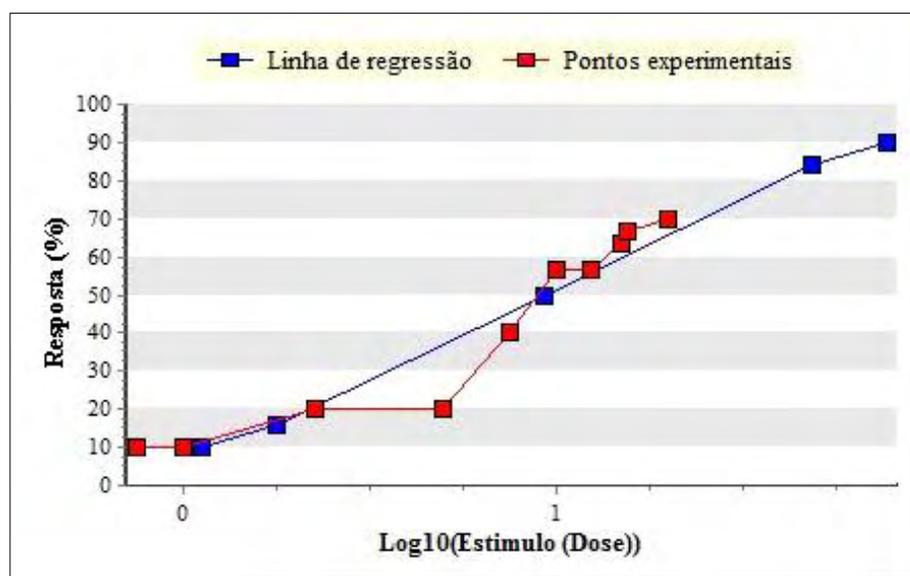
#### 5.1.1. Acetamiprido

Os dados de mortalidade observados após 24 horas para cada uma das doses testadas foram submetidos à análise Próbit, obtendo-se uma DL<sub>50</sub> no valor de 9,3 µg/abelha com um intervalo de confiança de 7,2 a 12,5 µg/abelha (tabela 4 e figura 10).

**Tabela 4:** Resultado da análise Próbit para a determinação da DL<sub>50</sub> em 24 horas do Acetamiprido aplicado em operárias de *A. mellifera*

N	$\alpha$	$\beta$	$\chi^2$	GL	DL <sub>50</sub>	Intervalo de Confiança	
						Inferior	Superior
30	3,6491	1,3932	3,104	8	9,325	7,2274	12,4837

N: número de indivíduos;  $\alpha$ : coeficiente de regressão;  $\beta$ : coeficiente angular;  $\chi^2$ : qui-quadrado; GL: Graus de liberdade; DL<sub>50</sub>, Intervalo de Confiança Inferior e Superior = µg/abelha



**Figura 10:** Regressão realizada pela análise Próbit a partir da mortalidade registrada para a determinação da DL<sub>50</sub> 24 horas após a aplicação tópica do Acetamiprido.

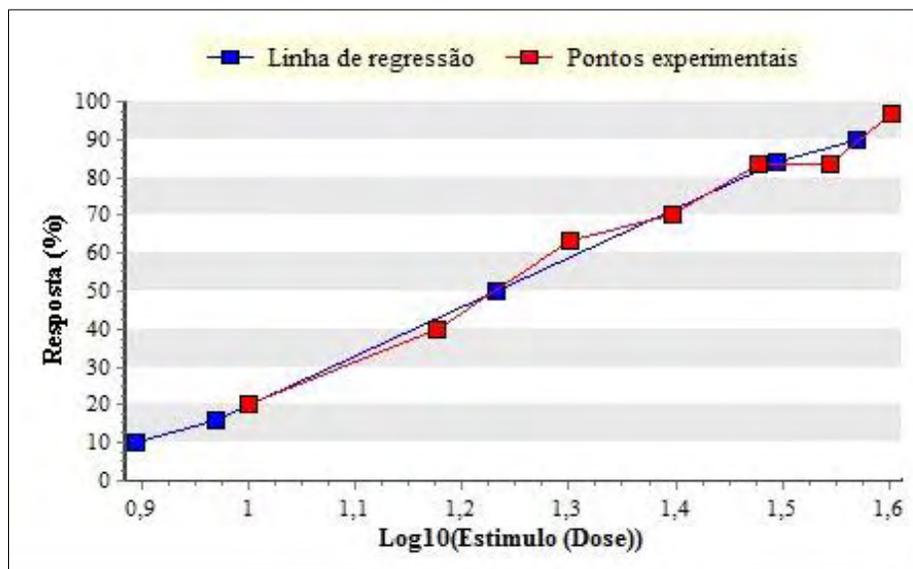
### 5.1.2. Tiametoxam

Os dados de mortalidade observados após 24 horas para cada uma das doses testadas foram submetidos à análise Próbit obtendo uma  $DL_{50}$  no valor de 17 ng/abelha com um intervalo de confiança de 14,6 a 19,2 ng/abelha (tabela 5 figura 11).

**Tabela 5:** Resultado da análise Próbit para a determinação da  $DL_{50}$  do Tiametoxam aplicado em operárias de *A. mellifera*.

n	$\alpha$	$\beta$	$\chi^2$	GL	$DL_{50}$	Intervalo de Confiança	
						Inferior	Superior
30	0,3168	3,8011	0,2891	5	17,0642	14,5948	19,2515

N: número de indivíduos;  $\alpha$ : coeficiente de regressão;  $\beta$ : coeficiente angular;  $\chi^2$ : qui-quadrado; GL: Graus de liberdade;  $DL_{50}$ , Intervalo de Confiança Inferior e Superior = ng/abelha



**Figura 11:** Regressão realizada pela análise próbit a partir da mortalidade registrada para a determinação da  $DL_{50}$  24 horas após a aplicação tópica do Tiametoxam.

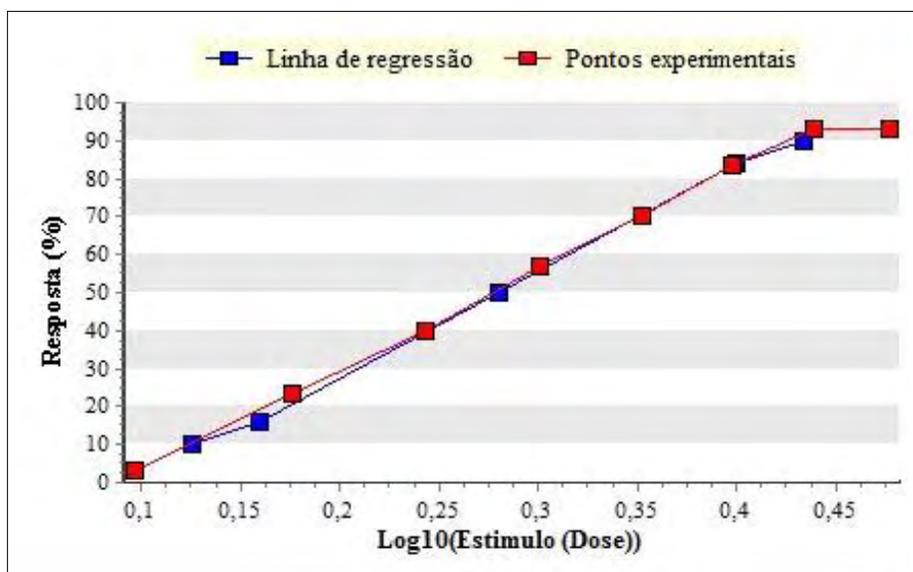
### 5.1.3. Fipronil

Os dados de mortalidade observados após 24 horas para cada uma das doses testadas foram submetidos à análise Próbit obtendo uma  $DL_{50}$  no valor de 1,9 ng/abelha com um intervalo de confiança de 1,8 a 2,0 ng/abelha (tabela 6 e figura 12).

**Tabela 6:** Resultado da análise Próbit para a determinação da  $DL_{50}$  do Fipronil aplicado em operárias de *A. mellifera*.

n	$\alpha$	$\beta$	$\chi^2$	GL	$DL_{50}$	Intervalo de Confiança	
						Inferior	Superior
30	2,6676	8,3306	0,7739	6	1,9054	1,7984	2,0082

N: número de indivíduos;  $\alpha$ : coeficiente de regressão;  $\beta$ : coeficiente angular;  $\chi^2$ : qui-quadrado; GL: Graus de liberdade;  $DL_{50}$ , **Intervalo de Confiança Inferior e Superior** = ng/abelha



**Figura 12:** Regressão realizada pela análise Próbit a partir da mortalidade registrada para a determinação da  $DL_{50}$  24 horas após a aplicação tópica do Fipronil.

## 5.2. Determinação da TL<sub>50</sub>

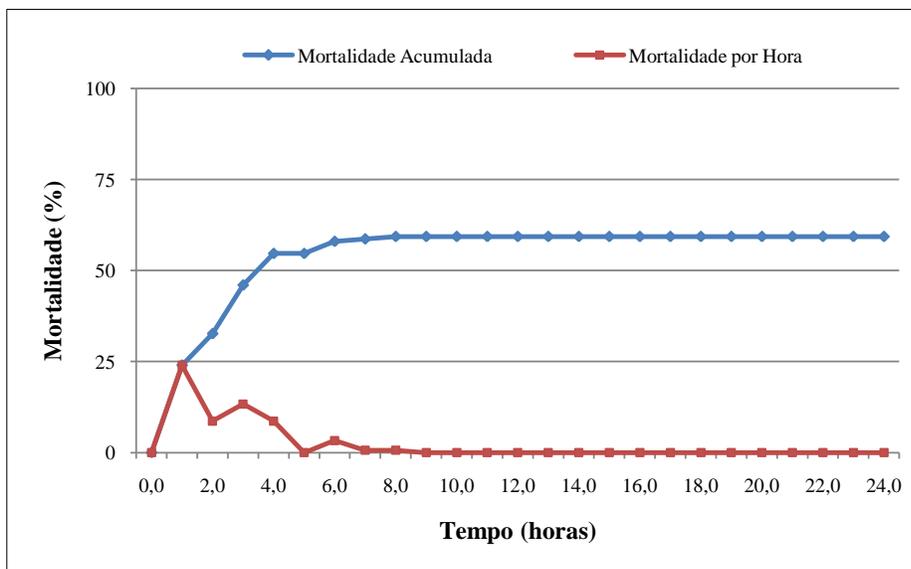
### 5.2.1. Acetamiprido

Os dados de mortalidade observados em 24 horas, após a aplicação da dose de 9,3 µg/abelha foram submetidos à análise Próbit obtendo uma TL<sub>50</sub> no valor de 1,45 horas com um intervalo de confiança de 1,2 a 1,6 horas (tabela 7 e figura 13).

**Tabela 7:** Resultado da análise Próbit para a determinação da TL<sub>50</sub> do Acetamiprido aplicado em operárias de *A. mellifera*.

n	$\chi^2$	GL	TL <sub>50</sub>	Intervalo de Confiança	
				Inferior	Superior
150	3,8481	6	1,4515	1,2428	1,6457

N: número de indivíduos;  $\chi^2$ : qui-quadrado; GL: Graus de liberdade; TL<sub>50</sub>, Intervalo de Confiança Inferior e Superior = Horas



**Figura 13:** Mortalidade de operárias de *A. mellifera* observada em 24 horas após a aplicação de 9,3 µg/abelha do Acetamiprido.

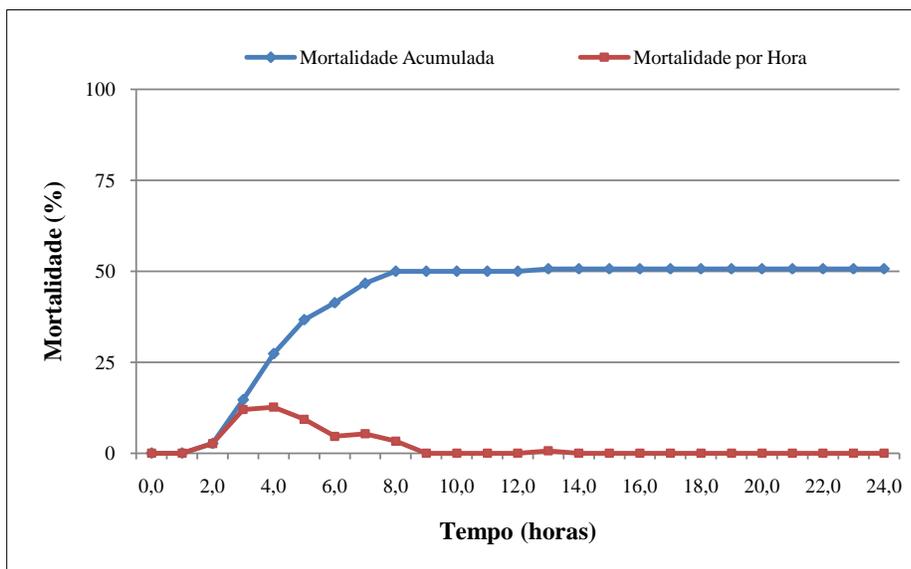
### 5.2.2. Tiametoxam

Os dados de mortalidade observados em 24 horas, após a aplicação da dose de 17 ng/abelha foram submetidos à análise Próbit obtendo uma  $TL_{50}$  no valor de 3,8 horas com um intervalo de confiança de 3,6 a 4,0 horas (tabela 8 e figura 14).

**Tabela 8:** Resultado da análise Próbit para a determinação da  $TL_{50}$  do Tiametoxam aplicado em operárias de *A. mellifera*.

n	$\chi^2$	GL	$TL_{50}$	Intervalo de Confiança	
				Inferior	Superior
150	1,4307	6	3,8678	3,6409	4,0884

N: número de indivíduos;  $\chi^2$ : qui-quadrado; GL: Graus de liberdade;  $TL_{50}$ , Intervalo de Confiança Inferior e Superior = Horas



**Figura 14:** Mortalidade de operárias de *A. mellifera* observada em 24 horas após a aplicação de 17 ng/abelha do Tiametoxam.

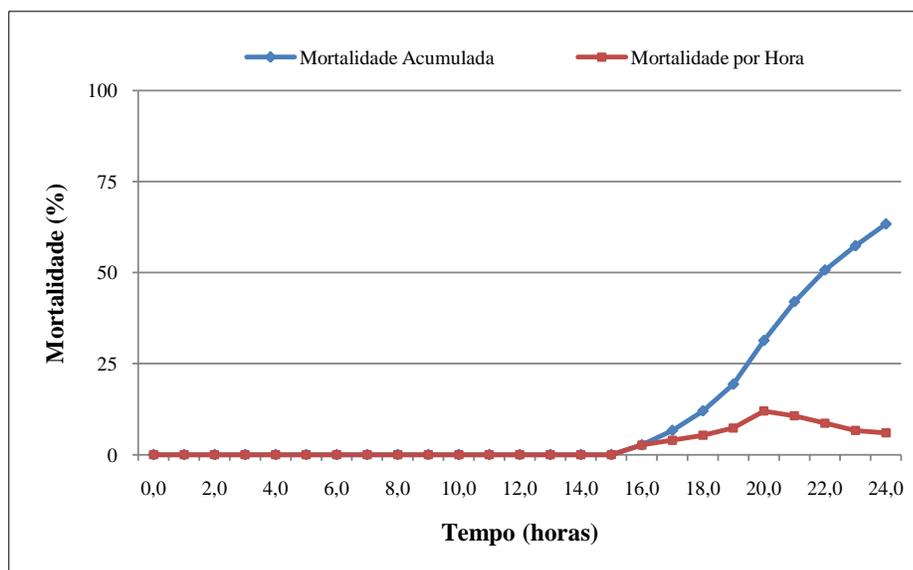
### 5.2.3. Fipronil

Os dados de mortalidade observados em 24 horas, após a aplicação da dose de 1,9 ng/abelha foram submetidos à análise Próbit obtendo uma  $TL_{50}$  no valor de 19,8 horas e um intervalo de confiança de 19,6 a 20,1 horas (tabela 9 e figura 15).

**Tabela 9:** Resultado da análise Próbit para a determinação da  $TL_{50}$  do Fipronil aplicado em operárias de *A. mellifera*.

n	$\chi^2$	GL	$TL_{50}$	Intervalo de Confiança	
				Inferior	Superior
150	2,4517	7	19,8684	19,6363	20,1006

N: número de indivíduos;  $\chi^2$ : qui-quadrado; GL: Graus de liberdade;  $TL_{50}$ , **Intervalo de Confiança Inferior e Superior** = Horas



**Figura 15:** Mortalidade de operárias de *A. mellifera* observada em 24 horas após a aplicação de 1,9 ng/abelha do Fipronil.

### 5.3. Testes comportamentais

#### 5.3.1. Reflexo de extensão da probóscide (REP)

##### 5.3.1.1. Acetamiprido

Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 1 hora após a aplicação tópica do Acetamiprido verificou-se, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foram oferecidas as concentrações de 0,3, 1,0, 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 10).

**Tabela10:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado entre os grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade entre os grupos, no teste realizado 1 hora após a aplicação das doses do Acetamiprido. \* = resultado significativo (GL = 3).

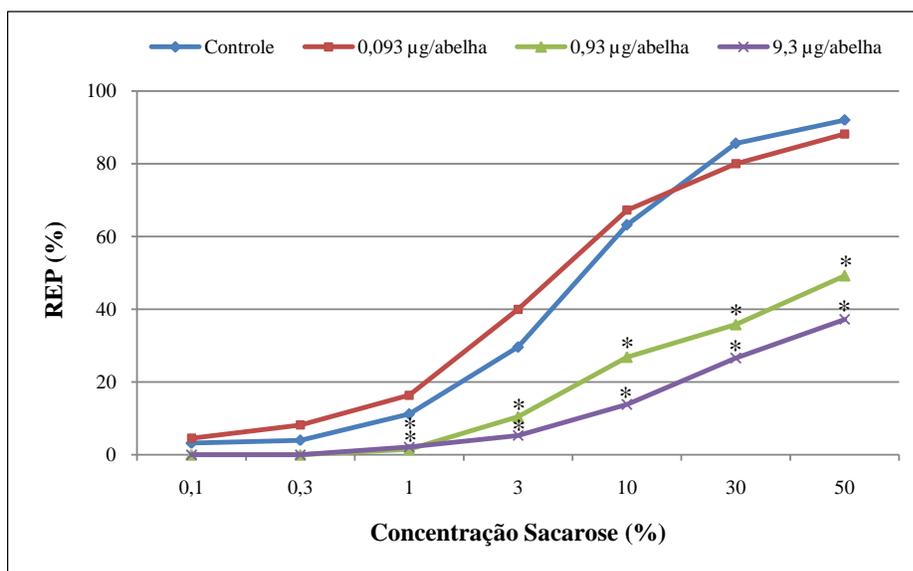
Sacarose (%)	$\chi^2$	p
0,1	6,786	0,079
0,3	12,943	0,0048*
1,0	18,338	0,0004*
3,0	42,897	< 0,0001*
10,0	83,813	< 0,0001*
30,0	113,716	< 0,0001*
50,0	109,318	< 0,0001*
<b>Mortalidade</b>	34,875	< 0,0001*

Para verificar qual grupo tratado diferiu do grupo controle (entre aqueles que apresentaram  $\chi^2$  significativo), foi aplicado o teste estatístico análogo ao Dunnett e verificou-se que o grupos de abelhas que receberam as doses de 0,93 e 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  do princípio ativo apresentaram diferença significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentração de 1,0, 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0 % de sacarose (tabela 11 e figura 16).

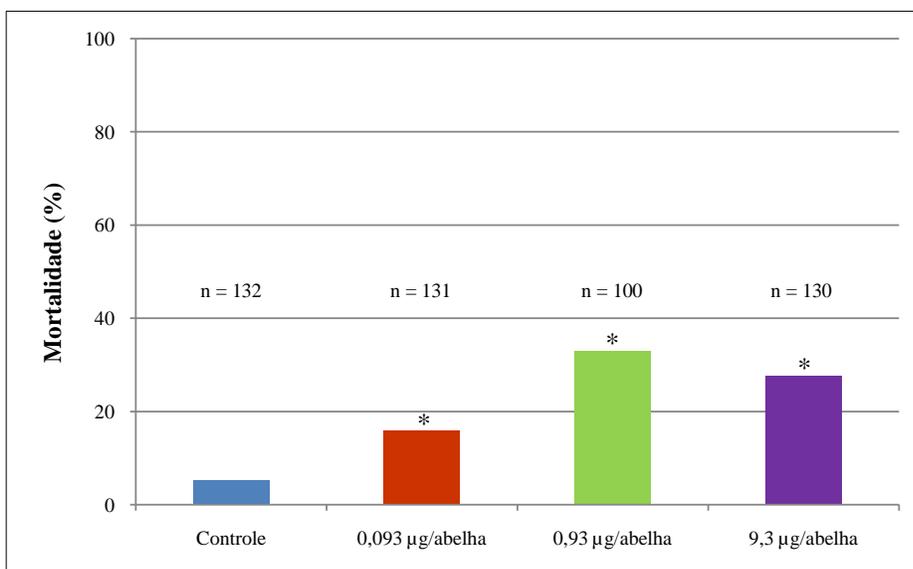
**Tabela 11:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Acetamiprido e grupo controle 1 hora após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos durante o teste. \* = diferença significativa quando comparada com o grupo controle.

Sacarose (%)	Doses do Acetamiprido ( $\mu\text{g}/\text{abelha}$ )			
	Controle (n = 125)	0,093 (n = 110)	0,93 (n = 67)	9,3 (n = 94)
0,1	3,2	4,5	0	0
0,3	4,0	8,9	0	0
1,0	11,2	16,4	1,5*	2,1*
3,0	29,6	40,0	10,4*	5,3*
10,0	63,2	67,3	26,9*	13,8*
30,0	85,6	80	35,8*	26,6*
50,0	92,0	88,2	49,3*	37,2*
<b>Mortalidade</b>	5,3	16,5*	33*	27,7*

A tabela 10 também indica que a mortalidade durante a execução do teste de reflexo de extensão da probóscide foi significativa entre os grupos de abelhas testados ( $\chi^2 = 34,875$ ;  $p < 0,0001$ ). No teste *a posteriori* verificou-se que todos os grupos experimentais (0,093, 0,93 e 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ ) apresentaram mortalidade significativa em relação ao grupo controle (tabela 11, figura17).



**Figura 16:** 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 do Acetamiprido aplicados topicamente 1 hora antes do teste. \* = diferença significativa quando comparada ao grupo controle.



**Figura 17:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Acetamiprido aplicados topicamente 1 hora antes do teste. \* = diferença significativa quando comparada ao grupo controle.

Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 4 horas após a aplicação tópica do Acetamiprido verificou-se, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foram oferecidas as concentrações de 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 12). Para verificar qual grupo tratado diferiu do grupo controle (entre aqueles que apresentaram  $\chi^2$  significativo), foi aplicado o teste estatístico análogo ao Dunnett e verificou-se que o grupo de abelhas que recebeu a dose de 0,93  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  do princípio ativo apresentou diferença significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentração de 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose. Já o grupo de abelhas que recebeu a dose de 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  apresentou diferença estatística significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentração de 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela13 e figura 18).

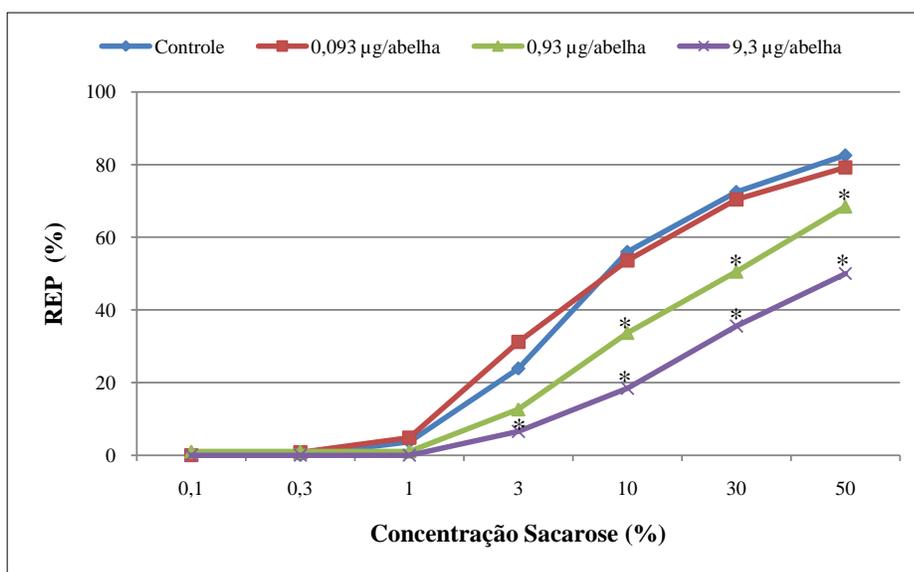
**Tabela 12:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado entre os grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade entre os grupos, no teste realizado 4 horas após a aplicação das doses do Acetamiprido. \* = resultado significativo (GL = 3).

Sacarose (%)	$\chi^2$	p
0,1	3,250	0,3546
0,3	1,742	0,6277
1,0	5,464	0,1408
3,0	21,833	< 0,0001*
10,0	34,037	< 0,0001*
30,0	33,317	< 0,0001*
50,0	25,725	< 0,0001*
<b>Mortalidade</b>	17,231	0,0006*

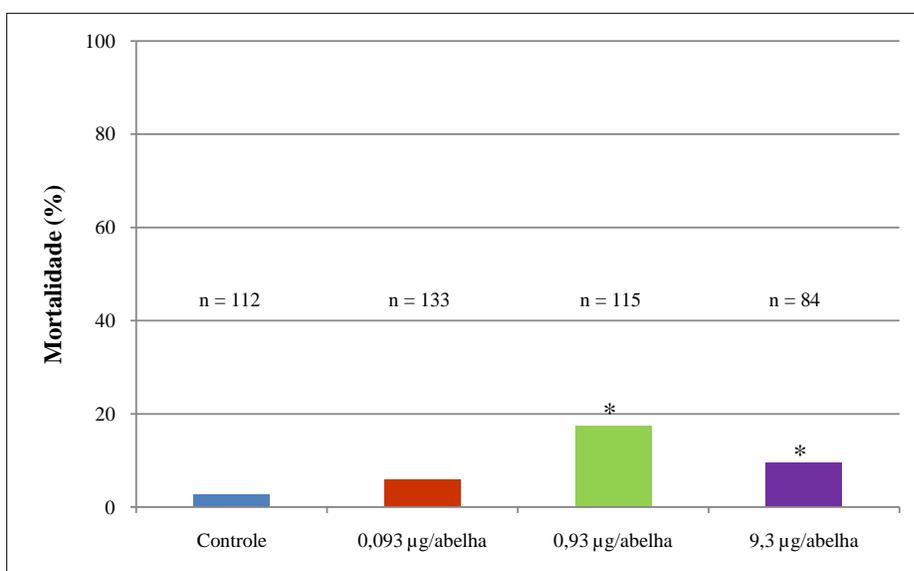
**Tabela 13:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Acetamiprido e grupo controle 4 horas após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos durante o teste. \* = diferença significativa quando comparada com o grupo controle.

Sacarose (%)	Doses do Acetamiprido (µg/abelha)			
	Controle (n = 109)	0,093 (n = 125)	0,93 (n = 95)	9,3 (n = 76)
0,1	0	0	1,0	0
0,3	0	0,8	1,0	0
1,0	3,7	4,8	1,0	0
3,0	23,9	31,2	12,6	6,6*
10,0	56,0	53,6	33,7*	19,0*
30,0	72,5	70,4	50,5*	36,5*
50,0	82,6	79,2	68,4*	51,3*
<b>Mortalidade</b>	2,7	6,0	17,4*	11,9*

A tabela 12 também indica que a mortalidade durante a execução do teste de reflexo de extensão da probóscide foi significativa entre os grupos de abelhas testados ( $\chi^2 = 17,231$ ;  $p = 0,0006$ ). No teste *a posteriori* verificou-se que os grupos experimentais que receberam as doses 0,93 e 9,3 µg/abelha apresentaram mortalidade significativa em relação ao grupo controle (tabela 13 e figura 19).



**Figura 18:** 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 do Acetamiprido aplicados topicamente 4 horas antes do teste. \* = diferença significativa quando comparada ao grupo controle.



**Figura 19:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Acetamiprido aplicados topicamente 4 horas antes do teste. \* = diferença significativa quando comparada ao grupo controle.

Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 24 horas após a aplicação tópica do Acetamiprido verificou-se, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foi oferecida a concentração de 50,0% (tabela 14). Para verificar qual grupo tratado diferiu do grupo controle (entre aqueles que apresentaram  $\chi^2$  significativo), foi aplicado o teste estatístico análogo ao Dunnet e não foi verificada diferença significativa (tabela 15 e figura 20).

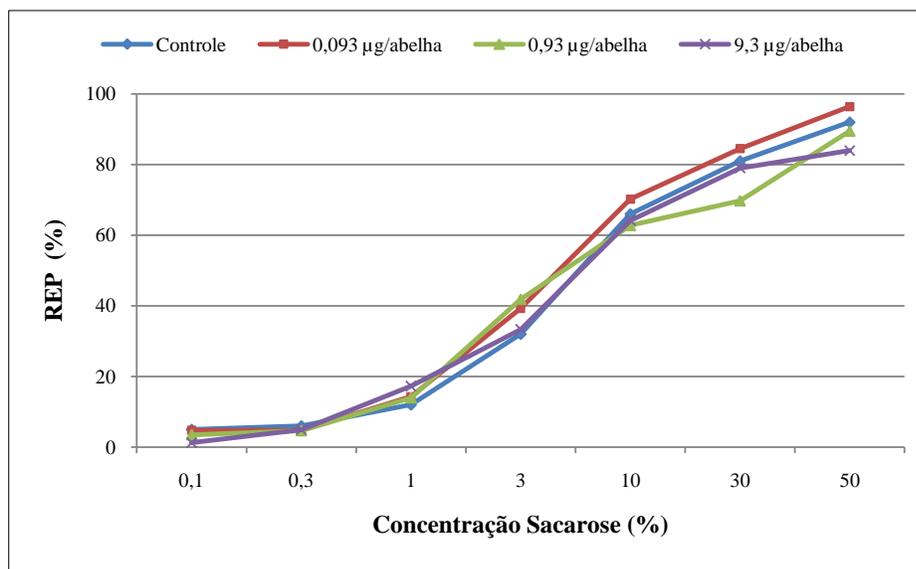
**Tabela 14:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado nos grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade observados no teste realizado 24 horas após a aplicação das doses do Acetamiprido. \* = resultado significativo (GL = 3).

<b>Sacarose (%)</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>p</b>
<b>0,1</b>	2,131	0,5457
<b>0,3</b>	0,226	0,9734
<b>1,0</b>	1,031	0,7937
<b>3,0</b>	2,572	0,4623
<b>10,0</b>	1,176	0,7588
<b>30,0</b>	6,098	0,1069
<b>50,0</b>	7,899	0,0481*
<b>Mortalidade</b>	9,064	0,0285*

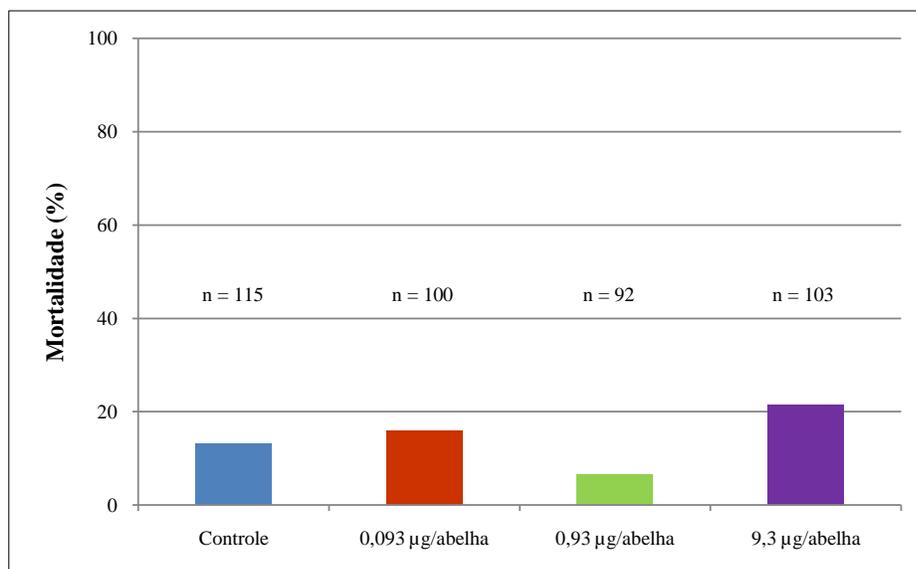
**Tabela 15:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Acetamiprido e grupo controle 24 horas após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos durante o teste. \* = diferença estatística quando comparada com o grupo controle.

Sacarose (%)	Doses do Acetamiprido (µg/abelha)			
	Controle (n = 100)	0,093 (n = 84)	0,93 (n = 86)	9,3 (n = 81)
0,1	5,0	4,8	3,5	1,2
0,3	6,0	4,8	4,6	4,9
1,0	12,0	14,3	13,9	17,3
3,0	32,0	39,3	41,9	33,3
10,0	66,0	70,2	62,8	64,2
30,0	81,0	84,5	69,8	79,0
50,0	92,0	96,4	89,5	83,9
<b>Mortalidade</b>	13,0	16,0	6,5	21,72

A tabela 14 também indica que a mortalidade durante a execução do teste de reflexo de extensão da probóscide foi significativa entre os grupos de abelhas testados ( $\chi^2 = 9,064$ ;  $p = 0,0285$ ). Porém, no teste *a posteriori* verificou-se que não é significativa a mortalidade ocorrida nos grupos experimentais em relação ao grupo controle (tabela 15 e figura 21).



**Figura 20:** 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 do Acetamiprido aplicados topicamente 24 horas antes do teste.



**Figura 21:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Acetamiprido aplicados topicamente 24 horas antes do teste.

### 5.3.1.2. Tiametoxam

Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 1 hora após a aplicação tópica do Tiametoxam verificou-se, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foram oferecidas as concentrações de 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 16). Para verificar qual grupo tratado diferiu do grupo controle (entre aqueles que apresentaram  $\chi^2$  significativo), foi aplicado o teste estatístico análogo ao Dunnett e verificou-se que o grupo de abelhas que recebeu a dose de 17 ng/abelha apresentou diferença estatística significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentrações de 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 17 e figura 22).

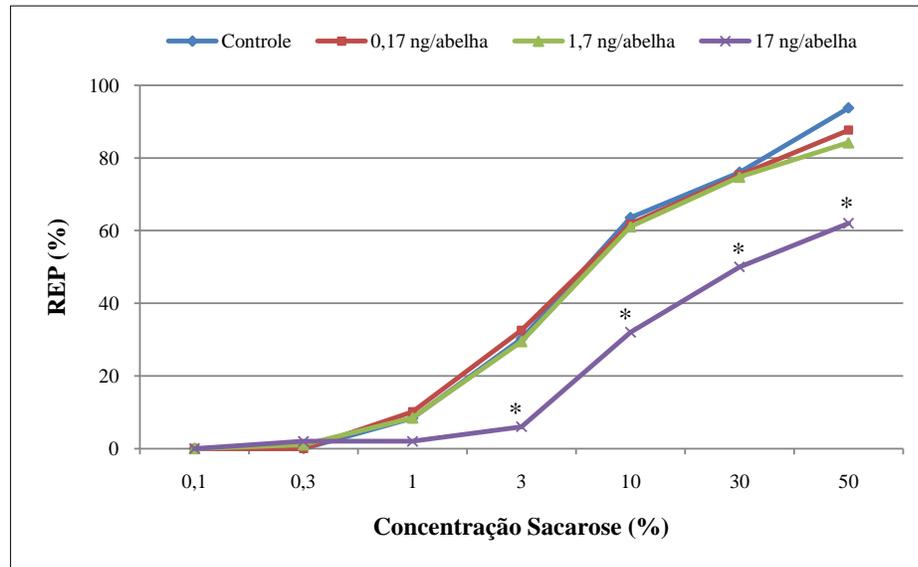
**Tabela 16:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado nos grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade observados no teste realizado 1 hora após a aplicação das doses do Tiametoxam. \* = valor significativo (GL = 3).

Sacarose (%)	$\chi^2$	p
0,1	-	-
0,3	3,055	0,3832
1,0	3,058	0,3827
3,0	13,401	0,0038*
10,0	15,908	0,0012*
30,0	13,431	0,0038*
50,0	26,336	< 0,0001*
<b>Mortalidade</b>	152,055	< 0,0001*

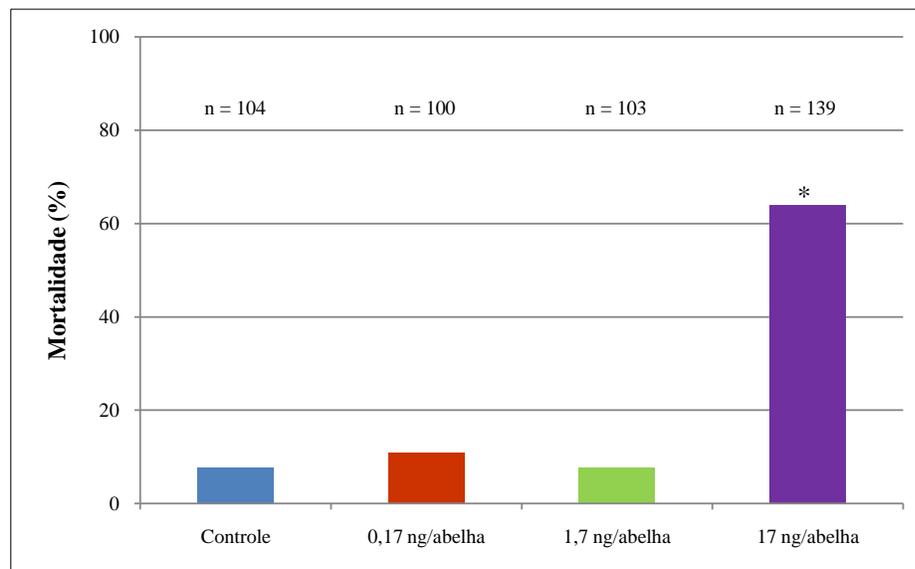
**Tabela 17:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Tiametoxam e grupo controle 1 hora após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos durante o teste. \* = diferença significativa quando comparada com o grupo controle.

Sacarose (%)	Doses do Tiametoxam (ng/abelha)			
	Controle (n = 96)	0,17 (n = 89)	1,7 (n = 95)	17 (n = 50)
<b>0,1</b>	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>0,3</b>	0,0	0,0	1,0	2,0
<b>1,0</b>	8,3	10,1	8,4	2,0
<b>3,0</b>	30,2	32,6	29,5	6,0*
<b>10,0</b>	63,5	61,8	61,0	32,0*
<b>30,0</b>	76,0	75,3	74,7	50,0*
<b>50,0</b>	93,7	87,6	84,2	62,0*
<b>Mortalidade</b>	7,7	11,0	7,8	64,0*

A tabela 16 também indica que a mortalidade durante a execução do teste de reflexo de extensão da probóscide foi significativa entre os grupos de abelhas testados ( $\chi^2 = 152,055$ ;  $p < 0,0001$ ). No teste *a posteriori* verificou-se que o grupo experimental que recebeu a dose 17 ng/abelha apresentou mortalidade significativa em relação ao grupo controle (tabela 17 e figura 23).



**Figura 22:** 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 do Tiametoxam aplicados topicamente 1 hora antes do teste. \* = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Dunnet,  $p < 0,05$ ).



**Figura 23:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Tiametoxam aplicados topicamente 1 hora antes do teste. \* = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Dunnet,  $p < 0,05$ ).

Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 4 horas após a aplicação tópica do Tiametoxam verificou-se, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foram oferecidas as concentrações de 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 18). Para verificar qual grupo tratado diferiu do grupo controle (entre aqueles que apresentaram  $\chi^2$  significativo), foi aplicado o teste estatístico análogo ao Dunnett e verificou-se que o grupo de abelhas que recebeu a dose de 17 ng/abelha do princípio ativo apresentou diferença estatística significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentração de 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0%, enquanto que o grupo de abelhas que recebeu a dose de 1,7 ng/abelha do princípio ativo apresentou diferença estatística significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentração de 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 19, figura 24).

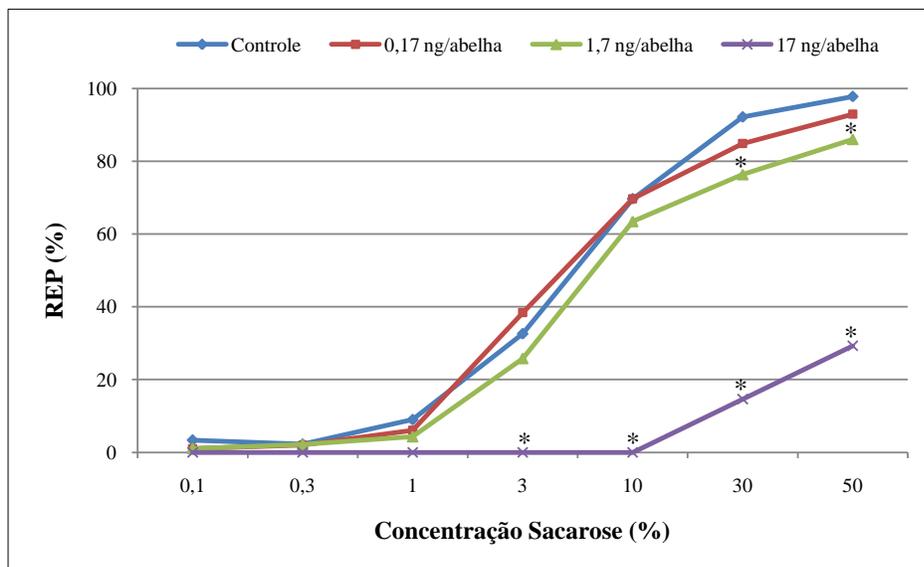
**Tabela 18:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado nos grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade observados no teste realizado 4 horas após a aplicação das doses do Tiametoxam. \* = valor significativo (GL = 3).

Sacarose (%)	$\chi^2$	p
0,1	2,900	0,4072
0,3	0,905	0,8241
1,0	4,710	0,1943
3,0	22,252	< 0,0001*
10,0	68,628	< 0,0001*
30,0	100,047	< 0,0001*
50,0	110,966	< 0,0001*
<b>Mortalidade</b>	100,812	< 0,0001*

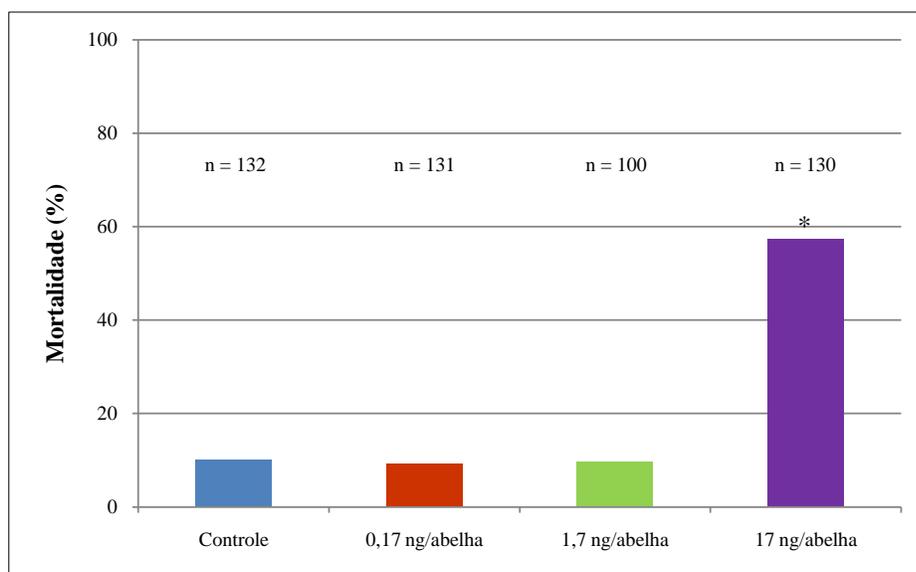
**Tabela 19:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Tiametoxam e grupo controle 4 horas após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos durante o teste. \* = diferença estatística significativa quando comparada com o grupo controle.

Sacarose (%)	Doses do Tiametoxam (ng/abelha)			
	Controle (n = 89)	0,17 (n = 99)	1,7 (n = 93)	17 (n = 41)
<b>0,1</b>	3,4	1,0	1,1	0,0
<b>0,3</b>	2,2	2,0	2,1	0,0
<b>1,0</b>	9,0	6,0	4,3	0,0
<b>3,0</b>	32,6	38,4	25,8	0,0*
<b>10,0</b>	69,7	69,7	63,4	0,0*
<b>30,0</b>	92,1	84,8	76,3*	14,6*
<b>50,0</b>	97,7	92,9	86,0*	29,3*
<b>Mortalidade</b>	10,1	9,2	9,7	57,3*

A tabela 18 também indica que a mortalidade durante a execução do teste de reflexo de extensão da probóscide foi significativa entre os grupos de abelhas tratados ( $\chi^2 = 100,812$ ;  $p < 0,0001$ ). No teste *a posteriori* verificou-se que o grupo experimental que recebeu a dose 17 ng/abelha apresentou mortalidade significativa em relação ao grupo controle (tabela 19 e figura 25).



**Figura 24:** 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 do Tiametoxam aplicados topicamente 4 horas antes do teste. Asteriscos acima dos pontos indicam diferença significativa quando comparada ao grupo controle.



**Figura 25:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Tiametoxam aplicados topicamente 4 horas antes do teste. Asterisco acima da barra indica diferença significativa quando comparada ao grupo controle.

Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 24 horas após a aplicação tópica do Tiametoxam verificou-se, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foram oferecidas as concentrações de 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 20). Para verificar qual grupo tratado diferiu do grupo controle (entre aqueles que apresentaram  $\chi^2$  significativo), foi aplicado o teste estatístico análogo ao Dunnett e verificou-se que o grupo de abelhas que recebeu a dose de 17 ng/abelha do princípio ativo apresentou diferença significativa na proporção de REP quando foi oferecida a concentração de 50,0% de sacarose (tabela 21 e figura 26).

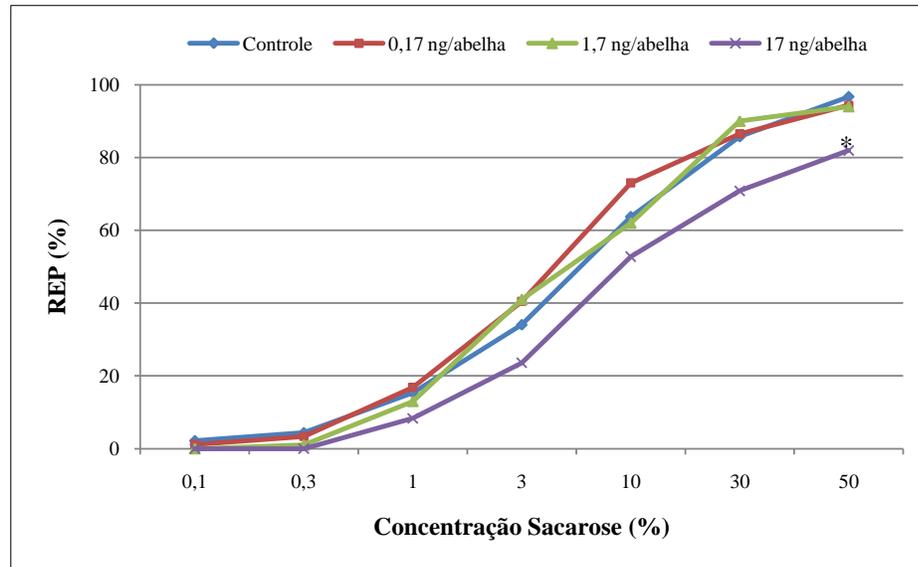
**Tabela 20:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado nos grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade observados no teste realizado 24 horas após a aplicação das doses do Tiametoxam. \* = valor significativo (GL = 3).

Sacarose (%)	$\chi^2$	p
<b>0,1</b>	3,506	0,3200
<b>0,3</b>	7,067	0,0698
<b>1,0</b>	2,772	0,4281
<b>3,0</b>	6,799	0,0786
<b>10,0</b>	7,145	0,0674
<b>30,0</b>	12,640	0,0055*
<b>50,0</b>	14,346	0,0025*
<b>Mortalidade</b>	11,848	0,0079*

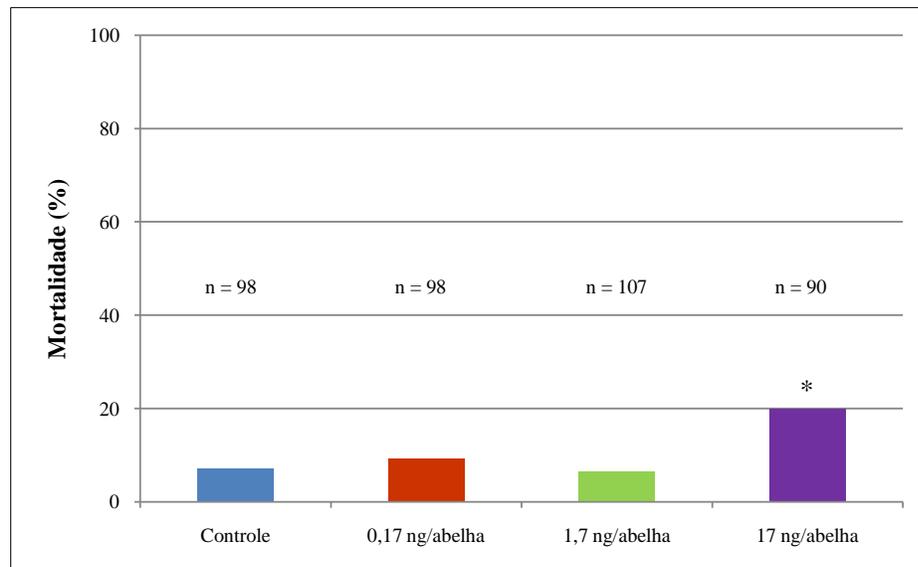
**Tabela 21:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Tiametoxam e grupo controle 24 horas após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos durante o teste. \* = diferença significativa quando comparada com o grupo controle.

Sacarose (%)	Doses do Tiametoxam (ng/abelha)			
	Controle (n = 91)	0,17 (n = 89)	1,7 (n = 100)	17 (n = 72)
<b>0,1</b>	2,2	1,1	0,0	0,0
<b>0,3</b>	4,4	3,4	1,0	0,0
<b>1,0</b>	15,4	16,8	13,0	8,3
<b>3,0</b>	34,0	40,4	41,0	23,6
<b>10,0</b>	63,7	73,0	62,0	52,8
<b>30,0</b>	85,7	86,5	90,0	70,8
<b>50,0</b>	96,7	94,4	94,0	81,9*
<b>Mortalidade</b>	7,1	9,2	6,5	20*

A tabela 21 também indica que a mortalidade durante a execução do teste de reflexo de extensão da probóscide foi significativa entre os grupos de abelhas testados ( $\chi^2 = 11,848$ ;  $p = 0,0079$ ). No teste *a posteriori* verificou-se que o grupo experimental que recebeu a dose 17 ng/abelha apresentou mortalidade significativa em relação ao grupo controle (tabela 21 e figura 27).



**Figura 26:** 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 do Tiametoxam aplicados topicamente 24 horas antes do teste. \* = diferença significativa quando comparada ao grupo controle.



**Figura 27:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Tiametoxam aplicados topicamente 24 horas antes do teste. \* = diferença significativa quando comparada ao grupo controle.

### 5.3.1.3. Fipronil

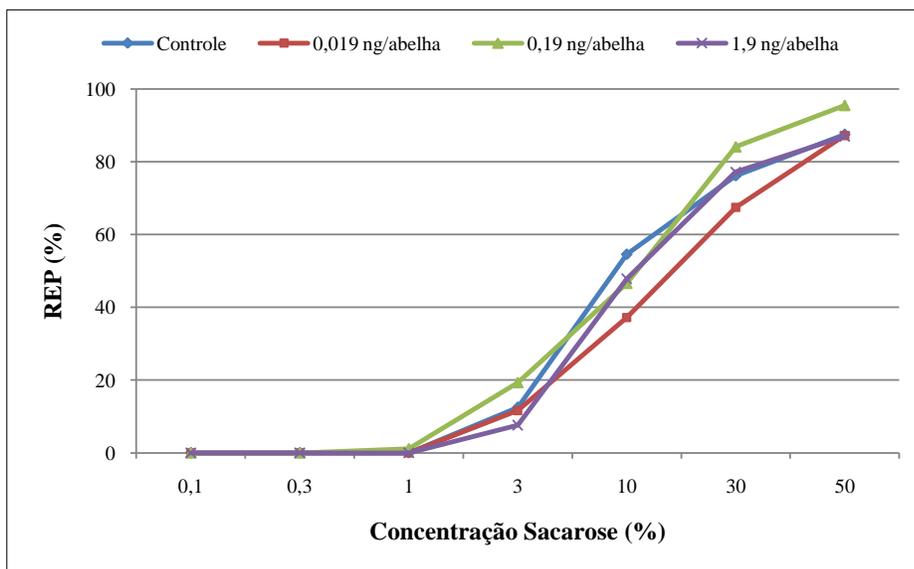
Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 1 hora após a aplicação tópica do Fipronil não se verificou, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foram oferecidas as diversas concentrações de sacarose. Também não foi verificada mortalidade significativa entre os grupos (tabela 22). As proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e as proporções de mortalidade ocorridos nos grupos após a aplicação das doses do princípio ativo estão dispostas na tabela 23 e figuras 28 e 29.

**Tabela 22:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado nos grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade observados no teste realizado 1 hora após a aplicação das doses do Fipronil. \* = valor significativo (GL = 3).

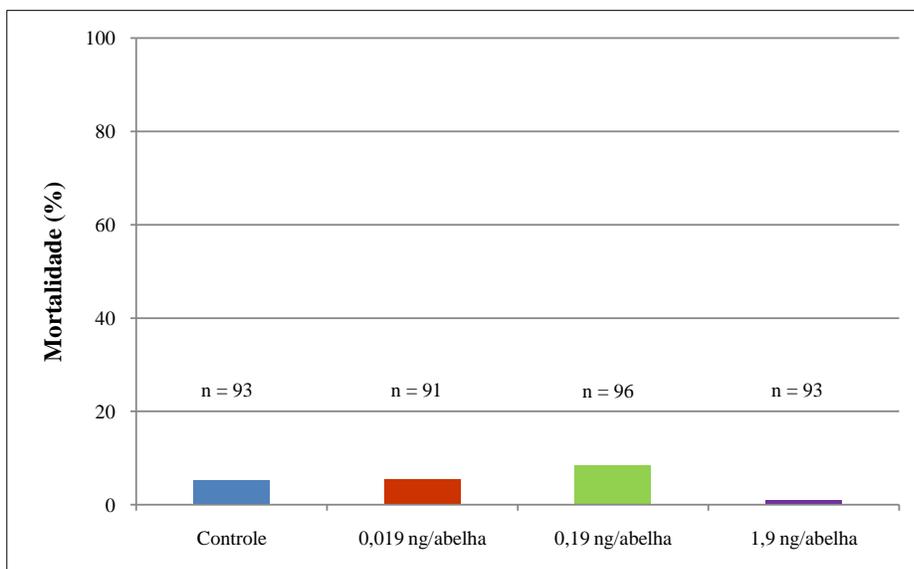
Sacarose (%)	$\chi^2$	p
0,1	-	-
0,3	-	-
1,0	3,031	0,3868
3,0	6,371	0,0949
10,0	5,336	0,1488
30,0	6,720	0,0814
50,0	4,695	0,1955
<b>Mortalidade</b>	5,236	0,1553

**Tabela 23:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Fipronil e grupo controle 1 hora após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos.

Sacarose (%)	Doses do Fipronil (ng/abelha)			
	Controle (n = 88)	0,019 (n = 86)	0,19 (n = 88)	1,9 (n = 92)
<b>0,1</b>	0	0	0	0
<b>0,3</b>	0	0	0	0
<b>1,0</b>	0	0	1,1	0
<b>3,0</b>	12,5	11,6	19,3	7,6
<b>10,0</b>	54,5	37,2	46,6	47,8
<b>30,0</b>	76,1	67,4	84,0	77,2
<b>50,0</b>	87,5	87,2	95,4	86,9
<b>Mortalidade</b>	5,4	5,5	8,5	1,1



**Figura 28:** 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 do Fipronil aplicados topicamente 1 hora antes do teste.



**Figura 29:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Fipronil aplicados topicamente 1 hora antes do teste.

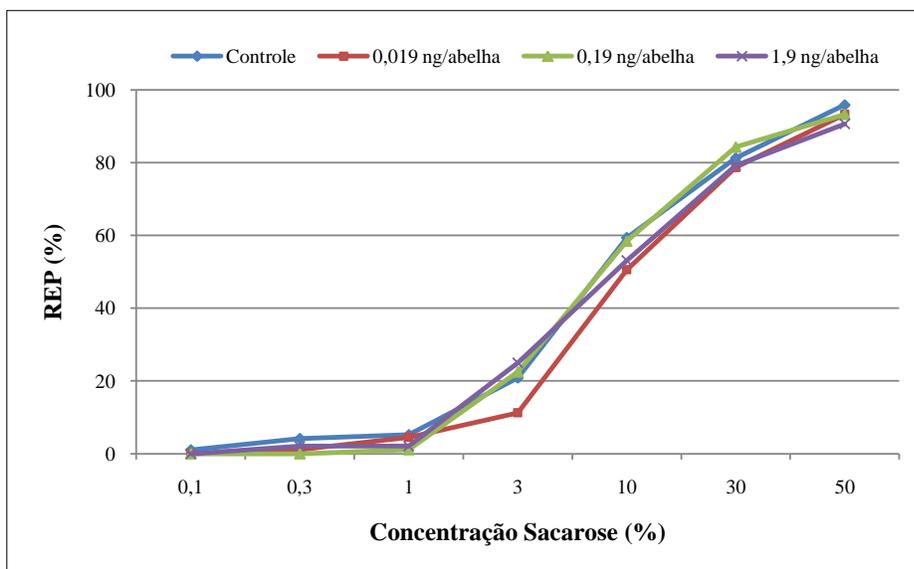
Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 4 horas após a aplicação tópica do Fipronil não se verificou, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foram oferecidas as diversas concentrações de sacarose. Também não foi verificada mortalidade significativa entre os grupos (tabela 24). As proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e as proporções de mortalidade ocorridos nos grupos após a aplicação das doses do princípio ativo estão dispostas na tabela 25 e figuras 30 e 31.

**Tabela 24:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado nos grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade observados no teste realizado 4 horas após a aplicação das doses do Fipronil. \* = valor significativo (GL = 3).

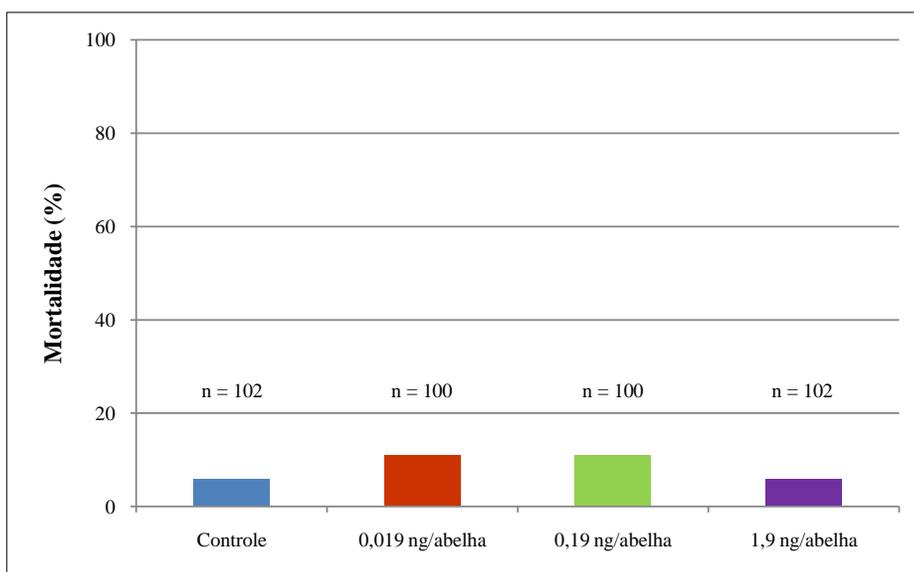
Sacarose (%)	$\chi^2$	p
<b>0,1</b>	2,862	0,4134
<b>0,3</b>	4,695	0,1956
<b>1,0</b>	3,311	0,3461
<b>3,0</b>	6,154	0,1044
<b>10,0</b>	1,988	0,5749
<b>30,0</b>	1,133	0,7690
<b>50,0</b>	2,067	0,5586
<b>Mortalidade</b>	3,432	0,3297

**Tabela 25:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Fipronil e grupo controle 4 horas após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos durante o teste.

Sacarose (%)	Doses do Fipronil (ng/abelha)			
	Controle (n = 96)	0,019 (n = 89)	0,19 (n = 89)	1,9 (n = 96)
0,1	1,0	0	0	0
0,3	4,2	1,1	0	2,0
1,0	5,2	4,5	1,1	2,0
3,0	20,8	11,2	22,5	25,0
10,0	59,4	50,6	58,4	53,1
30,0	81,2	78,6	84,3	79,2
50,0	95,9	93,2	93,2	90,6
<b>Mortalidade</b>	5,6	11,0	11,0	5,6



**Figura 30:** 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 do Fipronil aplicados topicamente 4 horas antes do teste.



**Figura 31:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Fipronil aplicados topicamente 4 horas antes do teste.

Ao analisar as proporções de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide (REP) no teste realizado 24 horas após a aplicação tópica do Fipronil verificou-se, através da análise do  $\chi^2$ , diferença significativa entre os grupos de abelhas testados (DL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>/10, DL<sub>50</sub>/100 e grupo controle) quando foram oferecidas as concentrações de 3,0, 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 26). Para verificar qual grupo tratado diferiu do grupo controle (entre aqueles que apresentaram  $\chi^2$  significativo), foi aplicado o teste estatístico análogo ao Dunnett e verificou-se que o grupo de abelhas que recebeu a dose de 1,9 ng/abelha do princípio ativo apresentou diferença estatística significativa na proporção de REP quando foram oferecidas as concentrações de 10,0, 30,0 e 50,0% de sacarose (tabela 27 e figura 32).

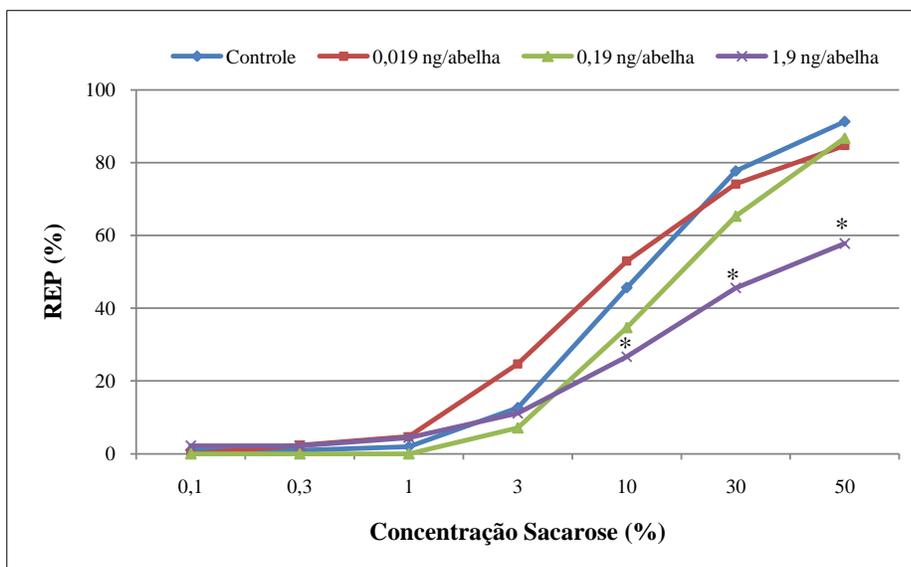
**Tabela 26:** Resultado do teste do  $\chi^2$  realizado nos grupos de abelhas que apresentaram reflexo de extensão da probóscide e da mortalidade observados no teste realizado 24 horas após a aplicação das doses do Fipronil. \* = valor significativo (GL = 3).

Sacarose (%)	$\chi^2$	p
<b>0,1</b>	3,818	0,2818
<b>0,3</b>	2,646	0,4494
<b>1,0</b>	5,365	0,1469
<b>3,0</b>	12,987	0,0047*
<b>10,0</b>	15,120	0,0017*
<b>30,0</b>	25,516	< 0,0001*
<b>50,0</b>	82,830	< 0,0001*
<b>Mortalidade</b>	4,824	0,1852

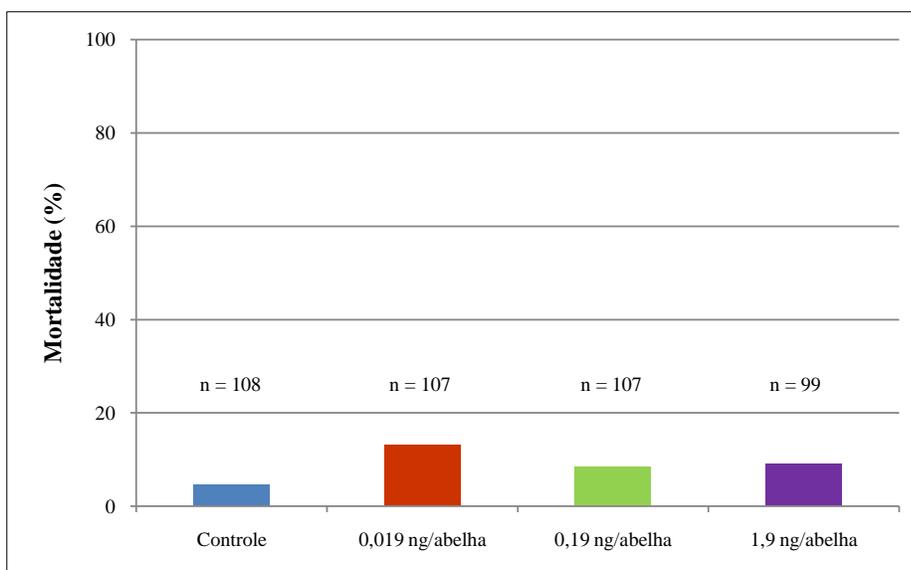
**Tabela 27:** Proporção de abelhas (%) que apresentaram reflexo de extensão da probóscide nos grupos que receberam as doses do Fipronil e grupo controle 24 horas após a aplicação. Também está representada a mortalidade ocorrida nos grupos durante o teste.

Sacarose (%)	Doses do Fipronil (ng/abelha)			
	Controle (n =103 )	0,019 (n = 85)	0,19 (n = 98)	1,9 (n = 90)
<b>0,1</b>	1,0	0	0	2,2
<b>0,3</b>	1,0	2,3	0	2,2
<b>1,0</b>	1,9	4,7	0	4,4
<b>3,0</b>	12,6	24,7	7,1	11,1
<b>10,0</b>	45,6	52,9	34,7	26,7*
<b>30,0</b>	77,7	74,1	65,3	45,5*
<b>50,0</b>	91,2	84,7	86,7	57,8*
<b>Mortalidade</b>	4,6	13,0	8,4	9,0

Não foi observada mortalidade significativa entre os grupos de abelhas testados (tabela 26). A tabela 27 e a figura 33 indicam a proporção de mortalidade observada em cada grupo 24 horas após a aplicação.



**Figura 32:** 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 do Fipronil aplicados topicamente 24 horas antes do teste. Asteriscos acima dos pontos indicam diferença significativa quando comparada ao grupo controle.



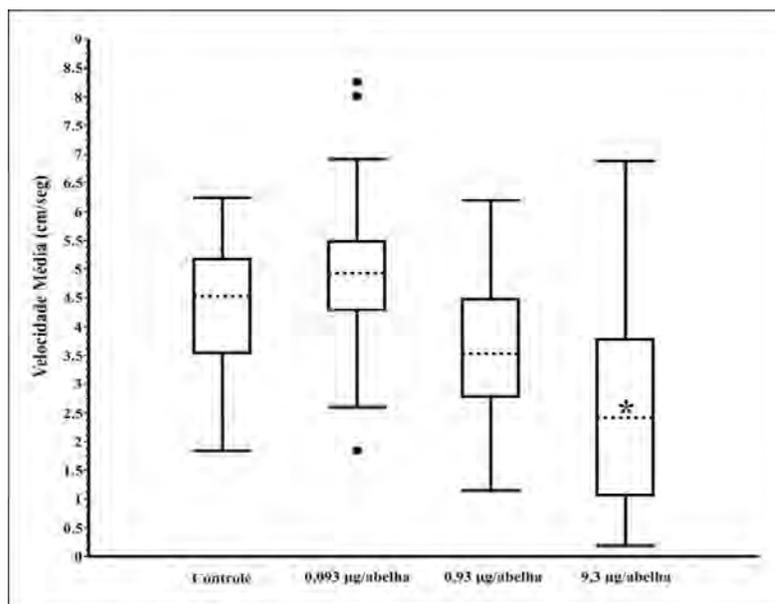
**Figura 33:** Proporção de abelhas que morreram durante o teste de reflexo de extensão da probóscide. As barras representam o grupo controle e as demais doses do Fipronil aplicados topicamente 24 horas antes do teste.

### 5.3.2. Teste de locomoção

#### 5.3.2.1. Acetamiprido

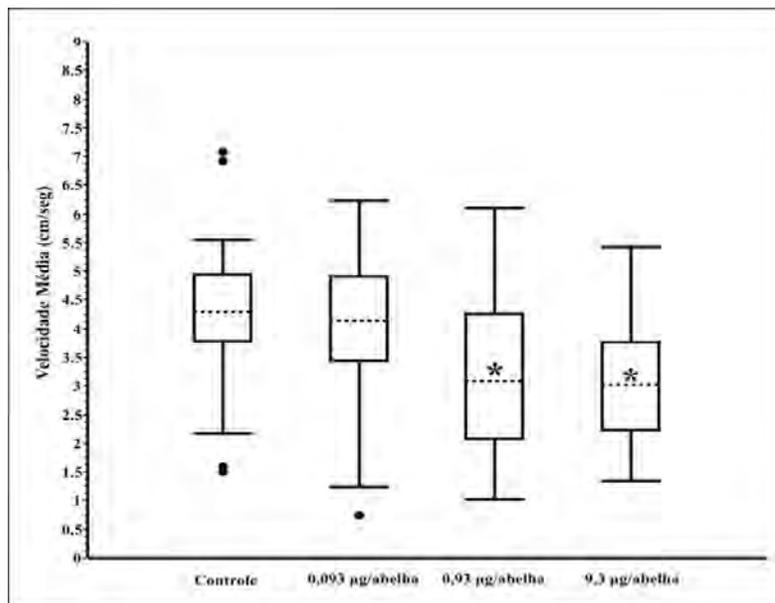
Comparações das velocidades médias dos grupos de abelhas no teste realizado 1 hora após a aplicação tópica do Acetamiprido, revelaram, através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 38,7892$ ,  $GL = 3$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 36$ ), diferença significativa entre os grupos de abelhas testados ( $DL_{50}$ ,  $DL_{50}/10$ ,  $DL_{50}/100$  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  $9,3 \mu\text{g}/\text{abelha}$  (figura 34).

No teste realizado 4 horas após a aplicação do princípio ativo também foi verificada diferença significativa na velocidade média entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 24,1211$ ,  $GL = 3$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 36$ ). Na comparação feita entre os grupos, realizado através do método de Dunn, verificou-se que tanto a velocidade média das abelhas do grupo onde foi aplicada a dose de  $0,93 \mu\text{g}/\text{abelha}$  quanto a velocidade média apresentada pelas abelhas do grupo onde foi aplicada a dose de  $9,3 \mu\text{g}/\text{abelha}$  diferiram significativamente da velocidade média apresentada pelas abelhas do grupo controle (figura 35).

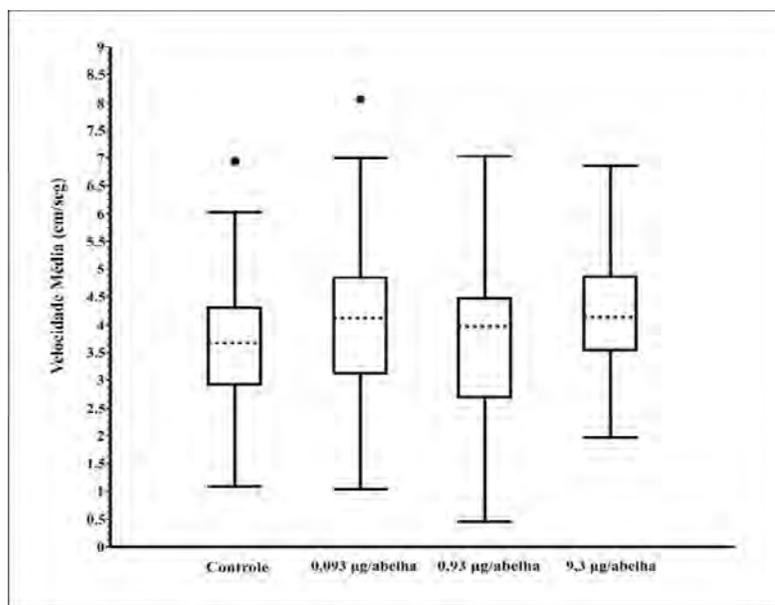


**Figura 34:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Acetamiprido aplicado topicamente 1 hora antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).

No teste realizado 24 horas após a aplicação do princípio ativo não foi verificada diferença significativa entre as velocidades médias apresentadas pelas abelhas dos grupos experimentais através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 4,2130$ ,  $GL = 3$ ,  $p = 0,2394$ ,  $n = 36$ ) (figura 36).



**Figura 35:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Acetamiprido aplicado topicamente 4 horas antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).

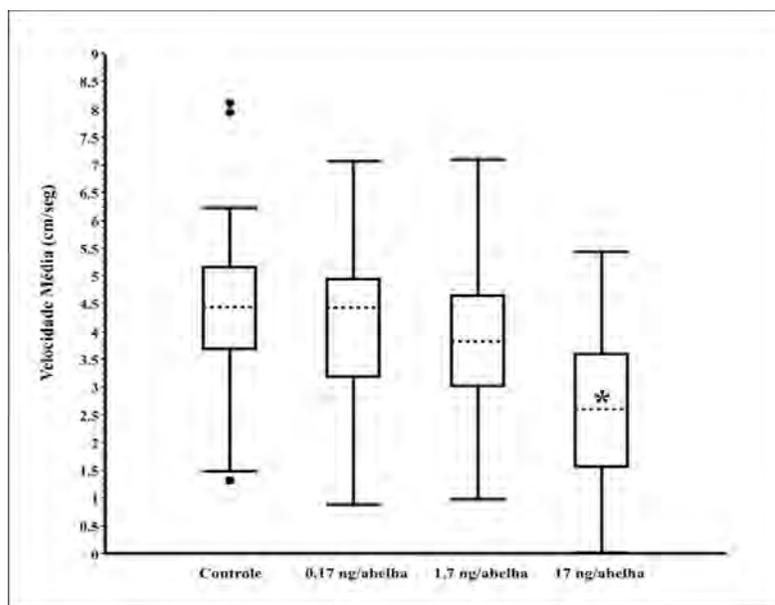


**Figura 36:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Acetamiprido aplicado topicamente 24 horas antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).

### 5.3.2.2. Tiametoxam

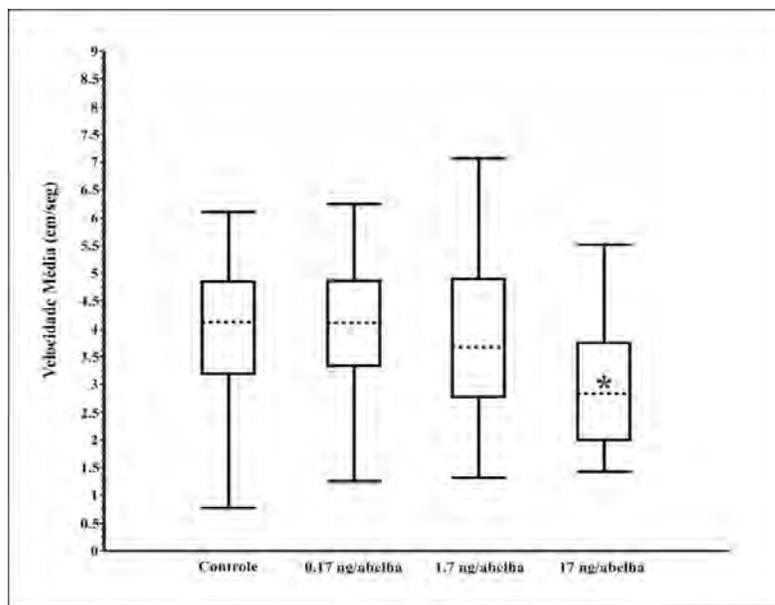
Comparando as velocidades médias dos grupos de abelhas no teste realizado 1 hora após a aplicação tópica do Tiametoxam, verificou-se, através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 28,3519$ ,  $GL = 3$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 36$ ), diferença significativa entre os grupos de abelhas testados ( $DL_{50}$ ,  $DL_{50}/10$ ,  $DL_{50}/100$  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 17 ng/abelha (figura 37).

No teste realizado 4 horas após a aplicação do princípio ativo também foi verificada diferença entre as velocidades médias dos grupos de abelhas através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 13,9661$ ,  $GL = 3$ ,  $p = 0,0030$ ,  $n = 36$ ). Na comparação feita entre os grupos, realizado através do método de Dunn, verificou-se diferença significativa entre a velocidade média apresentada pelas abelhas do grupo controle e a velocidade média apresentada pelas abelhas do grupo onde foi aplicada a dose de 17 ng/abelha (figura 38).

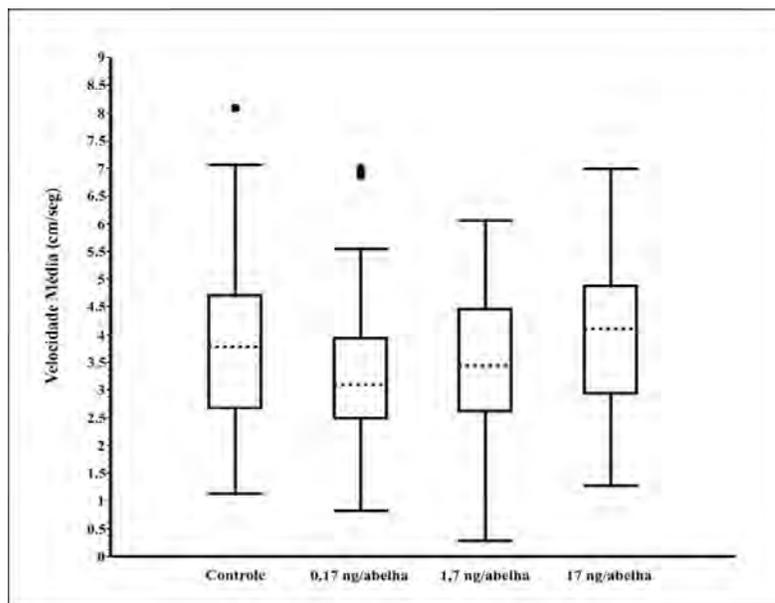


**Figura 37:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Tiametoxam aplicado topicamente 1 hora antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).

No teste realizado 24 horas após a aplicação do princípio ativo não foi verificada diferença significativa entre as velocidades médias dos grupos através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 4,3733$ ,  $GL = 3$ ,  $p = 0,2239$ ,  $n = 36$ ) (figura 39).



**Figura 38:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Tiametoxam aplicado topicamente 4 horas antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).



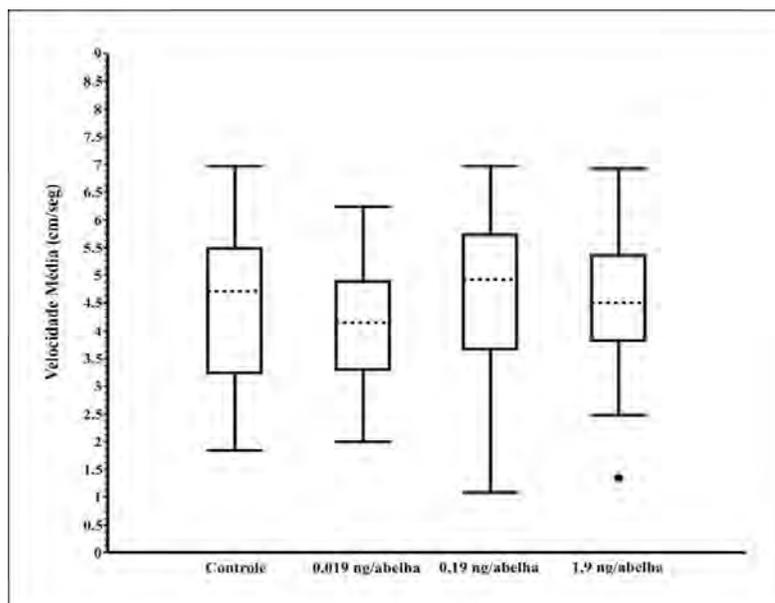
**Figura 39:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Tiametoxam aplicado topicamente 24 horas antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).

### 5.3.2.3. Fipronil

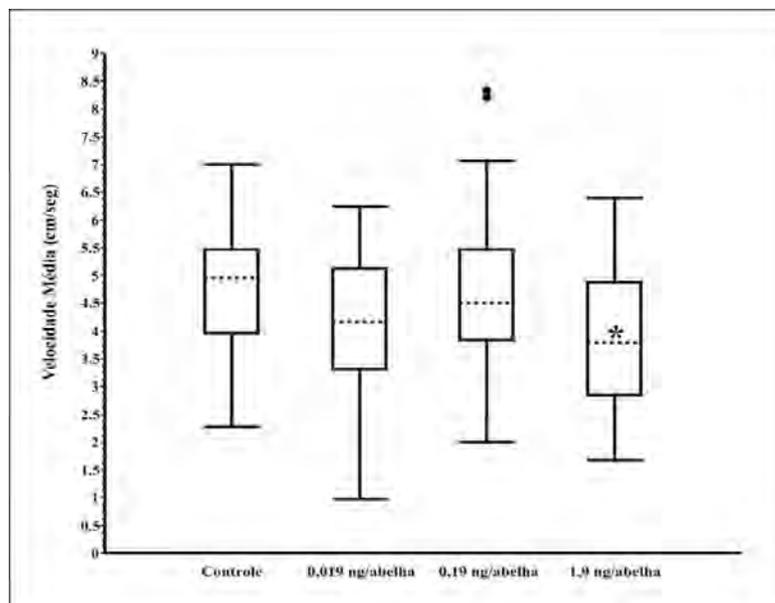
Comparando as velocidades médias dos grupos de abelhas no teste realizado 1 hora após a aplicação tópica do Fipronil, não se verificou diferença significativa através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 2,3399$ ;  $GL = 3$ ;  $p = 0,5049$ ;  $n = 36$ ) (figura 40).

No teste realizado 4 horas após a aplicação tópica do princípio ativo verificou-se diferença significativa entre a velocidade média dos grupos de abelhas através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 12,9520$ ;  $GL = 3$ ;  $p = 0,0047$ ;  $n = 36$ ). Na comparação feita entre os grupos, realizado através do método de Dunn, verificou-se diferença estatística entre a velocidade média apresentada pelas abelhas do grupo controle e a velocidade média apresentadas pelas abelhas do grupo onde foi aplicada a dose de 1,9 ng/abelha (figura 41).

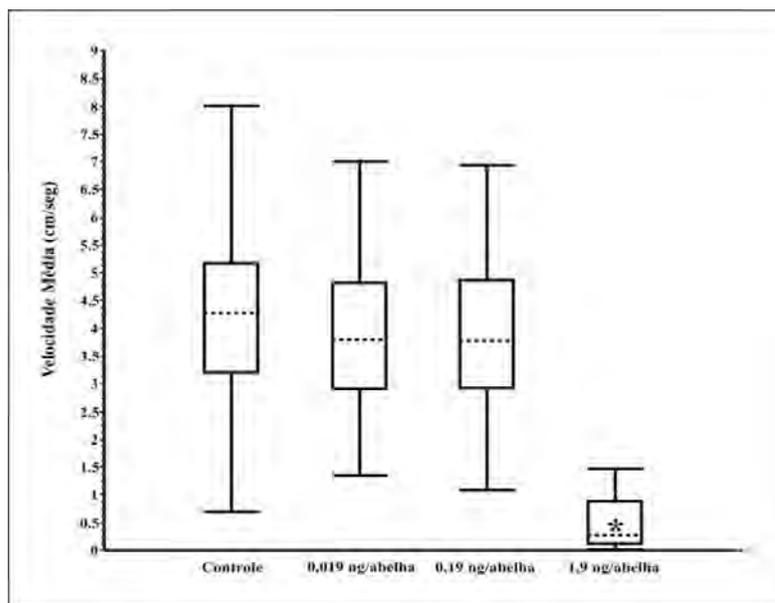
Já no teste realizado 24 horas após a aplicação tópica do princípio ativo também se verificou diferença estatística significativa entre as velocidades médias dos grupos de abelhas através do teste de Kruskal-Wallis ( $H = 79,5707$ ;  $GL = 3$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 36$ ). Na comparação feita entre os grupos, realizado através do método de Dunn, verificou-se diferença entre a velocidade média apresentada pelas abelhas do grupo controle e a velocidade média apresentada pelas abelhas do grupo onde foi aplicada a dose de 1,9 ng/abelha (figura 42).



**Figura 40:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Fipronil aplicado topicamente 1 hora antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).



**Figura 41:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Fipronil aplicado topicamente 4 horas antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).



**Figura 42:** Velocidade média das abelhas. Os box-plots representam o grupo controle e as demais doses do Fipronil aplicado topicamente 24 horas antes do teste. \* (interior das barras) = diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Teste Kruskal-Wallis; Dunn,  $n = 36$ ,  $p < 0,05$ ).

Não foi observada mortalidade durante os testes de locomoção realizados nos diversos intervalos de tempo após a aplicação tópica dos três ingredientes ativos.

## 6. DISCUSSÃO

A síndrome conhecida como CCD (Colony Collapse Disorder), caracterizada por alguns sintomas como a total ausência de abelhas mortas na colônia ou apiário, rápida perda de abelhas adultas e a falta de cleptoparasitas e que se acredita ser a causa da grande perda de colônias nos EUA e Europa, aparentemente não é ocasionada por um único fator, mas sim por um conjunto de fatores que podem ocorrer simultaneamente e até influenciar mutuamente. Doenças causadas por bactérias, fungos, vírus, microsporídeo, ação de parasitas, predadores e até mesmo as novas gerações de inseticidas podem contribuir para um enfraquecimento da colônia proporcionando condições para que patógenos oportunistas atuem e causem danos severos (COX-FOSTER; vanENGELSDORP, 2009; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; MORSE; FLOTTUM, 1997; OLDROYD, 2007; THOMPSON, 2003; vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

No Brasil, as monografias dos inseticidas Acetamiprido, Tiametoxam e Fipronil apresentam autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comercialização em diversas formulações.

O Acetamiprido é comercializado pela Iharabras S.A. Indústrias Químicas nas seguintes formulações: concentrado solúvel - Convence<sup>®</sup> (200g/L); pó solúvel - Mospilan<sup>®</sup> (200g/kg); pó molhável – Pirâmide<sup>®</sup> (700g/Kg). A Bayer CropScience apresenta um único produto: Saurus<sup>®</sup> (200g/kg) - pó solúvel. Com exceção do produto Pirâmide<sup>®</sup>, 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.

O Tiametoxam é comercializado pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda nas formulações: pó dispersível - Cruise<sup>®</sup> (700g/kg); granulado – Actara<sup>®</sup> 10 GR (10g/kg); granulado dispersível - Actara<sup>®</sup> 250 WG (250g/kg). O produto Cruise<sup>®</sup> é utilizado para o tratamento de sementes, o Actara<sup>®</sup> 10 GR é utilizado em tratamento terrestre e o Actara<sup>®</sup> 250 WG é utilizado em aplicações terrestres e aéreas. Dependendo do tipo de cultivo e diluição dos produtos Actara<sup>®</sup> 10 GR e Actara<sup>®</sup> 250 WG pode atingir a concentração de aplicação

variando entre 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ , valores que excedem o valor da  $\text{DL}_{50}$  para abelhas em 29,4 e 58,8 vezes, respectivamente.

O Fipronil é comercializado pela Basf S.A. em diversas formulações: isca granulada – Blitz<sup>®</sup> (0,03g/kg) usado como formicida com aplicação terrestre; suspensão concentrada - Standak<sup>®</sup> (250 g/L) usado no tratamento de sementes; granulado – Regent<sup>®</sup> 20 G (20g/kg) com aplicação no solo; granulado dispersível - Regent<sup>®</sup> 80 WG (800 g/kg) com aplicação terrestre e aérea; suspensão concentrada - Klap<sup>®</sup> (200g/L) com aplicação terrestre e aérea.

Dependendo do cultivo e do método de aplicação, o Regent<sup>®</sup> 80 WG e Klap<sup>®</sup> podem apresentar uma concentração de aplicação de 400 e 150  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estes valores excedem em até 200 vezes o valor observado nos teste com Fipronil capazes de provocar alterações no comportamento das abelhas.

O método mais utilizado de aplicação dos inseticidas é a pulverização, que provoca o aumento da dispersão do princípio ativo. Além disso, a pulverização aérea pode acarretar o “efeito deriva” fazendo com que um determinado inseticida atinja organismos não alvos localizados distantes do local de aplicação.

Os testes de avaliação de efeitos de tais produtos em organismos não alvos, como as abelhas, e pertencentes à fauna local mostram-se de grande importância, pois podem conduzir discussões sobre a comercialização destes produtos dentro dos países.

A União Européia é a que apresenta o maior número de restrições ao uso de inseticidas, como a Bifentrina, Cialotrina, Triazofós e Endosulfan. A permissão de comercialização é dada pela inclusão do inseticida na Diretiva 91/414/EEC, porém cada Estado-Membro decide a aceitação da inclusão desta substância. Caso algum produto seja excluído da Diretiva 91/414/EEC os Estados-Membros que comercializam o produto tem um prazo determinado para realizar sua retirada (EUROPEAN COMMISSION, 2010).

Os ingredientes ativos analisados no presente trabalho (Acetamiprido, Tiametoxam e Fipronil) estão todos incluídos na Diretiva 91/414/EEC, ou seja, liberados para comercialização em toda a zona do Euro; porém, com ressalvas importantes. O Tiametoxam e o Fipronil somente estão incluídos na lista desde que sejam utilizados exclusivamente para o tratamento de sementes para que as abelhas sejam protegidas do contato de tais produtos. Neste caso também incluem os inseticidas neonicotinoides Imidacloprido e a Clotianidina. Mesmo com esta autorização, poucos países autorizaram a comercialização do Fipronil, entre eles a Bélgica, Espanha e França. Dos 27 Estados-Membros 12 autorizam a comercialização Fipronil, 24 autorizam a comercialização do Acetamiprido e 25 autorizam a comercialização do Tiametoxam (EUROPEAN COMMISSION, 2010).

Os EUA apresentam um grande número de produtos registrados, o que reflete uma legislação mais permissiva para a comercialização de tais inseticidas. Enquanto que no Brasil existem 12 produtos registrados para Acetamiprido, Tiametoxam e Fipronil, nos EUA existem 41 produtos registrados (ANVISA, 2002; NPIRS, 2010). Aproximadamente 66.824 lbs (aproximadamente 30,5 mil toneladas) de Fipronil foram utilizados na Califórnia, em 2005, para controle de pragas. Porém o produto não tem registro para o uso agrícola neste estado (GUNASEKARA et al., 2007). No Brasil, tal característica também é marcante já que produtos proibidos há muito tempo em diversos países como o Endosulfan ainda são comercializados no país (ANVISA, 2002).

### 6.1. Ingrediente ativo X Toxicidade

Os valores de  $DL_{50}$  obtidos para Acetamiprido, Tiametoxam e Fipronil estão próximos aos relatados por diversos autores, representados na tabela 28, que também apresenta, comparativamente, os valores de  $DL_{50}$  de diversos ingredientes ativos analisados em abelhas melíferas tratadas oral e topicamente. Essa diferença observada entre os valores obtidos neste trabalho com os valores registrados por diversos 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.

A toxicidade tóxica de inseticidas neonicotinoides em abelhas melíferas pode ser classificada em dois grupos: um com a presença do grupo funcional nitro e outro com a presença do grupo funcional ciano. Os inseticidas com o agrupamento nitro são os mais tóxicos com Imidacloprido apresentando uma  $DL_{50}$  no valor de 17,9 ng/abelha, seguido de Clotianidina com valor de 21,8 ng/abelha, Tiametoxam com 29,9 ng/abelha, Dinotefuram com valor de 75 ng/abelha e Nitempiram com valor igual a 138 ng/abelha. Já os neonicotinoides que apresentam o grupo funcional ciano apresentam uma toxicidade menor com Acetamiprido apresentando uma  $DL_{50}$  com valor de 7,1 µg/abelha e o Tiacloprido 14,6 µg/abelha (IWASA et al., 2004). Stark, Jepson e Mayer (1995) e Suchail, Guez e Belzunces (2000) observaram que a  $DL_{50}$  do Imidacloprido variou de 6,7 a 23,8 ng/abelha. Senn et al. (1998 apud IWASA et al., 2004) estimou a  $DL_{50}$  do Tiametoxam em 24 ng/abelha e Elbert et al., (2000 apud IWASA et al., 2004) reportou que o Tiacloprido apresentou uma  $DL_{50}$  no valor de 24,2 µg/abelha.

As diferenças nos valores de  $DL_{50}$  podem ser explicadas devido às propriedades físico-químicas que estes dois grupos de inseticidas apresentam, pois a presença do grupo funcional nitro confere ao inseticida maior afinidade ao receptor de acetilcolina e, portanto maior potência do que o grupo funcional ciano (LIU; LANFORD; CASIDA, 1993; TOMIZAWA; YAMAMOTO, 1993; TOMIZAWA; LEE; CASIDA, 2000; TOMIZAWA; CASIDA, 2003). Esta maior afinidade aos receptores de acetilcolina faz com que o Imidacloprido apresente uma toxicidade 400 vezes maior que o Acetamiprido (IWASA et al., 2004).

**Tabela 28:** Valores de DL<sub>50</sub> de diversas classes de inseticidas avaliados em *A. mellifera* após tratamento por ingestão e tópico

	Ingestão	Tópico	Referência
<b>Piretroide</b>			
Bifentrina	100 ng/abelha	15 ng/abelha	Suchail, Guez e Belzunces (2000)
	-	34 ng/abelha	Ellis, Siegfried e Spawn (1997)
Cialotrina	-	27 ng/abelha	Smart e Stevenson (1982)
Deltametrina	-	51 ng/abelha	Smart e Stevenson (1982)
	79 ng/abelha	1,5 ng/abelha	European Commission (2002)
Cipermetrina	160 ng/abelha	-	Bendahou, Bounias e Fleche (1997)
	35 ng/abelha	20 ng/abelha	European Commission (2005a)
<b>Organofosforado</b>			
Clorpirifós	250 ng/abelha	59 ng/abelha	Suchail, Guez e Belzunces (2000); European Commission (2005b)
Triazofós	-	55 ng/abelha	Smart e Stevenson (1982)
Dimetoato	152 ng/abelha	-	Jaycox (1964)
	-	120 ng/abelha	Smart e Stevenson (1982)
Malation	-	270 ng/abelha	Smart e Stevenson (1982)
	400 ng/abelha	160 ng/abelha	EFSA (2009)

Tabela 28, continuação...

<b>Clorociclodieno</b>			
Endosulfan		7,1 µg/abelha	Smart e Stevenson (1982)
<b>Neonicotinoide</b>			
Imidacloprido	5,0-60,0 ng/abelha	6,0-24,0 ng/abelha	Stark, Jepson e Mayer (1995); Suchail, Guez e Belzunces (2000; 2001)
	3,7-70,3 ng/abelha	42,2-129,0 ng/abelha	EFSA (2008)
	-	17,9 ng/abelha	Iwasa et al. (2004)
Clotianidina	-	21,8 ng/abelha	Iwasa et al. (2004)
	3,7 ng/abelha	44,2 ng/abelha	European Commission (2005c)
Tiametoxam	-	29,9 ng/abelha	Iwasa et al. (2004)
	-	24,0 ng/abelha	Senn et al. (1998 apud IWASA et al., 2004)
	5,0 ng/abelha	24,0 ng/abelha	European Commission (2006)
Dinotefuram	-	75,0 ng/abelha	Iwasa et al. (2004)
Nitempiram	-	138,0 ng/abelha	Iwasa et al. (2004)
Acetamiprido	-	7,1 µg/abelha	Iwasa et al. (2004)
	14,5 µg/abelha	8,0 µg/abelha	European Commission (2004a)
Tiacloprido	-	14,6 µg/abelha	Iwasa et al. (2004)
	-	24,2 µg/abelha	Elbert et al. (2000 apud Iwasa et al., 2004)
	17,3 µg/abelha	38,8 µg/abelha	European Commission (2004b)

Tabela 28, continuação...

**Pirazóis**

Fipronil	4,17 ng/abelha	5,93 ng/abelha	EFSA (2006)
	-	4,0 ng/abelha	Tingle et al. (2003)
		6,2 ng/abelha	Decourtye (2002 apud El Hassani et al. , 2005)
		12,1 ng/abelha	Li et al. (2010).

O valor de 1,9 ng/abelha para a DL<sub>50</sub> do Fipronil é o mais baixo valor entre os ingredientes ativos testados. Ele apresentou uma toxicidade 4.895 maior que o Acetamiprido e 8,9 vezes maior que o Tiametoxam. Este valor também é o menor quando comparado com outros inseticidas. Os valores obtidos com Imidacloprido em *A. mellifera*, (4 a 24 ng/abelha) até então eram os mais baixos (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2000). Alguns dos inseticidas mais tóxicos, o organofosforado Triazofós (DL<sub>50</sub> com valor de 55 ng/abelha) e os piretroides Cialotrina, Bifentrina e Deltametrina (DL<sub>50</sub> com valores iguais a 27, 34 e 51 ng/abelha respectivamente) (ELLIS; SIEGFRIED; SPAWN, 1997; SMART; STEVENSON, 1982) são menos tóxicos para abelhas melíferas do que o Fipronil.

Portanto, Fipronil é um dos mais potentes inseticidas para abelhas melíferas e, como ressaltaram Tingle et al. (2003), esse produto não deve ser aplicado por meio de pulverização durante o período de florescimento de culturas atrativas para as abelhas. Da mesma forma Suchail, Guez e Belzunces (2000) sugerem que a aplicação do Imidacloprido (também por pulverização) seja evitada durante o período de florescimento, e que esta seja feita através do tratamento de sementes e utilização de grânulos para mitigar os efeitos em insetos polinizadores não alvo.

A maior toxicidade do Fipronil pode estar relacionada a diferentes sítios de ação dos neonicotinoides (AAJOUND; RAVANEL; TISSUT, 2003; HOROSZOK et al., 2001; IKEDA et al., 2003; ZHAO et al., 2004, 2005).

O inseticida Fipronil também apresenta maior toxicidade para as abelhas, em relação a outros inseticidas, quando se leva em consideração o valor da DL<sub>50</sub> calculado pelo tratamento por ingestão: 4,17 ng/abelha (EFSA, 2006). Enquanto que valores maiores foram observados

para outros inseticidas. Imidacloprido: 5 - 60 ng/abelha (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2000, 2001); 3,7 – 70,3 ng/abelha (EFSA, 2008). Tiametoxam: 5 ng/abelha (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Acetamiprido: 14,53 µg/abelha (EUROPEAN COMMISSION, 2004a). Dimetoato: 152 ng/abelha (JAICOX, 1964). Cipermetrina: 35 ng/abelha (EUROPEAN COMMISSION, 2005a) (tabela 28).

Suchail, Guez e Belzunces (2000) concluíram que, enquanto inseticidas como o Clorpirifós (organofosforado) em que a aplicação por contato é 4 vezes mais tóxica do que a ingestão ( $DL_{50}$  por contato = 59 ng/abelha;  $DL_{50}$  por ingestão = 250 ng/abelha), ou como a Bifentrina (piretroide), em que a aplicação tópica é sete vezes mais potente do que a oral ( $DL_{50}$  por contato = 15 ng/abelha;  $DL_{50}$  por ingestão = 100 ng/abelha), o neonicotinoide Imidacloprido apresenta maior toxicidade via oral do que por ação tópica, sendo 5 ng/abelha e 14-24 ng/abelha respectivamente. Porém, analisando os valores de  $DL_{50}$  da tabela 28, verifica-se que o Fipronil e todos neonicotinoides (exceto Acetamiprido) são mais tóxicos nas aplicações por ingestão do que nas aplicações por contato ao contrário dos inseticidas piretroides, organofosforados e clorociclodienos. A diferença com relação ao Acetamiprido, provavelmente, está relacionada ao rápido metabolismo que sofre nas abelhas em menos de 30 minutos (BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005).

Como o intestino é o principal compartimento do sistema de desintoxicação (WILKINSON; BRATTSTEN, 1972), ele deve apresentar um importante papel na formação dos metabólitos do Acetamiprido que, como verificado por Iwasa et al. (2004) apresentam pouca toxicidade para as abelhas melíferas.

Li et al. (2010) também observaram que os tratamentos por ingestão de Fipronil em abelhas apresentavam uma toxicidade 100 vezes maior do que aplicação tópica.

A diferença observada entre os valores de  $DL_{50}$  (tabela 28) para um mesmo inseticida pode estar relacionada com a variação da capacidade de desintoxicação que uma colônia apresenta em comparação a outra. Esta diferença pode variar de um fator no valor 2 ou até mesmo 100 (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2001).

A relação entre dose e mortalidade pode ser evidenciada nos testes realizados com Tiametoxam (tabela 5 e figura 11) e Fipronil (tabela 6 e figura 12), onde se observa uma taxa de mortalidade crescente quando aumenta a concentração do inseticida; porém no teste realizado com o Acetamiprido, a da mortalidade sofre uma redução com doses maiores (tabela 4, figura 10). 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.

Suchail, Guez e Belzunces (2000) observaram que, após a exposição oral ao Imidacloprido em operárias de abelhas melíferas, a cinética da mortalidade sofre um atraso quando são oferecidas doses maiores sugerindo que padrões metabólicos podem estar envolvidos com a toxicidade deste neonicotinoide. Além disso, a relação dose-mortalidade apresenta fases múltiplas (ascendentes e descendentes). Os sintomas de neurotoxicidade aparecem rapidamente enquanto que a mortalidade ocorre 4 horas após a intoxicação e se prolonga por mais de 96 horas (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2000).

Os neonicotinoides apresentam uma porção eletronegativa (nitroguanidina, nitrometileno ou cianoamidina) que confere seletividade a um sítio de ligação nos receptores de acetilcolina nos insetos (TOMIZAWA; LEE; CASIDA, 2000; TOMIZAWA; CASIDA, 2003). O metabolismo do neonicotinoide pode aumentar ou diminuir sua atividade dependendo do composto e especificidade com o receptor de acetilcolina (TOMIZAWA; CASIDA, 2003, 2005).

## **6.2. Ingrediente ativo X Tempo**

A ação de metabólitos também pode estar relacionada com decorrer do tempo, como observados nos resultados dos testes de  $TL_{50}$ . Imediatamente após a aplicação dos neonicotinoides Acetamiprido e Tiametoxam, sinais visíveis de intoxicação das abelhas puderam 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 (tabela 7, figura 13), 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 (tabela 8 e figura 14).

A expressiva mortalidade ocorrida na primeira hora após a aplicação do Acetamiprido (aproximadamente 25%) seguida de queda nesta taxa (pouca ou nenhuma mortalidade foi observada após a 6ª hora, figura 13) sugere que o Acetamiprido é o principal agente tóxico, responsável pelos sinais de intoxicação e consequente morte das operárias. Uma vez rapidamente metabolizado, seus produtos (metabólitos) apresentam pouca ou nenhuma

atividade tóxica para as abelhas. Brunet, Badiou e Belzunces (2005), estudando o metabolismo do Acetamiprido em operárias adultas de *A. mellifera*, verificaram que mais de 50% do Acetamiprido foi metabolizado em várias partes das abelhas (cabeça, tórax, abdome, hemolinfa, intestino médio e reto) em menos de 30 minutos, indicando uma meia-vida bastante curta. Estes mesmos autores encontraram sete metabólitos: N<sup>1</sup>-(6-cloro-3piridil)metil-N<sup>2</sup>-cianoacetamida (IM 2-1), N<sup>1</sup>-(6-cloro-3piridil)metil-N<sup>1</sup>-metilacetamida (IM 1-3), N-metil-(6-cloro-3piridil)metilamina (IM 1-4), (6-cloro-3piridil)metanol (IM 0), ácido 6-cloronicotínico (IC 0) e dois metabólitos não identificados, chamados de U1 e U2. Os metabólitos IC 0, IM 1-4, U1 e U2 foram os mais abundantes e o menos expressivo foi o IM 0. Durante as primeiras horas a maior ação do Acetamiprido ocorreu nos receptores nicotínicos de acetilcolina do abdome, tórax e cabeça.

Já que IM 2-1, IM 0 e IC 0 são os maiores metabólitos do Acetamiprido nas plantas (TOKIEDA et al., 1997), Iwasa et al. (2004) observaram que tais metabólitos não são altamente tóxicos quando aplicados topicamente em *A. mellifera* na dose de 50 µg/abelha. Brunet, Badiou e Belzunces (2005) também verificaram que menos de 10% do Acetamiprido aplicado inicialmente estava presente nas abelhas passadas 6 horas do tratamento e que sua biotransformação está relacionada com a ação das oxidases de função mista.

A mortalidade observada após a aplicação tópica do Tiametoxam que se iniciou na 2<sup>a</sup> hora, sendo mais expressiva depois da 3<sup>a</sup> hora (figura 14), sugere uma ação tardia dos metabólitos semelhante ao observado em trabalhos feitos com o Imidacloprido (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2001; SUCHAIL; DEBRAUWER; BELZUNCES, 2003). Os dois neonicotinoides podem apresentar o mesmo modo de ação já que, como relataram Iwasa et al. (2004), eles apresentam o mesmo grupo funcional nitro e, como exposto anteriormente, estes dois inseticidas apresentam as menores DL<sub>50</sub> entre os neonicotinoides quando aplicados topicamente em abelhas.

A mortalidade induzida pelo Imidacloprido em testes agudos começa aparecer geralmente 4 horas após a intoxicação e aumenta progressivamente por durante 100 horas apesar dos sintomas, como problemas de coordenação dos movimentos, tremores e quedas aparecerem imediatamente. A discrepância entre mortalidade e o rápido aparecimento dos sintomas pode ser explicada pelo efeito residual a longo prazo do Imidacloprido, pela ação tóxica dos metabólitos, ou pelo fato dos primeiros sintomas serem devido à ação do próprio Imidacloprido, enquanto que a mortalidade é induzida pelos metabólitos (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2001). Também verificaram que somente dois metabólitos (de um total de seis) apresentaram toxicidade para abelhas melíferas: 5-hidroxiimidacloprido que mostrou

uma  $DL_{50} = 200$  ng/abelha e olefina que apresentou uma  $DL_{50} = 30$  ng/abelha (menor que a  $DL_{50}$  do próprio Imidacloprido = 60 ng/abelha). A semelhança de estruturas entre o Imidacloprido e estes dois metabólitos pode ter alguma relação com este efeito.

O metabolismo do Tiametoxam provavelmente se assemelha ao metabolismo do Imidacloprido, pois a partir da 8ª hora (figura 14), não foi mais observada mortalidade, sugerindo que todas as possíveis substâncias tóxicas tenham sido metabolizadas. Suchail, Guez e Belzunces (2001) observaram que após o tratamento por ingestão de Imidacloprido na dose de 5 ng/abelha (os mesmos autores encontraram uma  $DL_{50}$  no valor de 6,6 ng/abelha) a mortalidade foi registrada até por volta de 10 horas após o tratamento, não ocorrendo nenhum registro de morte até 48 horas.

Suchail, Debrauwer e Belzunces (2003) observaram que seis horas após a aplicação do Imidacloprido apenas 10,5% do mesmo foi detectado nas abelhas e em 24 horas não pode ser mais encontrado. Imidacloprido apresentou uma meia-vida de 4,5 horas e foi rapidamente transformado em 5-hidroxiimidacloprido e olefina que tiveram uma maior representatividade 4 horas após a aplicação oral. Resultados semelhantes foram obtidos por Suchail et al. (2004).

Carvalho et al. (2009), expondo operárias de abelhas melíferas a folhas tratadas de citros com Tiametoxam (concentração de 375 µg/ml), verificaram uma  $TL_{50}$  no valor de 3,82 horas com 100% de mortalidade em 9 horas. Já *Epitrix fuscula* (Coleoptera: Chrysomelidae) apresentou uma  $TL_{50}$  no valor de 1,8 dias quando exposto a concentração de 3,25 ppm de Tiametoxam (MCLEOD; DIAZ; JOHNSON, 2002).

Abelhas tratadas oralmente com Tiametoxam (0,025 ppm) apresentam mortalidade após 6 horas do início do teste (KAKAMAND; MAHMOUD; AMIN, 2008).

Tiametoxam é o neonicotinoide que apresenta a menor afinidade aos receptores de acetilcolina nos insetos. No entanto a eficiência biológica do Tiametoxam é comparável a de outros neonicotinoides (WIESNER; KAYSER, 2000). Também constataram que o metabólito *N*-desmetil-tiametoxam apresenta uma afinidade aos receptores de acetilcolina dos insetos na ordem de 1000 vezes maior que o próprio Tiametoxam. Porém, estudando o metabolismo do Tiametoxam em plantas produtoras de algodão, Nauem et al. (2003) verificaram a formação do neonicotinoide Clotianidina, como o principal metabólico enquanto que *N*-desmetil-tiametoxam foi encontrado em baixíssimas quantidades. Também verificaram as mesmas proporções ao analisarem o metabolismo do Tiametoxam em larvas de *S. frugiperla*, sugerindo que a Clotianidina desempenha um papel importante entre os metabólitos do Tiametoxam.

Por outro lado, Wiesner e Kayser (2000) trabalhando com afídeos (*Aphis craccivora* e *Myzus persicae*) e Kagabu et al. (2005) trabalhando com baratas (*Periplaneta americana*) concluíram que a toxicidade do Tiametoxam é devida a sua própria ação atuando em sítios específicos diferentes dos outros neonicotinoides. Porém, deve-se levar em conta que a diversidade de padrões metabólicos depende da estrutura química dos inseticidas, das espécies de plantas e de enzimas metabólicas. O mesmo inseticida em diferentes espécies de plantas pode produzir diferentes metabólitos (van EERD et al., 2003) e, como consequência, toxicidades diferentes.

Nauen et al (1998) também sugeriram uma ação conjunta entre metabólitos tóxicos e resíduos de Imidacloprido para explicar a ação a longo prazo em plantas. Os sintomas de neurotoxicidade podem ser atribuídos pela atividade do próprio Imidacloprido enquanto que a mortalidade é provocada pela ação dos metabólitos, isto é 5-hidroxiimidacloprido e olefina agindo sozinhos ou em conjunto com resíduos do Imidacloprido. Isto está de acordo com a ação do Imidacloprido nas abelhas que não é somente idade e dose dependente, mas também tempo dependente (GUEZ et al., 2001; SUCHAIL; DEBRAUWER; BELZUNCES, 2003).

Todos os metabólitos do Imidacloprido nas abelhas resultam da biotransformação realizada pelas oxidases de função mista. Estas enzimas permitem a conversão do Imidacloprido em metabólitos mais hidrofílicos, que são mais rapidamente excretados, através de diversas reações incluindo hidroxilação, epoxidação e outras oxidações (SUCHAIL et al., 2004).

Os principais metabólitos do Imidacloprido identificados em mamíferos e plantas são 5-hydroxy-imidacloprido, 4,5-dihydroxy-imidacloprido, ácido 6-cloronicotínico, olefina, guanidina e derivados de uréia (SUCHAIL et al., 2004). Alguns dos metabólitos do Imidacloprido apresentam toxicidade para invertebrados, principalmente os derivados de olefina e 5-hydroxy-imidacloprido. Contra espécies de afídeos e *Bemisia tabaci*, a olefina e o 5-hydroxy-imidacloprido são, respectivamente, 16 e 10 vezes mais ativo do que o Imidacloprido propriamente dito (NAUEN et al., 1999).

Com o pirazol Fipronil, não apresentou qualquer sintoma de intoxicação nas primeiras horas que sucederam a aplicação. Somente após o início do registro da mortalidade (a partir da 16ª hora) que alguns sinais, como movimentos lentos e rastejamento, puderam ser observados. 50% das abelhas morreram com 19 horas e 50 minutos e a mortalidade se prolongou por mais de 24 horas (tabela 9 e figura 15).

Essa característica (retardo do início da mortalidade) pode ser uma consequência da penetração mais lenta do inseticida no tegumento do inseto e da ação tardia de seus

metabólitos. Durham, Siegfried e Scharf (2002) observaram que 71% do Fipronil aplicado topicamente (também tendo como solvente a acetona) em larvas de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) foi encontrado na parte externa do inseto 24 horas após a aplicação. A diferença de suscetibilidade de larvas de *C. suppressalis* e *S. inferens*, sendo 118,5 mais tóxico para *S. inferens*, e as diferentes respostas observadas em diferentes linhagens de moscas domésticas também foram atribuídas a diferentes razões de permeabilidade do Fipronil nos tegumentos destes insetos (FANG et al., 2008; KRISTENSEM; JESPERSEN; KNOOR, 2004).

Aliouane et al. (2009), através de tratamento diário com doses subletais de Fipronil aplicadas topicamente, observaram 100% de mortalidade em 7 dias, com início da mortalidade aos 5 dias.

Com relação aos metabólitos, os trabalhos divergem quanto à diferença de toxicidade do Fipronil em relação aos seus produtos. Estudos utilizando inibidor do citocromo P450, butóxido de piperonil (PBO), que provoca a inibição da formação do metabólito sulfona, tem revelado diversos resultados. Quando tratado com butóxido de piperonil, a toxicidade de Fipronil aumenta em camundongos (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003; HAINZL; COLE; CASIDA, 1998) e moscas (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993; HAINZL; CASIDA, 1996), resultado que indica que a conversão em sulfona é um processo de desintoxicação. Entretanto, em outros estudos, após o tratamento com butóxido de piperonil, a toxicidade do Fipronil diminui como observados em baratas (VALLES; KOEHLER; BRENNER, 1997) e lagartas de *D. virgifera* (SCHARF; SIEGFRIED, 1999) indicando que a conversão em sulfona não é um processo de desintoxicação. Tais resultados sugerem que o metabolismo oxidativo do Fipronil (levando a formação de sulfonas) pode aumentar a toxicidade em alguns insetos (SCHARF et al., 2000). Porém, os mesmos autores não observaram diferença entre a toxicidade do Fipronil e de seu metabólito sulfona (também pela utilização de PBO) aplicados topicamente em adultos de *D. virgifera*. Scharf e Siegfried (1999) sugerem que o metabólito sulfona induz uma resposta neurofisiológica idêntica ao Fipronil.

Estudos *in vivo* e *in vitro* do metabolismo do Fipronil mostraram que o metabólito sulfona é o principal produto formado em insetos e mamíferos através da ação das monooxigenases microsossomais (HAINZL; COLE; CASIDA, 1998; SCHARF et al., 2000). Este metabólito apresenta uma toxicidade semelhante ao produto principal agindo de forma competitiva no site de ligação do GABA e, em alguns casos, até mais tóxica (HAINZL;

COLE; CASIDA, 1998). Durham, Siegfried e Scharf (2002) também constataram que o metabólito sulfona foi o principal produto encontrado em larvas de *O. nubilalis*.

Os metabólitos sulfido e sulfona também apresentaram uma toxicidade maior que o Fipronil quando aplicados topicamente em larvas de *C. suppressalis* e *S. inferens* (FANG et al., 2008).

### **6.3. Ingredientes ativos X Comportamento**

Pela análise dos resultados observados tanto no comportamento de reflexo de extensão da probóscide quanto no teste de locomoção verificou-se que as diferenças com o grupo controle foram mais significativas quando os testes foram feitos próximos aos períodos determinados pela  $TL_{50}$  nos três ingredientes ativos testados.

No teste com Acetamiprido, o ingrediente ativo influenciou os dois comportamentos analisados na 1ª e na 4ª hora após sua aplicação, não sendo observada nenhuma diferença nos testes realizados na 24ª hora. No teste do REP as doses de 0,93 e 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  prejudicaram na percepção de concentrações, sendo que, no teste de 1 hora as proporções de abelhas que responderam às concentrações foram menores do que as abelhas que responderam no teste de 4 horas (tabelas 11 e 13; figuras 16 e 18).

A mortalidade durante o teste também foi mais pronunciada durante a primeira hora sendo que as três doses (0,093, 0,93 e 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ ) foram significativas enquanto que na quarta hora somente as duas maiores doses (0,93 e 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ ) apresentaram significância (tabelas 11 e 13; figuras 17 e 19). Já no teste de locomoção, no teste com 1 hora, a dose de 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  comprometeu a velocidade enquanto que no teste com 4 horas as duas maiores doses (0,93 e 9,3  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ ) comprometeram a velocidade das abelhas (figuras 34 e 35).

Esse maior comprometimento dos comportamentos no teste realizado 1 hora após a aplicação do Acetamiprido provavelmente está relacionado com a ação tóxica do ingrediente ativo que ocorre neste período já que sua  $TL_{50}$  apresentou o valor de 1 hora e 30 minutos (tabela 7, figura 13). 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 microssomais (BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005) o que justifica a influência nos comportamentos analisados neste período. Já na vigésima quarta hora grande parte do Acetamiprido foi metabolizado e os produtos resultantes deste processo não apresentam toxicidade suficiente para ocasionar diferenças nos comportamentos. Aproximadamente 5% do Acetamiprido aplicado inicialmente foi encontrado em abelhas 24 horas depois (BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005).

Nos testes com Tiametoxam, o ingrediente ativo prejudicou os comportamentos nos 4 períodos analisados. A dose de 17 ng/abelha prejudicou a velocidade estabelecida pelas abelhas no teste de locomoção e na percepção das concentrações no teste de REP 1 hora após a aplicação do ingrediente ativo (tabela 17; figuras 22 e 37). No teste realizado 4 horas após a aplicação, as doses de 1,7 e 17 ng/abelha prejudicaram os dois comportamentos, porém, com a dose de 17 ng/abelha, as proporções de abelhas que não responderam as concentrações de sacarose foram bem menores do que as abelhas que responderam no teste realizado 1 hora após a aplicação (tabela 19; figuras 24 e 38). Já no teste realizado 24 horas após a aplicação do ingrediente ativo, a dose de 17 ng/abelha prejudicou somente o comportamento de REP, porém as proporções de abelhas que responderam as concentrações de sacarose foram maiores que as proporções das abelhas que responderam nos testes de 1 e 4 horas após a aplicação (tabela 21; figuras 26 e 39). A mortalidade nos testes do REP foi registrada em todos os períodos com a dose de 17 ng/abelha (tabelas 17, 19 e 21; figuras 23, 25 e 27).

Como a  $TL_{50}$  do Tiametoxam foi determinada em 3 horas e 50 minutos (figura 11), foi no teste realizado próximo a este período (4 horas após a aplicação) que houve os maiores comprometimentos nos comportamentos.

O Tiametoxam, provavelmente, apresenta o mesmo metabolismo que o Imidacloprido. Da mesma forma que o Imidacloprido que apresenta uma maior mortalidade por volta de 4 horas (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2001), nas primeiras horas após a aplicação do Tiametoxam, 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 na primeira hora após a aplicação. Sinais de intoxicação foram observados imediatamente após a aplicação (problemas de coordenação de movimentos, quedas, tremores e rastejamento), como também observados em testes com o Imidacloprido (SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2001). Já no teste realizado 4 horas após a aplicação, a presença destes metabólitos tóxicos passa ser maior e, como consequência ocorre um maior comprometimento dos comportamentos analisados.

O comprometimento do comportamento de REP e a mortalidade observados no teste realizado 24 horas após a aplicação do ingrediente ativo (ambos em menores proporções em relação aos períodos anteriores) indicam a persistência de metabólitos tóxicos neste período. Este resultado sugere que o Tiametoxam apresenta uma ação prolongada da mesma forma que o Imidacloprido que age por até 100 horas (NAUEN et al., 1998; SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2001). Estes mesmos autores destacam que a discrepância na cinética da mortalidade do Imidacloprido pode ser explicada pelo efeito residual do produto, pela ação de seus metabólitos.

El Hassani et al. (2008) analisaram a influência de doses subletais de Acetamiprido e Tiametoxam no comportamento de REP, comportamento de locomoção e aprendizado olfatório de abelhas melíferas. Os autores observaram que as abelhas tratadas oralmente com Acetamiprido nas doses de 0,1 e 0,5 µg/abelha, mas não a de 1,0 µg/abelha apresentaram uma diminuição na proporção de abelhas submetidas ao teste de REP (realizado 1 hora após o tratamento), enquanto que as abelhas tratadas topicamente não apresentaram diferença significativa com relação ao grupo controle. Na atividade locomotora, realizada 1 hora após a aplicação tópica, estas mesmas doses do Acetamiprido provocaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Ao contrário do comportamento de REP, a atividade locomotora não foi influenciada pela aplicação oral. No comportamento de aprendizagem olfativa realizado 3 horas após o tratamento, tanto o Acetamiprido nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 µg/abelha quanto o Tiametoxam nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 ng/abelha, ambos aplicados tópica e oralmente não provocaram 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.

Os resultado observados por El Hassani et al. (2008) no tratamento tópico com Tiametoxam condizem com os resultados observados neste estudo, já que tanto o comportamento de REP quanto o locomotor não foram influenciados pelas menores doses do ingrediente ativo aplicadas 1 hora antes do teste. E conforme observado anteriormente, este ingrediente ativo causou maiores diferenças no comportamento quando os testes foram realizados próximo ao valor determinado pela  $TL_{50}$  (3 horas e 50 minutos). Importante ressaltar que estes autores utilizaram a acetonitrila como solvente e água como veículo de aplicação. Os testes também foram realizados de forma dependente, ou seja, as abelhas foram testadas duas vezes: antes e depois do tratamento.

O inseticida Imidacloprido também compromete o comportamento de REP nas doses de 5, 10 e 20 ng/abelha quando aplicado 1 hora antes do teste. Já no teste de locomoção as

doses de 2,5, 5, 10 e 20 ng/abelha prejudicaram este comportamento (ARMENGAUD; LAMBIN; GAUTHIER, 2002; LAMBIN et al., 2001).

Os resultados observados no testes de locomoção analisados 1 hora após a aplicação tópica do Acetamiprido também estão de acordo com os resultados observados por El Hassani et al. (2008) onde as menores doses não apresentaram influência no comportamento. Porém estes autores não verificaram influência da aplicação tópica no comportamento de REP, influência aqui verificada neste trabalho mesmo em uma dose menor (0,93 µg/abelha – valor próximo ao utilizado por estes autores). Da mesma forma que no inseticida Tiametoxam, El Hassani et al. (2008) utilizaram água como veículo para aplicação, porém a diluição foi realizada em acetona. Os testes também foram realizados de forma dependente, ou seja, as abelhas foram testadas duas vezes: antes e depois do tratamento.

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 reflexo de extensão de probóscide nos testes realizados no 12º dia. Quando tratadas oralmente, somente o Tiametoxam (1,0 ng/abelha) apresentou comprometimento do REP.

Da mesma forma que os ingredientes ativos anteriores, o Fipronil apresentou maior comprometimento nos testes que foram realizados próximo do valor calculado para a sua  $TL_{50}$ , sendo igual a 19 horas e 50 minutos (figura 15). No teste realizado 1 hora após a aplicação, não foi observada nenhuma diferença nos dois comportamentos analisados e tão menos na mortalidade (tabela 23; figuras 28, 29, 40). No teste realizado 4 horas após a aplicação do ingrediente ativo nenhuma alteração foi observada no comportamento de REP e na mortalidade durante o teste (tabela 25; figuras 30 e 31), porém no teste de locomoção, a dose de 1,9 ng/abelha prejudicou a velocidade das abelhas (figura 42) o que o diferencia dos neonicotinoides testados pelo fato de apresentar alterações no comportamento em um período anterior ao estabelecido pela  $TL_{50}$ . Esses resultados sugerem que nas primeiras horas após a aplicação ocorre a ação tóxica do Fipronil ou de seus metabólitos apesar da mortalidade somente iniciar 16 horas após a aplicação (figura 15). Apesar de apresentar uma baixa penetração em *O. nubilalis* o Fipronil é rapidamente convertido no metabólito sulfona e a concentração deste produto aumenta nas primeiras 6 horas após a aplicação (DURHAM; SIEGFRIED; SCHARF, 2002). Vários trabalhos têm indicado que este metabólito apresenta atividade tóxica em insetos (SCHARF; SIEGFRIED, 1999; SCHARF et al., 2000; VALLES; KOEHLER; BRENNER, 1997).

Já no teste realizado 24 horas a aplicação, tanto o comportamento de REP quanto o de locomoção foram prejudicados quando foi aplicada a dose de 1,9 ng/abelha (tabela 27; figuras 32 e 42). Nenhuma mortalidade significativa foi observada durante o teste de REP (tabela 27; figura 33). Pelo fato dos testes comportamentais terem sido realizados em um período próximo ao estabelecido pela  $TL_{50}$  (19 horas e 50 minutos) resultou um maior comprometimento dos comportamentos analisados, o que sugere que neste período ocorre uma maior atividade tóxica do ingrediente ativo que não foi evidenciada nos períodos anteriores. Provavelmente o ingrediente ativo apresenta baixa penetração no tegumento do inseto, como observado em *O. nubilalis* (DURHAM; SIEGFRIED; SCHARF, 2002), ou até mesmo uma ação tardia dos seus metabólitos, o que justificaria o maior comprometimento dos comportamentos somente nos testes realizados 24 horas após a aplicação. Porém, diversos trabalhos têm apresentados resultados diferentes quanto à toxicidade do Fipronil e de seus metabólitos (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003; COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993; HAINZL; CASIDA, 1996; HAINZL; COLE; CASIDA, 1998; SCHARF; SIEGFRIED, 1999; SCHARF et al., 2000; VALLES; KOEHLER; BRENNER, 1997).

El Hassani et al. (2005) estudaram o efeito de Fipronil no comportamento de REP, locomoção e memória olfativa de abelhas, administrado tópicamente e oralmente nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 ng/abelha. Os autores observaram que 1 hora após a aplicação tópica, somente a dose de 1 ng/abelha prejudicou o comportamento de REP não sendo observada nenhuma alteração após aplicação oral. Também não foram observadas nenhuma alteração no comportamento de locomoção tanto na aplicação tópica quanto oral, realizados 1 hora após o tratamento. No teste de aprendizagem olfativa, somente as abelhas que receberam aplicação tópica de 0,5 ng/abelha feita três horas antes do teste, mostraram-se diferente do grupo controle.

Os resultados observados neste trabalho nos testes de locomoção analisados 1 hora após a aplicação tópica do Fipronil também estão de acordo com os resultados observados por El Hassani et al. (2005) que não observaram diferença significativa em relação ao controle quando foram aplicadas as doses menores. Porém estes autores verificaram diferença no teste de REP após 1 hora da aplicação tópica com a dose de 1,0 ng/abelha enquanto que neste trabalho, mesmo aplicando uma dose aproximadamente duas vezes maior (1,9 ng/abelha) não se observou alteração no comportamento. Algumas diferenças na metodologia podem ter influenciado nestes resultados. El Hassani et al. (2005) realizaram os testes nas abelhas duas vezes, ou seja, o teste de REP antes e depois da aplicação do inseticida e também utilizaram água como veículo de aplicação.

Em um estudo de tratamento crônico por 11 dias em abelhas (aplicação tópica e oral), Aliouane et al. (2009) observaram que o Fipronil (0,1 e 0,01 ng/abelha) não prejudicou o comportamento de locomoção das abelhas no teste realizado no 12º dia. Porém, quando administrado oralmente, Fipronil (0,01 ng/abelha) apresentou um comprometimento do REP e nenhum comprometimento na aplicação tópica.

Três horas após a aplicação tópica de doses subletais do Fipronil, também causa sinais leves de intoxicação em *D. virgifera* (SCHARF; SIEGFRIED, 1999).

Wiltz, Suiter e Gardner (2009), impregnando papel com Fipronil e Tiametoxam, ambos na concentração de 0,06%, observaram uma TL<sub>50</sub> de 168,7 minutos e 54,7 minutos respectivamente (com observação máxima de 4 horas) para formigas *Linepithema humile*. As formigas que entraram em contato com Tiametoxam apresentaram sinais de intoxicação durante as 4 horas do teste, com leituras a cada 30 minutos. Já as formigas que entraram em contato com o Fipronil apresentaram sinais de intoxicação somente com 30 e 90 minutos. Na comparação feita entre os inseticidas, a proporção de formigas que apresentou sinais de intoxicação foi maior após o tratamento com o Tiametoxam.

*Blattella germanica* e *P. americana*, após aplicação tópica de Fipronil, apresentaram uma DL<sub>50</sub> no valor de 0,12 e 0,08 µg/g, respectivamente (KAAKEH; REID; BENNETT, 1997). Estes mesmos autores observaram uma TL<sub>50</sub> de 19,2 horas após a ingestão de Fipronil na formulação de 0,05%.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As aplicações dos inseticidas analisados no presente trabalho e que são amplamente utilizados na agricultura do país se mostraram prejudiciais à atividade apícola. Quando se analisa os dados da literatura, observa-se que o mesmo fato ocorre com outros insetos. A importância das abelhas não se restringe a seu valor econômico, pois são importantes na manutenção da biodiversidade vegetal. Vale ressaltar que as abelhas africanizadas (*A. mellifera*) podem ser consideradas como um modelo de estudo. Os resultados obtidos podem ser extrapolados para outros insetos polinizadores ou não, mas que desempenham papel fundamental na manutenção da biodiversidade. Nesse aspecto devem ser consideradas as abelhas nativas, que constantemente sofrem redução da população devido ao uso indiscriminado de inseticidas e mudanças ambientais.

## 8. CONCLUSÕES

As metodologias de análise dos comportamentos utilizando doses subletais de inseticidas mostraram-se uma ferramenta importante para estudos toxicológicos. Alguns itens devem ser observados preliminarmente, como 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. A determinação do valor da  $TL_{50}$  também se mostra importante como referência, tanto para não mascarar um possível efeito tardio do inseticida, quanto para elucidar possível mortalidade ocasionada pela metodologia associada à atividade tóxica.

Os inseticidas Acetamiprido, Tiametoxam (neonicotinoides) e Fipronil (pirazol) além de afetarem a sobrevivência das operárias de *Apis mellifera*, também apresentaram efeitos deletérios quando presentes em pequenas doses:

- I. O inseticida mais tóxico para as abelhas foi o Fipronil, pois apresentou o menor valor de  $DL_{50}$ ;
- II. A ação dos neonicotinoides ocorre rapidamente (4 horas) enquanto que o Fipronil foi tardia (19 horas);
- III. O Acetamiprido, aplicado nas doses que correspondem à  $DL_{50}$  e  $DL_{50}/10$ , prejudicou o comportamento de reflexo de extensão da probóscide nos testes realizados 1 e 4 horas após a aplicação do ingrediente ativo enquanto que a dose correspondente à  $DL_{50}$  prejudicou a atividade locomotora nesses mesmos períodos. A dose correspondente à  $DL_{50}/10$  também afetou a atividade locomotora no teste de 4 horas;
- IV. O Tiametoxam, aplicado na dose correspondente à  $DL_{50}$ , prejudicou o comportamento de reflexo de extensão da probóscide nos quatro períodos analisados. A dose correspondente à  $DL_{50}/10$  também prejudicou esse comportamento no teste realizado 4 horas após a aplicação do ingrediente ativo. A dose correspondente à  $DL_{50}$  prejudicou o comportamento de locomoção nos testes realizados 1 e 4 horas após a aplicação tópica do ingrediente ativo;
- V. O Fipronil, aplicado na dose que corresponde à  $DL_{50}$ , afetou o comportamento de reflexo de extensão da probóscide no teste realizado 24 horas após a

aplicação do ingrediente ativo enquanto que o comportamento de locomoção foi afetado por essa mesma dose nos testes realizados 4 e 24 horas após a aplicação.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 5, p. 1347-1352, 2003.

ABRAMSON, C. I.; BOYD, B. J. An automated apparatus for conditioning proboscis extension in honey bees, *Apis mellifera* L. **Journal of Entomological Science**, Tifton, v. 36, n. 1, p. 78-92, 2001.

ABRAMSON, C. I. et al. The effect of insecticides on learning in the Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 37, n. 4, p. 529-535, 1999.

ABRAMSON, C. I. et al. The effect of insecticides considered harmless to honey bees (*Apis mellifera*): proboscis conditioning studies by using the insect growth regulators tebufenozide and diflubenzuron. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 33, n. 2, p. 378-388, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Índice monográfico A29: Acetamiprido. 2008a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/a29.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Índice monográfico T48: Tiametoxam. 2008b. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/t048.pdf](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/t048.pdf)>. Acesso em: 2 fev. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Índice monográfico F43: Fipronil. 2008c. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/f43\\_fipronil.pdf](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/f43_fipronil.pdf)>. Acesso em: 2 fev. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Sistema de informações sobre agrotóxico - SIA. 2002. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>>. Acesso em: 2 fev. 2010.

AIZEN, M. A. et al. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. **Current Biology**, Cambridge, v. 18, n. 20, p. 1572-1575, 2008.

AIZEN, M. A.; HARDER, L. D. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current Biology**, Cambridge, v. 19, n. 11, p. 915-918, 2009.

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

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

AL-RIFAI, J.; AKEEL, N. Determination of pesticide residues in imported and locally produced honey in Jordan. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 36, n. 3-4, p. 155-161, 1997.

ANALYSTSOFT BioStat 2008: programa de análise estatística. [S.I.]: AnalystSoft, 2008. Disponível em: <<http://www.analystsoft.com/pt/>>. Acesso em: 10 dez 2009.

ARMENGAUD, C.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M. Effects of imidacloprid on the neural processes of memory in honey bees. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. (Eds.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002, p. 85- 100.

BALANÇA, G.; DE VISSCHER, M. N. Impacts on nontarget insects of a new insecticide compound used against the desert locust [ *Schistocerca gregaria* (Forskal 1775)]. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 32, n. 1, p. 58-62, 1997.

BENDAHO, N.; BOUNIAS, M.; FLECHE, C. Acute toxicity of cypermethrin and fenitrothion on honeybees (*Apis mellifera mellifera*) according to age, formulations and (chronic paralysis virus)/insecticide interaction. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 18, n. 1, p. 55-65, 1997.

BIESMEIJER, J. C. et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, Washington, v. 313, p. 351-354, 2006.

BITTERMAN, M. E. et al. Classical-conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of Comparative Psychology**, Washington, v. 97, n. 2, p. 107-119, 1983.

BLOOMQUIST, J. R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 54, n. 4, p. 145-156, 2003.

BOECKING, O.; GENERSCH, E. Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety**, Basel, v. 3, n. 2, p. 221-228, 2008.

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.

BUCKINGHAM, S. D. et al. Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 68, n. 4, p. 942-951, 2005.

CABONI, P.; SAMMELSON, R. E.; CASIDA, J. E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: Ethiprole compared with fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 24, p. 7055-7061, 2003.

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.

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

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.

CHAUZAT, M. P. et al. Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, n. 3, p. 514-523, 2009.

CLAUDIANOS, C. et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, 2006.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 46, n. 1, p. 47-54, 1993.

COLIN, M. E.; LE CONT, Y.; VERMANDERE, J. P. Managing nuclei in insect-proof tunnel as an observation tool for foraging bees: sublethal effects of deltamethrin and imidacloprid. In: BELZUNCES, L.P.; PELISSIER, C.; LEWIS, G. B. (Eds.). **Hazards of pesticides to bees**. Paris: INRA, 2001. p. 259-268.

COLIN, M. E. et al. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 47, n. 3, p. 387-395, 2004.

COLLINS, H. L.; CALLCOT, A. M. A. Fipronil: an ultra-low-dose bait toxicant for control of red imported fire ants (Hymenoptera : Formicidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 81, n. 3, p. 407-415, 1998.

COSTA, H. S.; RUST, M. K. Mortality and foraging rates of Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae) colonies exposed to potted plants treated with fipronil. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, MT Pleasant, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

COX, R. L.; WILSON, W. T. Effects of permethrin on the behavior of individually tagged honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 13, p. 375-378, 1984.

COX-FOSTER, D., vanENGELSDORP, D. Solving the mystery of the disappearing bees. **Scientific American**, New York, v. 300, n. 4, Abr. 2009. Disponível em: <<http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=saving-the-honeybee>>. Acesso em: 8 ago. 2009.

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

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.

DAG, A.; ZIPORI, I.; PLESER, Y. Using bumblebees to improve almond pollination by the honeybee. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 45, n. 4, p. 215-216, 2006.

DAVIS, A. R. The study of insecticide poisoning of honeybee brood. **Bee World**, Cardiff, v. 70, n. 4, p. 163-174, 1989.

DECOURTYE, A.; PHAM-DELÈGUE, M. H. The proboscis extension response. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. (Eds.). **Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. p. 67-84.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. **Pest Management Science**, Chichester, v. 59, n. 3, p. 269-278, 2003.

DECOURTYE, A. et al. Impairment of olfactory learning performances in the honey bee after long term ingestion of imidacloprid. In: BELZUNCES, L.P.; PELISSIER, C.; LEWIS, G. B. (Eds.). **Hazards of pesticides to bees**. Paris: INRA, 2001. p. 113-117.

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. 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.

DELAPLANE, K. S.; MAYER, D. F. **Crop pollination by bees**. New York: CABI Publishing, 2000. 344 p.

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

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

DURHAM, E. W.; SIEGFRIED, B. D.; SCHARF, M. E. In vivo and in vitro metabolism of fipronil by larvae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. **Pest Management Science**, Chichester, v. 58, n. 8, p. 799-804, 2002.

EISCHEN, F. A.; GRAHAM, R. H.; COX, R. Regional distribution of *Paenibacillus larvae* subspecies larvae, the causative organism of American foulbrood, in honey bee colonies of

the western United States. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 4, p. 1087-1093, 2005.

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.

ELLIS, M. D.; SIEGFRIED, B. D.; SPAWN, B. The effect of Apistan(R) on honey bee (*Apis mellifera* L). Responses to methyl parathion, carbaryl and bifenthrin exposure. **Apidologie**, Les Ulis, v. 28, n. 3-4, p. 123-127, 1997.

ERICKSON, E. H. et al. Effects of selected insecticide formulations, phased application and colony management strategies on honey bee mortality in processing sweet corn. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 36, n. 1, p. 3-13, 1997.

EUROPEAN COMISSINON. Review report for the active substance deltamethrin. 2002. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1-31\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1-31_en.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN COMISSINON. Review report for the active substance acetamiprid. 2004a. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/acetamiprid.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN COMISSINON. Review report for the active substance thiacloprid. 2004b. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/thiacloprid.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN COMISSINON. Review report for the active substance cypermethrin. 2005a. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list\\_cypermethrin.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_cypermethrin.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN COMISSINON. Review report for the active substance chlorpyrifos. 2005b. Disponível em:

<[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list\\_chlorpyrifos.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_chlorpyrifos.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Review report for the active substance clothianidin. 2005c. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list\\_clothianidin.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list_clothianidin.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Review report for the active substance thiamethoxam. 2006. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/thiamethoxam\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/thiamethoxam_en.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN COMMISSION. EU Pesticides database. 2010. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)>. Acesso em: 3 jan. 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil. 2006. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/65r.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imidacloprid. 2008. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/148r.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2009.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Conclusion on pesticide peer review regarding the risk assessment of the active substance malathion. 2009. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/333r.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2009.

FANG, Q. et al. Differential fipronil susceptibility and metabolism in two rice stem borers from China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 4, p. 1415-1420, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). FAOSTAT. 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/616/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

FAUCON, J. P. et al. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Pest Management Science**, Chichester, v. 61, n. 2, p. 111-125, 2005.

FERREIRA, R. A. C. **Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidea) tratadas com fipronil e ácido bórico.** 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

FIGUEIREDO, V. L. C.; BITONDI, M. M. G.; PAULINO-SIMOES, Z. L. Esterase inhibition during several immature worker stages of *Apis mellifera* following topical application of DDVP insecticide. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 35, n. 1, p. 37-43, 1996.

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

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.

FORSGREN, E. European foulbrood in honey bees. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, p. S5-S9, 2010.

FRANC, M.; CADIERGUES, M. C. Antifeeding effect of several insecticidal formulations against *Ctenocephalides felis* on cats. **Parasite Journal de la Societe Francaise de Parasitologie**, Issy Moulineaux, v. 5, n. 1, p. 83-86, 1998.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. London, UK: Academic Press, 1993. 544 p.

FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, n. Supplement 1, p. S73-S79, 2010.

GAHLHOFF, J. E.; MILLER, D. M.; KOEHLER, P. G. Secondary kill of adult male German cockroaches (Dictyoptera : Blattellidae) via cannibalism of nymphs fed toxic baits. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 5, p. 1133-1137, 1999.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. **Apidologie**, Les Ulis, v. 35, n. 4, p. 419-430, 2004.

GARY, N. E.; LORENZEN, K. Effect of methamidophos on honey bees (Hymenoptera: Apidae) during alfalfa pollination. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 82, n. 4, p. 1067-1072, 1989.

GENERSCH, E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, p. S10-S19, 2010.

GUEZ, D. et al. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). **Neurobiology of Learning and Memory**, San Diego, v. 76, n. 2, p. 183-191, 2001.

GUEZ, D.; ZHANG, S. W.; SRINIVASAN, M. V. Methyl parathion modifies foraging behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 14, n. 4, p. 431-437, 2005.

GUNASEKARA, A. S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 32, n. 3, p. 189-199, 2007.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 23, p. 12764-12767, 1996.

HAINZL, D.; COLE, L. M.; CASIDA, J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 11, n. 12, p. 1529-1535, 1998.

HAYNES, K. F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 33, p. 149-168, 1988.

HOROSZOK, L. et al. GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. **British Journal of Pharmacology**, Malden, v. 132, n. 6, p. 1247-1254, 2001.

IKEDA, T. et al. Fipronil modulation of glutamate-induced chloride currents in cockroach thoracic ganglion neurons. **NeuroToxicology**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 807-815, 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.

JAYCOX, E. R. Effect on honey bees of nectar from systemic insecticide treated plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 57, p. 31-35, 1964.

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

KAAKEH, W.; REID, B. L.; BENNETT, G. W. Toxicity of fipronil to German and American cockroaches. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Malden, v. 84, n. 3, p. 229-237, 1997.

KAGABU, S. et al. Insecticidal and neuroblocking activities of thiamethoxam-type compounds in the American cockroach (*Periplaneta americana* L.). **Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 30, n. 2, p. 111-115, 2005.

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.

KASINA, J. M. et al. Economic benefit of crop pollination by bees: a case of Kakamega small-holder farming in western Kenya. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 2, p. 467-473, 2009.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W.; WASER, N. M. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 83-112, 1998.

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

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.

KRISTENSEN, M.; JESPERSEN, J. B.; KNORR, M. Cross-resistance potential of fipronil in *Musca domestica*. **Pest Management Science**, Chichester, v. 60, n. 9, p. 894-900, 2004.

LAMBIN, M. et al. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 48, n. 3, p. 129-134, 2001.

LE PATOUREL, G. Secondary transmission of fipronil toxicity between Oriental cockroaches *Blatta orientalis* L in arenas. **Pest Management Science**, Chichester, v. 56, n. 9, p. 732-736, 2000.

LI, X. Q. et al. Toxicities of fipronil enantiomers to the honeybee *Apis mellifera* L. and enantiomeric compositions of fipronil in honey plant flowers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 29, n. 1, p. 127-132, 2010.

LIU, M. Y.; LANFORD, J.; CASIDA, J. E. Relevance of [3H]imidacloprid binding site in house fly head acetylcholine receptor to insecticidal activity of 2-nitromethylene- and 2-nitroimino-imidazolidines. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 46, n. 3, p. 200-206, 1993.

LOSEY, J. E.; VAUGHAN, M. The economic value of ecological services provided by insects. **Bioscience**, Washington, v. 56, n. 4, p. 311-323, 2006.

MACKENZIE, K. E.; WINSTON, M. L. Effects of sublethal exposure to diazinon on longevity and temporal division of labor in the honey bee (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 82, n. 1, p. 75-82, 1989.

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

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

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

MALASPINA, O. et al. Defesa de apiários e meliponários contra agratóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 18., 2010, Cuiabá, **Anais...** Cuiabá: Confederação Brasileira de Apicultura, 2010. 1 CD.

MAMOOD, A. N.; WALLER, G. D. Recovery of learning responses by honeybees following a sublethal exposure to permethrin. **Physiological Entomology**, Malden, v. 15, n. 1, p. 55-60, 1990.

MATSUDA, K. et al. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, London, v. 22, n. 11, p. 573-580, 2001.

MAYER, D. F.; LUNDEN, J. D. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 38, n. 3-4, p. 191-197, 1999.

MC CABE, S. I. et al. Odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in two stingless bee species in comparison to Africanized honeybees. **Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology**, New York, v. 193, p. 1089-1099, 2007.

MCLEOD, P.; DIAZ, F. J.; JOHNSON, D. T. Toxicity, persistence, and efficacy of spinosad, chlorfenapyr and thiamethoxam on eggplant when applied against the eggplant flea beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, n. 2, p. 331-335, 2002.

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

MENZEL, R.; GREGGERS, U.; HAMMER, M. Functional organization of appetitive learning and memory in a generalist pollinator, the honey bee. In: PAPA, D.R.; LEWIS, A. C. (Eds.). **Insect learning**. New York: Chapman Hall, 1993. p. 79-125.

MENZEL, R.; MULLER, 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: 10 fev. 2010.

MORSE, R. A.; FLOTTUM, P. K. **Honey bee pests, predators and diseases**. Ohio: A.I. Root Company, 1997. 575 p.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION RETRIEVAL SYSTEM (NPIRS). Pesticide Products. 2010. Disponível em: <<http://ppis.ceris.purdue.edu/htbin/ppisprod.com>>. Acesso em: 3 jan. 2010.

NAUEN, R. et al. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). **Pesticide Science**, Chichester, v. 52, n. 1, p. 53-57, 1998.

NAUEN, R. et al. Whitefly-active metabolites of imidacloprid: biological efficacy and translocation in cotton plants. **Pesticide Science**, Chichester, v. 55, n. 3, p. 265-271, 1999.

NAUEN, R. et al. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 76, n. 2, p. 55-69, 2003.

NGIM, K. K.; CROSBY, D. G. Abiotic processes influencing fipronil and desethiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 20, n. 5, p. 972-977, 2001.

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

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: 15 fev. 2010.

PAGE, R. E.; ERBER, J.; FONDRK, 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-Sensory Neural and Behavioral Physiology**, New York, v. 182, n. 4, p. 489-500, 1998.

PANKIW, T.; PAGE, 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-Sensory Neural and Behavioral Physiology**, New York, v. 185, n. 2, p. 207-213, 1999.

PANKIW, T.; PAGE, R. E. Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 47, n. 4, p. 265-267, 2000.

PANKIW, T.; WADDINGTON, K. D.; PAGE, R. E. Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. **Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural and Behavioral Physiology**, New York, v. 187, n. 4, p. 293-301, 2001.

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.

RANGANATHAN, R.; CANNON, S. C.; HORVITZ, H. R. MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. **Nature**, London, v. 408, n. 6811, p. 470-475, 2000.

ROSENKRANZ, P.; AUMEIER, P.; ZIEGELMANN, B. Biology and control of *Varroa destructor*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, p. S96-S119, 2010.

SANDOZ, J. C.; ROGER, B.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Olfactory learning and memory in the honeybee - comparison of different classical-conditioning procedures of the proboscis extension response. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences**, Paris, v. 318, n. 7, p. 749-755, 1995.

SCHARF, M. E.; SIEGFRIED, B. D. Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 40, n. 3, p. 150-156, 1999.

SCHARF, M. E. et al. Fipronil metabolism, oxidative sulfone formation and toxicity among organophosphate- and carbamate-resistant and susceptible western corn rootworm populations. **Pest Management Science**, Chichester, v. 56, n. 9, p. 757-766, 2000.

SCHEINER, R. Responsiveness to sucrose and habituation of the proboscis extension response in honey bees. **Journal of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology**, New York, v. 190, n. 9, p. 727-733, 2004.

SCHMUCK, R. et al. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L. Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, Chichester, v. 57, n. 3, p. 225-238, 2001.

SCHRICKER, B.; STEPHEN, W. P. The effect of sublethal doses of parathion on honeybee behaviour. 1. Oral administration and the communication dance. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 9, n. 3, p. 141-153, 1970.

SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 11, n. 4, p. 287-293, 1982.

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

SHEN, M. Q. et al. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. **Virology**, San Diego, v. 342, n. 1, p. 141-149, 2005.

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

SOUTHWICK, E. E.; SOUTHWICK, L. Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, n. 3, p. 621-633, 1992.

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) por meio de análises morfológicas e comportamentais**. 2009. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

STARK, J. D.; JEPSON, P. C.; MAYER, D. F. Limitations to use of topical toxicity data for predictions of pesticide side effects in the Field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, p. 1081-1088, 1995.

STEVENS, M. M.; HELLIWELL, S.; WARREN, G. N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 195-207, 1998.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, Washington, v. 316, n. 5827, p. 970-972, 2007.

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**, New York, v. 58, n. 2, p. 177-183, 1997.

SUCHAIL, S. et al. In vivo distribution and metabolisation of C-14-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. **Pest Management Science**, Chichester, v. 60, n. 11, p. 1056-1062, 2004.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, Chichester, v. 60, n. 3, p. 291-296, 2003.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 19, n. 7, p. 1901-1905, 2000.

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

SUNDRIYAL, M.; SUNDRIYAL, R. C. Wild edible plants of the Sikkim Himalaya: nutritive values of selected species. **Economic Botany**, New York, v. 58, n. 2, p. 286-299, 2004.

TAKEDA, K. Classical conditioned response in the honey bee. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 168-179, 1961.

TASEI, J. N.; LERIN, J.; RIPAULT, G. Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. **Pest Management Science**, Chichester, v. 56, n. 9, p. 784-788, 2000.

TAYLOR, K. S.; WALLER, G. D.; CROWDER, L. A. Impairment of a classical conditioned-response of the honey-bee (*Apis mellifera* L) by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides. **Apidologie**, Les Ulis, v. 18, n. 3, p. 243-252, 1987.

THOMPSON, H. M. Behavioural effects of pesticides in bees: their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 12, n. 1-4, p. 317-330, 2003.

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

TOKIEDA, M. et al. Method to determination of total residues of the insecticide acetamiprid and its metabolites in crops by gas chromatography. **Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 22, n. 2, p. 77-83, 1997.

TOMIZAWA, M.; YAMAMOTO, I. Structure activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs. **Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 18, n. 1, p. 91-98, 1993.

TOMIZAWA, M.; LEE, D. L.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticides: Molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 12, p. 6016-6024, 2000.

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.

TOMIZAWA, M. et al. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the drosophila nicotinic receptor: an anomaly for the nicotinoid cation-pi interaction model. **Biochemistry**, Washington, v. 42, n. 25, p. 7819-7827, 2003.

VALLES, S. M.; KOEHLER, P. G.; BRENNER, R. J. Antagonism of fipronil toxicity by piperonyl butoxide and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 90, p. 1254-1258, 1997.

van EERD, L. L. et al. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, Lawrence, v. 51, n. 4, p. 472-495, 2003.

VANDAME, R. et al. Alteration of the homing-flight in the honey-bee *Apis mellifera*. I Exposed to sublethal dose of deltamethrin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 14, n. 5, p. 855-860, 1995.

vanENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, n. Supplement 1, p. S80-S95, 2010.

WALLER, G. D. et al. Comparison of honey bee (Hymenoptera: Apidae) losses from two formulations of methyl parathion applied to sunflowers. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 77, p. 230-233, 1984.

WATANABE, M. E. Pollination worries rise as honey bees decline. **Science**, Washington, v. 265, n. 5176, p. 1170-1170, 1994.

WEBSTER, T. C.; PENG, Y. S. Short-term and long-term effects of methamidophos on brood rearing in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 82, p. 69-74, 1989.

WEICK, J.; THORN, R. S. Effects of acute sublethal exposure to coumaphos or diazinon on acquisition and discrimination of odor stimuli in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, n. 2, p. 227-236, 2002.

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

WILKINSON, C. F.; BRATTSTEN, L. B. Microsomal drug metabolizing enzymes in insects. **Drug Metabolism Reviews**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 153-227, 1972.

WILTZ, B. A.; SUITER, D. R.; GARDNER, W. A. Activity of bifenthrin, chlorfenapyr, fipronil, and thiamethoxam against argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 6, p. 2279-2288, 2009.

YAMAMOTO, I. et al. Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids. **Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 20, n. 1, p. 33-40, 1995.

YANG, X. L.; COX-FOSTER, D. L. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 21, p. 7470-7475, 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663 p.

ZHAO, X. L. et al. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 310, n. 1, p. 192-201, 2004.

ZHAO, X. L. et al. Sulfone metabolite of fipronil blocks gamma-aminobutyric acid- and glutamate-activated chloride channels in mammalian and insect neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 314, n. 1, p. 363-373, 2005.

---

Andrigo Monroe Pereira

---

Prof.Dr. Odair Correa Bueno  
(Orientador)

Rio Claro  
Agosto de 2010