

Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade - PPGECB

Padrão de distribuição temporal de *Apis mellifera* L. 1758
(Hymenoptera: Apidae) em um cultivo de soja (*Glycine max* (L.)
Merr.) de ciclo indeterminado e toxicidade de inseticidas para
tratamento de sementes em abelhas adultas

Ellen Patrícia de Souza

Dourados-MS

Janeiro/2019

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Ellen Patrícia de Souza

Padrão de distribuição temporal de *Apis mellifera* L. 1758
(Hymenoptera: Apidae) em um cultivo de soja (*Glycine max* (L.)
Merr.) de ciclo indeterminado e toxicidade de inseticidas para
tratamento de sementes em abelhas adultas

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande
Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de DOUTORA EM
ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande

Dourados-MS

Janeiro/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S729p Souza, Ellen Patricia De
Padrão de distribuição temporal de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) em um cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) de ciclo indeterminado e toxicidade de inseticidas para tratamento de sementes em abelhas adultas [recurso eletrônico] / Ellen Patricia De Souza. -- 2019.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Dr. Paulo Eduardo Degrande.
Coorientador: Dr. Valter Vieira Alves Junior.
Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Pólen. 2. Desordem do Colapso das Colônias. 3. Forrageamento. 4. Produtos Fitossanitários.
5. Intoxicação. I. Degrande, Dr. Paulo Eduardo. II. Alves Junior, Dr. Valter Vieira. III. 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.

"PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DE *Apis mellifera* L. 1758
(HYMENOPTERA: APIDAE) EM UM CULTIVO DE SOJA (*Glycine max* (L.)
MERR.) DE CICLO INDETERMINADO E TOXICIDADE DE INSETICIDAS
PARA TRATAMENTO DE SEMENTES EM ABELHAS ADULTAS."

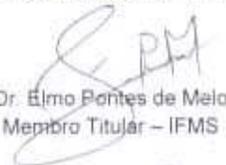
Por

ELLEN PATRÍCIA DE SOUZA

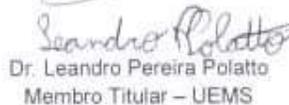
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTORA EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



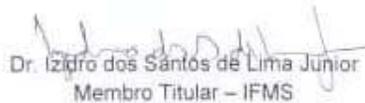
Dr. Paulo Eduardo Degraide
Orientador/Presidente – UFGD



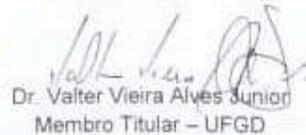
Dr. Elmo Pontes de Melo
Membro Titular – IFMS



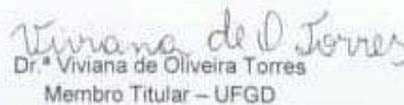
Dr. Leandro Pereira Polatto
Membro Titular – UEMS



Dr. Izidro dos Santos de Lima Junior
Membro Titular – IFMS



Dr. Valter Vieira Alves Junior
Membro Titular – UFGD



Dr. Viviana de Oliveira Torres
Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 31 de janeiro de 2019.

Biografia da Acadêmica

Ellen Patrícia de Souza nascida em Ivinhema-MS em 25/04/1989, filha da dona de casa Rosana Claudia Vitorino da Cruz e do mecânico/encarregado de garagem Jose Antônio de Souza que fizeram o possível e o impossível para fornecer um estudo de qualidade. Iniciou seus estudos no Ensino Fundamental na Escola Estadual Reynaldo Massi em Ivinhema, mas completou o mesmo na escola Centro Educacional 01 do Cruzeiro, no Cruzeiro Velho em Brasília onde também cursou e o Ensino Médio tendo concluído em 2006. Em 2008 iniciou os estudos no Ensino Superior em Ciências Biológicas na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul e engajada com os assuntos científicos da universidade foi bolsista do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica PIBIC/UEMS com o projeto intitulado “Levantamento das comunidades de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em uma área de cultura de Eucalipto no município de Ivinhema, sul do estado de Mato Grosso do Sul” sob a orientação do prof. Dr. João Cloves Stanzani Dutra no período de 08/2009 a 07/2010 e deu continuidade como bolsista com o projeto intitulado “Entomofauna visitante das flores de *Malpighia emarginata* Sessé e Moc. ex DC (Malpighiaceae) em uma área rural do município de Ivinhema-MS” com o mesmo orientador no período de 08/2010 a 07/2011, formando-se em 2011 no curso de graduação em Ciências Biológicas pela UEMS. No período de 2012 permaneceu em Ivinhema trabalhando fora da área de formação. Em 2013 foi aprovada no programa de pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, no qual obteve o título de mestre com a defesa da dissertação intitulada “Toxicidade de solo contaminado e pólen de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L., 1763) que receberam tratamento de sementes com inseticidas para *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) e avaliação de sua capacidade de coleta de pólen” sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande. No ano de 2015 iniciou o doutorado sob a orientação do mesmo professor, porém sem bolsa de estudos no início, mas tendo obtida mais tarde, com o projeto intitulado "Dinâmica populacional, distribuição espacial de *Apis mellifera* L. na Cultura da Soja (*Glycine max* L.) e avaliação do risco de inseticidas para tratamento de sementes em abelhas adultas", e hoje conclui mais uma etapa da sua vida acadêmica com a defesa desta tese, com a esperança que seja apenas o início de muitas etapas de uma carreira resplandecente.

Agradecimentos

Agradeço imensamente aos meus pais Rosana Cláudia Vitorino da Cruz e Jose Antônio de Souza, pelo amor, carinho, compreensão, alicerce, ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de poder seguir meus sonhos e estudar, quando nem mesmo eles puderam concluir, mas mesmo assim não mediram esforços para que eu obtivesse êxito. E aos meus irmãos Renan Guilherme de Souza e Suellen Fernanda de Souza pelo companheirismo e apoio.

Agradeço constantemente a Deus por me permitir ser feliz e ter saúde para buscar meus objetivos, e pela saúde da minha família.

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), pela oportunidade concedida para realização deste trabalho, e às Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) e a Faculdade de Ciências Agrárias (FCA).

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade concedida para a realização do curso, infra-estrutura e apoio.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de auxílio de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Paulo E. Degrande, a quem tenho profunda admiração e estimo, por todas as vezes em que precisei de seus ensinamentos e ele se fez presente me dando o suporte necessário para continuar a evoluir, me tratando sempre com respeito e educação e por todas as oportunidades concedidas que agarrei com todas as minhas forças, pela confiança no meu trabalho e na minha pessoa.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Valter Alves Vieira Junior que mais que um professor um amigo, conselheiro, por acreditar no meu potencial acadêmico, pelos ensinamentos transmitidos e pela disponibilidade em contribuir em todas as vezes que precisei.

Ao José Bruno Malaquias pelas valiosas contribuições nas análises estatísticas, pelos minicursos ministrados que me ajudaram a desenvolver o que se tem de mais recente em análises e os valiosos ensinamentos transmitidos, pelo qual tenho profunda admiração por tamanha inteligência e humildade em todos os atendimentos disponibilizados para sanar minhas dúvidas.

A todos os professores que passaram pela minha vida e contribuíram para minha caminhada em direção a luz do conhecimento. Aos professores do Programa da Pós-graduação

da UFGD pelos ensinamentos passados e a disponibilidade em sanar minhas dúvidas durante minha caminhada acadêmica.

Agradeço aos funcionários da Universidade Federal da Grande Dourados em especial aos secretários Marcelo Cardoso de Oliveira e Vítor Cunha Gomes Sfeir pelos atendimentos e auxílios administrativos, ao Sr. Jesus Felizardo de Souza (“Seu Jesus”) da Fazenda Experimental pelos auxílios prestados no campo e a todos os funcionários da Fazenda Experimental de Ciências Agrárias.

Deixo meu mais sincero agradecimento para a Janete Pezarine Greff de Lima, que sempre me tratou com carinho de uma mãe nessa jornada pelo o Laboratório de Entomologia, e com quem sempre pude contar com conselhos valiosos e que estará sempre em meu coração.

Aos amigos que fiz na Entomologia e a todos os amigos do Laboratório de Entomologia Aplicada, em especial a Rosalia Azambuja, Mateus F. Leal, Matheus D. C. Pereira, Renato A. Guazina, Filipe L. Jacques, Ricardo O. dos Santos, Rafael A. da Silva, Paulo R. A. Tavares, Elidiane Feltrin.

Em especial ao meu amigo Vinicius de Oliveira Barbosa pela cumplicidade, parceiro das gargalhadas mais sinceras e também as mais altas, por todas as vezes que eu precisei de um ombro amigo esteve presente.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização do meu doutoramento.

E a toda minha família que a razão pela qual já cheguei tão longe e pela qual continuarei lutando para conquistar meus objetivos.

Meu muito obrigada!

Dedicatória

Aos meus amados pais Rosana C. Vitorino da Cruz e Jose Antônio de Souza, por serem um exemplo de vida e me ensinarem a viver, por fazerem tudo por mim, pelo amor, dedicação e sem os quais nada seria.

Aos meus irmãos Renan G. de Souza e Suellen F. de Souza que sempre estão comigo nos momentos felizes mais principalmente nos momentos tristes.

E as minhas amadas sobrinhas Livia Helena de Souza Moretti e Lavinia Sofhia de Souza Moretti que trazem alegrias para a nossa família a cada sorriso.

“O mundo não está ameaçado pelas pessoas más, mas por aquelas que permitem a maldade”. -Albert Einstein-

Sumário

Padrão de distribuição temporal de <i>Apis mellifera</i> L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) em um cultivo de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) de ciclo indeterminado e toxicidade de inseticidas para tratamento de sementes em abelhas adultas.....	1
RESUMO GERAL.....	1
Temporal distribution pattern of <i>Apis mellifera</i> L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) in an indeterminate soybean crop (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) and toxicity of insecticides for seed treatment in adult bees.....	2
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
OBJETIVOS.....	5
HIPÓTESES.....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
CAPITULO I- Revisão de literatura.....	9
As abelhas <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae).....	9
A Cultura da Soja (<i>Glycine max</i> (L.)): características gerais	11
Benefícios da polinização de <i>Apis mellifera</i> na cultura da soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill.....	12
Produtos fitossanitários: <i>Apis mellifera</i> x Neonicotinoides (Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid)	14
Produtos fitossanitários: <i>Apis mellifera</i> x Fipronil.....	16
Desaparecimento das abelhas: Desordem do Colapso das Colônias.....	17
Referências Bibliográficas.....	19

CAPITULO II- Padrão de distribuição temporal de <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae) na floração de um cultivo de soja (<i>Glycine max</i>) de ciclo indeterminado.....	26
Resumo.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Resultados	31
Discussão.....	34
Referências.....	37

CAPÍTULO III- Toxicidade do solo contaminado com inseticidas de tratamento de sementes da soja (<i>Glycine max</i>) para <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae).....	39
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	43
Resultados.....	46
Discussão.....	50
Referências Bibliográficas.....	52

CAPÍTULO IV- Toxicidade de grãos de pólen de soja (<i>Glycine max</i>) que recebeu tratamento de sementes com inseticidas a <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae).....	56
Resumo.....	57
Introdução.....	58
Material e Métodos.....	59
Resultados.....	62
Discussão.....	66
Referências Bibliográficas.....	68

CAPÍTULO V- Toxicidade de néctar de flores de soja (<i>Glycine max</i>) que receberam tratamento de sementes com inseticidas a <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae).....	72
Resumo.....	73
Introdução.....	74
Material e Métodos.....	75
Resultados	79
Discussão.....	83
Referências Bibliográficas.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91

Lista de figuras e tabelas

CAPÍTULO II	26
Figura 1. Distribuição temporal de abelhas <i>A. mellifera</i> em um cultivo de soja de ciclo indeterminado, ao longo do período de floração estimado pelo modelo linear generalizado Poisson.....	32
Figura 2. Distribuição temporal de <i>A. mellifera</i> ao longo do horário de visitação em um cultivo de soja de ciclo indeterminado estimado pelo modelo linear generalizado Poisson.....	33
Tabela 1. Coeficiente de Correlação de Spearman entre o número de abelhas <i>A. mellifera</i> coletadas ao longo do dia na floração de um cultivo de Soja de ciclo indeterminado com as variáveis climáticas em Dourados-MS, safra 2017/2018.....	34
CAPÍTULO III	39
Tabela 1. Lista de produtos fitossanitários utilizados no tratamento de sementes bem como suas respectivas dosagens, classe inseticida e classificação toxicológica.....	44
Figura 1. Probabilidade de mortalidade ao longo do tempo de <i>Apis mellifera</i> após exposição de solo oriundo da semeadura de soja com sementes tratadas.....	46
Tabela 2. Médias da mortalidade de <i>A. mellifera</i> ao longo do tempo de exposição ao solo oriundo do contato com sementes de soja tratadas com inseticidas.....	49
CAPÍTULO IV	56
Tabela 1. Lista de produtos fitossanitários utilizados no tratamento de sementes, bem como suas respectivas dosagens, classe inseticida e classificação toxicológica.....	61
Figura 1. Probabilidade de mortalidade ao longo do tempo de exposição de <i>Apis mellifera</i> à alimentação com pasta candi mais pólen de soja que recebeu tratamento de sementes com inseticidas.....	63
Tabela 2. Médias de mortalidade para <i>A. mellifera</i> ao longo do tempo de alimentação com pasta candi mais pólen de soja que recebeu tratamento de sementes com inseticidas.....	65
CAPÍTULO V	72
Tabela 1. Lista de produtos fitossanitários utilizados no tratamento de sementes bem como suas respectivas dosagens, classe inseticida e classificação toxicológica.....	77

Figura 1. Probabilidade de mortalidade ao longo do tempo de exposição de *A. mellifera* à alimentação com pasta candi e macerados de flores de soja incorporados, cujas sementes receberam tratamentos com inseticidas.....79

Tabela 2. Médias da mortalidade de *A. mellifera* ao longo do tempo de alimentação com extrato de flores de soja que receberam tratamento de sementes com inseticidas, incorporado à pasta candi.....82

1 Souza, E. P. **Padrão de distribuição temporal de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera:**
2 **Apidae) em um cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) de ciclo indeterminado e toxicidade**
3 **de inseticidas para tratamento de sementes em abelhas adultas.** Tese de doutorado,
4 Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, 2019

6 **RESUMO GERAL**

7
8 Na cultura da soja, a necessidade de controlar insetos herbívoros torna-se imprescindível,
9 portanto, deve haver aplicação de produtos fitossanitários e estes quando não são seletivos
10 influenciam negativamente os polinizadores. Os objetivos deste trabalho foram: estudar a
11 distribuição temporal de *Apis mellifera* na soja de ciclo indeterminado e a avaliar os riscos à
12 exposição aos produtos fitossanitários via tratamento de sementes. Para a distribuição temporal
13 das abelhas na cultura, foram realizadas amostragens em pontos aleatórios em uma área de 4ha
14 de soja durante todo o período de florescimento, totalizando 5 dias de coleta não consecutivos.
15 Elas ocorreram da bordadura para o centro da cultura, iniciando as 08h:00min com duração de
16 15min/hora, sucessivamente até as 16h:00min. Foram testados a exposição do solo as abelhas
17 e o oferecimento de néctar e pólen proveniente de plantas de sementes tratadas. Os inseticidas
18 avaliados foram: Thiamethoxam; Clothianidin; Imidacloprid; Fipronil e Testemunha. As
19 abelhas foram coletadas em colônias diferentes para cada experimento, e agrupadas em 10
20 abelhas/gaiola. Após a semeadura de 5 sementes/vaso, foi coletado 10g de solo e exposto as
21 abelhas engaioladas. Para o pólen foi oferecido 8g de dieta com os grãos de pólen de 2 plantas
22 de soja. Para exposição do néctar foi oferecido 8g de pasta candi com 150 flores maceradas
23 (com a exclusão das anteras). A mortalidade foi avaliada ao longo do tempo (1h, 2h, 4h, 8h,
24 16h, 24h e 32h após exposição inicial) e foram consideradas mortas aquelas que permaneceram
25 totalmente imóveis após estímulo na gaiola. Nossos resultados demonstram que o
26 forrageamento de *A. mellifera* foi influenciado pelo a hora do dia e pelo período de floração, os
27 primeiros dias do florescimento da cultura foi o período de maior visitação das abelhas e o
28 horário foi a partir das 10h. Quanto a toxicidade do tratamento de sementes com os inseticidas
29 neonicotinoides estudados e o Fipronil, não foi detectada influência na mortalidade das abelhas
30 adultas de *A. mellifera* ao longo do tempo de exposição.

31

32 **Palavras-chave:** Pólen, néctar, forrageamento, ciclo indeterminado, polinizadores,
33 intoxicação.

1 **Temporal distribution pattern of *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) in an**
2 **indeterminate soybean crop (*Glycine max* (L.) Merr.) and toxicity of insecticides for seed**
3 **treatment in adult bees**

4
5 **ABSTRACT**
6

7 In the soybean crop, the need to control herbivorous insects becomes essential, therefore, there
8 should be application of phytosanitary products and these, when they are not selective,
9 negatively influence the pollinators. The objectives of this work were: to study the temporal
10 distribution of *Apis mellifera* in indeterminate soybeans and to evaluate the risks to exposure to
11 phytosanitary products through seed treatment. For the temporal distribution of the bees in the
12 culture, samples were taken at random points in an area of 4ha of soybean during the whole
13 flowering period, totaling 5 non-consecutive days of collection. They occurred from the border
14 to the center of the crop, starting at 8:00 AM with a duration of 15min/hour, successively until
15 4:00 PM. The soil exposure of bees and the supply of nectar and pollen from treated seedlings
16 were tested. The insecticides evaluated were: Thiamethoxam; Clothianidin; Imidacloprid;
17 Fipronil and control treatment. The bees were collected in different colonies for each
18 experiment, and grouped into 10 bees / cage. After sowing 5 seeds / pot, 10g of soil was
19 collected and exposed the caged bees. For the pollen was offered 8g of diet with the pollen
20 grains of 2 soybean plants. For the exposure of the nectar, 8g of candi paste with 150 macerated
21 flowers (excluding the anthers) were offered. Mortality was evaluated over time (1h, 2h, 4h,
22 8h, 16h, 24h and 32h after initial exposure) and those that remained totally immobile after
23 stimulation in the cage were considered dead. Our results demonstrate that the foraging of *A.*
24 *mellifera* was influenced by the time of day and the period of flowering, the first days of the
25 flowering of the culture was the period of greatest visitation of the bees and the time was from
26 10h. Regarding the toxicity of seed treatment with the studied neonicotinoid insecticides and
27 Fipronil, no influence was detected in the mortality of adult bees of *A. mellifera* over the
28 exposure time.

29
30 **Key words:** Pollen, nectar, foraging, indeterminate cycle, pollinators, intoxication.
31
32
33

1 INTRODUÇÃO GERAL

2

3 O grau do risco de intoxicação das abelhas *Apis mellifera* L. com produtos fitossanitários
4 vem sendo levantando devido as perdas de colônias. Esta preocupação aumenta em decorrência
5 do fenômeno presente nos países do Hemisfério Norte, mas extrapolado para o Brasil e
6 chamado de Desordem do Colapso das Colônias (DCC), consistindo no desaparecimento súbito
7 de operárias de *A. mellifera* adultas das suas colônias e aumentando relativamente a presença
8 de juvenis, o que enfraquece a colônia, levando-a à morte (vanEngelsdorp et al., 2009). Os
9 principais suspeitos de acarretarem esse fenômeno são os produtos fitossanitários, que são
10 empregados em culturas de importância agrícola para controlar populações de insetos
11 herbívoros por causarem danos a essas culturas levando a severos prejuízos econômicos nas
12 lavouras (Gallo et al., 2002; Blacquière et al., 2012).

13 Porém, outros fatores também são apontados como agentes causadores desse fenômeno,
14 tais como o estresse pelo manejo inadequado, a ocorrência de patógenos e parasitas, a falta de
15 variabilidade genética na espécie, mudanças climáticas, escassez de alimento ou uma
16 combinação de todos esses fatores juntamente com a exposição a produtos fitossanitários, no
17 entanto até o momento a DCC não foi confirmada no Brasil (Pires et al., 2016). As perdas anuais
18 de colônias são atribuídas a grandes períodos de estiagem o que compromete a disponibilidade
19 de alimento e a intoxicação a produtos fitossanitários (Pires et al., 2016).

20 A espécie de abelha *A. mellifera* é amplamente manejada para a extração de produtos
21 apícolas como o mel, própolis, cera, geleia real e pólen, que geram retorno financeiro
22 satisfatório para os apicultores e que vem sendo cada vez mais comercializados (Free, 1980).
23 No entanto esta espécie fornece não apenas produtos apícolas mas participa da polinização, que
24 além de ser considerada um serviço ecossistêmico de grande valor, pode ser explorada em
25 benefício tanto para o apicultor aumentando a produtividade dos produtos apícolas como para
26 o agricultor, aumentando a produtividade de seus cultivos, garantindo em alguns casos que
27 ocorra a formação de frutos de boa qualidade (Free, 1980; Gallo et al., 2002; Gullan e Cranston,
28 2017).

29 A cultura da soja (*Glycine max* L.) é um exemplo de como um cultivo pode ser
30 beneficiado por essas abelhas, tanto cultivos transgênicos como os convencionais. Os serviços
31 ecossistêmico da polinização prestados por essa espécie de abelha, gerando aumento na
32 produtividade quando estas estão presentes no cultivo e são manejadas adequadamente, mesmo
33 que a cultura não necessite da polinização entomófila e o aumento na produtividade seja

1 pequeno é preciso considerar que esta cultura oferece recursos florais que atraem tanto as
2 abelhas melíferas como outros polinizadores (Chiari et al., 2008; Milfont et al., 2013).

3 A necessidade e a importância de controlar insetos herbívoros nessa cultura é inegável,
4 o que torna imprescindível a aplicação de produtos fitossanitários para o controle das
5 populações desses artrópodes, e nesses casos produtos fitossanitários que não são seletivos aos
6 insetos benéficos podem também influenciar negativamente suas populações (Gallo et al., 2002;
7 Embrapa, 2010). Os produtos fitossanitários a base de neonicotinoides e pirazol são bastante
8 utilizados para proteção de culturas, principalmente na forma de tratamento de sementes
9 (Andrei, 2013), sendo eles os principais suspeitos do risco de intoxicação das abelhas em campo
10 já que são encontrados resíduos destes produtos no solo e na poeira logo após o plantio de
11 sementes tratadas (Krupke et al., 2012).

12 É comprovada a presença de resíduos de produtos fitossanitários e seus metabolitos em
13 recursos florais das plantas (pólen e néctar) e até mesmo no mel e alvéolos das colônias, isto
14 pode ocorrer pelo fato dos produtos empregados no tratamento de sementes serem sistêmicos,
15 assim a planta os absorve e estes são translocados por todas as partes da planta (Dively e Kamel,
16 2012; Blacquièrre et al., 2012). Dessa forma, o conhecimento do risco dos efeitos letais e
17 subletais de produtos fitossanitários aplicados em culturas de importância econômica para
18 controlar insetos herbívoros durante as fases de floração e frutificação, se torna essencial para
19 obter o máximo do benefício da polinização realizada pelas abelhas e para encontrar maneiras
20 eficientes de minimizar o risco de intoxicação (Freitas e Pinheiro 2010; Pinheiro e Freitas,
21 2010).

22 Portanto, levando em consideração a importância das abelhas para o ecossistema como
23 um todo e o seu importante papel na polinização tanto para espécies nativas quanto para as
24 culturas de importância econômica, faz necessário a realização de trabalhos com o intuito de
25 investigar o padrão da distribuição espacial das abelhas melíferas em culturas de interesse
26 agrícola e a avaliação dos riscos a exposição aos produtos fitossanitários utilizados no
27 tratamento de sementes, em relação aos adultos de *A. mellifera*, com fins de encontrar maneiras
28 de minimizar o risco de intoxicação dos polinizadores durante o forrageamento nos cultivos
29 agrícolas.

30

31

32

33

1 **OBJETIVOS**

2

3 ***Objetivo Geral***

4

5 Estudar a distribuição temporal de *A. mellifera* durante a floração da cultura de soja de ciclo
6 indeterminado, e avaliar os riscos à exposição aos produtos fitossanitários utilizados no
7 tratamento de sementes nesta cultura, de forma a entender o potencial efeito colateral destes
8 sobre as abelhas adultas desta espécie.

9

10 ***Objetivos Específicos***

11

12 • Identificar a distribuição temporal de *A. mellifera* durante a floração de um cultivo de
13 soja de ciclo indeterminado.

14 • Investigar se a contaminação do solo por resíduos de sementes tratadas com inseticidas
15 é letal às abelhas adultas.

16 • Investigar se o pólen das flores de soja proveniente de sementes tratadas com inseticidas
17 é potencialmente letal as abelhas adultas.

18 • Verificar se os macerados de flores de soja proveniente de sementes tratadas com
19 produtos fitossanitários são deletérios para *A. mellifera*.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **HIPÓTESES**

2

3 • As abelhas *A. mellifera* forrageiam durante todo o período de floração de forma
4 uniforme na cultura da soja de ciclo indeterminado.

5

6 • O solo logo após a semeadura da soja com sementes tratadas com os inseticidas
7 neonicotinoides e Fipronil influenciam a mortalidade de abelhas adultas de *A. mellifera*.

8

9 • O pólen de flores de soja que receberam tratamento de sementes com neonicotinoides e
10 Fipronil causam mortalidade de abelhas adultas de *A. mellifera*.

11

12 • O néctar de flores de soja que receberam tratamento de sementes com neonicotinoides
13 e Fipronil causam mortalidade de abelhas adultas de *A. mellifera*.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 Andrei, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**: Guia prático de produtos fitossanitários para
3 uso agrícola. 9º Ed. rev. atual. São Paulo: Organização Andrei, 1618 p, 2013.
- 4 Blacquièrre, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V. Neonicotinoids in bees: a
5 review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p.973–992,
6 2012.
- 7 Chiari, W.C., Toledo, V.A., Hoffmann-Campo, C.B., Rúvolo-Takasusuki, M.C., Toledo,
8 T.C.S.O.A., Lopes, T.S. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [(*Glycine max* (L.)
9 Merrill] Roundup Ready TM cv. BRS 245 e convencional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum**
10 **Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 267-271, 2008.
- 11 Dively G.P., Kamel A. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their
12 potential exposure to pollinators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60 (18), p.
13 4449–4456, 2012.
- 14 Embrapa soja. 2010. **A soja**. Disponível em:
15 http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16. Acesso em: 23 de maio de
16 2017.
- 17 Free, J. B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. São Paulo, SP: EPU, 1980. 79p.
- 18 Freitas, B. M., Pinheiro, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no
19 manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**. v.14, n.1, p.
20 282-298, 2010.
- 21 Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C.V., Berti Filho, E.,
22 Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D.X., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S.,
23 Omoto, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ: il (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz
24 de Queiroz), 2002. 920 p.
- 25 Gullan, P.J., Cranston, P.S. **Insetos: Fundamentos da Entomologia**. 5a. ed. Rio de Janeiro,
26 Roca, p. 427, 2017.

- 1 Krupke, C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino, G., Given, K. Multiple routes of pesticide
2 exposure for honey bees living near agricultural fields. **Plos One**, v.7, n.1, p. 1-8, 2012.
- 3 Milfont, M. O., Rocha, E.E.M., Lima, A.O.N., Freitas, B.M. Higher soybean production using
4 honeybee and wild pollinators, a sustainable alternative to pesticides and autopollination.
5 **Environmental Chemistry Letters**, v.11, p. 335-341, 2013.
- 6 Pinheiro, J.N., Freitas B.M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e
7 perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v.14, n.1,
8 p.266-281, 2010.
- 9 Pires, C.S.S., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., Pettis, J.S.,
10 Teixeira, E.W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?
11 **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.422-442, 2016.
- 12 vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K.,
13 Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D., Pettis, J.S. Colony
14 Collapse Disorder: A descriptive study. **Plos One**, v. 4, n. 8, p. 1-17, 2009.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

1 **CAPITULO I**

2

3 **REVISÃO DE LITERATURA**

4

5 **A espécie *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**

6

7 As abelhas melíferas são insetos pertencentes a ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea,
8 família Apidae, subfamília Apinae, tripo Apini, subtripo Apina que abrange somente o gênero
9 *Apis*, onde todas as espécies são eussociais. De ocorrência originalmente na Europa, Ásia e
10 África, posteriormente foram introduzidas nos demais continentes e no Brasil devido a sua
11 elevada produtividade de mel. Atualmente a abelha do gênero *Apis* que ocorre no Brasil é
12 resultante dos cruzamentos entre subespécies europeias (*Apis mellifera ligustica* Spinola 1806,
13 *Apis mellifera mellifera* Linnaeus 1758 e a *Apis mellifera carnica* Pollmann 1879) com uma
14 subespécie africana (*Apis mellifera scutellata* Lepeletier 1836) formando um polihíbrido a *Apis*
15 *mellifera* africanizada, que está presente em todo território nacional (Kerr, 1967; Silveira et al.,
16 2002; Rafael et al., 2012; Faita et al., 2014).

17 Esta espécie (*A. mellifera*) é conhecida por formar colônias altamente organizadas,
18 composta pela rainha fértil responsável em prover a prole e manter a coesão da colônia; as
19 operárias estéreis que são responsáveis por realizar a limpeza das células, alimentar as larvas e
20 a rainha, construir os favos do ninho, receber e armazenar pólen/néctar, retirar detritos do ninho,
21 guardar a entrada da colônia e coletar recursos para manter todos os indivíduos (Free 1980).

22 E uma característica interessante é que estas tarefas são realizadas de acordo com a idade
23 das operárias (polietismo etário), onde abelhas recém emergidas realizam a limpeza das células
24 as faxineiras. Abelhas com cinco a 10 dias de vida são as nutrízes que produzem geleia real.
25 Com 11 a 20 dias são as chamadas abelhas engenheiras pois trabalham na construção dos favos
26 e partir dessa idade as abelhas desempenham a atividade de guardar a colônia e campeiras com
27 mais de 22 dias de idade coletando recursos como néctar e pólen para manutenção da colônia
28 (Free 1980). Os machos da colônia, conhecidos por zangões, são responsáveis pela fecundação
29 das rainhas virgens no voo nupcial, após a cópula vêm à óbito, devido a ruptura do aparelho
30 reprodutor masculino preso no interior da fêmea fértil (Free 1980).

31 Outra característica bastante marcante nestas abelhas é o comportamento defensivo,
32 característica essa herdada da abelha africana, que muitas vezes são consideradas agressivas,
33 mas que na verdade estão atuando na proteção do ninho e dos seus indivíduos, já que a colônia

1 contém uma grande quantidade de recurso estocado como mel e pólen e muitos indivíduos
2 recém emergidos, isso acabam atraindo pilhadores, assim esse comportamento se torna
3 essencial para manter a integridade da colônia (Faita et al., 2014).

4 Essas colônias possuem uma elevada densidade populacional, e por sua vez as operárias
5 coletam uma grande quantidade de recursos florais, assim são excelentes produtoras de mel em
6 função das necessidades nutricionais da colônia (Free, 1980). Esta característica faz com que
7 elas sejam amplamente utilizadas para produção deste produto que é capaz de gerar um retorno
8 financeiro satisfatório e que é consumido desde antes da apicultura se tornar uma atividade
9 comercial, trazendo benefícios sociais como a geração de empregos, ecológicos com o serviço
10 da polinização realizada durante a coleta de pólen e néctar (Camargo et al., 2002).

11 Por serem insetos com comportamento eussocial mais derivado e manterem colônias de
12 densidade populacional elevada, e pela elevada necessidade nutricional, essa espécie possui
13 diferentes padrões de frequência de visitação floral conforme as características florais das
14 plantas visitadas, com diferentes horários de visitação (Rech et al., 2014).

15 Em culturas de interesse agrícola como a soja *A. mellifera* é relatada como o visitante floral
16 mais frequente entre os insetos (Milfont et al., 2013; Oliveira e Fernandes, 2016), sendo as
17 primeiras horas do dia o período de menor intensidade de frequência, com os picos de maior
18 visitação entre os horários das 10h até as 13h, com uma considerável diminuição da sua
19 atividade de forrageio a partir das 16h, ou em alguns casos, suspende sua visitação a partir desse
20 horário (Jung, 2014; Oliveira e Fernandes, 2016).

21 *Apis mellifera* também é relatada iniciando seu forrageamento por volta das 9h, com um
22 pico de visitação às 13h, e após as 16h ela diminui sua frequência na cultura (Chiari et al.,
23 2005), e sua presença nos cultivos de soja gera benefícios na sua produtividade, quando a planta
24 está recebendo a visita deste polinizador (Chiari et al., 2008).

25 Assim, fica claro que as abelhas *A. mellifera* desempenham um importante papel no meio
26 ambiente por meio da polinização, contribuindo para a manutenção da biodiversidade e
27 podendo aumentar a produção de algumas culturas de interesse agrícola, nas quais são capazes
28 de aumentar a produtividade ou então aumentar o tamanho e aspecto do fruto, características
29 essas que valorizam o produto final (Rech et al., 2014).

30

31

32

33

1 **A Cultura da Soja (*Glycine max* (L.)): características gerais**

2

3 A cultura da Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) proporciona muitas oportunidade de
4 empregos diretos e indiretos, além de contribuir para o superávit primário na balança comercial
5 do país. É de grande importância econômica para o Brasil gerando retorno financeiro
6 satisfatório, um reflexo disso foi a produtividade média da safra 2017/2018 que chegou a 3.394
7 kg/ha e a área plantada de soja que chegou a 35.149,3 mil hectares (Conab, 2018). No Mato
8 Grosso do Sul a área plantada desta oleaginosa teve um acréscimo de 5,9% em relação à safra
9 2015/2016 alcançando 2,67 milhões de hectares, enquanto sua produtividade foi considerada
10 recorde para a safra 2017/2018 com uma média de 3.593 kg/ha, representando um aumento de
11 5,7% na produtividade (Conab, 2018).

12 Esta espécie pertence à família Fabaceae, subfamília Faboideae do gênero *Glycine*, é
13 uma planta autógama e possui um ciclo de desenvolvimento dividido em estágio vegetativo que
14 é subdividido em: VE = quando os cotilédones emergem acima da superfície do solo; V1 = o
15 primeiro nó quando aparece duas folhas unifolioladas completamente desenvolvidas; V2 = o
16 segundo nó quando surge o trifólio completamente desenvolvido; V3 = o terceiro nó quando
17 surgem três nós no caule principal com folhas completamente desenvolvidas a partir do nó
18 unifoliolado e o Vn = o enésimo nó n número de nós no caule principal com folhas
19 completamente desenvolvidas a partir do nó unifoliolado (Fehr e Caviness, 1977).

20 O estágio reprodutivo que é subdividido em: R1 = o início do florescimento quando surge
21 um flor aberta em qualquer nó do caule principal; R2 = o florescimento pleno quando surge
22 uma flor aberta em um dos nós terminais do caule principal com folha completamente
23 desenvolvida; R3 = é o início da formação de vagens com 5mm de comprimento em um dos
24 quatro nós terminais do caule principal com folha completamente desenvolvida; R4 = é o
25 completo desenvolvimento das vagens com 2cm de comprimento em um dos quatro nós
26 terminais do caule principal com folha completamente desenvolvida; R5 = quando os grãos
27 começam a encher, possuem 3 mm de comprimento nas vagens localizadas em um dos quatro
28 nós terminais do caule principal com folha completamente desenvolvida; R6 = quando o grão
29 está cheio e verde preenchendo a cavidade da vagem em um dos quatros nós terminais do caule
30 principal com folha completamente desenvolvida; R7 = é o início da maturação das vagens
31 contendo grãos com coloração de maturação (amarelada) e o estágio R8 = quando a planta
32 chega na sua maturação plena e 95% das suas vagens estão com coloração de maturação (Fehr
33 e Caviness, 1977).

1 Também é importante saber que esta planta possui dois tipos de crescimento: o
2 crescimento determinado onde os estágios de desenvolvimento são bem definidos, quando o
3 florescimento ocorre em toda planta ao mesmo tempo; enquanto que no crescimento
4 indeterminado o florescimento ocorre de forma escalonada de baixo para cima, formando
5 vagens na base da planta, ela ainda está florescendo no topo e ainda está ocorrendo o
6 crescimento e ramificação da planta e o seu crescimento e desenvolvimento estão intimamente
7 ligados as condições ambientais, a cultivar, a latitude e aos tratos culturais empregados
8 (Miyasaka e Medina, 1981).

9 Essa planta possui flores perfeitas e hermafroditas de coloração que pode variar do
10 branco para roxo, são autopolinizadas o que pode ocorrer um dia antes da abertura da flor ou
11 no mesmo dia dependendo das condições em que se encontra a planta, fazendo com que esta
12 não dependa de visitantes florais para sua reprodução e conseqüentemente reduzindo sua taxa
13 de polinização cruzada (Miyasaka e Medina, 1981). Isso também faz com que as flores tenham
14 períodos de viabilidade de fecundação e polinização curtos, regulando o comportamento de
15 forrageio de visitantes florais que também é influenciado pela qualidade e quantidade de recurso
16 floral disponibilizado pela planta (Free e Williams, 1973; Miyasaka e Medina, 1981; Gazzoni,
17 2017).

18 A cultura da soja é prioritariamente autopolinizada devido as suas flores possuírem os
19 órgãos reprodutores femininos e masculinos, porém a polinização cruzada é observada mesmo
20 que em uma menor escala, já que esta planta disponibiliza recursos florais atrativos para os
21 polinizadores e que as abelhas são as mais frequentes e eficientes visitantes florais para
22 desempenhar este papel, em particular a abelha *A. mellifera*, o que gera vantagens para ambas
23 as partes. A abelha supre sua necessidade e da colônia com os recursos florais e para planta
24 ocorre o aumento da produtividade, em número de vagens por planta e número de grãos por
25 vagem (Miyasaka e Medina, 1981; Gazzoni, 2017).

26

27 **Benefícios da polinização de *Apis mellifera* na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill**

28

29 Sabe-se que a polinização realizada por abelhas é o serviço ecossistêmico de extrema
30 importância e que este é fundamental para culturas dependentes de agentes polinizadores, e que
31 pode trazer benefícios para aquelas que são autopolinizadas, como o aumento do número de
32 frutos, diminuição de flores abortadas, uniformização da maturação dos frutos, diminuição de
33 frutos deformados, aumento no peso do frutos, benefícios esses que são diretamente

1 correlacionados com o valor final dos frutos no momento da comercialização (Free, 1980;
2 Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010; Rech et al., 2014).

3 Na cultura da soja, *A. mellifera* têm sido citada como uma das abelhas mais frequentes
4 na visitação de suas flores. Autores citam que a introdução de colônias das abelhas melíferas
5 na cultura da soja pode incrementar a sua produção em até 18,09%. Quanto está exposta a livre
6 visitação de outras abelhas nativas o incremento chega a 6,34%. Isso demonstra que a
7 introdução de polinizadores leva a cultura a ser mais produtiva que a conservação dos
8 polinizadores nativos presentes naturalmente na cultura (Milfont et al., 2013).

9 A soja por disponibilizar recursos florais, atrai polinizadores em potencial como abelhas
10 das famílias de Apidae, Megachilidae e Halictidae. No entanto, a presença das abelhas *A.*
11 *mellifera* da família Apidae, é expressiva na cultura, estando presentes em até 70,5% do total
12 de insetos amostrados e sua busca dos recursos florais oferecidos pela cultura da soja, pode
13 gerar um aumento de até 25% no número de sementes formadas (Santos et al., 2013).

14 Conhecendo os benefícios da polinização não só para cultura da soja como para muitas
15 outras plantas, é inegável que quando há a livre visitação de abelhas *A. mellifera*, o rendimento
16 da cultura pode aumentar, porém outros fatores podem colaborar com esse aumento como as
17 condições climáticas favoráveis para a cultura, agindo em conjunto com a ocorrência de
18 polinizadores e com as características de cada cultivar (Chiari et al., 2005; Blettler et al., 2018).
19 É possível observar diferenças entre safras do cultivo da mesma variedade, podendo ocorrer um
20 aumento de rendimento da cultura em uma safra e na outra o rendimento pode não ser
21 influenciado pela livre visitação de insetos polinizadores, não correndo diferenças estatísticas
22 de áreas onde a visitação dos polinizadores foi excluída (Blettler et al., 2018).

23 Em culturas de soja transgênica também é possível observar os benefícios da visitação
24 de *A. mellifera*, mas esta não difere de cultivares convencionais quanto ao incremento na
25 produtividade, entretanto, quando são comparadas áreas de livre visitação de abelhas com áreas
26 em que a visitação foi restrita, é possível observar um aumento na produção de grãos de até
27 37,84%, embora o peso médio das sementes não apresenta diferenças. Dessa forma, uma
28 atenção especial e mais cuidadosa deve ser dada a cultivares transgênicas, pois ao receberem
29 visitantes florais que realizam a polinização cruzada, existe uma grande probabilidade de fluxo
30 gênico entre plantas transgênicas e convencionais (Chiari et al., 2008).

31
32

1 **Produtos fitossanitários: *Apis mellifera* x Neonicotinoides (Thiamethoxam, Clothianidin,**
2 **Imidacloprid)**

3
4 A necessidade da utilização de produtos fitossanitários se dá pela grande área destinada
5 ao plantio de grandes culturas de importância econômica relevantes para o país, como por
6 exemplo as culturas da soja, algodão, milho e cana-de-açúcar e devido ao elevado investimento
7 financeiro empregado nelas para evitar perdas na produção, se faz necessário aplicações
8 frequentes para eliminação de insetos herbívoros considerado pragas. No entanto, algumas
9 vezes essas são capazes de atingir insetos não alvo como predadores, parasitoides e os
10 polinizadores (Gallo et al., 2002; Czapak et al., 2005). Dentre os produtos mais utilizados para
11 o controle desses insetos, estão os produtos fitossanitários sintéticos a base de neonicotinoides
12 (Andrei, 2013).

13 Os neonicotinoides são produtos fitossanitários sintéticos análogos à molécula da
14 nicotina com toxicidade bastante elevada para os insetos e amplamente utilizado para o controle
15 de pragas. Eles agem no Sistema Nervoso Central do inseto como agonista da acetilcolina, se
16 ligando aos receptores nicotínicos do neurônio pós-sináptico, provocando uma hiperexcitação
17 do sistema nervoso pelo fato da sua molécula não se degradar facilmente, fazendo com que os
18 impulsos nervosos sejam transmitidos continuamente levando o inseto a morte (Gallo et al.,
19 2002; Tomizawa e Casida, 2003; Gullan e Cranston, 2017).

20 Os resíduos dos neonicotinoides utilizados na proteção de plantas e os de uso comum
21 dentro de colônias, tem sido cada vez mais encontrados em abelhas adultas, em recursos florais
22 como pólen e néctar, na cera dos alvéolos, no mel das colônias de *A. mellifera*, em troncos de
23 árvores, no solo e até em fontes de água do subsolo (Huseth e Groves, 2014; Jones e Turnbull,
24 2016, Valdovinos-Flores et al., 2017; Calatayud-Vernich et al., 2018), porém, as concentrações
25 desses resíduos e seus metabólitos são variáveis e em alguns casos não são suficientes para
26 causar a mortalidade crônica de abelhas adultas (Jones e Turnbull, 2016).

27 As vias de contaminação das abelhas com os produtos fitossanitários podem ser
28 variadas, como por exemplo: a partir de resíduos contidos no solo que são levantados no
29 momento da semeadura de sementes tratadas, através do pólen de plantas que receberam
30 tratamentos de sementes, do pólen de plantas próximas a cultivos agrícolas que podem ser
31 fontes de contaminação de abelhas no campo e de fontes de água contaminadas (Krupke et al.,
32 2012). Os resíduos de Thiamethoxam, Clothianidin e Imidacloprid já foram identificados em
33 amostras de solo e pólen de plantas de milho que receberam tratamento de sementes, porém,

1 em concentrações muito menor do que as dose empregadas em campo para o controle de pragas;
2 também foram encontradas em plantas circunvizinhas do cultivo de milho (Krupke et al., 2012).

3 No entanto, sabe-se que o Thiamethoxam mesmo em dose subletal pode causar
4 alterações no padrão de voo das abelhas melíferas fazendo com que a duração do voo seja maior
5 após a administração do produto é em exposição crônica as abelhas reduzem o tempo de voo
6 em relação as que não estão expostas, reduzindo assim sua capacidade de forrageio (Tosi et al.,
7 2017). Sobre o Thiamethoxam também há relatados que este altera o desenvolvimento larval
8 de abelhas, provocando altas taxas de mortalidade em larvas, pupas e adultos que foram
9 expostos a este inseticida em concentrações de 0.001 e 1.44 ng/ μ L. Quando imaturos são
10 expostos a doses semelhantes às encontradas a campo ou até menores, a manutenção e
11 emergência de novos indivíduos é comprometida, o que acaba por enfraquecer as colônias de
12 *A. mellifera* (Tavares et al., 2015; Tavares et al., 2017).

13 Há relatos de neonicotinoides em doses subletais como Clothianidin, Imidacloprid e
14 Thiacloprid afetando negativamente a capacidade imunológica de abelhas melíferas recém
15 emergidas sadias, onde os autores estudaram a imunocompêtencia dessas abelhas após uma
16 exposição em dieta de 24h a esses produtos (Brant et al., 2016). Estes autores observaram que
17 estes neonicotinoides foram capazes de influenciar os parâmetros observados como contagem
18 de hemócitos, encapsulação/resposta de cicatrização de feridas e a atividade antimicrobiana da
19 hemolinfa, fatores estes que estão ligados à capacidade da abelha a resistir aos vírus e parasitas,
20 porém, estudos de longo prazo ainda são necessários para entender os efeitos sinérgicos da
21 exposição a produtos fitossanitários e dos patógenos (Brant et al., 2016).

22 Kessler et al., (2015) relatam que abelhas melíferas não são repelidas quando expostas
23 a alimento contendo os neonicotinoides Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam, e que
24 demonstram uma preferência por alimento contaminado pelos Imidacloprid e Thiamethoxam
25 do que apenas a sacarose, apesar da quantidade de alimento ingerido ser menor em relação a
26 sacarose, o que pode ser em decorrência de sua ação neural agindo nos receptores nicotínicos
27 de acetilcolina e afetando a capacidade de localização de alimentos, o que pode levar a abelha
28 a carregar este alimento para colônia e assim contaminar as crias, e dessa forma, gerando um
29 problema a longo prazo.

30 É indiscutível a elevada toxicidade dos neonicotinoides sobre as abelhas, devido ao seu
31 modo de ação, mas o ponto chave da segurança na utilização desses produtos em campo está
32 no conhecimento do comportamento das abelhas em campo forrageando nas culturas de
33 interesse agrícola e nas tecnologias de aplicação de produtos fitossanitários, o que pode permitir

1 o emprego desses produtos de maneira que os riscos oferecidos para as abelhas sejam
2 minimizados.

3

4 **Produtos fitossanitários: *Apis mellifera* x Fipronil**

5

6 Outro inseticida bastante empregado no controle de insetos pragas é o Fipronil,
7 pertencente ao grupo dos inseticidas fenilpirazol que são antagonistas do neurotransmissor
8 ácido γ -aminobutírico (GABA). As moléculas desse inseticida têm ação contrária do
9 neurotransmissor GABA, inibindo a permeabilidade da membrana da célula nervosa aos íons
10 de Cl^- causando uma hiperexcitação do sistema nervoso central do inseto levando a morte.
11 Possui uma elevada toxicidade para os insetos e é relativamente seguro aos mamíferos, já que
12 ele bloqueia os canais de cloro ativados pelo glutamato (Gallo et al., 2002; Ikeda et al., 2003;
13 Narahashi et al., 2007).

14 Devido ao seu modo de ação, o produto fitossanitário com ingrediente ativo a base de
15 Fipronil tem uma elevada toxicidade aos insetos, inclusive para as abelhas *A. mellifera*. Ele
16 afeta negativamente a atividade motora das abelhas em doses subletais a exposição, tanto por
17 contato quanto por ingestão, o que pode influenciar na sua capacidade de coletar recurso e na
18 manutenção das colônias (Bovi et al., 2018).

19 Para este produto fitossanitário, também existem relatos de alterações na expressão de
20 proteínas no cérebro de abelhas melíferas recém-emergidas e adultas em dose subletais, o que
21 pode resultar em prejuízos à memória e aprendizagem das abelhas e sua exposição crônica pode
22 levar a uma diminuição da vida útil do inseto (Roat et al., 2014). Esse produto apresenta também
23 efeito sinérgico com o parasita *Nosema ceranae* influenciando negativamente a fertilidade de
24 zangões, o que pode levar a uma rainha ser fecundada com sêmen de baixa qualidade
25 influenciando assim na produtividade da colônia (Kairo et al., 2017). Embora não seja claro o
26 mecanismo envolvido no efeito sinérgico entre o parasita intestinal *Nosema ceranae* e a
27 exposição a produtos fitossanitários, a mortalidade de abelhas melíferas infectadas com o
28 parasita e expostas a doses subletais do Fipronil é mais elevada em comparação a abelhas sadias
29 (Vidau et al., 2011).

30 Resíduos de Fipronil e seus metabólitos, foram identificados juntamente com uma série
31 de produtos fitossanitários e de uso veterinário nas colônias. Em cargas de pólen de abelhas *A.*
32 *mellifera* que coletaram e a transportaram para a colônia, foi detectado em 12,4% das amostras,

1 resíduos de Fipronil e metabólitos em pequenas quantidades, mas ainda não se sabe como essas
2 pequenas quantidades influenciam a colônia de maneira geral (Chauzat et al., 2006).

3 Devido sua elevada toxicidade para insetos pragas o Fipronil é amplamente empregado
4 na agricultura, e além de serem encontrados seus resíduos e dos seus metabólitos em cargas de
5 pólen (Chauzat et al., 2011), ele também já foi detectado em néctar, no mel, em abelhas
6 operárias dentro de colônias em campos agrícolas e geralmente em combinação com resíduos
7 de outros produtos fitossanitários. Dessa forma, as abelhas ficam expostas por contato e
8 ingestão aos resíduos desses produtos (Pareja et al., 2011).

9 Existe uma gama de maneiras para que os organismos não-alvo sejam expostos aos
10 resíduos deste produto e a outros tantos que são utilizados para a proteção de plantas, já que
11 estes são detectados no solo, em suspensão no ar, em fontes de água subterrânea, vegetação
12 circunvizinha de culturas agrícolas, produtos apícolas e até mesmo nas próprias abelhas, cujas
13 concentrações são amplamente variadas desde doses recomendadas no campo a doses subletais
14 e frações menores ainda (Bonmatin et al., 2015). No entanto, resta ainda compreender se estes
15 resíduos são capazes de causar mortalidade total em colônia de abelhas sadias.

16 Enquanto tentamos entender e identificar maneiras para minimizar os riscos da
17 exposição de abelhas *A. mellifera* à inseticidas, sua utilização nos cultivos de importância
18 econômica é essencial e constante para o controle de populações de insetos herbívoros que
19 ocasionam prejuízos econômicos na lavouras. Porém, a escolha de um produto seletivo, sua
20 aplicação em doses cuidadosamente temporizadas com os estágios de maior vulnerabilidade
21 dos insetos herbívoros. O emprego do Manejo Integrado de Pragas e o conhecimento da
22 biologia tanto dos insetos alvos como os não-alvos ajudam a minimizar os danos causados a
23 eles e ao ambiente (Gallo et al., 2002; Gullan e Cranston, 2017).

24

25 **Desaparecimento das abelhas: Desordem do Colapso das Colônias**

26

27 O fenômeno que vem motivando os pesquisadores a realizarem vários estudos sobre a
28 saúde das abelhas e tem sido cada vez mais discutido no meio científico é conhecido como
29 Desordem do Colapso das Colônias (DCC). Este consiste no rápido desaparecimento das
30 colônias de abelhas manejadas *A. mellifera*, com a ausência de abelhas adultas e cria mortas
31 dentro ou fora do ninho, onde só restam a rainha, algumas crias e algumas poucas operárias,
32 enquanto o restante das abelhas somem sem deixar vestígios e isso faz com que abelhas mais
33 novas que são responsáveis por atividades dentro da colônia, sejam obrigadas a forragear para

1 coletar recursos, enquanto a rainha aumenta sua atividade de postura para suprir as que
2 desapareceram, assim a colônia vai enfraquecendo até morrer por completo (vanEngelsdorp et
3 al., 2009).

4 Esse colapso das abelhas tem sido detectado nos países do Hemisfério Norte e ganhou
5 alarde devida a elevada mortalidade das abelhas em 2006-2007, quando alguns apicultores
6 tiveram perdas significativas de suas colônias, porém, sua causa ainda não foi totalmente
7 esclarecida e muitos fatores são apontados como agentes causais: como a intoxicação por
8 inseticidas, contaminação por patógenos, ataque de ácaros, mudanças climáticas, estresse de
9 manejo, baixa variabilidade genética, deficiência nutricional ou uma combinação de alguns
10 desses fatores pode ser o agente causador deste desaparecimento súbito das abelhas (Oldroyd,
11 2007; vanEngelsdorp et al., 2008).

12 No Brasil vem sendo questionado a presença deste fenômeno já que também são
13 registradas algumas perdas anuais de colônias por alguns apicultores, porém essas perdas foram
14 relacionadas a acidentes com aplicação aérea de inseticidas, mal-uso de tecnologias de
15 aplicação, com períodos de seca prolongada que limita a disponibilidade de alimento para as
16 colônias, e também, com o manejo inadequado das colônias. Dessa forma, ainda não se tem a
17 confirmação que o fenômeno DCC tenha ocorrido no Brasil, porém as investigações quanto as
18 contaminações devem ser continuadas pois o risco da intoxicação de abelhas com pesticidas é
19 real e devem ser estudadas maneiras de minimizar o impacto do uso desses produtos para os
20 polinizadores (Pires et al., 2016).

21 Pensando na segurança e saúde dos polinizadores a União Europeia em decisão a favor
22 da proteção dos mesmos, proibem no ano de 2018 a utilização ao ar livre dos três ingredientes
23 ativo que são os mais apontados e questionados quanto a intoxicação de abelhas: Imidacloprid,
24 Thiamethoxam e Clothianidin, cujo uso ficou restrito apenas ao interior de estufas permanentes,
25 mas o seu uso já estava proibido em culturas com flores atraentes para abelhas o que ainda
26 permanece (Commission Implementing Regulation 2013; Commission Implementing
27 Regulation, 2018a,b,c).

28 Já no Brasil, ano de 2017, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos
29 Naturais Renováveis (IBAMA), publicou a Instrução Normativa Nº 02/2017 que estabelece
30 diretrizes, procedimentos e requisitos para o registro de novos ingredientes ativos e para os que
31 estão sob reavaliação de risco, com o intuito de acrescentar normas que incluam dados
32 científicos de estudos de risco ambiental que sejam realizados no Brasil, com culturas
33 preferencialmente indicadas no rótulo do produto. Estes estudos devem incluir dados de

1 toxicidade oral aguda e crônica, por contato aguda para abelhas adultas, testes de toxicidade
2 oral aguda e crônica para larvas e testes de toxicidade residual foliar, somente para produtos
3 aplicados por pulverização e cuja DL⁵⁰ contato seja < 11 µg de ingrediente ativo/abelha, sendo
4 o estudo conduzido com a maior dose por tipo de formulação (Brasil, 2017).

5 Portanto, estudos que demonstram os efeitos letais, subletais de produtos fitossanitários
6 tanto em laboratório, quanto à campo, sobre os polinizadores tanto abelhas *A. mellifera* quanto
7 para abelhas nativas, além de estudos que descrevam sua atividade em culturas de interesse
8 econômico, são de suma importância para que possamos compreender o comportamento desses
9 polinizadores nessas culturas e assim encontrar maneiras que favoreçam a conservação das
10 abelhas e o cultivo de plantas de interesse agrícola.

11

12

13 **Referências bibliográficas**

14

15 Andrei, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: Guia prático de produtos fitossanitários para**
16 **uso agrícola.** 9º Ed. rev. atual. São Paulo: Organização Andrei, 1618 p, 2013.

17

18 Blettler, D.C., Fagúndez, G.A., Caviglia, O.P. Contribution of honeybees to soybean yield.
19 **Apidologie**, v. 49, Issue 1, p. 101–111, 2018.

20

21 Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess,
22 M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. A. D., Noome, D. A., Simon-Delso, N., Tapparo, A.
23 Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and**
24 **Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35–67, 2015.

25

26 Bovi, T.S., Zaluski, R., Orsi, R.O. Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis*
27 *mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.**
28 v. 90, n.1, p. 239-245, 2018.

29

30 Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R. The neonicotinoids thiacloprid,
31 imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.).
32 **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 40-47, 2016.

33

1 Brasil. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.
2 Instrução Normativa nº 2, de 9 de fevereiro de 2017. Estabelecer diretrizes, requisitos e
3 procedimentos para a avaliação dos riscos de ingredientes ativos de agrotóxicos para insetos
4 polinizadores, utilizando-se as abelhas como organismos indicadores. **Diário Oficial da União**,
5 nº 30, Brasília-DF. 2017.
6
7 Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simo, E., Pico, Y. Pesticide residues in honey bees,
8 pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. **Environmental Pollution**, v. 241 p. 106 –
9 114, 2018.
10
11 Camargo, R.C.R., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R. **Produção de mel**. Embrapa Meio-Norte.
12 Sistemas de Produção 3. Teresina, 138 p. 2002.
13
14 Chauzat, M.P., Faucon, J.P., Martel, A.C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M. A Survey of
15 Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France. **Journal of Economic**
16 **Entomology**, v. 99, n. 2, p. 253-262, 2006.
17
18 Chauzat, M.P., Martel, A.C, Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M.,
19 Carpentier, P., Faucon, J.P. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera*
20 (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. **Environmental**
21 **Toxicology Chemistry**. v. 30, n. 1, p. 103-11, 2011.
22
23 Chiari, W.C., Toledo, V.A.A., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Attencia, V.M., Costa, F.M.,
24 Kotaka, C.S., Sakaguti, E.S., Magalhães, H.R. Floral biology and behavior of Africanized
25 honeybees *Apis mellifera* in soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Brazilian Archives of Biology**
26 **and Technology**, v. 48, n. 3, p. 367-378, 2005.
27
28 Chiari, W.C., Toledo, V.A.A., Hoffmann-Campo, C.B., Rúvolo-Takasusuki, M.C.C., Oliveira,
29 T.C.S., Toledo, A., Lopes, T.S. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [*Glycine*
30 *max* (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. **Acta**
31 **Scientiarium Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 267-271, 2008.
32

1 Commission Implementing Regulation (EU). No 485/2013 of 24 May 2013. Amending
2 Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active
3 substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of
4 seeds treated with plant protection products containing those active substances Text with EEA
5 relevance. **Official Journal of the European Union**, L 139, 25.5.2013, p. 12–26.
6

7 Commission Implementing Regulation (EU). 2018/783 of 29 May 2018a. Amending
8 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
9 substance imidacloprid. **Official Journal of the European Union**, L. 132, 30.5.2018, p. 31-
10 34.
11

12 Commission Implementing Regulation (EU). 2018/784 of 29 May 2018b. amending
13 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
14 substance clothianidin. **Official Journal of the European Union**, L 132, 30.5.2018, p. 35–39.
15

16 Commission Implementing Regulation (EU). 2018/785 of 29 May 2018c. amending
17 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
18 substance thiamethoxam. **Official Journal of the European Union**, L 132, 30.5.2018, p. 40–
19 44.
20

21 Conab. **Acompanhamento de safra Brasileira Grãos** – Safra 2017/18. Décimo segundo
22 levantamento, v12, Brasília, p. 1-148. 2018.
23

24 Czepak, C.; Fernandes, P. M.; Albernaz, K.C.; Rodrigues, O.D.; Silva, L.M.; Silva, E.A.;
25 Takatsuka, F.S.; Borges, J.D. Seletividade de inseticidas ao complexo de inimigos naturais na
26 cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 35, n. 2, p.
27 123-127, 2005.
28

29 Faita, M.R., Carvalho, R.M.M.C., Alves-Junior, V.V., Chaud-Neto, J. Defensive behavior of
30 africanized honeybees (Hymenoptera: Apidae) in Dourados-Mato Grosso do Sul, Brasil.
31 **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 40, n. 2, p. 241-246, 2014.
32

1 Fehr, W.R., Caviness, C.E. Stages of soybean development. Iowa State University Cooperative
2 Extension Service, **Special Report**, v.80. 1977.
3
4 Free, John Brand. **A organização social das abelhas** (*Apis*). São Paulo, SP: EPU, 1980. 79p.
5 Free, J.B., Williams, I.H. The pollination of hybrid kale (*Brassica oleracea* L.). **Journal of**
6 **Agricultural Science**, v. 81, n. 3, p. 557-559, 1973.
7
8 Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C. de V., Berti Filho, E.,
9 Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D.X., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S.,
10 Omoto, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ: il (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz
11 de Queiroz), 2002. 920 p.
12
13 Gazzoni, D.L. **Soja e abelhas**. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2017. 151 p.
14
15 Gullan, P.J., Cranston, P.S. **Insetos: Fundamentos da Entomologia**. 5a. ed. Rio de Janeiro,
16 Roca, 2017, p. 427.
17
18 Huseh, A.S., Groves, R.L. Environmental Fate of Soil Applied Neonicotinoid Insecticides in
19 an Irrigated Potato Agroecosystem. **Plos One**, v. 9, n. 5: e97081, 2014.
20
21 Ikeda, T., Zhao, X., Kono, Y., Yeh, J. Z., Narahashi, T. Fipronil Modulation of Glutamate-
22 Induced Chloride Currents in Cockroach Thoracic Ganglion Neurons. **NeuroToxicology**, v. 24,
23 n. 6, p. 807-815, 2003.
24
25 Imperatriz-Fonseca, V.L.; Nunes-Silva, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código
26 Florestal Brasileiro. **Biota Neotropical**, v. 10, n. 4, p. 59-62, 2010.
27
28 Jones, A., Turnbull, G. Neonicotinoid concentrations in UK honey from 2013. **Pest**
29 **Management Science**, v. 72. n. 10. p. 1897-900, 2016.
30
31 Jung, A. H. Impacto de inseticidas aplicados em soja sobre abelhas melíferas. Dissertação
32 (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, 63 p., 2014.
33

1 Kairo, G., Biron, D. G., Ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Tchamitchian, S., Cousin, M.,
2 Dussaubat, C., Benoit, B., Kretzschmar, A., Belzunces, L.P., Brunet, J.L. *Nosema ceranae*,
3 Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male
4 physiology. **Scientific Reports**, v.7, n. 8556. p. 1-14, 2017.

5 Kerr, W.E. The history of introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**,
6 v. 39, n. 2, p. 3-5, 1967.

7

8 Kessler, S., Tiedeken E.J., Simcock, K.L., Derveau, S., Mitchell, J., Softley, S., Stout, J.C.,
9 Wright, G.A. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, v. 521, n. 7550,
10 p. 74–76, 2015.

11

12 Krupke, C. H., Hunt G. J., Eitzer B. D., Andino, G., Given, K. Multiple routes of pesticide
13 exposure for honey bees living near agricultural fields. **Plos One**, v.7, n.1. p. 1-8, 2012.

14

15 Milfont, M. O., Rocha, E.E.M., Lima, A.O.N., Freitas, B.M. Higher soybean production using
16 honeybee and wild pollinators, a sustainable alternative to pesticides and autopollination.
17 **Environmental Chemistry Letters**, v.11, p. 335-341, 2013.

18

19 Miyasaka, S. Medina, J.C. **A soja no Brasil**. 1ed. 1062 p. 1981.

20

21 Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K., Yeh, J. Differential actions of insecticides on
22 target sites: basis for selective toxicity. **Human & Experimental Toxicology**. v. 26. n. 4, p.
23 361-366. 2007.

24

25 Oldroyd, B.P. What's killing American honey bees? **Plos Biology**, v. 5, n. 6, p. 1195-1199,
26 2007.

27

28 Oliveira, F., Fernandes, M.G. Does the transgenic Cry1Ac toxin adversely affect the population
29 dynamics of floral-visiting insects in soybean crop? **African Journal Biotechnology**, v.15, n.25,
30 p. 1320-1329. 2016.

31

32 Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., Cesio,
33 M.V., Heinzen, H. Detection of Pesticides in Active and Depopulated Beehives in Uruguay.

1 **International Journal Environmental Research Public Health.** v. 8, n. 10, p. 3844–3858,
2 2011.

3 Pires, C.S.S., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O. (4), Pettis, J.S.,
4 Teixeira, E.W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?
5 **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.422-442, 2016.

6

7 Rafael, J. A.; Melo, G. A. R.; Carvalho, C. J. B.; Casari, S. A.; Constantino, R. **Insetos do**
8 **Brasil: Diversidade e Taxonomia** I. Ribeirão Preto: Halos, Editora, 2012. 810 p.

9

10 Rech, A. R.; Agostini, K.; Oliveira, P. E.; Machado, I. C.; **Biologia da Polinização.** Rio de
11 Janeiro, Ed. Projeto Cultura, 2014. 527 p.

12

13 Roat, T. C., Santos-Pinto, J. R. A., Santos, L. D., Santos, K. S., Malaspina, O., Palma, M. S.
14 Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-
15 lethal doses of the insecticide fipronil. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 9, p. 1659-1670, 2014.

16

17 Santos, E., Mendoza, Y., Vera, M., Carrasco-Letelier, L., Díaz, S., Invernizzi, C. Aumento en
18 la producción de semillas de soja (*Glycine max*) empleando abejas melíferas (*Apis mellifera*).
19 **Agrociencia Uruguay**, v.17, n. 1, p. 81-90, 2013.

20

21 Silveira, F. A.; Melo, G. A. R.; Almeida, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e**
22 **identificação.** Belo Horizonte, 2002. 253 p.

23

24 Tavares, D. A., Roat, T.C., Carvalho S.M., Silva-Zacarin E.C.M., O. Malaspina. In vitro
25 effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera:
26 Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370-378, 2015.

27

28 Tavares, D.A., Dussaubat, C., Kretzschmar, A., Carvalho, S.M., Silva-Zacarin, E.C.M.,
29 Malaspina, O., Berail, G., Brunet, J.L., Belzunces, L. P. Exposure of larvae to thiamethoxam
30 affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental**
31 **Pollution**, v. 229, p. 386-393, 2017.

32

1 Tomizawa, M.; Casida, J. E. Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of
2 Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. **Annual Review Entomology**, v.48, p. 339-364,
3 2003.

4 Tosi, S., Burgio, G., Nieh, J.C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs
5 honey bee flight ability. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1201, p. 1-8, 2017.
6

7 Valdovinos-Flores, C., Alcantar-Rosales, V. M., Gaspar-Ramírez, O., Saldanña-Loza, L. M.,
8 Dorantes-Ugalde, J. A. Agricultural pesticide residues in honey and wax combs from
9 Southeastern, Central and Northeastern Mexico. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 5,
10 p. 667–679, 2017.
11

12 van Engelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R.M., Pettis, J. A survey of honey bee colony losses
13 in the U.S., fall 2007 to spring 2008. **Plos One**. v.3, n. 12, p. 1-6, 2008.
14

15 vanEngelsdorp, D.; Evans, J. D.; Saegerman, C.; Mullin, C.; Haubruge, E.; Nguyen, B.K.;
16 Frazier, M.; Frazier, J.; Cox-Foster, D.; Chen, Y.; Underwood, R.; Tarpay, D.; Pettis, J. S.
17 Colony Collapse Disorder: A descriptive study. **Plos One**, v. 4, n. 8, p. 1-17, 2009.
18

19 Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J-L., Texier, C., Biron,
20 D.G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L.P., Delbac, F. Exposure to Sublethal Doses of
21 Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by
22 *Nosema ceranae*. **Plos One**, v. 6, n. 6: e21550. p. 1-8, 2011.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

CAPITULO II

Padrão de distribuição temporal de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) na floração de cultivo de soja (*Glycine max*) de ciclo indeterminado

(De acordo com as normas do periódico “Anais da Academia Brasileira de Ciências”, com adaptações para as normas de “Redação de Tese” da Universidade Federal da Grande Dourados)

1 **Padrão de dinâmica temporal de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) na floração de**
2 **cultivo de soja (*Glycine max*) de ciclo indeterminado**

3

4 **Resumo**

5 As variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) com ciclo de crescimento indeterminado são
6 bastante utilizadas no estado de Mato Grosso do Sul, as quais são caracterizadas por não terem
7 seus estádios fenológicos bem marcados, com período de floração escalonado e dependente das
8 condições climáticas, que pode se estender ou encurtar. Como as abelhas estão presentes nas
9 mais variadas culturas de importância econômica e desempenham papel importante na
10 polinização dá-se a necessidade de investigar a frequência e o horário de visitação de *Apis*
11 *mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em cultivo de soja de ciclo indeterminado. As coletas
12 ocorreram em uma área de 4 ha de soja (variedade Monsoy M6410 IPRO®) que não recebeu
13 aplicação de inseticidas. As amostragens foram realizadas em pontos aleatórios dentro de toda
14 área, durante todo o período de florescimento. Ocorreram da bordadura para o centro da cultura,
15 iniciando as 08h:00min com duração de 15min/hora, sucessivamente até às 16h:00min. Na
16 análise dos dados foram gerados Modelos Lineares Generalizados, no qual o Modelo de Poisson
17 foi o que melhor se ajustou, verificando as diferenças significativas pela análise de Deviance.
18 Testamos a correlação entre as abelhas e as variáveis climáticas através da Correlação de
19 Spearman. Os resultados demonstram que o padrão temporal da visitação das abelhas foi
20 influenciado pelos fatores de período de floração da cultura e o horário do dia de maneira
21 independente, entretanto as variáveis climáticas não influenciaram significativamente na taxa
22 de visitação das abelhas. Nos primeiros dias de florescimento da cultura as abelhas estão mais
23 presentes, apresentando tendência a visitar a cultura no meio do dia entre as 10h e as 15h. Os
24 resultados deste trabalho têm implicações práticas na conservação da espécie durante os tratos
25 culturais na cultura da Soja, contribuindo para harmonizar a convivência entre apicultores e

1 sojicultores. Evitando aplicações de produtos fitossanitários nos períodos de maior visitaçã
2 das abelhas na cultura da soja.

3

4 **Palavras-chave:** Forrageamento; abelha; comportamento, horário de visitaçã.

5

6 **Introdução**

7

8 A polinizaçã é um serviçã ecossistêmico de suma importãncia, e este processo ocorre
9 naturalmente, mas muitas plantas não dependem de agentes polinizadores externos para a
10 fecundaçã de suas flores e realizam a autopolinizaçã na presençã de flores auto compatíveis
11 (Rech et al., 2014). As abelhas desempenham esse serviçã naturalmente e mantêm relações de
12 dependênciã que muitas vezes podem ser essenciais para a cultura que recebe a visitaçã destes
13 insetos, ou em alguns casos modesta, como no caso da cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.),
14 que apresenta uma relaçã de dependênciã reduzida com a abelha *Apis mellifera* L. 1758
15 (Hymenoptera: Apidae) (Gianini et al., 2015a,b).

16 Esta relaçã modesta se dá pelo fato de a soja ser uma planta autógama e realizar a
17 autopolinizaçã, pois suas flores possuem estruturas femininas e masculinas e possuem uma
18 sincronizaçã na receptividade do estigma e viabilidade do pólen, o que lhes proporciona uma
19 alta taxa de frutificaçã (Miyasaka e Medina, 1981). Algumas das suas variedades possuem o
20 seu ciclo de crescimento indeterminado caracterizado por um estágio da floraçã que pode se
21 estender ou encurtar dependendo das condições climáticas, a qual se sobrepõe ao estágio de
22 formaçã de vagens (Fehr e Caviness, 1977; Miyasaka e Medina, 1981).

23 O período de enchimento dos grãos nas vagens é quando a soja está mais vulnerável a
24 danos causados por insetos herbívoros, eles danificam os frutos e as sementes e prejudicam sua
25 qualidade interferindo assim na viabilidade das sementes, porém neste período uma planta de

1 ciclo indeterminado ainda está produzindo algumas flores na sua região apical o que pode ser
2 atrativo para polinizadores, podendo expor as abelhas a riscos de contaminação, se estiverem
3 presentes na cultura durante este período (Gazzoni, 2017; Corrêa-Ferreira e Azevedo, 2002), se
4 ocorrer a aplicação de produtos fitossanitários.

5 As abelhas da espécie *A. mellifera* são consideradas os visitantes florais mais frequentes
6 na cultura da soja, apesar da ocorrência de outras espécies de insetos polinizadores, tal
7 frequência pode ser atribuída a sua necessidade nutricional para suprir as demandas de colônias
8 populosas e seu hábito generalista em busca do melhor recurso floral que vai fornecer os
9 nutrientes necessários para o desenvolvimento da cria e suas necessidades fisiológicas (Free,
10 1980; Milfont et al., 2013; Santos et al., 2013). A sua presença de forma natural ou introduzida
11 para coleta de pólen e néctar, resulta na polinização cruzada desta cultura o que pode gerar
12 aumentos na produtividade de até 18%, apesar da planta não necessitar de agentes polinizadores
13 (Milfont et al., 2013; Blettler et al., 2018).

14 As abelhas melíferas têm um padrão de comportamento de forrageio ao longo do dia
15 que pode ser influenciado pelas variáveis climáticas do ambiente e/ou pela disponibilidade e
16 qualidade do recurso floral, comportamento este, que pode variar no decorrer do dia (Chiari et
17 al., 2005; Abou-Shaara, 2014). Estudos que elucidam o comportamento de forrageio de abelhas
18 melíferas em culturas de interesse agrícola, como a soja, são de suma importância devido ao
19 risco de exposição a produtos fitossanitários a que estas abelhas estariam expostas, o que ajuda
20 a gerar informações que possam ser utilizadas para fins de mitigação de risco aos polinizadores
21 durante as aplicações destes pesticidas. Assim o presente estudo teve como objetivo investigar
22 o padrão de distribuição temporal de *A. mellifera* em um cultivo de soja de ciclo indeterminado.

23

24 **Materiais e métodos**

25

1 Este experimento foi desenvolvido na Fazenda Experimental da Universidade Federal
2 da Grande Dourados na safra de 2017/2018 (Latitude 22°23'55" e Longitude 54°98'82").
3 Exclusivamente para a realização deste experimento foi instalada uma área de 4 ha de Soja da
4 variedade Monsoy 6410 IPRO® de ciclo indeterminado (Monsoy, 2018). E a 75,28m de
5 distância da área de cultivo havia um fragmento de mata nativa, e o restante da área era
6 circundada por pasto e cultivo de cana-de-açúcar. A semeadura foi realizada em 18/10/2017 e
7 seguiu as recomendações agrônômica para seu cultivo, porém não foi efetuada nenhuma
8 aplicação de produtos fitossanitário de ação inseticida desde o início do experimento até o seu
9 encerramento.

10 As amostragens foram iniciadas quando as primeiras flores se abriram no estágio R1 e
11 se estendeu durante todo o período de florescimento da cultura. As amostragens foram
12 realizadas nos dias 14/12/2017 (52 DAE – Dias Após Emergência), 21/12/2017 (59 DAE),
13 27/12/2017 (65 DAE), 03/01/2018 (72 DAE) e 05/01/2018 (74 DAE), para determinar em qual
14 período do florescimento da cultura as abelhas estão mais presentes, tendo sido encerradas
15 quando a cultura não estava mais produzindo flores. As abelhas foram coletadas com rede
16 entomológica ao longo do dia, iniciando as 08h:00min com duração de 15min, sucessivamente
17 até as 16h:00min (08h, 09h, 10h, 11h, 12h, 13h, 14h, 15h e 16h) (Oliveira e Fernandes, 2016).
18 Deste modo foram avaliadas a frequência de visitação das abelhas ao longo do dia e o período
19 de visitação ao longo da floração da cultura. Os indivíduos foram coletados diretamente nas
20 flores em caminhada lenta em zigue-zague do coletor, no sentido da borda para o meio do
21 cultivo e foram sacrificadas em câmara mortífera com acetato de etila. Todo material coletado
22 foi acondicionado em potes plásticos devidamente etiquetados contendo o horário da coleta e o
23 dia, e foram mantidas congeladas a -18°C até a triagem do material e sua identificação em
24 laboratório.

25

1 *Análise estatística*

2

3 Foram gerados Modelos Lineares Generalizados com as distribuições de Poisson,
4 Quasepoisson e Binomial Negativa. O modelo de Poisson foi o que melhor se ajustou aos dados
5 da dinâmica temporal das abelhas. A verificação da qualidade dos ajustes do modelo de Poisson
6 foi feita com uso de gráfico meio-normal de probabilidades com o envelope o pacote Half-
7 Normal Plots (Moral et al., 2016). A diferenças significativas foram verificadas através da
8 análise de deviance. Para verificar se existia correlação entre as abelhas coletadas e as variáveis
9 climáticas foi aplicada a análise de Correlação de Spearman, utilizando o programa estatístico
10 R Core Team (2017) para todos os testes aplicados.

11

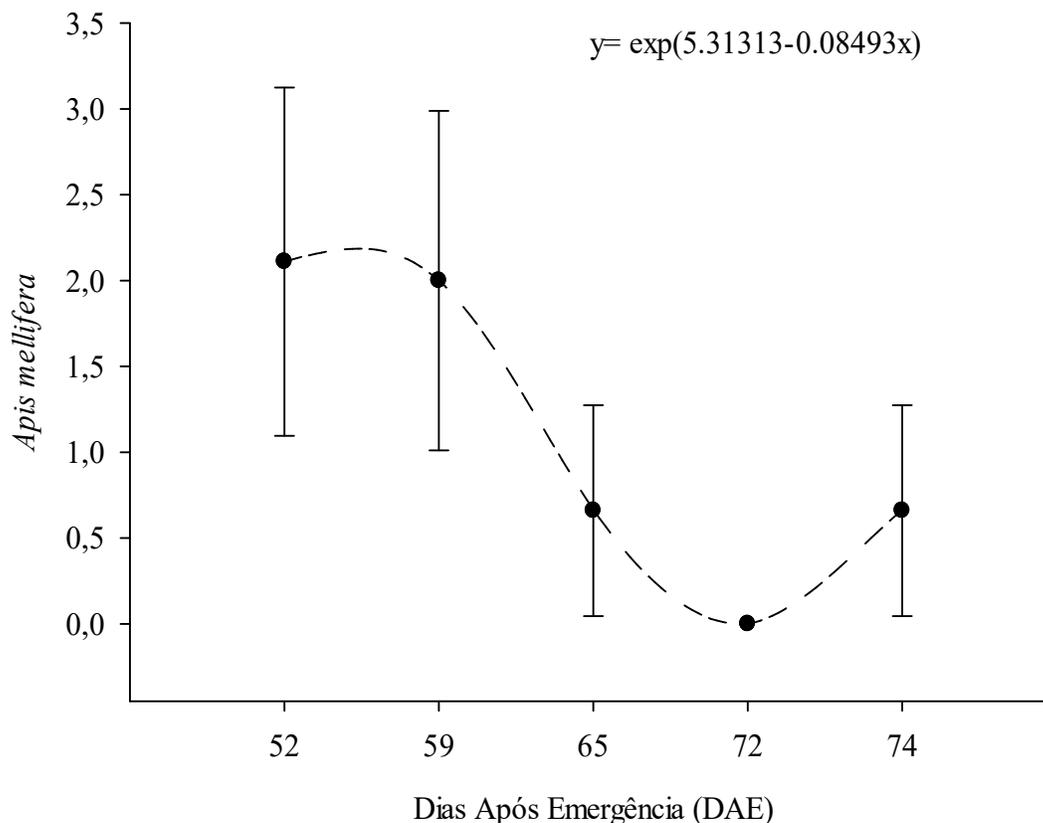
12 ***Resultados***

13

14 A dinâmica temporal das abelhas foi influenciada pelo horário do dia ($P < 0,00001$) e
15 por DAE da planta ($P < 0,00001$), mas não houve interação entre os fatores horário x DAE ($P =$
16 $0,2902$), assim cada fator influenciou a dinâmica temporal das abelhas coletadas na soja de ciclo
17 indeterminado de forma independente. Nos primeiros dias da floração, a visitação das abelhas
18 é mais intensa e vai decrescendo com o passar dos dias. Aos 52 DAE e 59 DAE a frequência
19 das abelhas foi maior que em qualquer outro período de floração (Figura 1). Aos 65 e 72 DAE
20 o forrageio das abelhas diminuíram consideravelmente.

21 Aos 74 DAE tem um pequeno aumento, mas nos dias que precedem, a cultura já não
22 estava produzindo mais flores pois o enchimento dos grãos já teve início, então a tendência da
23 visitação das abelhas é continuar baixa até cessar, já que a cultura não estará mais
24 disponibilizando recursos para as abelhas coletarem. Consequentemente os primeiros dias da

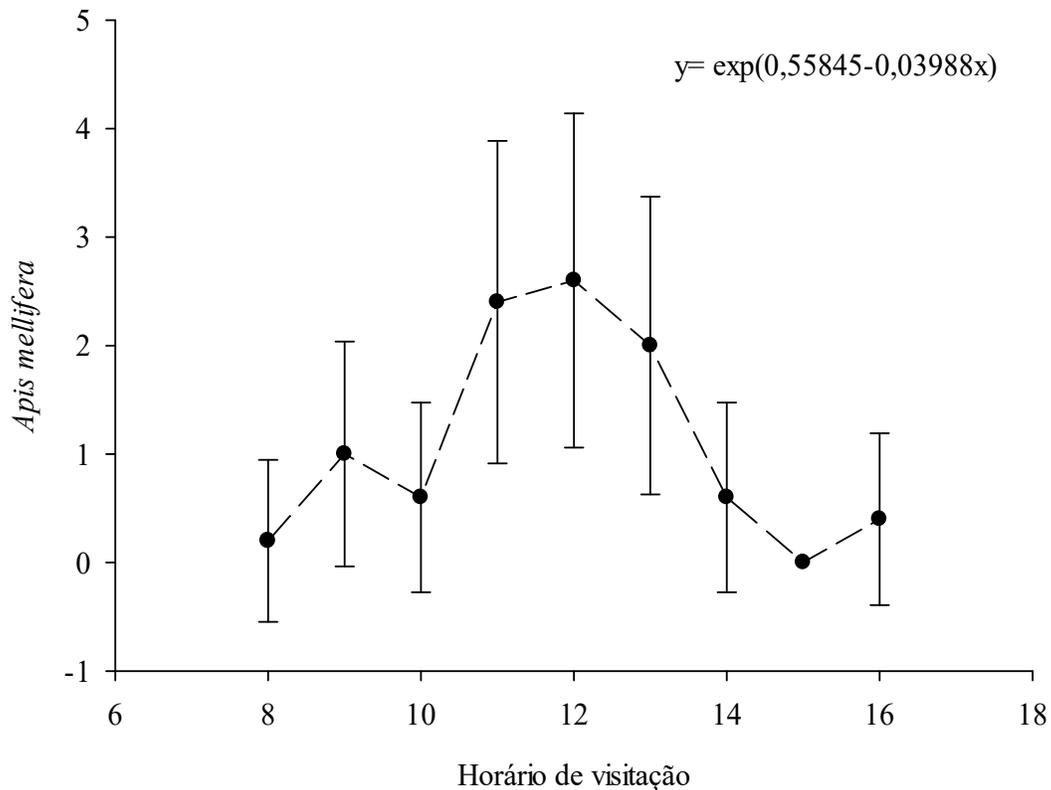
- 1 floração se tornam os mais propícios para intoxicação de abelhas a produtos fitossanitários
- 2 empregados na soja, já que elas estarão forrageando com maior frequência a cultura.



3
4 **Figura 1.** Dinâmica temporal de abelhas *Apis mellifera* em um cultivo de soja de ciclo
5 indeterminado, ao longo do período de floração estimado pelo modelo linear generalizado
6 Poisson.

7
8 Já a dinâmica temporal das abelhas em relação ao horário de visitação oscilou
9 consideravelmente, os horários com as maiores médias de frequência previstas pelo o modelo
10 foram as 11h, 12h e as 13h (Figura 2). Indicando que esses horários são os mais propícios para
11 serem encontradas abelhas na cultura da soja que apresente ciclo indeterminado. O período das
12 11h até as 13h foi quando se registrou a maior frequência de abelhas na cultura, declinando a
13 partir das 14h. Entretanto os registros obtidos indicam que a abelhas estão presentes na cultura

1 durante todo o período avaliado neste estudo, e que a partir das 10h, quando a frequência de
2 visitação começa a aumentar até as 15h, deve se evitar as aplicações de produtos fitossanitários,
3 considerando o período mais crítico para aplicações em função da presença mais intensa das
4 abelhas na cultura estudada.



5
6 **Figura 2.** Dinâmica temporal de *A. mellifera* ao longo do horário de visitação em um cultivo
7 de soja de ciclo indeterminado estimado pelo modelo linear generalizado Poisson.

8
9 A frequência das abelhas na cultura, não foi influenciada pelas condições climáticas
10 neste estudo durante os horários de visitação (Tabela 1), uma vez que, as variáveis precipitação
11 e umidade relativa apesar de não significativas, demonstraram uma fraca correlação negativa
12 com a frequência de abelhas indicando que conforme aumentavam, o número de abelhas
13 diminuía, porém, essa correlação não foi forte o suficiente para indicar uma influência dos

1 fatores climáticos. Já para as variáveis temperatura média, velocidade do vento e radiação solar
 2 a correlação foi fracamente positiva, mas também não foi forte o suficiente para influenciar a
 3 visitação das abelhas no cultivo.

4
 5 **Tabela 1.** Coeficiente de Correlação de Spearman entre o número de abelhas *Apis mellifera*
 6 coletadas ao longo do dia na floração de um cultivo de soja de ciclo indeterminado com as
 7 variáveis climáticas em Dourados-MS, safra 2017/2018.

	Temperatura média (°C)	Umidade relativa (%)	Velocidade do Vento (m/s)	Precipitação (mm)	Radiação solar líquida (W/m ² /hora)
<i>Apis mellifera</i>	rho= 0,184 <i>P</i> = 0,61	rho= -0,184 <i>P</i> =0,61	rho= 0,156 <i>P</i> =0,67	rho= -0,413 <i>P</i> =0,24	rho=0,393 <i>P</i> = 0,26

8 Valor de *P*: probabilidade de significância. rho=coeficiente de correlação. Fonte dados climáticos: Rede
 9 do INMET

10

11 **Discussão**

12

13 O padrão de distribuição temporal das abelhas *A. mellifera* em um cultivo de soja de
 14 ciclo indeterminado foi influenciado pelos fatores: horário do dia em que a abelha realizava a
 15 visitação e pelo período de florescimento em que a cultura se encontrava (DAE), isoladamente.
 16 Nos primeiros dias de florescimento da cultura, aos 52 DAE e 59 DAE, foi o período em que
 17 as abelhas se apresentaram mais abundantes na cultura. Enquanto que ao longo do dia, o período
 18 com a maior presença de abelhas foi entre as 10h e 15h. A abelha *A. mellifera* é citada como o
 19 visitante floral mais abundante na cultura da soja tanto em cultivares Bt quanto não Bt, e nossos
 20 resultados apontam as abelhas visitando a cultura da soja com maior intensidade a partir das

1 10h, enquanto nas primeiras horas do dia elas forrageiam com menor intensidade, coincidindo
2 com os nossos resultados (Oliveira e Fernandes, 2016).

3 As abelhas são consideradas os polinizadores mais frequentes da soja e a espécie *A.*
4 *mellifera*, se destaca entre elas (Chiari et al., 2005; Oliveira e Fernandes, 2016), forrageando
5 intensamente na cultura em busca de néctar e pólen, no entanto, o recurso floral mais coletado
6 pela *A. mellifera* na cultura é o néctar, que muitas vezes é coletado isoladamente, raramente
7 ocorrendo a coleta somente grãos de pólen (Chiari et al., 2005). Chiari et al., (2005) observaram
8 que *A. mellifera* forrageia com maior intensidade no período das 13h entre algum tempo, e que
9 nos primeiros horários do dia e após as 16h sua presença na cultura é menor, constatando que
10 o período com a maior intensidade é no meio do dia.

11 Bletter et al. (2018) avaliando aumentos nos rendimentos da soja que recebeu visitaço
12 de *A. mellifera* também verificaram que no período das 12h foi o que teve a maior taxa de
13 visitaço pelas abelhas, e que a sua presença na cultura trouxe aumento no rendimento da
14 cultura em até 18% no primeiro ano de avaliação, porém, na segunda safra não houve diferenças
15 significativas entre as áreas com a presença da abelha e nas áreas em que as abelhas eram
16 impedidas de visitar a cultura. Tal resultado pode ter sido observado em decorrência das
17 condições climáticas que são diferentes de um ano para o outro, e que podem influenciar a
18 produção da cultura, ou pela variedade em estudo, já que muitas variedades fecundam as flores
19 antes mesmo destas abrirem.

20 Esse padrão de visitaço das abelhas na soja, está relacionado com a quantidade e
21 qualidade de recurso oferecido além disso, a secreço de néctar da soja é correlacionada com o
22 aumento da temperatura do ar, e em temperaturas em torno de 28°C a planta tende a secretar
23 maior quantidade desse recurso e se torna mais atrativa para as abelhas e a evaporaço da água
24 é maior e o néctar tende a ficar mais viscoso (Robacker et al., 1983). Isto pode explicar o porquê
25 das abelhas melíferas são encontradas forrageando com maior intensidade nas horas mais

1 quentes do dia nessa planta já que geralmente ela visita a soja na maioria das vezes em busca
2 de néctar. No entanto, as variáveis climáticas não foram correlacionadas com o padrão temporal
3 de visitação das abelhas na soja de ciclo indeterminado avaliado em nossos estudos, mas a
4 variável temperatura pode ter influenciado indiretamente, atuando sobre a soja e resultando no
5 aumento da produção de néctar e aumentando assim a atratividade das flores para as abelhas.

6 A capacidade de *A. mellifera* visitar a cultura da soja e realizar o serviço da polinização
7 já foi constatada, o que gera para a planta benefícios no rendimento da sua produtividade através
8 de aumentos no número de sementes e no número de vagens por planta e conseqüentemente,
9 ganhos financeiros quando presente na cultura (Milfont et al., 2013; Bletter et al., 2018).
10 Juntamente com a implantação do MIP (Manejo Integrado de Pragas) que contribuirá para a
11 redução de quantidade de produtos fitossanitários no ambiente favorecendo o controle
12 biológico, o equilíbrio do agroecossistema e reduzindo os gastos dos produtores (Ávila e
13 Santos, 2018).

14 Porém, o aumento da produtividade da soja não depende única e exclusivamente da
15 presença ou não de abelhas por se tratar de uma planta autógama, mas não se pode negar que
16 quando presentes, elas atuam como agente polinizadores, assim boas práticas como a
17 temporização de aplicação de produtos em horários que as abelhas não estão presentes ou são,
18 sejam menos frequentes, e/ou a utilização de produtos seletivos às abelhas, contribuem para a
19 sua conservação e um melhor desempenho da polinização. Deste modo, estudos que desvendem
20 o padrão de distribuição temporal dos polinizadores na cultura da soja contribuem para alcançar
21 aumentos na produtividade e fornecem dados sobre o comportamento das abelhas em campo
22 que podem ser utilizados para gerar medidas de mitigação de risco de contaminação dos
23 polinizadores no campo. Portanto sugere-se que a utilização de produtos fitossanitários entre os
24 horários das 10h às 15h seja evitada e nos primeiros dias da floração da cultura, quando a
25 visitação das abelhas é mais intensa também, preferindo a utilização desses produtos após os

1 75 DAE de uma cultura de ciclo indeterminado, afim de evitar a contaminação das abelhas em
2 campo.

3

4 ***Referências bibliográficas***

5

6 Abou-Shaara HF. 2014. The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. *Vet*
7 *Med* 59 (1): 1–10.

8 Ávila CJ, Santos V. 2018. Manejo Integrado de Pragas (MIP) na cultura da soja: um estudo de
9 caso com benefícios econômicos e ambientais. Dourados, MS: Embrapa Agropecuária
10 Oeste, 43 p. ISBN 1679-043X; Documento 143.

11 Blettler DC, Fagúndez GA, Caviglia OP. 2018. Contribution of honeybees to soybean yield.
12 *Apidologie* 49(1): 101–111.

13 Chiari WC, Toledo VAA, Ruvolo-Takasusuki MCC, Attencia VM, Costa FM, Kotaka CS,
14 Sakaguti ES, Magalhães HR. 2005. Floral biology and behavior of Africanized
15 honeybees *Apis mellifera* in soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Braz Arch Biol and*
16 *Technol* 48(3): 367-378.

17 Corrêa-Ferreira BS, Azevedo J. 2002. Soybean seed damage by different species of stink bugs.
18 *Agri and For Entomol* 4: 145 -150.

19 Fehr, WR., C.E. Caviness. 1977. Stages of soybean development. Iowa State University
20 Cooperative Extension Service, Spec Rep 80: 1-12.

21 Free JB. 1980. A organização social das abelhas (*Apis*). São Paulo, SP: EPU, 79p.

22 Gazzoni DL. 2017. Soja e abelhas. Brasília, DF: Embrapa Soja, 151 p.

23 Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, Cartolano Jr EA, Veiga AK, Imperatriz-Fonseca VL,
24 Saraiva AM. 2015a. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions.
25 *Apidologie* 46(2): 209-223.

1 Giannini TC, Cordeiro GD, Freitas BM, Saraiva AM, Imperatriz-Fonseca VL. 2015b. The
2 Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil.
3 J Econ Entomol 108 (3): 849-857.

4 Milfont MO, Rocha EEM, Lima AON, Freitas BM. 2013. Higher soybean production using
5 honeybee and wild pollinators, a sustainable alternative to pesticides and
6 autopollination. *Envir Chem Lett* 11: 335 - 341.

7 Miyasaka S, Medina JC. 1981. *A soja no Brasil*. 1ed. 1062 p.

8 Moral RA, Hinde J, Demetrio CGB. 2016. hnp: Half-Normal Plots with Simulation Envelopes.
9 R package version 1.2. <http://CRAN.R-project.org/package=hnp>

10 Monsoy. Variedades Monsoy, 2018. Disponível em:
11 <www.monsoy.com.br/variedades_monsoy/m6410ipro>. Acesso em: 12/12/2018.

12 Oliveira F, Fernandes MG. 2016. Does the transgenic Cry1Ac toxin adversely affect the
13 population dynamics of floral-visiting insects in soybean crop? *Afri J Biotec* 15(25):
14 1320-1329.

15 R Studio. 2017. Rob Thomas. *Data Analysis with R Statistical Software: A Guidebook for*
16 *Scientists*. Eco-explore. 166.

17 Rech AR, Agostini K, Oliveira PE, Machado IC. 2014. *Biologia da Polinização*. Rio de Janeiro,
18 Ed. Projeto Cultura, 527 p.

19 Robacker DC, Flottum PK, Sammataro D, Erickson EH. 1983. Effects of climatic and edaphic
20 factors on soybean flowers and on the subsequent attractiveness of the plants to honey
21 bees. *Fiel Crop Res* 6(1983): 267-278.

22 Santos E, Mendoza Y, Vera M, Carrasco-Letelier L, Díaz S, Invernizzi C. 2013. Aumento en
23 la producción de semillas de soja (*Glycine max*) empleando abejas melíferas (*Apis*
24 *mellifera*). *Agroc Urug* 17(1): 81-90.

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

CAPITULO III

Toxicidade do solo contaminado com inseticidas de tratamento de sementes da soja
(Glycine max) para *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

(De acordo com as normas do periódico “Bulletin of Entomological Research”, com adaptações para as normas de “Redação de Tese” da Universidade Federal da Grande Dourados)

1 **Toxicidade do solo contaminado com inseticidas de tratamento de sementes da soja**
2 **(*Glycine max*) para *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**

3

4 **RESUMO**

5

6 Operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) são polinizadoras por excelência e há o
7 risco de estarem expostas durante o forrageamento aos produtos fitossanitários utilizados na
8 proteção de cultivos, como no caso de resíduos derivados do tratamento de sementes. Portanto
9 o objetivo deste estudo foi investigar os riscos toxicológicos de inseticidas via tratamento de
10 sementes de soja à abelhas adultas expostas a partículas de solo obtidas logo após semeadura.
11 As abelhas adultas foram coletadas em uma colmeia sadia, levadas ao laboratório e agrupadas
12 em 10 abelhas/gaiola. Foram semeadas sementes de soja tratadas com Thiamethoxam,
13 Clothianidin, Imidacloprid, Fipronil e Testemunha; logo após foi coletado 10g de solo por
14 repetição para exposição das abelhas e avaliação da mortalidade. Para análise dos dados,
15 modelos lineares generalizados foram testados e o modelo do tipo beta binomial foi o que
16 melhor se ajustou. Os tratamentos foram contrastados dentro de cada intervalo de tempo pela
17 sobreposição dos intervalos de credibilidade (IC 95%) através da Inferência Bayesiana. A
18 princípio, a probabilidade de mortalidade para todos os tratamentos foi semelhante, e
19 gradativamente aumentou uniformemente ao longo do tempo em todos os tratamentos,
20 inclusive na testemunha. Conforme contraste das médias do modelo os tratamentos não
21 diferiram entre si ao longo do tempo de exposição, logo, podemos considerar que a mortalidade
22 observada nesse estudo foi igual para todos os tratamentos, demonstrando que não houveram
23 influências do solo no qual foram semeadas sementes tratadas de soja sobre a mortalidade das
24 abelhas.

25 **PALAVRAS-CHAVE:** Neonicotinoides, fipronil, mortalidade.

1 INTRODUÇÃO

2

3 A espécie *Apis mellifera* é excelente produtora de mel e desempenha um papel
4 importantíssimo no ecossistema, ao realizar a polinização, da qual muitas plantas são
5 dependentes para garantir sua reprodução, enquanto outras se beneficiam para incrementar sua
6 produção de frutos e sementes (Free, 1980). Devido seu hábito generalista as abelhas visitam
7 várias espécies de plantas para coletar recursos florais que irão atender a sua necessidade
8 nutricional e a manutenção da colônia (Free, 1980; Malerbo-Souza e Silva, 2011).

9 Assim, elas estão presentes em plantas nativas e também em sistemas de cultivos
10 comerciais de interesse econômico (Imperatriz-Fonseca e Nunes-silva, 2010) que são
11 produzidas em larga escala e, por isso, necessitam do manejo de pragas que quase sempre é
12 feito com aplicações de produtos fitossanitários, incluindo os inseticidas sintéticos para
13 controlar as populações de insetos que causam danos econômicos nas culturas agrícolas (Gullan
14 e Crasston, 2017).

15 No caso da diminuição de polinizadores, alguns produtos químicos são suspeitos de
16 serem um dos causadores do fenômeno Desordem do Colapso das Colônias (DCC), que consiste
17 no desaparecimento súbito de um grande número de campeiras das colônias aparentemente
18 sadias e o enfraquecimento da colônia, pois com o sumiço das campeiras, as operárias mais
19 jovens são obrigadas a sair para forragear e com isso deixam de desempenhar suas atividades
20 dentro da colônia, forçando a rainha a produzir mais larvas para suprir essa falta de indivíduos
21 o que leva a um esgotamento da rainha dada a elevada atividade de postura e com isso a colônia
22 vai ficando cada vez com menos operárias, levando assim a morte da colônia (vanEngelsdorp
23 et al., 2009).

24 A causa do DCC ainda permanece em discussão em fóruns de proteção das abelhas,
25 porém, um conjunto de fatores são constantemente citados, tais como a exposição aos

1 inseticidas neonicotinoides e fipronil, estresse causados por patógenos como ácaros e vírus,
2 mudanças genéticas, redução da vegetação nativa, manejo inadequado e má nutrição das
3 colônias ou a combinação destes fatores, no entanto, ainda não se chegou a uma conclusão
4 definitiva (Blacquière et al., 2012).

5 Um dos métodos de proteção de plantas corriqueiramente utilizado na fase inicial do
6 ciclo das culturas, é o tratamento de sementes, que consiste no revestimento da semente com o
7 produto fitossanitário (Simon-Delso et al., 2015). Para a proteção da soja contra pragas iniciais,
8 são amplamente empregados os inseticidas a base de neonicotinoides e fipronil (Andrei, 2013).

9 Ao usar esse método de controle, grande parte do inseticida pode não ser absorvido pela
10 plântula e permanecer no solo por longos períodos, como visto com os neonicotinoides
11 (Samnani et al., 2013), ou ainda esses produtos poderiam se desprender das sementes, no
12 momento da semeadura, e por meio do vento ser depositado nas flores e nas abelhas operárias
13 que estariam forrageando ou, até mesmo permanecer em suspensão no ar junto com as
14 partículas de poeira que são expelidas no momento da semeadura e, dessa forma, se deslocar
15 para outras culturas circunvizinhas ou plantas nativas próximas, representando um risco de
16 contaminação (Krupke et al., 2012).

17 Existem indícios de que esses inseticidas são um dos causadores do fenômeno que
18 acomete a espécie *A. mellifera*, o DCC ocasionando perdas de abelhas campeiras, assim,
19 obrigam abelhas mais novas a desempenhar o papel de campeiras e sair para forragear antes de
20 atingir a idade ideal, além de afetar o crescimento, desenvolvimento e reprodução da colônia
21 (Desneux et al., 2007; Blacquière et al., 2012). Os casos mais graves da DCC são comumente
22 relatados nos países do Hemisfério Norte. No entanto, no Brasil esse fenômeno ainda não foi
23 confirmado apesar de várias perdas de colônias já terem sido observadas no país, estas são
24 atribuídas ao uso inadequado dos produtos fitossanitários ou incidentes, diminuição do habitats

1 natural e mudanças climáticas, no entanto, o declínio de polinizadores vem se tornando cada
2 vez mais preocupante e medidas de conservação desses, devem ser tomadas (Pires et al., 2016).

3 Como se trata de um sério problema e devido a importância dos polinizadores para o
4 ecossistema são necessários estudos que visem avaliar o impacto desses produtos fitossanitários
5 sobre as abelhas, seu comportamento e mortalidade em colônias. Assim o objetivo deste estudo
6 foi investigar a toxicidade dos inseticidas neonicotinoides e o fipronil via tratamento de
7 sementes de soja em abelhas adultas de *A. mellifera* expostas a partículas de solo obtidas logo
8 após semeadura.

9

10 **MATERIAL E MÉTODOS**

11

12 O presente trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação e laboratório de
13 Entomologia Aplicada situados na Universidade Federal da Grande Dourados. O delineamento
14 experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (inseticidas e
15 testemunha) e 12 repetições cada, sendo 10 indivíduos por repetição, totalizando 120 abelhas
16 por tratamento. Os inseticidas sintéticos utilizados seguiram as dosagens de bula/registro
17 recomendadas para a cultura da soja (Tabela 1) (Andrei, 2013).

18 Foram coletadas operárias campeiras com mais de 21 dias de idade diretamente no
19 alvado da colmeia com o pote coletor, transportadas para o laboratório e transferidas para as
20 gaiolas de exposição (Patente nº: BR 10 2018 010112 9) (Souza et al., 2018), com essa idade
21 pós-emergência elas desempenham o papel de coletoras (Free, 1980), e estão frequentemente
22 em contato direto com plantas estando sujeitas a receberem algum tipo de aplicação de produtos
23 fitossanitários ou de se contaminar com seus resíduos. Assim após a coleta das abelhas elas
24 foram armazenadas em grupos de 10/gaiola e foram oferecidos pasta candi e água durante
25 execução do experimento.

- 1 **Tabela 1.** Lista de produtos fitossanitários utilizados no tratamento de sementes bem como suas
 2 respectivas dosagens, classe inseticida e classificação toxicológica.

Tratamento (I. a.)	Nome comercial	Dosagem	Classe	Classe toxicológica
Thiamethoxam	Cruiser® 350Fs	105g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III - Medianamente tóxico
Clothianidin	Poncho® 600Fs	60g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III - Medianamente tóxico
Imidacloprid	Provado® 200Sc	120g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III - Medianamente tóxico
Fipronil	Regent® 80Wg	50g i.a./100kg sementes	Pirazol	II – Altamente tóxico
Testemunha	-	-	-	-

- 3 i.a. ingrediente ativo. Fonte: Andrei, 2013. Obs.: As sementes receberam tratamento industrial
 4 em “zero dust”.

5 Após as coletas das abelhas, foram semeadas cinco sementes de soja BMX Potencia
 6 RR a uma profundidade de 4cm de cada tratamento em vasos de 10L preparados na proporção
 7 de 1:1:1 (solo, areia, substrato) conforme recomendações agrônomicas para a cultura.
 8 Imediatamente após semeadura foi retirado uma amostra de 10g de solo (Latosolo Vermelho
 9 Distroferrico) de cada vaso/repetição, exatamente no local da semeadura de cada semente para
 10 garantir que os possíveis resíduos contidos no solo fossem coletados. Assim, logo após a coleta
 11 do solo, ele foi colocado na gaiola com as abelhas para a avaliação da taxa de mortalidade que
 12 consistiu na contagem de abelhas mortas partir de 1 hora de exposição ao solo, e posteriormente,
 13 o intervalo foi aumentando gradativamente até completar 32h de avaliações (1h, 2h, 4h, 8h,

1 16h, 24h, 32h) em condições de laboratório (temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ e umidade $70\%\pm 10$).
2 Durante as avaliações foram consideradas mortas às abelhas que permaneceram totalmente
3 imóveis após estímulo (Souza et al., 2018).

4

5 **Análise dos dados**

6

7 Para os dados de mortalidade de *A. mellifera*, modelos lineares generalizados foram
8 testados com distribuição binomial, beta binomial e quasibinomial com as funções de ligação
9 Probit, Cauchit e Complemento Log Log. Todavia, o modelo com distribuição do tipo beta
10 binomial foi o que melhor se ajustou aos dados de mortalidade; inseticidas e tempo de exposição
11 foram considerados como fatores na análise de deviance. A verificação da qualidade do ajuste
12 foi realizada pelo gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (Demétrio
13 et al., 2014), utilizando o pacote “hnp” do R Core Team (2017). Modelos encaixados foram
14 construídos e comparados com o pacote “lmtree” do R Core Team (2017), a escolha do melhor
15 modelo foi dada utilizando como critérios os valores de AIC e teste de razão de
16 verossimilhança.

17 Os tratamentos foram contrastados dentro de cada intervalo de tempo pela sobreposição
18 dos intervalos de credibilidade (IC 95%). Os respectivos intervalos de credibilidade foram
19 obtidos com a utilização de inferência bayesiana, nas análises foram utilizadas 30 mil interações
20 com o método de Monte Carlo e Cadeias de Markov MCMC com três cadeias para cada
21 parâmetro e com *burn-in* de 5 mil amostras foram verificadas as convergências das cadeias por
22 meio de análise gráfica (não expostas nesse trabalho). Para estimação dos parâmetros utilizou-
23 se o R Core Team (2017) com auxílio do pacote INLA.

24

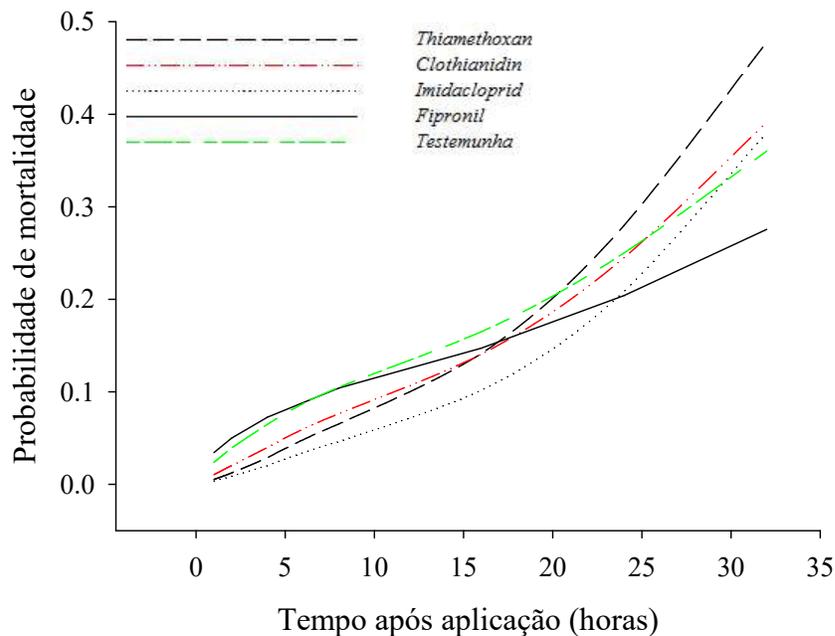
25

1 RESULTADOS

2

3 A probabilidade de mortalidade para todos os tratamentos foi semelhante e
4 gradativamente ela foi aumentando uniformemente ao longo do tempo em todos os tratamentos,
5 inclusive na testemunha. Aparentemente as curvas de regressão partiam de um mesmo
6 intercepto, na comparação do modelo de retas com intercepto coincidentes ($y = \text{horário}$), com
7 o modelo saturado ($y = \text{horário versus inseticidas}$) observou-se que não houve diferença, por
8 outro lado, o modelo saturado incorporou mais informações do ponto de vista prático (Figura
9 1).

10



11

12 **Figura 1.** Probabilidade de mortalidade de operárias de *Apis mellifera* ao longo do tempo após
13 exposição à solo oriundo da semeadura de soja com sementes tratadas.

14

15 A probabilidade de mortalidade foi mais intensa a partir de 20h após a exposição inicial,
16 porém para o tratamento com Fipronil a probabilidade absoluta de mortalidade estimada é de

1 0,3 (30%) até o final das avaliações. Enquanto que os valores preditos para Imidacloprid,
2 Clothianidin e a testemunha se mantiveram abaixo de 0,40 (40%); a tendência para o maior
3 risco de mortalidade é estimado para o tratamento com Thiamethoxam, chegando a 0,50 (50 %)
4 ao final das avaliações.

5 Também é possível observar que entre 15 a 20 horas após exposição inicial nos
6 tratamentos com Thiamethoxam, Fipronil e Clothianidin há uma sobreposição das curvas de
7 mortalidade, indicando um efeito semelhante desses inseticidas no padrão de mortalidade das
8 abelhas, sendo que após as 20h elas se distanciam, porém, o menor risco de mortalidade é
9 encontrado quando na adoção do Fipronil ao final das avaliações. Assim as aparentes diferenças
10 são explicadas pelo acaso.

11 Conforme as médias do modelo beta-binomial, os tratamentos não diferiram entre si ao
12 longo do tempo de exposição para todos os tratamentos, inclusive a testemunha. Assim foi
13 possível verificar uma mortalidade natural ao longo do tempo, ainda que 24h após a exposição
14 inicial a média do tratamento com Thiamethoxam diferiu casualmente de todos os outros
15 tratamentos, registrando uma mortalidade maior apenas nesse horário de avaliação (Tabela 2).

16 O tratamento com Thiamethoxam foi o que mais variou, nas duas primeiras horas de
17 avaliação não houve intervalos de credibilidade (IC) em razão da falta de variabilidade das
18 médias. Após 4h de exposição inicial, foi registrado o menor IC, sendo as médias iguais para
19 as 8h e 16h. Para as 24h e 32h após exposição inicial também foram iguais estatisticamente,
20 porém diferindo de 8h e 16h (Tabela 2).

21 Para o tratamento com Clothianidin e Fipronil a única diferença encontrada foi às 32h
22 após a exposição inicial, que diferiu de todos os outros horários. Já para o Imidacloprid as
23 médias do IC não foram gerados nos dois primeiros horários, e a única diferença entre os outros
24 horários foi observado às 32h. Já para o tratamento testemunha, sem inseticida, nos primeiros
25 horários de avaliação (1h, 2h, 4h, 8h, 16h e 24h após exposição inicial) as médias do IC foram

1 semelhantes estatisticamente; porém, às 16h e 24h também foram iguais às 32h que diferiu
2 apenas das primeiras horas de avaliação (1h, 2h, 4h, 8h) (Tabela 2).

3 A partir desses resultados podemos observar que em todos os tratamentos existe uma
4 diferença nas médias do IC após 32h em solo oriundo da semeadura de sementes tratadas de
5 soja, entre as médias do IC das médias das 24h após a exposição inicial, demonstrando que há
6 uma sobreposição dos IC entre todos tratamentos, mas não entre os horários de exposição de
7 cada tratamento.

- 1 **Tabela 2.** Médias da mortalidade de *Apis mellifera* ao longo do tempo de exposição ao solo oriundo do contato com sementes de soja tratadas
 2 com inseticidas.

Tratamento	Tempo (horas)						
	1	2	4	8	16	24	32
Thiamethoxam	0,00 **	0,00 **	1,56 Ca	11,08 Ba	17,39 Ba	24,01 Aba	46,63 Aa
Clothianidin	1,73 Ba	1,73 Ba	3,41 Ba	10,62 Ba	13,53 Ba	15,18 Ba	47,93 Aa
Imidacloprid	0,00 **	0,00 **	3,10 Ba	7,61 Ba	10,62 Ba	11,44 Ba	44,90 Aa
Fipronil	6,01 Ba	6,25 Ba	6,25 Ba	9,61 Ba	10,51 Ba	12,95 Ba	40,00 Aa
Testemunha	3,29 Ba	3,29 Ba	3,29 Ba	14,82 Ba	17,68 ABa	19,76 ABa	39,09 Aa

- 3 Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (dentro das linhas) e minúsculas (dentro das colunas) não diferenciam entre si devido à
 4 sobreposição dos intervalos de credibilidade (IC 95%).
 5 Médias e IC 95% foram gerados pelo modelo beta-binomial com inferência bayesiana.
 6 ** intervalos de credibilidade não gerados devido à falta de variabilidade.

1 **DISCUSSÃO**

2

3 De acordo com os nossos resultados em função da metodologia empregada, podemos
4 observar que a exposição de abelhas adultas de *A. mellifera* ao solo oriundo do local da
5 semeadura de sementes de soja tratadas com neonicotinoides e o Fipronil não ofereceram risco,
6 uma vez que não influenciou na taxa de mortalidade, mesmo depois de um período de 32h após
7 exposição. Como se sabe, o grupo dos neonicotinoides pertence à classe de inseticida mais
8 utilizada no mundo nas últimas décadas devido ao seu modo de ação neurotóxica e sua
9 versatilidade no modo de aplicação, como no tratamento de sementes ou pulverizações, além
10 da sua alta eficácia no controle de pragas fez com que fosse amplamente empregados na
11 agricultura (Jeschke et al., 2011).

12 No entanto, devido ao seu modo de ação, ele apresenta elevada toxicidade aos
13 polinizadores, inclusive à espécie *A. mellifera*, causando sérios danos quando usado
14 incorretamente (Blacquièrre et al., 2012). Danos como efeitos negativos prejudicando o
15 desempenho de aprendizagem olfativa de *A. mellifera*, quando exposta por um período
16 prolongado ao Imidacloprid em doses realista de campo e também a memória de curto prazo
17 (Williamson e Wright, 2013). Imidacloprid e Clothianidin também afetam a navegação das
18 abelhas e sua capacidade de se orientar em campo, quando estas são expostas a soluções de
19 sacarose contendo doses não letais desses neonicotinoides (Fischer et al., 2014). A exposição
20 aguda ou crônica do inseticida Thiamethoxam, é capaz de alterar a capacidade de forragear das
21 abelhas melíferas em campo, causando uma hiperexcitação ou hipoexcitação, demonstrando a
22 toxicidade em doses subletais deste inseticida para as abelhas (Tosi et al., 2017).

23 Já o inseticida Fipronil, em doses subletais, é capaz de causar a diminuição da
24 concentração de espermatozoides e a viabilidade espermática dos zangões prejudicando assim
25 sua fertilidade, o que pode prejudicar o potencial reprodutivo da rainha, quando fertilizada com

1 espermatozoides de zangões que foram expostos ao Fipronil, agindo assim diretamente na
2 aptidão da colônia (Kairo et al., 2016). Ou seja, de alguma forma eles interferem na fisiologia
3 e comportamento das abelhas podendo levar a extinção de uma colônia.

4 Samson-Robert et al. (2017) relataram no período de semeadura mortalidade de abelhas
5 melíferas em colônias próximas a áreas de cultivo de milho, semeadas com sementes tratadas
6 com neonicotínicos, e identificaram resíduos de produtos fitossanitários em abelhas mortas
7 coletadas em frente as colônias. Apesar dos resíduos de Clothianidin e Thiamethoxam estarem
8 abaixo da dose que causa mortalidade nas abelhas, as colônias estudadas demonstraram taxas
9 de mortalidade maiores no período de semeadura do milho tratado.

10 Devido a elevada toxicidade dos produtos fitossanitários utilizados em tratamento de
11 sementes, a exposição a poeira levantada durante o plantio de sementes tratadas representa uma
12 rota de exposição aos inseticidas para as abelhas se seus resíduos forem capazes de atingi-las
13 (Krupke et al., 2012; Krupke et al., 2017). Em nosso estudo foi possível observar que mesmo
14 os inseticidas a base de Thiamethoxam, Imidacloprid, Clothianidin, e Fipronil possuem
15 elevada toxicidade, eles não causaram a mortalidade de abelhas melíferas quando expostas ao
16 solo onde sementes de soja tratadas foram semeadas. Isto corrobora os resultados observados
17 por Souza et al., (2018) que avaliaram em laboratório a taxa de mortalidade de *A. mellifera*,
18 expostas ao solo onde sementes de algodão tratadas com os mesmos inseticidas, os quais
19 observaram que a mortalidade destas abelhas não foi influenciada pela exposição ao solo.

20 No entanto Tapparo et al., (2012), reproduzindo as condições de campo na semeadura
21 do milho e avaliando as partículas expelidas para o ambiente e a contaminação de abelhas que
22 se aproximavam do material em suspensão próximo a máquina de plantio, verificaram elevadas
23 taxas de resíduos dos inseticidas expelidos pela máquina e também nas abelhas mortas que
24 encontraram próximos aos locais da semeadura. Os autores concluíram que este era um fator
25 de risco para contaminação de abelhas próximas aos locais de plantio em discordância dos

1 nossos achados. Porém, o modo de tratamento de sementes empregado é diferente daquele que
2 utilizamos em nosso trabalho, que foi em formulação “zero dust” enquanto eles utilizaram pó
3 inerte, talvez esse possa ser um fator chave para encontrar uma maneira de amenizar o risco de
4 intoxicação das abelhas a campo.

5 A adoção de medidas que possam minimizar a exposição das abelhas aos resíduos dos
6 inseticidas como o tratamento de sementes em “zero dust” pode ser uma saída eficaz para evitar
7 a contaminação de *A. mellifera* quando estiverem forrageando em culturas agrícolas como a
8 soja, já que nossos resultados de exposição sobre solo contaminado não demonstrou efeitos
9 negativos em curto prazo, talvez estudos a longo prazo dessa exposição devam ser conduzidos
10 para avaliar a eficácia em minimizar os risco de intoxicação quando empregada a técnica de
11 tratamento de sementes. Assim, podemos concluir que a mortalidade observada nesse estudo
12 foi igual para todos os tratamentos, portanto, não há influência sobre a mortalidade das abelhas
13 *A. mellifera*.

14

15 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

16 **Andrei, E.** (2013) Compêndio de defensivos agrícolas: Guia prático de produtos fitossanitários
17 para uso agrícola. 9º Ed. São Paulo: Organização Andrei, 1618 p.

18 **Blacquièrè, T., Smaghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V.** (2012) Neonicotinoids in
19 bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology** 21, 973–992.

20 **Demetrio, C.G.B., Hinde, J. Moral, R.A.** (2014) hnp: Half-Normal Plots with Simulation
21 Envelopes. [S.l.], R package version 1.0. Disponível em: [http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=hnp)
22 [project.org/package=hnp](http://CRAN.R-project.org/package=hnp).

- 1 **Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M.** (2007) The sublethal effects of pesticides on
2 beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52, 81-106.
- 3 **Fischer, J, Müller, T, Spatz, AK, Greggers, U, Grünewald, B, Menzel, R.** (2014)
4 Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *Plos one*, 9(3),
5 1-10.
- 6 **Free, J. B.** (1980) A organização social das abelhas (*Apis*). São Paulo, SP: EPU, 79p.
- 7 **Gullan, P.J., Cranston, P.S.** (2017). *Insetos: Fundamentos da Entomologia*. 5a. ed. Rio de
8 Janeiro, Roca, p. 427, 2017.
- 9 **Imperatriz-Fonseca, VL, Nunes-Silva, P.** (2010) Bees, ecosystem services and the Brazilian
10 Forest Code. *Biota Neotropica* 10(4):
11 <http://www.biotaneotropica.org.br/v10n4/en/abstract?article+bn00910042010>.
- 12 **Jeschke, P, Nauen, R, Schindler, M, Elbert, A.** (2011) Overview of the status and global
13 strategy for neonicotinoids. *Journal Agricultural Food Chemistry* 59(7), 2897-908.
- 14 **Kairo, G., Provost, B., Tchamitchian, S., Ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Cousin, M.,**
15 **Sénéchal, J., Benet, P., Kretzschmar, A., Belzunces, L.P., Brunet, J.L.** (2016) Drone
16 exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential.
17 *Scientific reports* 6(31904), 1-12.
- 18 **Krupke, CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino, G, Given, K.** (2012) Multiple routes of pesticide
19 exposure for honey bees living near agricultural fields. **Plos One** 7(1), 1-8.

1 **Krupke, CH, Holland, JD, Long, EY, Eitzer, BD.** (2017) Planting of neonicotinoid-treated
2 maize poses risks for honey bees and other non-target organisms over a wide area without
3 consistent crop yield benefit. *Journal of Applied Ecology* 54 (5), 1449-1458.

4 **Marbelo-Souza, DT, Silva, FAS.** (2011) Comportamento forrageiro da abelha africanizada
5 *Apis mellifera* L. no decorrer do ano. *Acta Scientiarum*, 33 (2), 183-190.

6 **Pires, CSS, Pereira, FM, Lopes, MTR, Nocelli, RCF, Malaspina, O, Pettis, JS, Teixeira,**
7 **EW.** (2016) Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?
8 *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 51 (5), 422-442.

9 **R Studio.** (2017) Rob Thomas. *Data Analysis with R Statistical Software: A Guidebook for*
10 *Scientists*. Eco-explore. 166.

11 **Samnani, P., Vishwakarma, K., Pandey, S.Y.** (2013) Persistence study of imidacloprid in
12 different soils under laboratory conditions. *International Journal of Environmental Sciences*, 4
13 (2), 151-157.

14 **Samson-Robert, O., Labrie, G., Chagnon, M., Fournier, V.** (2017) Planting of
15 neonicotinoid-coated corn raises honey bee mortality and sets back colony development. *PeerJ*,
16 5, 1-24.

17 **Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M.,**
18 **Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D.,**
19 **Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell,**
20 **E.A., Morrissey, C.A., Nooma, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van**
21 **Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M.** (2015)

1 Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and
2 metabolites. *Environmental science and pollution research international*, 22(1), 5-34.

3 **Souza, E.P., Degrande, P.E., Azambuja, R., Silva, R.A., Alves Junior, V.V.** (2018) Toxicity
4 of Insecticide-Contaminated Soil Used in the Treatment of Cotton Seeds to Bees. *Journal of*
5 *Agricultural Science*, 10 (10), 189-196.

6 **Tapparo, A., Marton, D., Giorio, C., Zanella, A., Soldà, L., Marzaro, M., Vivan, L.,**
7 **Girolami, V.** (2012) Assessment of the Environmental Exposure of Honeybees to Particulate
8 Matter Containing Neonicotinoid Insecticides Coming from Corn Coated Seeds. *Environmental*
9 *Science Technology*, 46, 2592–2599.

10 **Tosi, S, Burgio, G, Nieh, JC.** (2017) A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam,
11 impairs honey bee flight ability. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.

12 **vanEngelsdorp, D, Evans, JD, Saegerman, C, Mullin, C, Haubruge, E, Nguyen, BK,**
13 **Frazier, M, Frazier, J, Cox-Foster, D, Chen, Y, Underwood, R, Tarpy, D, Pettis, JS.** (2009)
14 Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *Plos One*, 4 (8), 1-17.

15 **Williamson, SM, Wright, GA.** (2013) Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs
16 olfactory learning and memory in honeybees. *The Journal of Experimental Biology*, 216 (10),
17 1799-807.

18

19

20

21

22

1 **CAPITULO IV**

2

3 **Toxicidade de grãos de pólen de soja (*Glycine max*) que recebeu tratamento de sementes**

4 **com inseticidas a *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**

5

6 (De acordo com as normas do periódico “Bulletin of Entomological Research”, com

7 adaptações para as normas de “Redação de Tese” da Universidade Federal da Grande

8

Dourados)

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **Toxicidade de grãos de pólen de soja (*Glycine max*) que recebeu tratamento de sementes**
2 **com inseticidas a *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**

3

4 **RESUMO**

5

6 Já é conhecido que resíduos de produtos fitossanitários utilizados na proteção de plantas contra
7 os ataques de insetos herbívoros estão sendo encontrados nos recursos florais como o pólen,
8 mas os riscos potenciais da exposição dos polinizadores ainda não estão claros. Assim, tornam-
9 se necessários estudos para avaliar o risco dessa exposição/intoxicação para as abelhas, já que
10 necessitam destes recursos para a manutenção da colônia. Este estudo foi desenvolvido em
11 delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e 12 repetições, com 10 abelhas
12 cada. Os tratamentos foram: Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid, Fipronil e
13 Testemunha. O pólen foi coletado durante toda floração de 2 plantas de soja por repetição e
14 incorporado a 8g de pasta candi (água destilada + açúcar) e oferecido para as abelhas, e logo
15 após foi avaliada a mortalidade ao longo do tempo (1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h e 32h após
16 exposição inicial). Para análise dos dados modelos lineares generalizados foram testados e o
17 modelo do tipo beta binomial foi o que melhor se ajustou. Os tratamentos foram contrastados
18 dentro de cada intervalo de tempo pela sobreposição dos intervalos de credibilidade através da
19 Inferência Bayesiana. A probabilidade de mortalidade das abelhas foi pequena nas primeiras
20 horas de avaliação, aumentando gradativamente ao longo do tempo, em todos os tratamentos;
21 e na comparação das médias do modelo beta-binomial foi possível observar que não há
22 diferenças estatísticas entre os tratamentos, indicando uma mortalidade padrão inclusive na
23 testemunha.

24

25 **Palavras-chaves:** Mortalidade, neonicotinoide, fipronil.

1 **INTRODUÇÃO**

2

3 As operárias de *Apis mellifera* forrageiam intensamente devido à elevada necessidade
4 nutricional da colônia em decorrência do grande número de indivíduos, com isso coletam o
5 pólen e néctar necessários para a alimentação de adultos e imaturos (Free, 1980). Apesar da
6 soja ser uma planta autógama e não necessitar de um agente polinizador para realizar a
7 fecundação das suas flores, ela se beneficia quando é visitada por um polinizador, e nestas
8 abelhas *A. mellifera* são excelentes polinizadores. Elas são frequentemente encontradas
9 forrageando esta cultura em busca dos recursos florais disponíveis na planta e como
10 consequência a cultura é beneficiada com um aumento na produtividade (Blettler et al., 2018).

11 Durante o forrageio de recursos florais elas podem ficar expostas a diferentes produtos
12 fitossanitários que são empregados na proteção de plantas, como os neonicotinoides e Fipronil,
13 produtos sistêmicos e circulam por todas as partes das plantas que recebem estes produtos na
14 forma de tratamento de sementes antes da semeadura, ou por absorção da planta dos resíduos
15 contidos no solo (Bonmatin et al., 2015). Estes são necessários para a proteção das plantas
16 contra os danos ao cultivo, porém, os polinizadores também podem ser expostos aos resíduos
17 destes produtos quando forrageiam em culturas que recebem este tratamento (Simon-Delso et
18 al., 2015), como por exemplo a cultura da soja.

19 O tratamento de sementes vem sendo apontado como uma rota de exposição das abelhas
20 melíferas no campo e os inseticidas neonicotinoides e seus metabólitos em diferentes
21 concentrações, estão presentes no pólen do milho e algodão, no néctar do algodão, nas flores
22 de soja, nas abelhas que forrageiam nestas culturas, no pólen de operárias campeiras retornando
23 às colmeias, no solo e até em flores silvestres adjacentes aos campos em que ocorreu a
24 semeadura com sementes tratadas, porém, os níveis encontrados estão abaixo dos níveis
25 preocupantes que causam mortalidade em abelhas (Stewart et al., 2014).

1 Devido a esse risco de intoxicação no campo em que as abelhas estão expostas ao
2 forragear cultivos agrícolas, e ao declínio dos polinizadores em função da Desordem do Colapso
3 das Colônias (DCC), a preocupação com a saúde dos polinizadores vem aumentando. Porém,
4 as causas desse fenômeno ainda não estão esclarecidas e muitos agentes estão sendo apontados
5 como causadores do declínio de polinizadores (vanEngelsdorp et al., 2009; Blacquièrre et al.,
6 2012), tanto que em 2018 a União Europeia proibiu o uso dos produtos à base de
7 Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid de serem utilizados em campos abertos sendo o seu
8 uso permitido somente em estufas (Commission Implementing Regulation, 2018a, b, c).

9 A presença de resíduos de produtos fitossanitários em cargas de pólen coletadas por
10 abelhas que forrageiam áreas de cultivos de plantas de interesse agrícolas oferece um risco de
11 intoxicação para abelhas em campo, ainda mais quando uma grande variedade de resíduos e
12 seus metabólitos são encontrados em massas de pólen manuseadas pelas abelhas. Comprovando
13 a presença destes produtos dentro das colônias e quando ingeridos por elas, oferecem risco de
14 mortalidade mesmo em dose subletais (Böhme et al., 2018). E devido ao risco oferecido as
15 abelhas *A. mellifera* e sua importância para o ecossistema, nosso estudo teve como objetivo
16 avaliar a toxicidade de grãos de pólen de flores de soja que recebeu tratamento das sementes
17 com neonicotinoides e fipronil para abelhas *A. mellifera* expostas em dieta.

18

19 ***MATERIAL E MÉTODOS***

20

21 O presente trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação e no Laboratório de
22 Entomologia Aplicada situados na Universidade Federal da Grande Dourados. O delineamento
23 experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com cinco tratamentos (quatro
24 inseticidas e uma testemunha) e 12 repetições, sendo que cada uma delas foram testados 10
25 indivíduos, totalizando 120 abelhas por tratamento. Os inseticidas sintéticos utilizados

1 seguiram as dosagens de bula/registro recomendadas para a cultura da soja (Tabela 1) (Andrei,
2 2013).

3 Foram semeadas cinco sementes de soja BMX Potencia RR tratadas e a testemunha sem
4 inseticida, em vasos de 10L preparados na proporção de 1:1:1 (solo, areia, substrato) conforme
5 recomendações agrônômicas para cultura. Após a emergência das plantas foi realizado o
6 desbaste e permaneceram apenas duas plantas em cada vaso. Essas plantas foram cultivadas em
7 casa de vegetação, e com o início do florescimento, cada flor foi coletada e dela retirados os
8 grãos de pólen, diariamente, ao longo de todo o período de florescimento da cultura. O pólen
9 foi armazenado em refrigeração (-18C°) e agregado em pasta candi (15ml/ água destilada para
10 cada 170g de açúcar de confeitiro). Cada repetição consistiu de pólen oriundo de duas plantas
11 combinado com 8g de pasta candi.

12 Foram coletadas operárias campeiras com mais de 21 dias de idade diretamente no
13 alvado da colmeia com o pote coletor, em seguida, transportadas para o laboratório e
14 transferidas para as gaiolas de exposição (Patente nº: BR 10 2018 010112 9) (Souza et al.,
15 2018), com essa idade pós-emergência, elas desempenham o papel de coletoras (Free, 1980) e
16 estão frequentemente em contato direto com plantas, estando sujeitas a receberem algum tipo
17 de aplicação de produtos fitossanitários ou de se contaminar com seus resíduos. Assim, após a
18 coleta das campeiras elas foram colocadas em gaiolas em grupos de 10 indivíduos e foram
19 oferecidos os grãos de pólen agregados na pasta candi para avaliação da taxa de mortalidade,
20 que consistiu na contagem de abelhas mortas a partir de 1 hora de exposição ao alimento, e
21 posteriormente, o intervalo foi aumentando gradativamente até completar 32h de avaliações
22 (1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24, 32h) em condições de laboratório (Temperatura 25°C±1; Umidade
23 70%±10). Durante as avaliações foram consideradas mortas às abelhas que permaneceram
24 totalmente imóveis após estímulo (Souza et al., 2018).

25

1 **Tabela 1.** Lista de produtos fitossanitários utilizados no tratamento de sementes, bem como
 2 suas respectivas dosagens, classe inseticida e classificação toxicológica.

Tratamento (I. a.)	Nome comercial	Dosagem	Classe	Classe toxicológica
Thiamethoxam	Cruiser [®] 350Fs	105g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III-Medianamente tóxico
Clothianidin	Poncho [®] 600Fs	60g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III-Medianamente tóxico
Imidacloprid	Provado [®] 200Sc	120g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III-Medianamente tóxico
Fipronil	Regent [®] 80Wg	50g i.a./100kg sementes	Pirazol	II-Altamente tóxico
Testemunha	-	-	-	-

3 i.a. ingrediente ativo. Fonte: Andrei, 2013. Obs.: As sementes receberam tratamento industrial
 4 em “zero dust”.

5

6 *Análise dos dados*

7

8 Para os dados de mortalidade de *A. mellifera*, modelos lineares generalizados foram
 9 testados com distribuição binomial, beta binomial e quasibinomial com as funções de ligação
 10 Probit, Cauchit e Complemento Log Log. Todavia o modelo com distribuição do tipo beta
 11 binomial foi o que melhor se ajustou aos dados de mortalidade; inseticidas e tempo de exposição
 12 foram considerados como fatores na análise de deviance. A verificação da qualidade do ajuste
 13 foi realizada pelo gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (Demétrio

1 et al., 2014), utilizando o pacote “hnp” do R Core Team (2017). Modelos encaixados foram
2 construídos e comparados com o pacote “lmtree” do R Core Team (2017), a escolha do melhor
3 modelo foi dada utilizando como critérios os valores de AIC e teste de razão de
4 verossimilhança.

5 Os tratamentos foram contrastados dentro de cada intervalo de tempo por diferença dos
6 intervalos de credibilidade (IC 95%). Os respectivos intervalos de credibilidade (ICR) foram
7 obtidos com a utilização de inferência bayesiana. Nas análises foram utilizadas 30 mil
8 interações com o método de Monte Carlo e Cadeias de Markov MCMC com três cadeias para
9 cada parâmetro e com *burn-in* de 5 mil amostras. Foram verificadas as convergências das
10 cadeias por meio de análise gráfica (não expostas nesse trabalho), e para a estimação dos
11 parâmetros utilizou-se o R Core Team (2017) com auxílio do pacote INLA.

12

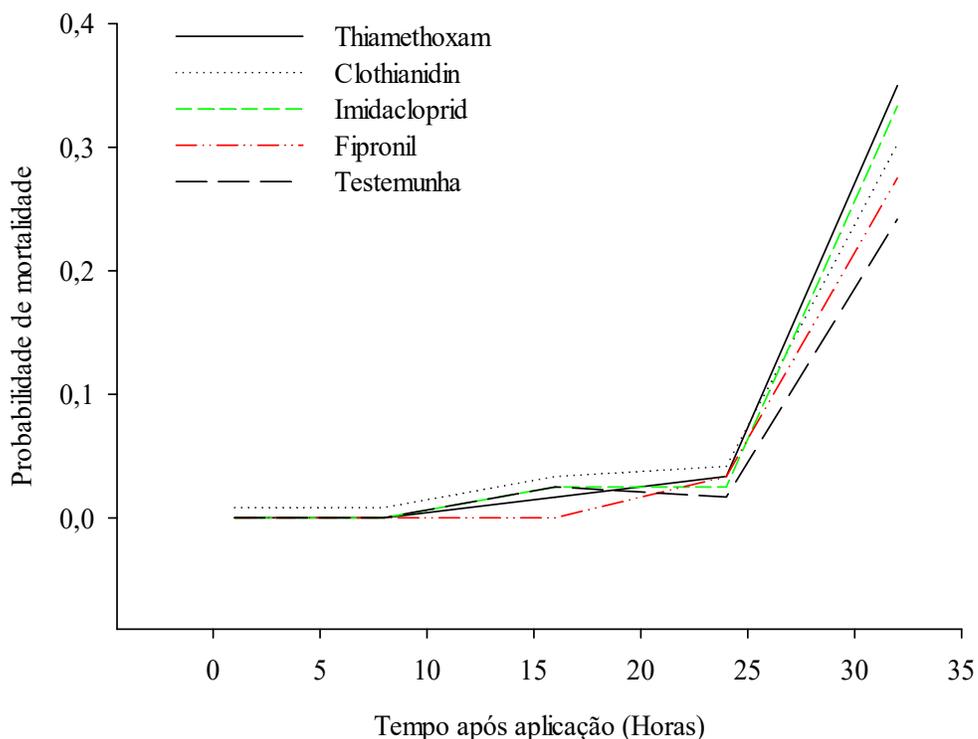
13 **RESULTADOS**

14

15 A probabilidade de mortalidade de *A. mellifera* foi similar em todos os tratamentos
16 inclusive para a testemunha, aumentando gradativamente ao longo do tempo. Às 24h após a
17 exposição ao alimento, a probabilidade de mortalidade tem um aumento repentino em todos os
18 tratamentos, e esse aumento persiste até final das avaliações igualmente para todos os
19 tratamentos, assim não houve diferença significativa entre os tratamentos, pois a probabilidade
20 de mortalidade foi semelhante para todos os tratamentos avaliados (Figura 1).

21 Às 8h os tratamentos com Imidacloprid e a testemunha não diferiram, persistindo até
22 16h e ao final das avaliações, o tratamento com Imidacloprid apresentou probabilidade de
23 mortalidade estimada acima de 0,3 (30%), a testemunha teve uma probabilidade estimada em
24 0,2 (20%). Enquanto o Fipronil se manteve em 0,0 (0%) até as 16h. Clothianidin se manteve
25 acima de todos os tratamentos até as 24h, momento em que todos tiveram uma elevação na

1 probabilidade de mortalidade. A partir desse horário, os tratamentos com Thiamethoxam e
2 Clothianidin tiveram probabilidade de mortalidade estimada mais elevada, além de 0,3 (30%)
3 ao final das avaliações (Figura 1).



4
5 **Figura 1.** Probabilidade de mortalidade ao longo do tempo de exposição de *Apis mellifera* a
6 alimentação com pasta candi mais pólen de soja, que recebeu tratamento de sementes com
7 inseticidas.

8 De acordo com as médias de mortalidade de operárias de *A. mellifera*, expostas a
9 alimentação com pólen de soja contaminado foi possível observar que não houve diferença
10 significativa entre todos os tratamentos inclusive para a testemunha, ocorrendo uma taxa de
11 mortalidade semelhante ao longo do tempo de avaliação. Apesar de que às 32h após a oferta
12 do alimento, ocorreu uma diferença significativa em relação a 24h em todos os tratamentos,
13 entretanto não houve diferença entre eles (Tabela 2).

1 Para os tratamentos Thiamethoxam, Imidacloprid e a Testemunha as 4 primeiras
2 avaliações (1h, 2h, 4h e 8h) não apresentou variabilidade não permitindo, portanto, a estimativa
3 das médias e dos ICRs, somente a partir das 16h, médias essas que não diferiram das 24h, foram
4 diferentes estatisticamente das 32h após a exposição inicial ao alimento. Enquanto para o
5 tratamento com Fipronil, apenas as médias das 24h e das 32h foram geradas e diferiram entre
6 si. No tratamento com Clothianidin foi possível estimar os ICRs para todos os horários de
7 avaliação, sendo estas significativamente iguais apenas nos primeiros horários de avaliação (1h,
8 2h, 4h, 8h, 16h e 24h) e diferindo das 32h (Tabela 2).

9 A partir dos resultados obtidos neste estudo podemos observar que em todos os
10 tratamentos existe diferença significativa as 32h após alimentação inicial com pólen de soja que
11 recebeu tratamento de sementes com inseticidas incorporado a pasta candi, em relação aos
12 demais períodos de avaliação, mas não havendo diferença em relação aos produtos dentre os
13 intervalos, sugerindo uma mortalidade igual para todos os tratamentos indicando que a ela não
14 foi motivada pelo tratamento das sementes utilizadas neste estudo, e sim pelo tempo decorrido
15 do engaiolamento das abelhas no laboratório, inclusive no tratamento testemunha.

- 1 **Tabela 2.** Médias de mortalidade para *Apis mellifera* ao longo do tempo de alimentação com pasta candi mais pólen de soja que recebeu tratamento
 2 de sementes com inseticidas.

Tratamento	Tempo (horas)						
	1	2	4	8	16	24	32
Thiamethoxam	0,00 **	0,00 **	0,00**	0,00**	1,66 Ba	3,33 Ba	35,00 Aa
Clothianidin	0,83 B	0,83 B	0,75 B	0,75 B	0,83 Ba	3,33 Ba	30,09 Aa
Imidacloprid	0,00 **	0,00 **	0,00 **	0,00 **	2,50 Ba	2,50 Ba	33,33 Aa
Fipronil	0,00 **	0,00 **	0,00 **	0,00 **	0,00 **	3,33 Ba	27,50 Aa
Testemunha	0,00 **	0,00 **	0,00 **	0,00 **	2,50 Ba	1,66 Ba	24,16 Aa

- 3 Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (dentro das linhas) e minúsculas (dentro das colunas) não diferenciam entre si devido a
 4 sobreposição dos intervalos de credibilidade (IC 95%).
 5 Médias e IC 95% foram gerados pelo modelo beta-binomial com inferência bayesiana.
 6 ** intervalos de credibilidade não gerados devido à falta de variabilidade.

1 **DISCUSSÃO**

2

3 Apesar de já ter sido relatada a presença de resíduos de produtos fitossanitários em
4 cargas de pólen coletadas por abelhas *A. mellifera* (Böhme et al., 2018), nossos resultados
5 demonstraram que a mortalidade após 32h de exposição de abelhas adultas *A. mellifera* não foi
6 influenciada pela alimentação com dieta contendo grãos de pólen de plantas de soja, que
7 receberam tratamento de sementes com os inseticidas Fipronil, Thiamethoxam, Clothianidin e
8 Imidacloprid.

9 No entanto, o inseticida Thiamethoxam é sabidamente tóxico para as abelhas melíferas
10 quando empregado por meio de pulverização, causando mortalidade e prejudicando a sua
11 capacidade de forragear em plantas (Giri et al., 2018). Este produto também pode causar déficit
12 de locomoção em abelhas melíferas, em doses subletais (abaixo da qual geralmente é
13 empregada em campo). Já o Fipronil, também em dose subletal, pode não apresentar prejuízos
14 na locomoção de abelhas, porém, este apresenta um aumento na mortalidade das mesmas após
15 72h de exposição, enquanto o tratamento testemunha se manteve estável até 120h após a
16 exposição inicial (Charreton et al., 2015).

17 Os inseticidas como os neonicotinoides Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam
18 podem causar diferentes efeitos nas abelhas em doses baixas como: hiperatividade, tremores,
19 extensão da probóscide descontrolada, lentidão ou ausência de movimentos, estes efeitos
20 podem não matar as abelhas de imediato, no entanto, atrapalham o seu o comportamento normal
21 e assim elas deixam de se alimentar mesmo quando existe uma fonte de alimento disponível
22 (Baines et al., 2017).

23 A presença de inseticidas Imidacloprid e o Thiamethoxam, é relatada em grãos de pólen
24 e no néctar de flores de algodão que receberam tratamento de sementes. Os autores calcularam
25 um coeficiente de risco de intoxicação com base na ingestão diária das abelhas operárias e

1 larvas e verificaram que a presença destes produtos nos recursos florais oferece algum risco de
2 intoxicação para as abelhas melíferas (Jiang et al., 2018).

3 No entanto, a curto prazo Souza et al., (2017) testando os neonicotinoides
4 Thiamethoxam, Imidacloprid, Clothianidin e o Fipronil na forma de tratamento de sementes de
5 algodão, onde ofereceram os grãos de pólen do algodoeiro para abelhas adultas de *A. mellifera*,
6 não observaram efeitos diferenciados na taxa de mortalidade das mesmas após exposição
7 inicial, corroborando com nossos resultados no presente estudo. É provável que as abelhas
8 estudadas não ingeriram todos os grãos de pólen presentes na dieta, mas quando no campo as
9 abelhas tem à disposição uma diversidade de fontes de recursos florais (pólen e néctar) e a
10 ingestão diária de grãos de pólen de diferentes origens pode apresentar uma grande variedade
11 de produtos que podem agir sinergicamente com os produtos fitossanitários e seus resíduos. É
12 inegável que os efeitos destes produtos são variáveis, e que mesmo em doses subletais podem
13 afetar o comportamento de forrageio das abelhas, o que pode representar um risco para a
14 colônia, já que ela depende das abelhas campeiras para coletar recursos florais para manutenção
15 e garantia da sobrevivência do grupo.

16 As abelhas, em campo, também estão expostas aos efeitos das pulverizações de produtos
17 fitossanitários que se deposita nos recursos florais, tanto de culturas circunvizinhas de cultivos
18 agrícolas como das próprias plantas cultivadas, assim elas estariam expostas não só aos resíduos
19 dos tratamentos de sementes como aos resíduos da pulverização depositados no pólen, cera, e
20 até mesmo nas próprias abelhas que estão forrageando nessas culturas no momento das
21 aplicações o que as tornam expostas a uma enorme variedade de produtos fitossanitários
22 (Stewart et al., 2014; Calatayud-Vernich et al., 2018).

23 Outra fonte de pólen contaminado são as flores de plantas silvestres, que podem servir
24 como fontes atrativas para alimentação das abelhas, porém também podem oferecer uma gama

1 de resíduos não só de inseticidas como fungicidas, que acabam sendo coletados pelas operárias
2 e transportados para a colônia (David et al., 2016).

3 Deste modo, existe uma variedade de resíduos presentes nas colônias, tanto os
4 neonicotinoides e Fipronil, como herbicidas e fungicidas, incorporados aos produtos das
5 abelhas e nos recursos coletados por elas, como o pólen, e quando as abelhas se alimentam
6 deste pólen contaminado, isto se torna uma rota de exposição e intoxicação pelos produtos
7 fitossanitários (Codling et al., 2016; Drummond et al, 2018).

8 Por outro lado, como nossos resultados demonstraram, a alimentação com dieta
9 contendo grãos de pólen de plantas de soja que receberam tratamento de sementes, não induziu
10 a mortalidade imediata de operárias de *A. mellifera*, dessa forma, no campo, as abelhas ao
11 coletarem e manusearem esses grãos de pólen contaminados, acabam levando-os para colônia
12 para servir de alimento para os outros indivíduos que a compõem, como abelhas mais jovens,
13 rainha e larvas. Portanto, estudos que avaliem esta ingestão a longo prazo e efeito sinérgico
14 destes produtos para a saúde das abelhas e da colônia como um todo são necessários para melhor
15 compreender os riscos dessa intoxicação a campo tanto das abelhas melíferas como de abelhas
16 nativas.

17

18 ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

19

20 **Andrei, E.** (2013) Compêndio de defensivos agrícolas: Guia prático de produtos fitossanitários
21 para uso agrícola. 9º Ed. rev. atual. São Paulo: Organização Andrei, 1618 p.

22 **Baines, D., Wilton, E., Pawluk, A., de Gorter, M., Chomistek, N.** (2017) Neonicotinoids act
23 like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. *Scientific Reports*
24 7 (1), 1-18.

- 1 **Blacquière, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V.** (2012) Neonicotinoids in
2 bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992.
- 3 **Blettler, D.C., Fagúndez, G.A., Caviglia, O.P.** (2018) Contribution of honeybees to soybean
4 yield. *Apidologie* 49 (1), 101–111.
- 5 **Böhme, F., Bischoff, G., Zebitz, C., Rosenkranz, P., Wallner, K.** (2018) Pesticide residue
6 survey of pollen loads collected by honeybees (*Apis mellifera*) in daily intervals at three
7 agricultural sites in South Germany. *Plos One* 13 (7), 1-21.
- 8 **Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.,**
9 **Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N.,**
10 **Tapparo, A.** (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil.
11 *Environmental Science and Pollution Research* 22 (1), 35–67.
- 12 **Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., Picó, Y.** (2018) Pesticide residues in honey
13 bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution*, 241, 106-114.
- 14 **Charreton, M., Decourtye, A., Henry, M., Rodet, G., Sandoz, J.C., Charnet, P., Collet,**
15 **C.A.** (2015) Locomotor Deficit Induced by Sublethal Doses of Pyrethroid and Neonicotinoid
16 Insecticides in the Honeybee *Apis mellifera*. *Plos One* 10 (12), 1-14.
- 17 **Codling, G., Naggara, Y.A., Giesy, J.P., Robertson, A.J.** (2016) Concentrations of
18 neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central
19 Saskatchewan, Canada. *Chemosphere* 144, 2321-2328.
- 20 **Commission Implementing Regulation (EU).** 2018/783 of 29 May 2018a. Amending
21 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
22 substance imidacloprid. *Official Journal of the European Union*, L. 132, 30.5.2018, 31-34 p.

1 **Commission Implementing Regulation** (EU). 2018/784 of 29 May 2018b. amending
2 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
3 substance clothianidin. Official Journal of the European Union, L 132, 30.5.2018, 35–39. p

4 **Commission Implementing Regulation** (EU). 2018/785 of 29 May 2018c. amending
5 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
6 substance thiamethoxam. Official Journal of the European Union, L 132, 30.5.2018, 40–44 p.

7 **David, A., Botías, C., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Rotheray, E.L., Hill, E.M., Goulson, D.**
8 (2016) Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex
9 mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environment*
10 *International* 88, 169-178.

11 **Demetrio, C.G.B., Hinde, J., Moral, R.A.** (2014) hnp: Half-Normal Plots with Simulation
12 Envelopes. [S.l.]. R package version 1.0. Disponível em: [http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=hnp)
13 [project.org/package=hnp](http://CRAN.R-project.org/package=hnp).

14 **Drummond, F.A., Ballman, E.S., Eitzer, B.D., Clos, B.D., Dill, J.** (2018) Exposure of Honey
15 Bee (*Apis mellifera* L.) Colonies to Pesticides in Pollen, A Statewide Assessment in Maine.
16 *Environmental Entomology* 20 (10), p. 1-10.

17 **Free, J.B.** (1980) A organização social das abelhas (*Apis*). São Paulo, SP: EPU, 79p.

18 **Giri, G.S., Bhatt, B., Mall, P., Pandey, R.** (2018) Effect of thiamethoxam on foraging activity
19 and mortality of *Apis mellifera* (L.). *Indian Journal of Agricultural Research* 52 (2), 215-217.

20 **Jiang, J., Ma, D., Zoua, N., Yub, X., Zhang, Z., Liu, F., Mu, W.** (2018) Concentrations of
21 imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and
22 their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere* 201, 159-167.

1 **R Studio.** (2017) Rob Thomas. Data Analysis with R Statistical Software: A Guidebook for
2 Scientists. Eco-explore. 166.

3 **Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M.,**
4 **Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D.,**
5 **Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell,**
6 **E.A., Morrissey, C.A., Nooma, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van**
7 **Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M.** (2015)
8 Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and
9 metabolites. Environmental Science and Pollution Research International 22 (1), 5-34.

10 **Souza, E.P., Degrande, P.E., Azambuja, R., Santos, R.O., Alves-Junior, V.V., Silva, R.A.,**
11 **Leal, M.F.** (2017) Pollen Toxicity from Seed-Treated Cotton on Bees and Pollen Collection
12 Capacity. Journal of Agricultural Science 9 (11), 1-8.

13 **Souza, E.P., Degrande, P.E., Azambuja, R., Silva, R.A., Alves Junior, V.V.** (2018) Toxicity
14 of Insecticide-Contaminated Soil Used in the Treatment of Cotton Seeds to Bees. Journal of
15 Agricultural Science, 10 (10), 189-196.

16 **Stewart, S.D., Lorenz, G.M., Catchot, A.L., Gore, J., Cook, D., Skinner, J., Mueller, T.C.,**
17 **Johnson, D.R., Zawislak, J., Barber, J.** (2014) Potential exposure of pollinators to
18 neonicotinoid insecticides from the use of insecticide seed treatments in the mid-southern
19 United States. Environ Science Technology 48 (16), 9762–9769.

20 **vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K.,**
21 **Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D., Pettis, J.S.**
22 (2009) Colony Collapse Disorder: A descriptive study. Plos One 4 (8), 1-17.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

CAPITULO V

Toxicidade de néctar de flores de soja (*Glycine max*) que receberam tratamento de sementes com inseticidas a *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

(De acordo com as normas do periódico “Bulletin of Entomological Research”, com adaptações para as normas de “Redação de Tese” da Universidade Federal da Grande Dourados)

1 **Toxicidade de néctar de flores de soja (*Glycine max*) que receberam tratamento de**
2 **sementes com inseticidas a *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**

3
4 **RESUMO**

5 Os riscos de intoxicação de *Apis mellifera* com produtos fitossanitários pode ocorrer de
6 diferentes maneiras, e como seus resíduos podem ser encontrados nos recursos florais das
7 plantas se faz necessários trabalhos para avaliar os potenciais de intoxicação. Portanto o
8 objetivo foi avaliara a toxicidade para abelhas adultas a partir de macerados de flores de soja
9 contendo néctar, oriundas de plantas que receberam tratamentos de sementes. O experimento
10 foi desenvolvido em delineamento casualizado com seis tratamentos e 12 repetições:
11 Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid, Fipronil, Testemunha (sem inseticida) e
12 Testemunha negativa (pasta candi). Foram selecionadas 150 flores por repetição e retirada as
13 anteras para exclusão dos grãos de pólen e depois maceradas, a essas foram incorporadas a 8g
14 de pasta candi (açúcar + água destilada). Após o preparado da dieta foram agrupadas 10 abelhas
15 por gaiolas/repetição e oferecido o alimento, logo após iniciou a avaliação da mortalidade. Para
16 análise dos dados, modelos lineares generalizados foram testados e o modelo que melhor se
17 ajustou foi o beta binomial. Os tratamentos foram contrastados dentro de cada intervalo de
18 tempo pela sobreposição dos intervalos de credibilidade através da Inferência Bayesiana. A
19 probabilidade de mortalidade de *A. mellifera* foi similar em todos os tratamentos inclusive no
20 tratamento testemunha e na testemunha negativa, aumentando gradativamente ao longo do
21 tempo de exposição. Conforme comparação das médias do modelo beta-binomial os
22 tratamentos não diferiram significativamente entre si ao longo do tempo de exposição. Assim
23 a dieta contendo macerados das flores de soja, que receberam tratamento de sementes, não
24 influenciou na mortalidade das abelhas.

25 **Palavras-chaves:** Neonicotinoides, Fipronil, DCC.

1 **INTRODUÇÃO**

2

3 Em 2018, a União Europeia proibiu o uso de alguns produtos à base de neonicotinoides
4 em campos abertos, usados na proteção de culturas (Commission Implementing Regulation,
5 2018a, b, c), enquanto no Brasil os produtos à base de Thiamethoxam, Clothianidin,
6 Imidacloprid e o Fipronil estão em processo de reavaliação pelo mesmo motivo, porém, seguem
7 sendo permitido seu uso com algumas restrições, como por exemplo, a proibição de
8 pulverizações na florada de culturas como algodoeiro e soja, em decorrência das suspeitas de
9 serem causadores da intoxicação de abelhas *A. mellifera* em campo, e por serem apontados
10 como causadores do declínio global de polinizadores (Brasil, 2012; Brasil 2014; vanEngelsdorp
11 et al., 2009; Potts et al., 2010; Pires et a., 2016). Como os modelos agrícolas entre estas duas
12 regiões são muito diferentes, estudos regionalizados são necessários para o entendimento do
13 problema.

14 Até o presente momento, no Brasil não se tem a comprovação que de o fenômeno que
15 relata o declínio de polinizadores conhecido como Desordem do Colapso das Colônias (DCC)
16 estaria ligado diretamente à utilização desses produtos. Por outro lado, existem relatos de perdas
17 de colônias sem a identificação de um único agente causador, o que vem sendo atribuído a
18 vários fatores como estiagens prolongadas, mudanças genéticas, estresse de manejo, ataque de
19 patógenos e a intoxicação a campo de abelhas melíferas e polinizadores nativos (Pires et al.,
20 2016).

21 Tais suspeitas de intoxicação são levantadas devido seus resíduos e metabólitos terem
22 sido identificados nos recursos florais como grãos de pólen e néctar de plantas cultivadas e
23 plantas silvestres (David et al., 2016; Moreno-Gonzalez et al., 2018), em gotas de gutação de
24 plântulas de milho (Tapparo et al., 2011) em produtos das abelhas como o mel (Sánchez-
25 Hernández et al., 2016) e até mesmo nas próprias abelhas próximas a plantios com sementes

1 tratadas e de massas de pólen retirado das colônias e das corbículas de abelhas coletoras
2 (Stewart et al., 2014).

3 Existem evidências de resíduos contidos no néctar de Canola que receberam tratamento
4 de sementes com inseticida Clothianidin, foram encontradas concentrações em média de 0,6 ng
5 g⁻¹ mas podendo chegar a 2,4 ng g⁻¹, abaixo do que é empregado para o tratamento de sementes
6 (Xu et al., 2016); as concentrações encontradas variam bastante de 1,769 ng g⁻¹ para
7 Imidacloprid e de 4,285 ng g⁻¹ para o Thiamethoxam, em néctar de flores de algodão que foram
8 tratados (Jiang et al., 2018). No entanto, existem relatos de doses subletais de neonicotinoides
9 prejudicando funções motoras básicas das abelhas, o que pode prejudicar o seu comportamento
10 de forrageamento em campo afetando a colônia como um todo quando estas são intoxicadas
11 por inseticidas (Williamson et al., 2014; Baines et al., 2017).

12 Muitas são as rotas de exposição de abelhas aos inseticidas empregados no campo e o
13 tratamento de sementes representa um risco para contaminação no campo, quando seus resíduos
14 são capazes de atingir as abelhas devido sua elevada toxicidade (Krupke et al., 2012). Assim
15 com base na evidência de que resíduos de produtos fitossanitários são encontrados nos recursos
16 florais de plantas que receberam tratamento de sementes, nosso estudo objetivou avaliar a
17 mortalidade de abelhas *A. mellifera* após alimentação com macerados de flores de soja,
18 contendo os nectários florais e extraflorais, oriundas de plantas cujas sementes receberam
19 tratamento de sementes com alguns neonicotinoides e Fipronil.

20

21 ***MATERIAL E MÉTODOS***

22

23 O presente estudo foi desenvolvido em casa de vegetação e no Laboratório de
24 Entomologia Aplicada, ambos situados na Universidade Federal da Grande Dourados. Para o
25 desenvolvimento do experimento foram semeadas cinco sementes da soja BMX Potencia RR

1 para cada tratamento em vasos (10L), preparados na proporção de 1:1:1 (solo, areia, substrato)
2 conforme recomendações agronômicas para a cultura. Os tratamentos com produtos
3 fitossanitários seguiram as recomendações em suas dosagens de bula/registro (Tabela 1)
4 (Andrei, 2013). A testemunha não recebeu nenhum tratamento, e para a testemunha negativa,
5 somente pasta candi foi oferecida (água destilada + açúcar de confeitiro).

6 As plantas de soja foram cultivadas em casa de vegetação, onde ocorreu a coleta diária
7 das flores durante todo período de floração, essas flores foram acondicionadas em potes
8 plásticos e mantidos refrigerados a -19 °C. Posteriormente foram selecionadas 150 flores para
9 cada repetição de cada tratamento. Dessas flores foram retiradas as anteras para exclusão dos
10 grãos de pólen, posteriormente foram maceradas e incorporada a pasta candi. Como tínhamos
11 outras estruturas junto da mistura (estigma, sépala, pétala, estilete, ovário), foi oferecido para
12 as abelhas somente a pasta candi (Testemunha negativa) para que pudéssemos ter certeza que a
13 mortalidade observada não foi causada pelas outras estruturas das flores. O delineamento
14 experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com seis tratamentos (inseticidas em teste,
15 testemunha e testemunha negativa) e 12 repetições cada, contendo 10 indivíduos por repetição,
16 totalizando 120 abelhas por tratamento.

17 Para o estabelecimento desta metodologia foi realizado um pré-teste no qual foram
18 oferecidos para as abelhas dieta contendo apenas os nectários das flores de soja, outra dieta
19 contendo macerados das flores que tiveram a antera excluída e somente pasta candi. Foi
20 observado que não houve diferença na mortalidade entre as duas dietas testadas, então se optou
21 por usar a dieta com os macerados em razão da preparação da dieta ser mais rápida evitando
22 que as flores murchassem e ocorresse a evaporação o néctar, já que a quantidade disponível na
23 flor é muito pequena.

24

1 **Tabela 1.** Lista de produtos fitossanitários utilizados no tratamento de sementes bem como suas
 2 respectivas dosagens, classe inseticida e classificação toxicológica.

Tratamento (I. a.)	Nome comercial	Dosagem	Classe	Classe toxicológica
Thiamethoxam	Cruiser® 350Fs	105g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III – Medianamente tóxico
Clothianidin	Poncho® 600Fs	60g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III – Medianamente tóxico
Imidacloprid	Provado® 200Sc	120g i.a./100kg sementes	Neonicotinoide	III – Medianamente tóxico
Fipronil	Regent® 80Wg	50g i.a./100kg sementes	Pirazol	II – Altamente tóxico
Testemunha	-	-	-	-
Testemunha negativa	-	-	-	-

3 i.a. ingrediente ativo. Fonte: Andrei, 2013. Obs.: As sementes receberam tratamento industrial
 4 em “zero dust”.

5

6 Para realização dos testes foram coletadas operárias campeiras com mais de 21 dias de
 7 idade diretamente no alvado da colmeia com os potes coletores, transportadas para o laboratório
 8 e transferidas para as gaiolas de exposição (Patente nº: BR 10 2018 010112 9) (Souza et al.,
 9 2018). Com essa idade pós-emergência elas desempenham o papel de coletoras (Free, 1980), e
 10 estão frequentemente em contato direto com plantas estando sujeitas a receberem algum tipo
 11 de aplicação de produtos fitossanitários ou de se contaminar com seus resíduos. Assim foram

1 agrupadas nas gaiolas, e para cada tratamento, oferecido o alimento de pasta candi com flores
2 maceradas incorporadas, para a avaliação da taxa de mortalidade. As avaliações iniciaram-se a
3 partir de 1 hora de exposição e posteriormente, o intervalo foi aumentando gradativamente até
4 completar 32h (1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h, 32h). Durante as avaliações foram consideradas mortas
5 as abelhas que permaneceram totalmente imóveis após estímulo com um pincel dentro da
6 gaiola.

7 *Análise dos dados*

8

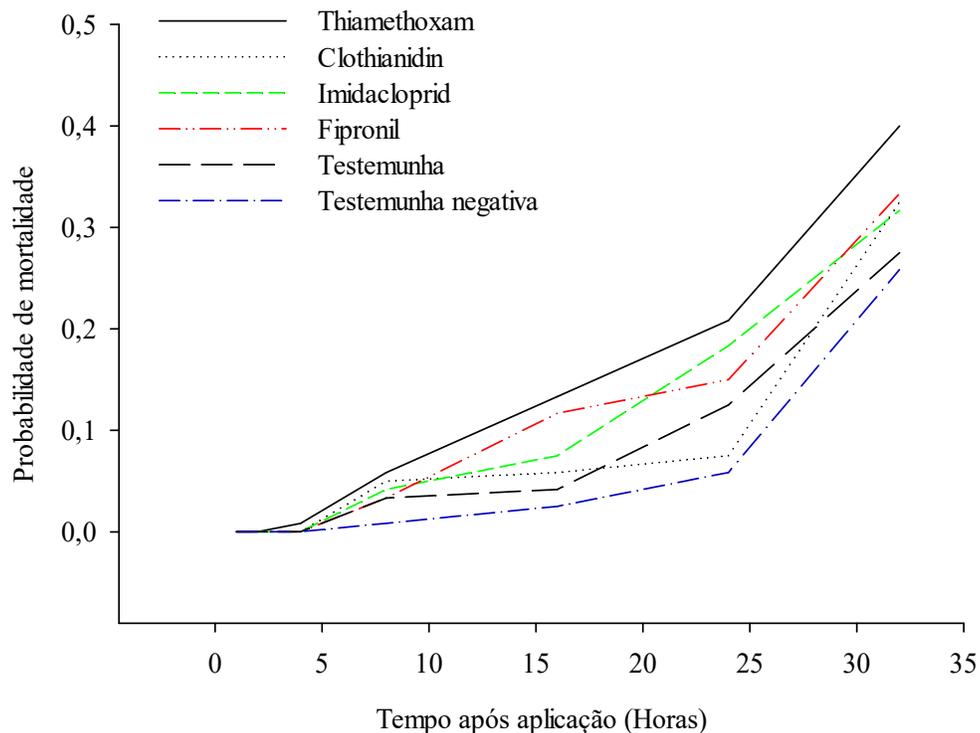
9 Para os dados de mortalidade de *A. mellifera*, modelos lineares generalizados foram
10 testados com distribuição binomial, beta binomial e quasibinomial com as funções de ligação
11 probit, cauchit e complemento log log. Todavia o modelo com distribuição do tipo beta
12 binomial foi o que melhor se ajustou aos dados de mortalidade; inseticidas e tempo de exposição
13 foram considerados como fatores na análise de deviance. A verificação da qualidade do ajuste
14 foi realizada com o gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação
15 (Demétrio et al., 2014), utilizando o pacote “hnp” do R Core Team (2017). Modelos encaixados
16 foram construídos e comparados com o pacote “lmtree” do R Core Team (2017), a escolha do
17 melhor modelo foi dada utilizando como critérios os valores de AIC e teste de razão de
18 verossimilhança.

19 Os tratamentos foram contrastados dentro de cada intervalo de tempo por diferença dos
20 intervalos de credibilidade (IC 95%). Os respectivos intervalos de credibilidade (ICR) foram
21 obtidos com a utilização de inferência bayesiana. Nas análises foram utilizadas 30 mil
22 interações com o método de Monte Carlo e Cadeias de Markov MCMC com três cadeias para
23 cada parâmetro e com *burn-in* de 5 mil amostras. Foram verificadas as convergências das
24 cadeias por meio de análise gráfica (não expostas nesse trabalho); para estimação dos
25 parâmetros utilizou-se o R Core Team (2017) com auxílio do pacote INLA.

1 **RESULTADOS**

2

3 A probabilidade de mortalidade de *A. mellifera* foi similar em todos os tratamentos
4 inclusive na testemunha e na testemunha negativa, aumentando gradativamente ao longo do
5 tempo de exposição. 24h após a exposição das abelhas ao alimento a probabilidade de
6 mortalidade na maioria dos tratamentos apresenta um pico em relação aos outros horários de
7 avaliação, e esse aumento persiste igualmente para todos os tratamentos até final da exposição.
8 Assim foi possível observar que não houve diferença na probabilidade de mortalidade ao longo
9 do tempo de exposição nos tratamentos propostos, pois a curva de mortalidade aumentou
10 gradativamente em todos eles ao longo do tempo (Figura 1).



11

12 **Figura 1.** Probabilidade de mortalidade ao longo do tempo de exposição de *A. mellifera* à
13 alimentação com pasta candi e macerados de flores de soja incorporados, cujas sementes
14 receberam tratamentos com inseticidas.

1 Contudo, é possível observar que o Thiamethoxam é o tratamento que tem a maior
2 probabilidade absoluta de mortalidade desde início das avaliações, chegando ao final do
3 período, com uma probabilidade estimada de 0,4 (40%) e manteve a probabilidade de
4 mortalidade maior, em relação a todos os tratamentos, porém, sem diferenças estatísticas
5 significativas com os demais tratamentos. A testemunha negativa foi o tratamento com a menor
6 probabilidade de mortalidade estimada até às 24h, e manteve abaixo de 0,1 (10%). Ao final das
7 avaliações às 32h, a probabilidade estimada permaneceu acima de 0,2 (20%) (Figura 1).

8 Também é possível observar que entre as primeiras horas de avaliação até às 8h, as
9 curvas de mortalidade dos tratamentos Fipronil e testemunha se sobrepõem, indicando um
10 padrão semelhante no efeito sobre a mortalidade das abelhas, e logo após esse período elas se
11 distanciam, porém, a partir das 16h, a testemunha começa a ter um aumento na probabilidade
12 de mortalidade estimada que persiste até ao final das avaliações. Contudo, o Fipronil tem a
13 maior probabilidade absoluta de mortalidade estimada acima de 0,3 (30%) enquanto a
14 testemunha está acima de 0,2 (20%). O tratamento com Clothianidin apresentou uma
15 probabilidade de mortalidade absoluta nas primeiras horas de avaliação abaixo de 0,1 (10%)
16 que persistiu até às 24h, e a partir daí aumentou repentinamente alcançando uma probabilidade
17 absoluta de mortalidade de 0,3 (30%). Enquanto que o tratamento com Imidacloprid se manteve
18 abaixo de 0,1 (10%) somente até às 16h e o risco da mortalidade estimada também de 0,3 (30%).

19 De acordo com as médias do modelo beta-binomial os tratamentos não diferiram
20 significativamente entre si ao longo do tempo de exposição ao alimento inclusive a testemunha
21 negativa, desta forma, é possível observar que ocorreu uma mortalidade natural ao longo do
22 tempo. Ainda que às 32h após exposição inicial, todos os tratamentos apresentaram diferença
23 estatística entre as médias das 24h, mas não entre os tratamentos (Tabela 2).

24 O tratamento com Clothianidin foi o que mais variou, nas primeiras horas de avaliação
25 (1h, 2h e 4h), os intervalos de credibilidade (IC) não foram gerados em razão da falta de

1 variabilidade das médias, o que também foi possível observar para Imidacloprid, Fipronil,
2 Testemunha e a Testemunha negativa. No entanto, com Clothianidin houve diferenças
3 significativas entre os ICs das 16h, 24h e 32h após a exposição inicial. Já para as médias do
4 tratamento com Imidacloprid não houve diferença significativa em nenhum dos horários de
5 avaliação. Para o tratamento com Thiamethoxam, Fipronil, Testemunha e Testemunha negativa
6 a única diferença entre os horários ocorreu às 32h, enquanto que para o tratamento com
7 Thiamethoxam as médias das duas primeiras horas não foram geradas devido à falta de
8 variabilidade (Tabela 2).

1 **Tabela 2.** Médias da mortalidade de *Apis mellifera* ao longo do tempo de alimentação com extrato de flores de soja que receberam tratamento de
 2 sementes com inseticidas, incorporado à pasta candi.

Tratamento	Tempo (horas)						
	1h	2h	4h	8h	16h	24h	32h
Thiamethoxam	0.00**	0.00**	0,83A	5,83Aa	13,33Aa	20,83Aa	40,00Ba
Clothianidin	0.00**	0.00**	0.00**	5,00Aa	5,83Aa	7,50Ba	32,50Ca
Imidacloprid	0.00**	0.00**	0.00**	4,16Aa	7,50Aa	18,33Aa	31,66Aa
Fipronil	0.00**	0.00**	0.00**	3,33Aa	11,66 Aa	15,00Aa	33,33Ba
Testemunha	0.00**	0.00**	0.00**	3,33Aa	4,16Aa	12,50Aa	27,50Ba
Testemunha negativa	0.00**	0.00**	0.00**	0,83Aa	2,50Aa	5,83Aa	25,83Ba

3 Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (dentro das linhas) e minúsculas (dentro das colunas) não diferenciam entre si devido à
 4 sobreposição dos intervalos de credibilidade (IC 95%).

5 Médias e IC 95% foram geradas pelo modelo beta-binomial com inferência bayesiana.

6 ** Intervalos de Credibilidade não gerados devido à falta de variabilidade.

1 **DISCUSSÃO**

2

3 Com os nossos resultados é possível observar que a exposição das abelhas adultas de *A.*
4 *mellifera* à dieta contendo macerado das flores de soja não influenciou na mortalidade das
5 abelhas, mesmo quando essas plantas receberam tratamento de sementes com o Fipronil e os
6 neonicotinoides Thiamethoxam, Clothianidin e Imidacloprid. E não houve diferenças até
7 mesmo entre a testemunha negativa que continha apenas pasta candi, confirmando que as outras
8 estruturas da flor não influenciaram a mortalidade. A não influência dos produtos fitossanitários
9 na taxa de mortalidade das abelhas, pode ter sido em decorrência da ação sistêmica desses
10 produtos, já que quando aplicados em tratamento de sementes o produto é absorvido e
11 translocado para todas as partes da planta (Simon-Delso et al., 2015), então é provável que a
12 quantidade do resíduo do produto que chega até as flores e conseqüentemente ao néctar estaria
13 em concentrações baixas que não ocasionou a intoxicação aguda das abelhas.

14 Conforme observado em outros estudos, o inseticida Imidacloprid pode ser tóxico para
15 diferentes estágios de desenvolvimento de abelhas melíferas, desde a fase larval até os adultos
16 (Dai et al., 2017). Ele também é relatado prejudicando a fecundidade de rainhas, o que tem um
17 impacto direto na manutenção das colônias, pois pode diminuir quantitativamente os indivíduos
18 produzidos pela colônia (Wu-Smart e Spivak, 2016). Seus resíduos encontrados no néctar são
19 capazes de influenciar negativamente o comportamento de forrageamento de abelhas, mesmo
20 não causando mortalidade aguda, o que também influencia diretamente na sobrevivência das
21 abelhas (Gill et al., 2012). Apesar de não ser observada a mortalidade das abelhas quando
22 expostas a dieta, os resíduos contidos nos recursos florais podem representar risco para a
23 colônia como um todo a longo prazo, quando os recursos florais vão se acumulando e por sua
24 vez, os resíduos dos inseticidas.

1 O Imidacloprid é considerado tóxico para abelhas até mesmo em dose subletais, assim
2 como o Fipronil e prejudicam funções motoras básicas como a capacidade de se locomover, o
3 que interfere diretamente na sua capacidade de coletar recursos, no entanto, sua toxicidade pode
4 ser maior por contato do que por ingestão (Bovi et al., 2018), assim as pulverizações podem ser
5 mais danosas do que o tratamento de sementes, corroborando os nossos resultados.

6 O inseticida Fipronil em dose subletais pode afetar a mortalidade de abelhas melíferas
7 que estão infectadas com *Nosema ceranae* (Dissociodihaplophasida: Nosematidae) sugerindo
8 assim que a exposição ao inseticida pode deixar as abelhas mais susceptíveis ao ataque de
9 patógenos, logo uma alimentação contaminada seria um risco para as abelhas (Vidau et al.,
10 2011). O inseticida Clothianidin também é relatado causando efeitos subletais em abelhas,
11 afetando sua resposta imune, comprometendo a imunidade do inseto e favorecendo a atividade
12 viral do vírus da asa deformada (Di Prisco et al., 2013). Então como observado em nosso
13 trabalho, o alimento contendo resíduos de produtos fitossanitários pode não levar as abelhas a
14 morte imediata, mas pode estar colaborando para que a imunidade do inseto seja comprometida
15 favorecendo a proliferação de patógenos como observado por Vidau et al. (2011) e Di Prisco et
16 al. (2013), o que precisa ser melhor avaliado.

17 Thiamethoxam é sabidamente tóxico para as abelhas melíferas e nativas (Baines et al.,
18 2017), da mesma maneira que o Clothianidin e Imidacloprid afetam o desenvolvimento de
19 colônias (Wood et al., 2018) e a termorregulação de *A. mellifera* influenciando na sua atividade
20 de forrageio (Tosi et al., 2017). Souza et al. (2017), em estudos de alimentação com pólen de
21 algodão contaminado, não observaram a mortalidade aguda de abelhas melíferas após 32h de
22 exposição e verificaram que as abelhas não estavam efetivamente coletando pólen na cultura,
23 apenas néctar evidenciando a necessidade de testar a toxicidade desse recurso floral quando
24 estes são contaminados com produtos fitossanitários.

1 Baseado nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que apenas para o
2 tratamento com Imidacloprid não existe diferença significativa entre todos os horários de
3 avaliação após a alimentação inicial com o macerado de flores de soja que receberam tratamento
4 de sementes com inseticidas, em relação aos demais períodos de avaliação, mas não ocorrendo
5 diferença em relação aos produtos. E mesmo para a Testemunha negativa que continha apenas
6 pasta candi, a mortalidade observada não diferiu do demais tratamentos, sugerindo que a taxa
7 de mortalidade das abelhas *A. mellifera* não foi influenciada pelo tratamento de sementes a
8 partir da exposição de macerados de flores de soja contendo os macerados de flores estaminadas
9 da planta.

10 Uma vez que ao se alimentar dos recursos contaminados, não houve um aumento
11 significativo na mortalidade das abelhas adultas em relação aos inseticidas e a testemunha, a
12 presença ou não dos resíduos torna-se apenas mais um fator a ser avaliado. Portanto é preciso
13 identificar a nível de campo quais recursos as abelhas estão coletando nas culturas agrícolas,
14 bem como a frequência das coletas, pois mesmo que os resíduos sejam encontrados em recursos
15 florais de plantas cultivadas e plantas circunvizinhas às culturas tratadas, e mesmo que elas se
16 alimentem deles é importante observar quanto desse alimento ela carrega para a colônia, pois
17 diferentes efeitos são observados no comportamento das abelhas o que pode comprometer o
18 desenvolvimento da colônia.

19

20 ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

21 **Andrei, E.** (2013) Compêndio de defensivos agrícolas: Guia prático de produtos fitossanitários
22 para uso agrícola. 9º Ed. rev. atual. São Paulo: Organização Andrei, 1618 p.

1 **Baines, D., Wilton, E., Pawluk, A., Gorter, M., Chomistek, N.** (2017) Neonicotinoids act
2 like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. *Scientific Reports*,
3 7(1), 1-18.

4 **Bovi, T.S., Zaluski, R., Orsi, R.O.** (2018) Toxicity and motor changes in Africanized honey
5 bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. *Anais da Academia Brasileira de*
6 *Ciências*, 90 (1), 239-245.

7 **Brasil.** (2012) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis –
8 IBAMA. Instrução Normativa Conjunta nº 1, de 28 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a
9 aplicação dos ingredientes ativos Imidacloprido, Clotianidina, Tiametoxam e Fipronil. *Diário*
10 *Oficial da União*, nº 3, Brasília-DF.

11 **Brasil.** (2014) Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis –
12 IBAMA. Instrução Normativa Conjunta nº 01, de 31 de dezembro de 2014. Estabelece
13 condições para a aplicação dos ingredientes ativos Imidacloprido, Clotianidina, Tiametoxam e
14 Fipronil na cultura do algodão em conformidade com a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 e a
15 Instrução Normativa Conjunta MAPA/IBAMA nº 01, de 28 de dezembro de 2012. *Diário*
16 *Oficial da União*, nº 6, Brasília-DF.

17 **Commission Implementing Regulation (EU).** 2018/783 of 29 May 2018a. Amending
18 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
19 substance imidacloprid. *Official Journal of the European Union*, L. 132, 30.5.2018, 31-34 p.

20 **Commission Implementing Regulation (EU).** 2018/784 of 29 May 2018b. amending
21 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
22 substance clothianidin. *Official Journal of the European Union*, L 132, 30.5.2018, 35–39 p.

- 1 **Commission Implementing Regulation** (EU). 2018/785 of 29 May 2018c. amending
2 Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active
3 substance thiamethoxam. Official Journal of the European Union, L 132, 30.5.2018, 40–44 p.
- 4 **Dai, P., Jack, C.J., Mortensen, A.N., Ellis, J.D.** (2017) Acute toxicity of five pesticides to
5 *Apis mellifera* larvae reared in vitro. *Pest Management Science*, 73 (11), 2282-2286.
- 6 **David, A., Botías, C., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Rotheray, E.L., Hill, E.M., Goulson, D.**
7 (2016) Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex
8 mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environment*
9 *International*, 88,169-178.
- 10 **Demétrio, C.G.B., Hinde, J., Moral, R.A.** (2014) hnp: Half-Normal Plots with Simulation
11 Envelopes. [S.l.]. R package version 1.0. Disponível em: [http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=hnp)
12 [project.org/package=hnp](http://CRAN.R-project.org/package=hnp).
- 13 **Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo,**
14 **G., Pennacchio, F.** (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and
15 promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy*
16 *of Sciences of the United States of America*, 110 (46), 18466–18471.
- 17 **Free, J. B.** (1980) A organização social das abelhas (*Apis*). São Paulo, SP: EPU, 79p.
- 18 **Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., Raine, N.E.** (2012) Combined pesticide exposure severely
19 affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491 (7422), 105-8.
- 20 **Jiang, J., Ma, D., Zoua, N., Yub, X., Zhang, Z., Liu, F., Mu, W.** (2018) Concentrations of
21 imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and
22 their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.). *Chemosphere*, 201, 159-167.

- 1 **Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K.** (2012) Multiple routes of
2 pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *Plos One*, 7 (1), 1-8.
- 3 **Moreno-Gonzalez, D., Alcantara-Duran, J., Gilbert-Lopez, B., Beneito-Cambra, M.,**
4 **Cutillas, V.M., Rajski, L., Molina-Diaz, A., Garcia -Reyes, J.F.** (2018) Sensitive Detection
5 of Neonicotinoid Insecticides and Other Selected Pesticides in Pollen and Nectar Using
6 Nanoflow Liquid Chromatography Orbitrap Tandem Mass Spectrometry. *Journal of AOAC*
7 *International*, 101 (2), 367-373.
- 8 **Pires, C.S.S., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., Pettis, J.S.,**
9 **Teixeira, E.W.** (2016) Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de
10 CCD? *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51 (5), 422-442.
- 11 **Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E.** 2010.
12 Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25
13 (6), 342-353.
- 14 **R Studio.** (2017) Rob Thomas. *Data Analysis with R Statistical Software: A Guidebook for*
15 *Scientists*. Eco-explore. 166.
- 16 **Sánchez-Hernández, L., Hernández-Domínguez, D., Martín, M.T., Nozal, M.J., Higes, M.,**
17 **Yagüea, J.L.B.** (2016) Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen
18 from sunflower and maize seed dressing crops. *Journal of Chromatography A*, 1428, 220-227.
- 19 **Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M.,**
20 **Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D.,**
21 **Kreutzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell,**
22 **E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van**

1 **Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M.** (2015)
2 Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and
3 metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (1), 5-34.

4 **Souza, E.P., Degrande, P.E., Azambuja, R., Santos, R.O., Alves-Junior, V.V., Silva, R.A.,**
5 **Leal, M.F.** (2017) Pollen Toxicity from Seed-Treated Cotton on Bees and Pollen Collection
6 Capacity. *Journal of Agricultural Science*, 9 (11), 1-8.

7 **Souza, E.P., Degrande, P.E., Azambuja, R., Silva, R.A., Alves Junior, V.V.** (2018) Toxicity
8 of Insecticide-Contaminated Soil Used in the Treatment of Cotton Seeds to Bees. *Journal of*
9 *Agricultural Science*, 10 (10), 189-196.

10 **Stewart, S.D., Lorenz, G.M., Catchot, A.L., Gore, J., Cook, D., Skinner, J., Mueller, T.C.,**
11 **Johnson, D.R., Zawislak, J., Barber, J.** (2014) Potential exposure of pollinators to
12 neonicotinoid insecticides from the use of insecticide seed treatments in the mid-southern
13 United States. *Environ Science Technology* 48 (16), 9762–9769.

14 **Tapparo, A., Giorio, C., Marzaro, M., Marton, D., Soldà, L., Girolami, V.** (2011) Rapid
15 analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated
16 seeds. *Jounal Environmental Monitoring*, 13 (6),1564-1568.

17 **Tosi, S., Burgio, G., Nieh, J.C.** (2017) A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam,
18 impairs honey bee flight ability. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.

19 **vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K.,**
20 **Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D., Pettis, J.S.**
21 (2009) Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *Plos One*, 4 (8), 1-17.

- 1 **Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J-L., Texier, C.,**
2 **Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L.P., Delbac, F.** (2011). Exposure to
3 Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees
4 Previously Infected by *Nosema ceranae*. *Plos One*, v. 6, n. 6: e21550. p. 1-8, 2011.
- 5 **Williamson, S.M., Willis, S.J., Wright, G.A.** (2014) Exposure to neonicotinoids influences
6 the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology*, 23 (8), 1409-1418.
- 7 **Wood, S.C., Kozii, I.V., Koziy, R.V., Epp, T., Simko, E.** (2018). Comparative chronic
8 toxicity of three neonicotinoids on New Zealand packaged honey bees. *Plos One* 13(1), 1-19.
- 9 **Wu-Smart, J. & Spivak, M.** (2016) Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide
10 exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports*, 6 (32108),
11 1-11.
- 12 **Xu, T., Dyer, D.G., McConnell, L.L., Bondarenko, S., Allen, R., Heinemann, O.** (2016)
13 Clothianidin in agricultural soils and uptake into corn pollen and canola nectar after multiyear
14 seed treatment applications. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35 (2), 311-21.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

1 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 A exposição ao solo oriundo da semeadura da soja que recebeu tratamento de sementes,
4 em “zero dust” com os neonicotinoides Thiamethoxam, Clothianidin e Imidacloprid e o Fipronil
5 não ofereceram risco de mortalidade aguda para operárias de *A. mellifera*. Quanto a alimentação
6 com dieta contendo recursos florais (pólen e néctar) de flores de soja que receberam tratamento
7 de sementes com os mesmos produtos fitossanitários também não houve influência na
8 mortalidade imediata das abelhas adulta. Porém, o efeito a longo prazo deve ser melhor
9 estudado pois as abelhas manuseiam esses recursos florais em campo e podem carregar eles
10 para a colônia o que pode representar um risco, já que eles agem no sistema nervoso central do
11 inseto. Assim, novos estudos que avaliem esta ingestão a longo prazo e a sua influência para a
12 saúde das abelhas e da colônia são necessários para compreender quais os riscos dessa
13 alimentação a campo.

14 Quanto a dinâmica temporal das abelhas em um cultivo de soja de ciclo indeterminado
15 foi possível observar que o horário e o DAE em que a soja se encontrava influenciaram,
16 isoladamente, e que no início do florescimento a sua frequência é mais intensa. Os horários com
17 maior visitação foram das 11h às 13h, deste modo, a utilização de produtos fitossanitários nestes
18 horários e nos primeiros dias da floração da cultura onde a visitação das abelhas é mais intensa
19 deve ser evitada, preferindo a utilização desses produtos após os 75 DAE de uma cultura de
20 ciclo indeterminado, afim de evitar a contaminação das abelhas em campo.

21