

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

ELIZABETH RENATA DA SILVA

**DOSES SUBLETAIS DE PESTICIDA (acetamiprido) NÃO INFLUENCIAM NA  
SOBREVIVÊNCIA MAS AFETAM SIGNIFICATIVAMENTE A COMUNICAÇÃO  
DA ABELHA *Melipona quadrifasciata* (APIDAE: MELIPONINI)**

Dourados, Mato Grosso do Sul  
2017

ELIZABETH RENATA DA SILVA

**DOSES SUBLETAIS DE PESTICIDA (acetamiprido) NÃO INFLUENCIAM NA SOBREVIVÊNCIA MAS AFETAM SIGNIFICATIVAMENTE A COMUNICAÇÃO DA ABELHA *Melipona quadrifasciata* (APIDAE: MELIPONINI)**

Relatório final, apresentado a Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título em Bacharelado em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Samuel Vieira Boff.

Dourados, 07 de abril de 2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Samuel Vieira Boff  
UFGD/Dourados-MS

---

Dra. Julia Calhau Almeida  
UFGD/Dourados-MS

---

Ma. Jéssica Amaral Henrique  
UFGD/Dourados-MS

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S586d Silva, Elizabeth Renata Da

Doses subletais de pesticida (acetamiprido) não influenciam na sobrevivência mas afetam significativamente a comunicação da abelha *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) / Elizabeth Renata Da Silva --  
Dourados: UFGD, 2017.

23f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Samuel Vieira Boff

TCC (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências  
Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Abelhas sem ferrão. 2. Antenação e trofilaxia. 3. Comportamento social.  
4. Neonicotinoide. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**DOSES SUBLETAIS DE PESTICIDA (acetamiprido) NÃO INFLUENCIAM NA SOBREVIVÊNCIA MAS AFETAM SIGNIFICATIVAMENTE A COMUNICAÇÃO DA ABELHA *Melipona quadrifasciata* (APIDAE: MELIPONINI)**

**Resumo**

O uso de pesticida em culturas agrícolas tem aumentado significativamente no decorrer dos anos. Seu uso parece afetar indivíduos bem como colônias de insetos, dentre eles, as abelhas que são os agentes polinizadores encontrados em maior número no meio ambiente. Os efeitos nocivos de agrotóxicos nas abelhas têm despertado atenção de criadores e pesquisadores em várias partes do mundo. No presente estudo foram testadas diferentes doses do pesticida Fastac Duo (acetamiprido) para inferir toxicidade e efeito no comportamento social da abelha *Melipona quadrifasciata* (Lepetelier, 1863). Para isso, indivíduos da espécie foram submetidos à inoculação de 10µl de cinco diferentes doses do pesticida e observados por um período de 120h para a determinação de uma dose subletal. Em seguida, os indivíduos foram divididos em trios, dos quais apenas um havia sido exposto ao pesticida, para observação comportamental. Foram avaliados comportamentos de antenação e trofilaxia entre indivíduos tratados e não tratados. A mortalidade causada pelas doses não diferiu significativamente entre as doses nas 120h de experimento. Quando analisado o parâmetro comportamento social, observou-se que o tratamento com o pesticida interfere na interação entre as abelhas tratadas e as não tratadas, podendo inferir que o pesticida neonicotinoide testada causa impacto negativo na comunicação da abelha *M. quadrifasciata*.

**Palavras-chave:** abelhas sem ferrão, antenação e trofilaxia, comportamento social, neonicotinoide.

**SUBLETHAL DOSES OF PESTICIDE (acetamiprid) DO NOT INFLUENCE ON  
SURVIVAL BUT SIGNIFICANTLY AFFECT THE COMMUNICATION OF THE  
*Melipona quadrifasciata* (APIDAE: MELIPONINI)**

**Abstract**

The use of pesticides in agricultural crops has increased significantly over the years. Its use seems to affect individuals and colonies of insects, and among them, the bees that are the pollinating agents found in greater numbers in the environment. The nocive effects generated by pesticides on bees has warning beekeepers and researchers global wide. In the present study, we testes several doses of the pesticide Fastac Duo (acetamiprid) to infer toxicity and effect in the social behavior of the stingless bees *Melipona quadrifascita* (Lepetelier, 1863). For this, individuals of the species were inoculated with 10µl of five different doses of the pesticide and observed for a period of 120h for the determination of a sublethal dose. The bees were then divided into trios, and after one bee had been exposed to the pesticide, the social behaviour of the three individuals were analysed. The antennation and trophylaxis between treated and untreated individuals were evaluated. Mortality caused by sublethal doses did not differ significantly between doses within 120 hours of experiment. When analyzing the social behavior, it was observed that the treatment with the pesticide interferes in the interaction between the treated and untreated bees, being able to infer that the studied neonicotinoid pesticide causes negative impact on the communication of the bee *M. quadrifasciata*.

**Key words:** antennation and trophylaxia, neonicotinoid, social behavior, stingless bees.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 EXPERIMENTO I.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 EXPERIMENTO II.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.1 EXPERIMENTO I.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2 EXPERIMENTO II.....</b>	<b>12</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>18</b>
<b>6. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>19</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>20</b>

## 1. Introdução

A polinização é um serviço ecossistêmico que contribui com a produção de frutos e sementes bem como contribui para a ampliação da diversidade genética (Bawa, 1990). Entre os diversos polinizadores, as abelhas representam papel fundamental por realizarem a polinização de mais de 70% de plantas com flores, sendo assim, considerados os mais diversos agentes polinizadores encontrados no meio ambiente (Freitas, 2006; Michener 2007).

As abelhas também apresentam um papel importante, incrementado à produção agrícola, principalmente de frutíferas, de pequenos e grandes produtores em detrimento das monoculturas (Garibaldi et al., 2016). Diversos estudos mostram que a prática dos polinizadores além de aumentar a produtividade também aumenta a qualidade do produto contribuindo assim para a economia local e regional (Klein et al., 2007; Aizen et al., 2009; Garibaldi et al., 2013). Recentemente o serviço global dos polinizadores passou a ser valorado em termos monetários (Hein, 2009; Winfree et al., 2011) sendo estimado em 202 bilhões de dólares ao ano (Gallai et al., 2009).

Por outro lado, o serviço prestado pelos polinizadores está ameaçado (Potts et al., 2010). O aumento da população mundial e a busca crescente de alimentos têm como consequência uma maior solicitação de pesticidas nas plantações como medida de assegurar maior produtividade. Embora ocorra dependência das abelhas para a manutenção da biodiversidade e para a expansão da demanda por alimento, diversas populações de abelhas, como espécies manejadas (ex: abelhas africanizadas - *Apis mellifera* e mamangavas- *Bombus* sp e *Xylocopa* sp) bem como espécies não manejadas, estão diminuindo em todo o mundo (Biesmeijer et al., 2006; Ricketts et al., 2008; Brown & Paxton, 2009; Freitas et al., 2009; Potts et al., 2010). Diversos fatores, em sua maioria antrópicos, tem causado o declínio dos polinizadores e colocado em risco a biodiversidade de abelhas. Dentre as causas destacam-se as atividades de monocultura e o uso indiscriminado de pesticidas (Potts et al., 2010).

A contaminação das abelhas por pesticidas ocorre, geralmente, durante a coleta de recursos florais pelo contato, pela ingestão e por meio da fumigação e pode atingir em maior ou menor extensão o interior do ninho afetando diretamente os indivíduos da mesma forma que todo o funcionamento da colônia (Pacífico da Silva et al., 2016). Dessa forma, a descaracterização ambiental com ausência de oferta de recursos e o uso dos pesticidas contribuem com o aumento do *stress* energético das abelhas (Mayack & Naug, 2009), à redução da sua habilidade de forrageamento (Samuelson et al., 2016), tal como a oferta de áreas de nidificação (Potts et al., 2010). Os efeitos tóxicos também estão intimamente ligados

às concentrações administradas, o tempo de exposição, dentre outras características (Double et al., 2014; Pacífico da Silva et al., 2016).

Diversos estudos com pesticidas já foram realizados cobrindo tópicos de efeitos subletais, à exposição em combinação com outros agentes estressores como infecções a parasitas (Alaux et al., 2010; Laurino et al., 2011; Krupke et al., 2012) entre eles de patógenos *Nosemacerane* e Black queen cell virus (Doublet et al., 2014).

Dentre alguns efeitos neurológicos pode se salientar uma diminuição na qualidade de voo (Henry et al., 2012; Gill & Raine, 2014; Samuelson et al., 2016) e redução das atividades de memória, fatores requeridos para uma polinização eficiente e alimentação das crias no interior do ninho (Fischer et al., 2014). Quando os neonicotinoides são misturados aos fungicidas é observado uma potencialização dos efeitos negativos no comportamento das abelhas (Biddinger et al., 2013).

Entre os mais diversos tipos de pesticidas que são regularmente utilizados, sobretudo no Brasil, os neonicotinoides, incluem fórmulas (ex. triacloprida, imidacloprida e acetamiprida), empiricamente testadas e avaliadas como muito tóxicas. Estes pesticidas interagem e atuam antagonicamente com os receptores da acetilcolina nicotínica no cérebro dos insetos, podendo ser muito efetivos em matar uma ampla gama de insetos (Matsuda et al., 2001; Elbert et al., 2008). Recentemente foi mostrado que eles desregulam e afetam negativamente o sistema imune das abelhas, culminando em uma maior susceptibilidade de infecção viral (Di Prisco et al., 2013).

Embora a intensidade dos efeitos dos pesticidas possa variar entre espécies, os resultados obtidos a partir destes estudos são consistentes em demonstrar que os pesticidas contribuem com o declínio das populações de abelhas. Os efeitos dos pesticidas nas abelhas, todavia, são dependentes da classe ao qual o pesticida pertence bem como do desenho experimental, os quais incluem a espécie de abelha utilizada, idade, os métodos para testar sua toxicidade (se oral ou tópico), além da concentração.

Visto a importância das abelhas para a polinização e a situação de risco a que estes indivíduos estão submetidos, sobretudo nas áreas de tensão com uso extensivo de pesticidas (ex. Mato Grosso do Sul), este estudo tem por objetivo analisar o efeito de pesticidas na sobrevivência da abelha *M. quadrifasciata* (Lepetelier, 1863) (toxicidade) bem como estudar o efeito de dose subletal no comportamento social das abelhas. Parte-se do princípio de que acetamiprida por ser um neonicotinoide age como receptor da acetilcolina no cérebro das abelhas e assim as interações sociais podem ser afetadas entre indivíduos quando do contato com o pesticida. As hipóteses do estudo é que doses mais altas do pesticida tem efeito sobre o



tempo de vida das abelhas e de que o comportamento social (número de antenações e trofilaxia) entre indivíduos é afetado quando um indivíduo recebe uma dose de pesticida.

## **1. Materiais e Métodos**

As abelhas utilizadas no experimento foram providas de cinco diferentes ninhos (provenientes de Itu-SP) mantidos em um fragmento de Mata Atlântica na Fazenda Coqueiro, Dourados-MS (22°11'57"S e 54°54'29"W). Fêmeas adultas foram capturadas na entrada dos ninhos nas primeiras horas da manhã (entre 7 e 8 horas) com auxílio de tubos plásticos, tipo Falcon (50ml). Estes foram posicionados em frente à entrada do ninho, de maneira que abelhas, ao saírem do mesmo (após o gentil estímulo mecânico-sonoro no lado externo), passassem diretamente do interior do ninho para o interior do frasco. Após a coleta, as abelhas foram levadas diretamente para o laboratório onde foram submetidas a condições controladas de estudo (Fig 2a).

### **2.1 Experimento I: Teste para avaliação de toxicidade**

No laboratório, as abelhas foram individualizadas em potes (250cm<sup>3</sup>) e armazenadas por privação de alimento por um período de 1h (Fig 2b). Em seguida foi ofertado para cada abelha individualmente o volume de 10 µl de solução em um alimentador no interior de cada pote (Fig 2c). Cada abelha tratada recebeu uma única dose da solução controle (solução de sacarose 50%) ou uma única dose da solução contendo o pesticida Fastac Duo – BASF, composto por acetamiprido (10% - (E)-N1[(6-cloro-3-pyridyl)methyl]-N2-cyano-N1-methyl-acetamidine), alfa-cipermetrina (20% - racemate comprising (S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-cyclo-propane-carboxylate e (R)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1S,3S)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethyl-cyclo-propane-carboxylate) e outros componentes (86%). Todavia cinco doses do pesticida de diferentes concentrações foram utilizadas durante o estudo. Estas foram obtidas através de diluição em série (10 vezes) do pesticida em água destilada a partir da dose de maior concentração (Tabela 1). Esta última foi aquela similar ao encontrado na bula do pesticida Fastac Duo e indicada para aplicação em campo nos cultivos de soja.

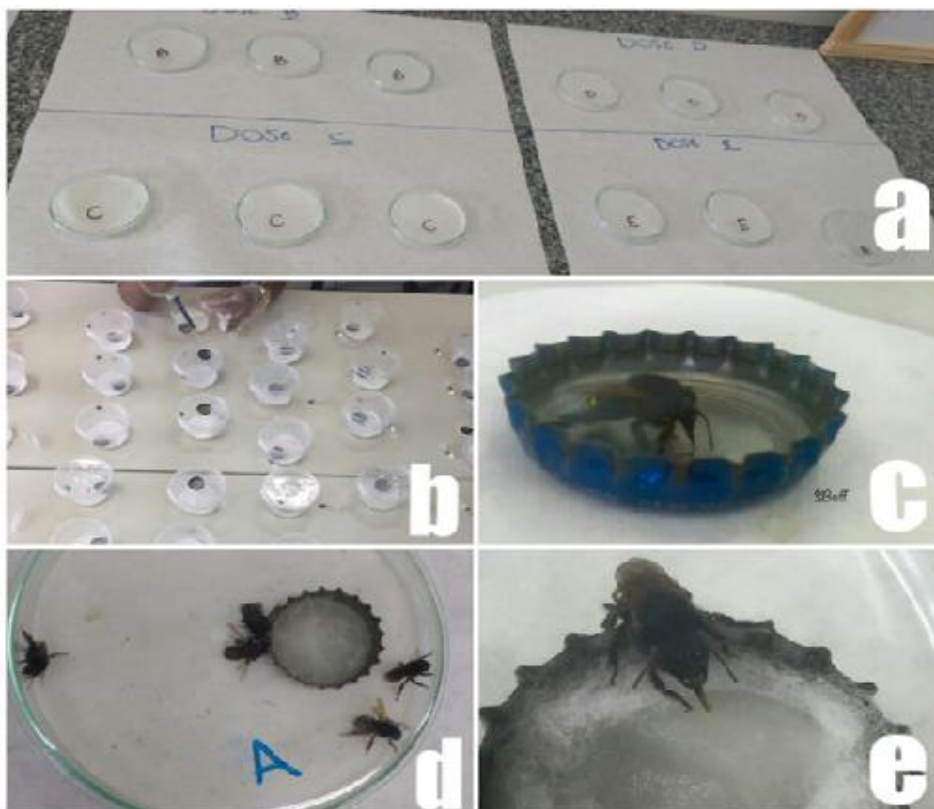
Após a ingestão da solução (controle ou pesticida) por todas as abelhas testadas, estas foram transferidas para placas de Petri (10cm<sup>3</sup>) forrada com papel filtro na base e com tampa em grupo de cinco indivíduos por placa de acordo com a dose ofertada (Fig 2d). No centro de cada placa foi oferecido um alimentador em forma de prato. O alimentador fora constituído

por um chumaço de algodão embebido em solução de sacarose 50% sobre um recipiente metálico. Diariamente, 1000µl de solução sacarose 50% foi oferecida no alimentador de modo que as abelhas sempre tivessem alimento disponível no interior da placa (Fig 2e).

**Tabela 1.** Concentrações utilizadas para cada dose.

<b>Dose</b>	<b>Concentração (acetamiprido)</b>
Controle	0g/L
A	100g/L
B	10g/L
C	1g/L
D	0,001g/L
E	0,0001g/L

Os testes de susceptibilidade ao tratamento (controle e pesticidas) pelas abelhas tiveram a duração máxima de 120h. Assim, as placas que continham as cinco abelhas foram monitoradas diariamente em intervalos de 24 horas após ingestão, por cinco dias. Durante o monitoramento as abelhas receberam um novo alimentador e os indivíduos que não apresentavam movimentos foram retirados da placa com auxílio de uma pinça. Estas abelhas foram consideradas mortas e o seu registro foi contabilizado para o cálculo da sobrevivência referente a cada grupo (controle e tratamento com pesticida).



**Figura 2.** Desenho experimental: (a) disposição das placas sobre bancada para realização da observação diária e contagem de possíveis mortes; (b) etapa de individualização dos indivíduos para o tratamento com pesticida; (c) indivíduo ingerindo dose de 10 $\mu$ l oferecida em alimentador metálico; (d) placa onde foram dispostas as abelhas após o tratamento com o pesticida; (e) alimentador disponível no interior da placa, com algodão embebido em solução de sacarose 50%. (Fotos autorais).

## 2.2. Experimento II: Efeito de pesticida no comportamento social

Para a avaliação do comportamento social foram separados dezessete grupos, cada qual formado por 3 abelhas. Inicialmente, para que não houvesse qualquer tipo de comunicação entre os indivíduos, as abelhas foram individualizadas em potes plásticos (250cm<sup>3</sup>) transparentes onde foram mantidas sem qualquer tipo de alimentação e contato por um período de uma hora. Após esse período apenas uma abelha (de um grupo de três) recebeu uma dose de 15 $\mu$ l do pesticida de concentração mais alta (dose A), oferecida também em alimentador. Marcou-se o horário em que a abelha tratada consumiu por completo a dose do pesticida. Logo após o intervalo de uma hora, período de digestão do pesticida, foi aguardado até que as três abelhas (uma tratada e duas não tratadas) fossem marcadas no tórax com cores diferentes e reunidas em placas de Petri com tampa, forrada com papel filtro e alimento *ad libitum*.

Os grupos foram observados individualmente durante 10 minutos cronometrados em 3 rodadas, totalizando 30 minutos de observação em cada grupo. O experimento foi realizado em dois dias, onde, no primeiro dia foram observadas oito placas contendo três indivíduos cada, e no segundo dia, nove placas também com três indivíduos cada. Foram anotados comportamentos de antenação e trofilaxia, diferenciando-se se a comunicação era entre as abelhas não tratadas ou entre a abelha tratada e não tratada.

O estudo do efeito de doses subletais e para a avaliação do comportamento social foi realizada em condições laboratoriais, com presença de luz natural ou artificial durante o período de dia e com fase de escuro durante o período natural de ausência de luz, sem interrupção de luz artificial durante a noite. A temperatura durante todo o experimento foi controlada entre 25° e 26 °C.

### **2.3. Análises estatísticas**

#### **2.3.1. Experimento I**

Quando houve mortes, estas foram computadas em planilhas anotando-se separadamente o número de mortes em cada período e dose. Ao final do experimento foi levantada a porcentagem de mortes em cada dose, incluindo o grupo controle, com base no número inicial e total de indivíduos mortos. Tais porcentagens foram analisadas entre as primeiras 48 horas de experimento. Todavia, as abelhas sobreviventes nas primeiras 48 horas foram acompanhadas num período total de 120 horas para avaliar o efeito tardio na sobrevivência das abelhas pelas doses utilizadas. A análise de sobrevivência foi realizada por meio da utilização do método denominado Regressão Cox, que consiste na investigação do efeito do variável tratamento sobre o tempo de vida. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico **SPSS v.19 (IBM)**.

#### **2.3.2. Experimento II**

Foram consideradas cinco amostras de três observações aleatórias entre as dezessete placas de cada tratamento por hora, totalizando trinta amostras. Foi considerada a soma das três observações em cada amostra, sendo assim, essas amostras foram consideradas não pareadas. As análises das interações sociais (abelha tratada vs. abelhas não tratadas) foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) com a comparação aleatória de cinco conjunto de dados para cada hora. As análises estatísticas foram tabeladas com auxílio do programa estatístico **R**.

### 3. Resultado

Os resultados mostram que ao longo das primeiras 48 horas, duas das doses (“A” e “C”), sendo uma delas a de maior concentração do pesticida (dose A), contribuíram para maior mortalidade de indivíduos do que todas as demais doses juntas e o controle (Tabela 2). Apesar da maior mortalidade entre as doses “A” e “C”, nos dois primeiros dias após início do experimento, não houve uma diferença significativa global no número de mortes entre as doses testadas e controle ao longo das 48 horas iniciais de experimento ( $X^2 = 1.510$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.912$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada para qualquer comparação pareada entre os diferentes tratamentos ao longo das primeiras 48 horas ( $p > 0.05$ , para todas possíveis comparações pareadas).

**Tabela 2.** Número amostral utilizado em cada dose com número de mortes e porcentagem do índice de mortalidade nas primeiras 48 horas de experimento.

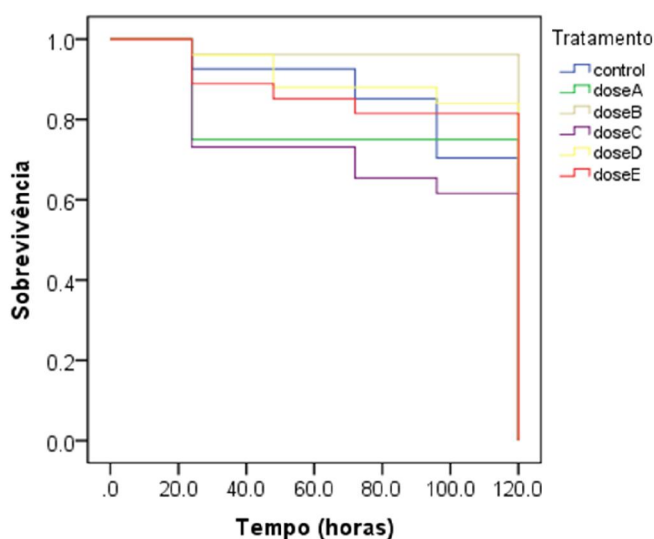
		% mortes		
	N	24h	48h	em 48h
<b>Controle</b>	29	2	0	6%
<b>Dose A</b>	28	7	0	25%
<b>Dose B</b>	26	1	0	3%
<b>Dose C</b>	26	7	0	26%
<b>Dose D</b>	25	1	2	12%
<b>Dose E</b>	27	3	1	14%

Não foi encontrada nenhuma evidência estatística de que as doses diminuíssem a expectativa de sobrevivência das abelhas, o que evidenciou em doses que não levam a um incremento na mortalidade com o passar de 120 horas ( $X^2 = 2.173$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.825$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Número amostral (N) utilizado no teste para doses subletais em cada dose, com soma total do número de mortalidade (N mortes) e porcentagem do índice de mortalidade para cada dose (% mortes).

								%
	N	24h	48h	72h	96h	120h	N mortes	mortes
<b>Controle</b>	29	2	0	2	4	1	9	31%
<b>Dose A</b>	28	7	0	0	0	1	8	29%
<b>Dose B</b>	26	1	0	0	0	1	2	8%
<b>Dose C</b>	26	7	0	2	1	2	12	46%
<b>Dose D</b>	25	1	2	0	1	0	4	16%
<b>Dose E</b>	27	3	1	1	0	0	5	19%

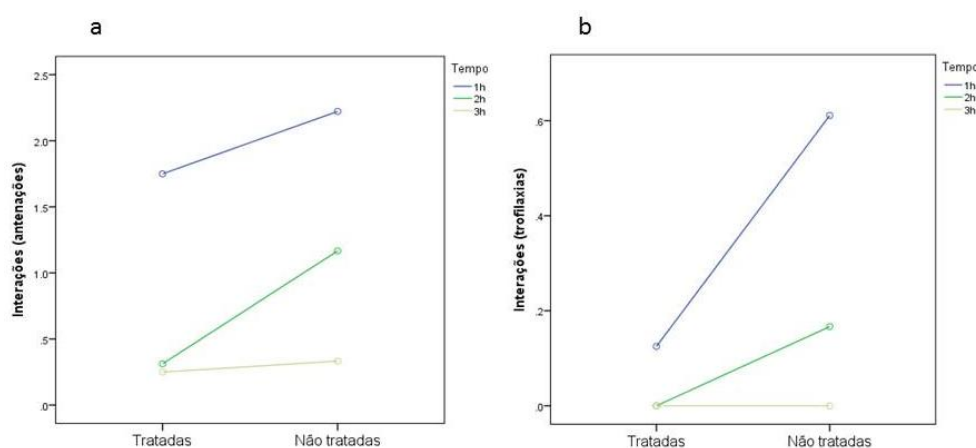
Apesar das doses “A” e “C” apresentaram maior índice de mortes nas primeiras 24 horas, as doses “controle”, “B”, “D” e “E” se mantiveram com resultados semelhantes durante as 120 horas do experimento, sendo ausente qualquer diferença significativa na mortalidade entre todos os tratamentos ( $p > 0.05$ , para todas possíveis comparações pareadas) (Fig. 3).



**Figura 3.** Efeito de doses de Neonicotinoide (Acetamiprido) na sobrevivência da abelha *Melipona quadrifasciata*

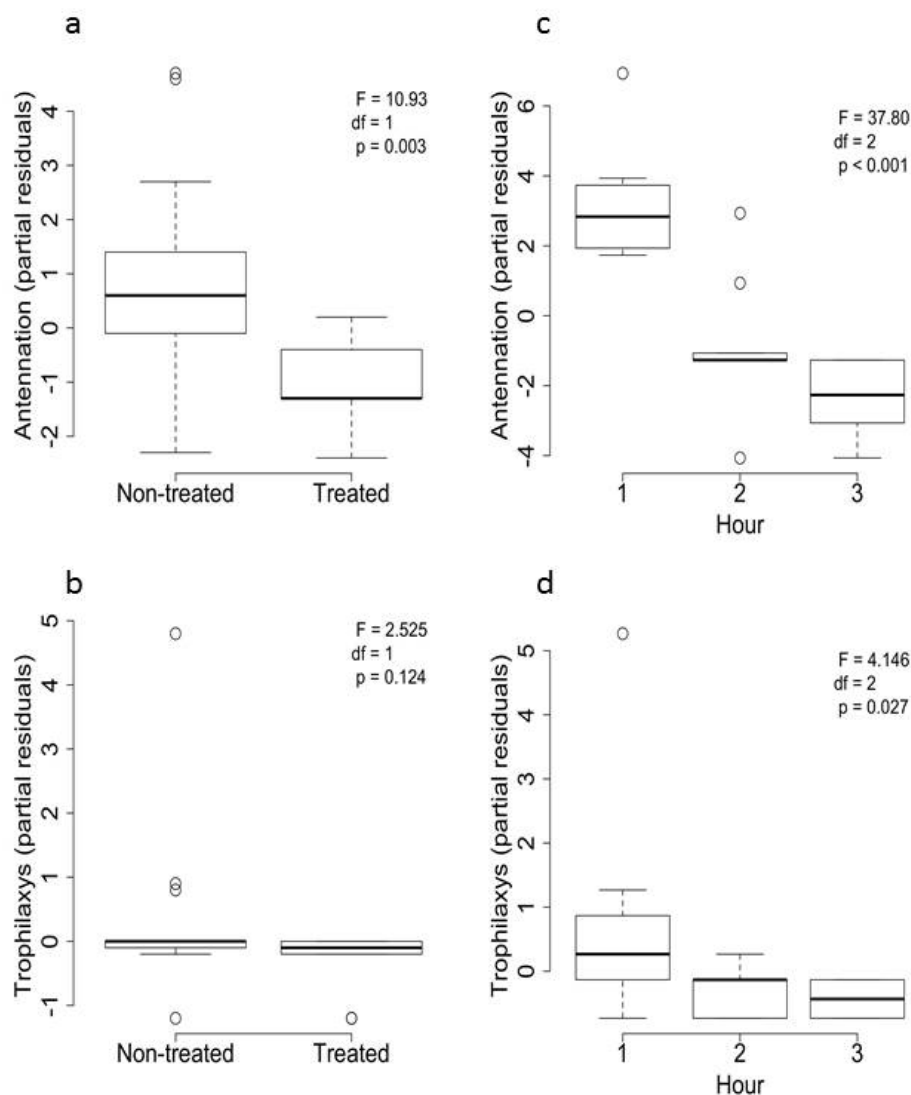
As doses “A” e “C” apresentaram maior índice de mortalidade nas primeiras 24 horas de experimento em relação às demais doses testadas (“B”, “D”, “E”). No grupo Controle as mortes se mantiveram próximas aos resultados obtidos nas doses mais fracas (“D” e “E”). Não houve diferença significativa na mortalidade para qualquer comparação entre os tratamentos ( $p > 0.05$ , para todas as comparações).

Em relação a comunicação social, encontrou-se um efeito do pesticida no número de antenações. O número observado deste comportamento, entre as abelhas não tratadas ( $n=64$ ) foi superior ao número de antenações entre as fêmeas tratadas e as demais do grupo ( $n=40$ ). Embora o número de trofilaxias entre abelhas não tratadas ( $n = 14$ ) tenha sido maior que nas abelhas tratadas ( $n = 2$ ) em geral as trofilaxias foram raras, independente do tratamento. O número de interações sociais (antenações e trofilaxias) na primeira hora após o tratamento foi superior que o da segunda hora e este último maior que o da terceira hora (Fig 4).



**Figura 4.** As interações sociais (a-antenações e b- trofilaxia) ocorreram com maior frequência entre as abelhas não tratadas. As interações sociais entre as abelhas (independente do tratamento) reduziram ao longo.

O número de antenações foi significativamente maior entre fêmeas não tratadas do que para com fêmea tratada ( $F = 10.93$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.003$ , Fig 5a). A diferença no número de trofilaxias não foi diferente entre os dois tratamentos ( $F = 2.525$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.124$ , Fig 5b). Houve também diferença temporal durante o experimento. As abelhas trocaram antenações com mais frequência na primeira hora de observação do que nas demais horas ( $F = 37.80$ ,  $df = 2$ ,  $p = <0.001$ , Fig 5c). O mesmo padrão foi observado para trofilaxia ( $F = 4.146$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.027$ , Fig 5d).



**Figura 5.** As antenações se apresentaram em maior número nas abelhas não tratadas do que em relação as abelhas tratadas (a); na trofilaxia, não houve diferença nos resultados entre os dois tratamentos (b). As interações sociais foram maiores nas primeiras horas de observação tanto para antenação (c) quanto para trofilaxia (d).

#### 4. Discussão

O presente estudo testou doses subletais de um pesticida neonicotinoide (Fastac Duo-BASF) no comportamento social da abelha neotropical *M. quadrifasciata*, utilizando dois experimentos distintos. Em um primeiro momento testou-se cinco doses diferentes do pesticida, mantendo uma sexta dose para o grupo controle. O efeito das doses foi contabilizado diariamente durante 120h, com levantamento de mortes causadas por cada uma delas. Apesar de não ter apresentado significância estatística, tal teste foi importante para determinar a dose que seria utilizada para o teste de comportamento social. Em sequência,



observamos comportamentos essenciais para a sobrevivência das abelhas sociais (antenação e trofilaxia) entre abelhas tratadas e não tratadas com dose subletal do pesticida. Pode-se notar que o pesticida tem visível impacto sobre a interação social entre uma abelha que foi exposta a sua ação e abelhas que não tiveram contato com o pesticida.

Os estudos realizados visando efeitos subletais de pesticidas em abelhas melíferas ainda são pouco conhecidos e vem ganhando espaço em pesquisa por todo o mundo. Em nossos testes, apesar de não encontrar significância na mortalidade, o número desta foi consideravelmente alto nas primeiras 48 horas de experimento. Isto pode decorrer à possibilidade de haver atenuação da toxicidade do pesticida após a ingestão do mesmo, com o decorrer dos dias de observação. Tal atenuação pode ser consequência tanto de trabalho metabólico, como eliminação do pesticida através de fras e vômito. A partir desse resultado, novos testes específicos podem ser realizados para averiguar se há resíduos de pesticida entre os diferentes grupos e testar essa hipótese.

No experimento testando o efeito do pesticida no comportamento social, as abelhas não tratadas apresentaram interação estatisticamente significativas quando comparadas à comunicação entre as tratadas e as não tratadas, principalmente, quando se observa o comportamento de antenação na primeira hora de observação. Embora o número de trofilaxias tenha sido menor entre os indivíduos, não se pode descartar que o pesticida também surte efeito negativo sobre esse fator comportamental. Existem evidências de que pesticidas em concentrações subletais contribuem para o declínio dos polinizadores pois afetam as respostas comportamentais dos indivíduos (Desneux et al., 2007; Blacquiere et al., 2012).

Organismos sociais, sobretudo aqueles que vivem com centenas de indivíduos organizados hierarquicamente em um ninho (ex: abelhas eusociais) apresentam um refinado sistema de comunicação (Michener, 2007). Os indivíduos podem comunicar-se através de pistas químicas, danças ou diretamente por contato (Michener, 2007). Dentre os diferentes tipos de comunicação por contato, destaca-se a antenação, comportamento utilizado para distinguir fêmeas aparentadas de fêmeas provenientes de outros ninhos (rejeição a fêmeas de ninhos diferentes) (Breed et al., 1992). O resultado da comunicação entre os indivíduos não tratados corrobora com a hipótese de que a exposição ao pesticida prejudica a interação entre os indivíduos dentro do ninho. O déficit de comunicação entre as abelhas contaminadas pode acarretar em inúmeros problemas para uma colônia, uma vez que o reconhecimento de abelhas não relacionadas pode estar sob risco (Breed et al., 1992). Recentemente foi encontrado a presença de inúmeras proteínas específicas de receptores de odores nas antenas,

sendo assim a redução da antenação entre indivíduos poderia afetar em grande escala o desenvolvimento da colônia, uma vez que odores sexuais podem ser transmitidos via antenação (Laughlin et al., 2008; Leal, 2005).

Em outro estudo realizado por Tomé et al., (2015) foram verificados os efeitos letais e subletais que também alteraram o comportamento social da espécie quando expostos ao neonicotinóide imidacloprida e ao bio-inseticida spinosad 4. Os indivíduos adultos das abelhas operárias foram extremamente susceptíveis ao tratamento oral de ambos os pesticidas, ou seja, as abelhas apresentam grande sensibilidade aos efeitos causados pela toxicidade de pesticidas. Além disso, os danos causados pelos pesticidas às abelhas não se restringem apenas ao comportamento social. A reprodução e desenvolvimento dos ninhos também é posto em risco, uma vez que, a ação do pesticida afeta o desenvolvimento larval. Tais ações podem interferir no tempo de desenvolvimento larval, morte de larvas, diferenciação das rainhas e produção de geleia real (Santos et al., 2016). Em estudo realizado por Schmuck et al., (2001) foi avaliado o efeito da exposição crônica de abelhas melíferas à neonicotinoide. Foi constatado que uma pequena dose do pesticida afetou o ciclo de postura de ovos da rainha e a quantidade de larvas e de pupas de *Apis mellifera*. Em outro estudo, utilizando do mesmo procedimento, foi verificado que a exposição mesmo que a baixas doses de neonicotinoide gera baixa emergência de larvas de *Bombus terrestris*, tendo como consequência a diminuição do número de crias (Tasei et al., 2000).

## 5. Considerações Finais

Embora tenha-se notado esforços nesta área de estudos no Brasil (atual estudo, Tomé et al., 2015; Pacífico et al., 2016; Santos et al., 2016) ainda há poucas informações sobre os efeitos subletais de pesticidas à agentes polinizadores (Malaspina & Souza 2008; Malaspina et al., 2008; Pinto & Miguel 2008), principalmente devido ao fato de que muitos agrotóxicos, banidos em outros países, são legais no Brasil. Levando em conta visar boas práticas de manejo para minimizar os efeitos negativos racionalizando o uso de pesticida nas culturas agrícolas brasileiras (Pinheiro & Freitas, 2010). É necessário levar em conta não somente os efeitos letais, mas também subletais, principalmente a longo prazo (Freitas & Pinheiro, 2010). Os nossos resultados mostraram a curto prazo os problemas associados a comunicação social. Em campo os efeitos de pesticidas, todavia, é potencialmente mais crítica, uma vez que as abelhas estão sujeitas a múltiplas doses de pesticidas. Ensaio laboratoriais testando o efeito

de múltiplas doses subletais de pesticidas indicam múltiplos efeitos negativos no comportamento para um bom desenvolvimento da colônia (Aliouane et al., 2009).

Estudos realizados associando pesticidas de outras categorias, como piretroides e fipronil, com neonicotinoides apontam que estes são potenciais agentes causadores de problemas em colônias de abelhas (Cress Well et al., 2012, Gill et al., 2012, Tirado et al., 2013). Além disso, os pesticidas neonicotinoides podem reduzir a resposta imune à patógenos que podem atacar o ninho (Doublet et al., 2014; Pacífico da Silva et al., 2016). O sistema tradicional de aplicação e o uso irracionalizado destes pesticidas afetam de forma extremamente negativa a biodiversidade em largo espectro, atingindo não apenas o inseto-alvo, mas também uma variedade de outras espécies de insetos. A acetamiprida, em especial, afeta negativamente as abelhas (os mais importantes agentes polinizadores) em sua comunicação, devido sua ação neurotóxica (Freitas & Pinheiro, 2010). Sendo assim, é necessário que haja com urgência uma revisão sobre as políticas públicas do uso de pesticidas no Brasil, sobretudo os neonicotinoides, para que abelhas e demais insetos polinizadores não continuem sendo prejudicados pelo uso de tais produtos.

Embora os testes apresentados aqui tenham sido realizados em condições controladas diferindo às condições de variáveis climáticas e ecológicas em que as comunidades de abelhas são expostas diariamente no campo nossos resultados corroboram com outros diversos estudos sobre os malefícios de pesticidas, sobre tudo quanto ao efeito de neonicotinoides sobre o comportamento social das abelhas.

## **6. Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Samuel Boff, por toda ajuda e ensinamentos passados mim durante a realização da pesquisa. A Anna Friedel, Eliana Ferreira, Nathalia Lomba e Patricia Rosetti Lenis, pela ajuda na coleta de dados em campo e durante os experimentos no Laboratório. Ao Prof. Dr. Josué Raizer e Anna Friedel, pelo auxílio estatístico. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Mussury, por contribuir e disponibilizar facilidades para o desenvolvimento da pesquisa.

## 7. Referências Bibliográficas

- AIZEN, M. A.; GARIBALDI, L. A.; CUNNINGHAM, S. A.; KLEIN, A. M. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long- trends in crop production. **Annals of Botany**, p 1-10, 2009.
- ALAUX, C.; BRUNET, J. L.; DUSSAUBAT, C.; MONDET, F.; TCHAMITCHAN, S.; BRILLARD, J.; BALDY, A.; BELZUNCES, L. P.; LE CONTE, Y. Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, v.12, p. 74-78, 2010.
- ALIOUANE, Y.; HASSANI, A. K. E.; GARY, V.; ARMENGAUD, C.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 113-122, 2009.
- BAWA, K. S. Plant-pollinator interections in tropical rais forests. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.21, p. 399-422, 1990.
- BIDDINGER, D. J.; ROBERTSON, J. L.; MULLIN, C.; FRAZIER, J.; ASHCRAFT, S.A.; RAJOTTE, E. G.; JOSHI, N. K.; VAUGHN, M. Comparative toxicities and synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmiacornifrons* (Radoszkowski). **PLoS ONE**, 2013.
- BIESMEIJER, J. C., ET AL. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, p. 351-354, 2006.
- BLACQUIERE, T.; SMAGGHE, G.; VAN GESTEL, C. A. M.; Mommaerts, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 973 – 992, 2012.
- BREED, M. D; SMITH, T. A; TORRES, A. Role of guard honey bees (Hymenoptera: Apidae) in nestmate discrimination and replacement of removed guards. **Annals of th Entomological Society of Amercia**, v. 85, p.33–37, 1992.
- BROWN, M. J. F., PAXTON, R. J. The conservation of bees: a global perspective. **Apidologie**, v. 40, p. 410-416, 2009.

CRESSWELL, J. E.; PAGE, C. J.; UYGUN, M. B.; HOLMBERGH, M.; LI, Y., ET AL. Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide(imidacloprid). **Zoology**, v. 115, p. 365–371, 2012.

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

DI PRISCO, G.; CAVALIERE, V.; ANNOSCIA, D.; VARRICCHIO, P.; CAPRIO, E.; NAZZI, F., ET AL. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 110, p. 18466-18471, 2013.

DOUBLET, V.; LABARUSSIAS, M.; MIRANDA, J. R.; MORITZ, R. F. A.; PAXTON, R. J. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. **Environmental Microbiology**, 2014.

ELBERT, A.; HAAS, M.; SPRINGER, B.; THIELERT, W.; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, v. 1105, p. 1099-1105, 2008.

FREITAS, B. M. As abelhas como agentes polinizadores na produção de alimentos e conservação de recursos florais. **Anais de Simpósios da 43ª Reunião Anual da SBZ**, 2006.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MEDINA, L. M.; KLEINERT, A.M. P.; GALETTO, L.; NATES-PARRA, G.; QUEZADA-EUÁN, J.J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, p. 32-34, 2009.

FISCHER, J.; MÜLLER, T.; SPATZ, A. K.; GREGGERS, U.; GRÜNEWALD, B.; MENZEL, R. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. **PLoS ONE**, 2014.

FREITAS B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos subletais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 282-298, 2010.

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

GARIBALDI, L. A.; CARVALHEIRO, L. G.; VAISSIÈRE, B. E., ET AL. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. **Science**, v. 351, p. 388-391, 2016.

GARIBALDI, L. A., STEFFAN-DEWENTER, I.; WINFREE, R.; AIZEN, M. A.; ET AL. Wild pollinator enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science Express**, 2013.

GILL, R. J.; RAINE N.E. Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. **Functional Ecology**, v. 28, p. 1459-1471, 2014.

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

HEIN, L. The Economic Value of the Pollination Service, a Review Across Scales. **The Open Ecology Journal**, v.2, p.74-82, 2009.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J. F.; AUPINEL, P.; DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, p. 348-350, 2012.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMENCAND, T.; TSCHARNTKE. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society**, v. 274, p. 303-313, 2007.

KRUPKE, C. H.; HUNT, G. J.; EITZER, B. D.; ANDINO, G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS ONE**, 2012.

LAUGHLIN, J. D.; HA, T. S.; JONES, D. N.; SMITH, D. P. Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone binding protein. **Cell**, v. 133, p. 55–65, 2008.

LEAL, W.S. Pheromone reception. **Topics in Current Chemistry**, v. 240, p. 1–36, 2005.

LAURINO, D.; PORPORATO, M.; MANINO, A.; PATETTA, A. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, v. 64, p. 107-113, 2011.

MALASPINA, O; SOUZA, T. F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. **Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Apicultura e III de Meliponicultura**, 2008.

MALASPINA, O; SOUZA, T. F.; ZACARIN, E. C. M. S.; CRUZ, A. S.; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos no Brasil. **Anais do VIII Encontro sobre Abelhas**, v. 8, p. 41-48, 2008.

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM, S. D.; KLEINER, D.; RAUH, J. J.; GRAUSO, M.; SATTELLE, D. B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 573-580, 2001.

MAYACK, C.; AND NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from Nosemaceranae infection. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 185-188, 2009.

MICHENER, C. D. The bees of world. **Library of Congress Cataloging**, v. 2, p. 9-13, 2007.

PACÍFICO DA SILVA, I.; MELO, M. M.; SOTO-BLANCO, B. Efeitos tóxicos dos praguicidas para abelhas. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, p. 142-157, 2016.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **O ecologia Australis**, 14: 266-281, 2010.

PINTO, M. R.; MIGUEL, W. Intoxicação de *Apis mellifera* por organofosforado na região do Vale do Itajaí – SC. **Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 2008.

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

RICKETTS, T.; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; BOGDANSKI, A.; GEMMIL-HERREN, B.; GREENLEAF, S. S.; KLEIN, A. M.; MAYFIELD, M. M.; MORANDIN, L. A.; OCHIENG, A.; VIANA, B.F. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, v. 11, p. 499-515, 2008.

SAMUELSON, E. E. W.; CHEN-WISHART, Z. P.; GILL, R. J.; LEADBEATER, E. Effect of acute pesticide exposure on bee spatial working memory using an analogue of the radial-arm maze. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

SANTOS, C. F.; ACOSTA, A. L.; DORNELES, A. L.; SANTOS, P. D. S.; BLOCHTEIN, B. Queen become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. In: **Scientific Reports. Nature**, v. 6, p. 1-9 2016.

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

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**, v. 56, p. 784-788, 2000.

TIRADO, R.; SIMON, G.; JOHNSTON, P. A. Greenpeace International, The Netherlands. Bees in decline—a review of factors that put pollinators and agriculture in Europe at risk. In: **Greenpeace International (ed.), Greenpeace Research Laboratories Technical Report (Review)**, v. 1, 2013.

TOMÉ, H. V.V.; BARBOSA, W. F.; MARTINS, G. F.; GUEDES, R. N. C. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, p. 3-10, 2015.

WINFREE, R.; BARTOMEUS, I.; CARIVEAU, D. P. Native Pollinators in Anthropogenic Habitats. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 1-22, 2011.