

LEONARDO TELLEZ GUIO

ISCAS FORMICIDAS COM FIPRONIL E SULFLURAMIDA
E *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

T275i
2017
Téllez Guio, Leonardo, 1975-
Iscas formicidas com fipronil e sulfluramida e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) / Leonardo Téllez Guio. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 28f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Cola Zanúncio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelhas. 2. Iscas. 3. Toxicologia. 4. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22 ed. 595.799

LEONARDO TELLEZ GUIO

ISCAS FORMICIDAS COM FIPRONIL E SULFLURAMIDA
E *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 fevereiro de 2017.



Ricardo Henrique Silva Santos



Weyder Cristiano Santana
(Coorientador)



Ricardo Alcántara de la Cruz



José Cola Zanuncio
(Orientador)

*A meus irmãos Patrícia e Herson,
pelo apoio, estando fora de casa*

Agradeço

*A meus sobrinhos Andrés e Raky,
força e motivo para
alcançar meus objetivos*

*A meu pai por superar adversidades
de saúde e esperar meu regresso*

Ofereço

*A minha mãe exemplo de amor, dedicação e
trabalho (in memoriam)*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força interior e saúde

Ao Departamento de Fitotecnia, ao Laboratório de Controle Biológico de Insetos e ao Apiário do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Ao Professor José Cola Zanuncio, por aceitar a orientação de meu mestrado e apoio constante na escrita do trabalho de pesquisa. Ao professor Weyder Cristiano Santana a quem admiro e respeito, por sua confiança, valiosos ensinamentos e ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Insetos: Barbara, Bruno, Isabel, Francisco, Gabriela, Rafael, Ricardo, Tonny, Valdeir, Wagner, e em especial a Angelica Plata e Juliana Mendonça pela amizade, colaboração e apoio durante o tempo do mestrado e a realização desta pesquisa.

Ao grupo corujão do Restaurante Universitário, pela oportunidade de trabalho voluntário, de apoio alimentar durante o tempo de estudos.

Aos funcionários do Apiário e aos colegas da Entomologia Alejandra, Amália, Laura e Luis Carlos e da Fitotecnia Eduardo, Ina, Tiago entre outros tantos, pela amizade e ajuda durante o tempo de estudos.

A todos os professores e amigos, que alguma forma, direta ou indireta, tenha participado desse trabalho, ou me ajudaram durante o período de estudo.

Ao grupo de capoeira Cordão de Ouro Mt. Vitinho, Vermelho, Sandrinha, Dogui, Fernandinha, Matheus e a galera toda, pela amizade e me permitir conhecer a magia dessa arte da cultural brasileira.

A Bruno e a Fusca da república, pelo agradável convívio durante os estudos.

A Luís Alejandro, familiares e amigos e a quem, de uma ou outra me ajudaram a superar as dificuldades e a permanecer e estudar longe de casa.

Muito obrigado a todos !!!

BIOGRAFIA

LEONARDO TÉLLEZ GUIO, filho de Vitalina Guio Corrales (falecida) e Segundo Laurentino Téllez Avila, nasceu em Bogotá, Colômbia, em abril de 1975. Em agosto de 1997, ingressou no curso de Agronomia na “Universidad Nacional de Colombia – Bogotá”, graduando em 2005. Em 2004 ingressou como estagiário na empresa Minagro Indústria Química Ltda e, após poucos meses, foi contratado como assessor externo no departamento de pesquisa, coordenando testes de eficácia, procedimentos de desenvolvimento e registro e venda de produtos e elaborando estudos de risco e plano de manejo ambiental de praguicidas, entre outras atividades por mais de 10 anos. Tem experiência profissional em extensão rural: engenheiro residente na unidade local de assistência técnica agrícola e pecuária, Usme, Bogotá; como coordenador técnico do projeto “Bioinsumos Fontagro” na produção sustentável de hortaliças com pequenos agricultores, para a “Corporacion PBA”; como assessor técnico externo no manejo de pragas em cultivos agroflorestais, em Nuqui, Choco, para a corporação “Swissaid - Colombia”, entre outros trabalhos no manejo de pragas e fertilização de plantios. Em março de 2015, iniciou o curso de mestrado em Fitotecnia na área de manejo pragas, doenças e impacto ambiental no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), submetendo-se a defesa de tese em fevereiro de 2017.

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BOD	Incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio ou microbiologia com temperatura controlada
GluCls	Canal íon cloro glutamato
DL	Doses letal
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)
FSC	Forest Stewardship Council (Conselho de Manejo Florestal)
g	grama
GABA	Gamma ácido aminobúterico
°C	grau Celsius
h	horas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IA	Ingrediente ativo
kg	kilograma
µL	micro litro
µg	micro grama
min	minutos
mg	mili grama
mL	mili Litro
ng	nano grama
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico)
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
ppt	Parte por trilhão
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
%	Porcentagem

UNEP/POPS/POPRC	Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Review Committee.(Convenção de Estocolmo de Poluentes Orgânicos Persistentes. Comitê de revisão).
PFOs	Sulfonato de perfluorooctano
TL	Tempo letal
TCHD	Thurston County Health Department (Departamento de Saúde do Condado de Thurston)
TOXNET	Toxicology Data Network (Rede de Dados de Toxicologia)
UR	Umidade relativa

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E METODOS	3
2.1 Material biológico	3
2.2 Condições experimentais	3
2.3 Iscas inseticidas	3
2.4 Toxicidade potencial das iscas	3
2.4.1 Experimento 1: Iscas formicidas são tóxicas por ingestão a abelhas?	3
2.4.2 Experimento 2: Iscas formicidas são tóxicas por contato a abelhas?	4
2.4.3 Experimento 3: Voláteis das iscas formicidas são tóxicos as abelhas?	5
2.4.4 Procedimento experimental	6
2.5 Experimento 4: Iscas formicidas podem atrair abelhas?	6
2.5.1 Iscas formicidas colocadas junto ao xarope	6
2.5.2 Iscas colocadas no nível do solo	7
2.5.3 Registro da atividade	8
2.6 Análises de dados	8
3. RESULTADOS	9
3.1 Toxicidade por ingestão das iscas formicidas em abelhas	9
3.2.1 Toxicidade por contato direto das iscas formicidas em abelhas	10
3.2.2 Toxicidade por contato dos voláteis das iscas formicidas em abelhas	12
3.3.1 Atração das iscas formicidas colocadas no campo junto ao xarope	13
3.3.2 Atração de iscas dispostos no solo	14
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÕES	19
6. REFERÊNCIAS	19

RESUMO

TELLEZ, Guio Leonardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017, **Iscas formicidas com fipronil e sulfluramida e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Orientador: José Cola Zanuncio. Coorientadores: Rosa Angelica Plata Rueda e Weyder Cristiano Santana.

Iscas atrativas com os ingredientes ativos fipronil e sulfluramida são utilizadas no controle de formigas cortadeiras e substâncias alimentícias nestas iscas podem atrair e expor abelhas a esses tóxicos, o que pode alterar o comportamento e reduzir a sobrevivência desses insetos. O objetivo foi determinar a toxicidade e atração das iscas a *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Operárias dessa abelha foram expostas, por ingestão de solução de açúcar 50% (xarope) com fipronil ou sulfluramida quanto por contato direto e inalação dos voláteis das iscas formicidas tendo cada unidade experimental 10 abelhas/pote. A mortalidade foi registrada após um, dois, quatro, seis, 12, 24 e 48 horas nos tratamentos e nos controles: xarope e atraentes da isca sem ativo. Cinco gramas das iscas foram disponibilizadas no campo às abelhas em pratos plásticos junto com o xarope (alimento com 30% de açúcar) ao nível do solo. O número de abelhas que pousaram sobre as iscas, foi registrado a cada 30min em seis observações por dia e comparado com o daquelas atraídas no controle (mel à 50%). A sobrevivência de forrageiras de *A. mellifera* foi menor com as concentrações da isca fipronil com DL₅₀ oral 48 h de $54,5 \pm 12,9$ µg isca/abelha. Abelhas expostas por ingestão da solução com a isca formicida sulfluramida tiveram sobrevivência semelhante a do controle. A mortalidade de abelhas após 48 h de contato direto com as iscas foi >86,0%, com efeito letal dos voláteis da isca com sulfluramida (contato ou inalação), maior que o controle. O número de abelhas forrageiras que posou sobre as iscas formicidas com fipronil e sulfluramida oscilou entre 11,0 e 0,0, menor que daquelas atraídas no controle (mel à 50%) 143,0 a 114,3. Iscas formicidas com fipronil e sulfluramida são “perigosos e pouco perigosos” respectivamente, para *A. mellifera* por ingestão. Tem potencial tóxico por contato direto e com os voláteis da isca com sulfluramida, mas no campo não foram atraentes as abelhas.

ABSTRACT

TELLEZ, Guio Leonardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Formicidas baits with fipronil and sulfluramide and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Adviser: José Cola Zanuncio. Co-advisers: Rosa Angelica Plata Rueda and Weyder Cristiano Santana.

Attractive baits with the active ingredients fipronil and sulfluramide are used in the control of leaf cutting ants and food substances in these baits can attract and expose bees to these toxins, which can alter the behavior and reduce the survival of these insects. The objective was to determine the toxicity and attraction of the baits to *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Operators of this bee were exposed by ingestion of 50% sugar solution (syrup) with fipronil or sulfluramide and by direct contact and inhalation of the volatiles of the formicidal baits with each experimental unit 10 bees/pot. The mortality was registered after one, two, four, six, 12, 24 and 48 hours in the treatments and in the controls: syrup and attractive of the bait without assets. Five grams of the baits were made available in the field to the bees in plastic plates with the syrup (feed with 30% of the her sugar) at the level of the soil. The number of bees that landed on the baits was recorded every 30 minutes in six observations per day and compared to those attracted to the control (honey at 50%). The survival of forages of *A. mellifera* was lower with the concentrations of fipronil bait with oral LD₅₀ 48 h of 54.5 ± 12.9 µg bait/bee. Bees exposed by ingestion of the solution with the formicidal sulfluramide bait had similar survival to that of the control. The mortality of bees after 48 hours of direct contact with the baits was >86.0%, with a lethal effect of the volatiles of the bait with sulfluramide (contact or inhalation), greater than the control. The number of forage bees that posed on the baits formulated with fipronil and sulfluramide oscillated between 11.0 and 0.0, lower than those attracted in the control (honey at 50%) 143.0 to 114.3. Baits formicidal with fipronil and sulfluramida are “dangerous and little dangerous” respectively, for *A. mellifera* by ingestion. It has toxic potential by direct contact and with the volatiles of the bait with sulfluramida, but in the field the bees were not attractive.

INTRODUÇÃO

Iscas atraentes com os ingredientes ativos fipronil e sulfluramida são utilizadas no controle de formigas cortadeiras (Zanetti et al 2003a, Reis et al 2015), por sua efetividade, facilidade de aplicação, menor custo operacional e risco ambiental, quando comparada a inseticidas termonebulizáveis (Nagamoto et al 2004, Zanetti et al 2008, Bollazzi et al 2014). Estes compostos tóxicos podem alterar o comportamento e reduzir a sobrevivência de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) com impactos negativos em áreas de produção e na economia mundial (vanEngelsdorp et al 2009, Carrillo et al 2013).

A polinização é fundamental para a conservação das mais variadas espécies vegetais (Ricketts et al 2008). Três de cada quatro espécies cultiváveis dependem de agentes polinizadores (água, vento, animais, etc), sendo as abelhas os principais polinizadores (Klein et al 2007). *Apis mellifera*, espécie generalista introduzida nas Américas com excelente adaptação (Boff et al 2013), é utilizada em serviços de polinização com aumento dos rendimentos e qualidade das colheitas (Bartomeus et al 2014), além de produção de mel, pólen, cera e geleia real (Wiese 2005).

Praguicidas podem afetar abelhas durante o forrageio das mesmas nos agroecossistemas e contaminarem o mel, pólen, própolis e geleia real (Bogdanov 2006). Estas substâncias estão associadas ao desaparecimento das abelhas ou Distúrbio de Colapso das Colônias “DCC” (Kiljanek et al 2016), conjuntamente com doenças e ectoparasitos (Naggar et al 2016), perda de diversidade genética, redução, fragmentação do hábitat das abelhas e mudança climática (Potts et al 2010, Bates et al 2014).

Sustâncias tóxicas podem afetar abelhas por contato ou inalação, diretamente, durante o vôo ou quando estes insetos caminham sobre plantas e superfícies do solo tratadas, especialmente com praguicidas aplicados via pulverização (Silva et al 2015). Além disso, podem sofrer impacto direto pela ingestão de pólen, néctar ou exsudados de plantas cultivadas e da vegetação próxima onde praguicidas sistêmicos foram aplicados (Sanchez-Bayo & Goka 2014). O consumo de água superficial contaminada, utilizada para manter a temperatura da colônia durante o verão e no inverno solubilizar o mel cristalizado, pode, também, afetar abelhas (Nicolson 2009).

Iscas formicidas são aplicadas no solo próximo às trilhas e entrada dos ninhos de formigas cortadeiras, para ser carregadas e distribuídas uniformemente dentro dos mesmos, contaminando os indivíduos da colônia por contato e ingestão do ativo tóxico (Laranjeiro & Zanuncio 1995, Gandra et al 2016). No entanto, iscas não carregadas pelas formigas ou aplicadas em dias chuvosos podem se dissolver na água e gerar resíduos tóxicos a abelhas (Zanetti et al 2014).

O ingrediente ativo utilizado nas iscas fipronil (fenilpirazol), tem ação sistêmica na planta e é altamente tóxico por ingestão e contato para abelhas (DL₅₀ 48 h de 4,2 e 5,93 ng/abelha, respectivamente) (Li et al 2010, Bonmatin et al 2015). Esse composto age em receptores específicos do sistema nervoso central, com maior toxicidade a insetos que a mamíferos (Narahashi et al 2010). No ambiente, fipronil é persistente, com alto potencial de lixiviação e não volátil (Gunasekara et al 2007). A sulfluramida (sulfonamida fluoralfática) é perigosa para abelhas (DL₅₀ oral 48 h de 5 µg/abelha) (TCHD 2013), bloqueando o fluxo de elétrons na cadeia respiratória das mitocôndrias, interrompendo a síntese de adenosina trifosfato “ATP”, causando movimentos lentos, reduzindo a energia, metabolismo e causando a morte do inseto (De Britto et al 2016). A sulfluramida é altamente persistente no solo, moderadamente volátil e com alto potencial de bioconcentração, toxica por inalação e causadora de efeitos adversos na saúde reprodutiva e desenvolvimento em humanos (Gilljam et al 2016, TOXNET 2013).

Apis mellifera é um bioindicador de poluição ambiental (Schindler et al 2013). A avaliação de risco de agrotóxicos em insetos não alvos realizada com abelhas inclui testes de laboratório para determinar a DL₅₀ 48 h por via oral e contato (OECD No213 1998a, OECD No214 1998b) e de casa de vegetação e campo com avaliações de sobrevivência, alterações na habilidade de forrageio e desenvolvimento da colmeia (Medrzycki et al 2013).

Abelhas melíferas coletam recursos como pólen e néctar, água (alimentar) e resinas (não alimentares) do ambiente (Schmidt et al 2006) para obter carboidratos (4 mg de açúcares por dia), proteínas (5 mg de pólen por dia) e própolis (Pernal & Currie 2000, Di Pasquale et al 2013). Carboidratos e proteínas, substâncias alimentícias atrativas presentes em iscas formicidas (Zanetti 2007), podem atrair abelhas.

O objetivo deste trabalho foi determinar a atração e toxicidade aguda de iscas formicidas contendo fipronil e sulfluramida a *A. mellifera*.

2. MATERIAL E METODOS

2.1 Material biológico

Operárias forrageiras de *A. mellifera* africanizada com mais de 18 dias de vida e coletadas, diretamente, na entrada de colônias do apiário da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil, foram utilizadas.

2.2 Condições experimentais

As abelhas coletadas foram anestesiadas em freezer a -4°C por 10 minutos, colocadas em potes plásticos perfurados para ventilação (10 abelhas/pote), constituindo uma unidade experimental e mantidas em incubadora tipo BOD com temperatura, umidade relativa e luz controladas ($32 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65 a 70% UR e 12 h fotofase). A dieta alimentar de xarope (solução de sacarose 50%) e água foi fornecida em tubos Eppendorfs.

2.3 Iscas inseticidas

Iscas comerciais, para o controle de formigas cortadeiras com ingrediente ativo (IA) fipronil a 0,03 g/kg, sulfluramida 3,0 g/kg e a matriz atraente sem o IA, foram utilizadas.

2.4 Toxicidade potencial das iscas

2.4.1 Experimento 1: Iscas formicidas são tóxicas por ingestão a abelhas?

Cinco concentrações de iscas com fipronil e sulfluramida, feitas a partir de um grama da isca formicida macerada, misturada em xarope (solução de sacarose 50%), filtrada e diluída, foram oferecidas por unidade experimental e comparadas com o controle negativo dieta (xarope) sem isca formicida (Tabela 1). Após três horas, as soluções foram substituídas por xarope e água. A mortalidade de abelhas foi registrada após um, dois, quatro, seis, 12, 24 e 48 h de exposição para se determinar a dose letal media DL_{50} oral das iscas a *A. mellifera*.

Tabela 1. Concentrações de isca por 100mL de xarope e controle negativo para estimar sobrevivência e DL₅₀ oral (24 e 48 h) de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Tratamentos		Isca mg/100 mL	IA mg/100 mL
Solução com fipronil	F1	1000	0,03
	F2	500	0,015
	F3	250	0,0075
	F4	125	0,0037
	F5	62,5	0,0019
Solução com sulfluramida	S1	1000	3,0
	S2	500	1,5
	S3	250	0,75
	S4	125	0,375
	S5	62,5	0,1875
Controle	Xarope	0,0	0,0

IA: Ingrediente ativo.

2.4.2 Experimento 2: Iscas formicidas são tóxicas por contato a abelhas?

Dez abelhas por unidade experimental foram expostas por contato direto de um grama de isca seca ou úmida com água na proporção 1:2 (1g de isca: 2 mL de água) colocadas sobre uma tampa plástica de 4 cm de diâmetro. A mortalidade de *A. mellifera*, causada pelo contato direto ou ingestão da isca, foi registrada por unidade experimental e tratamento (Fig 1).

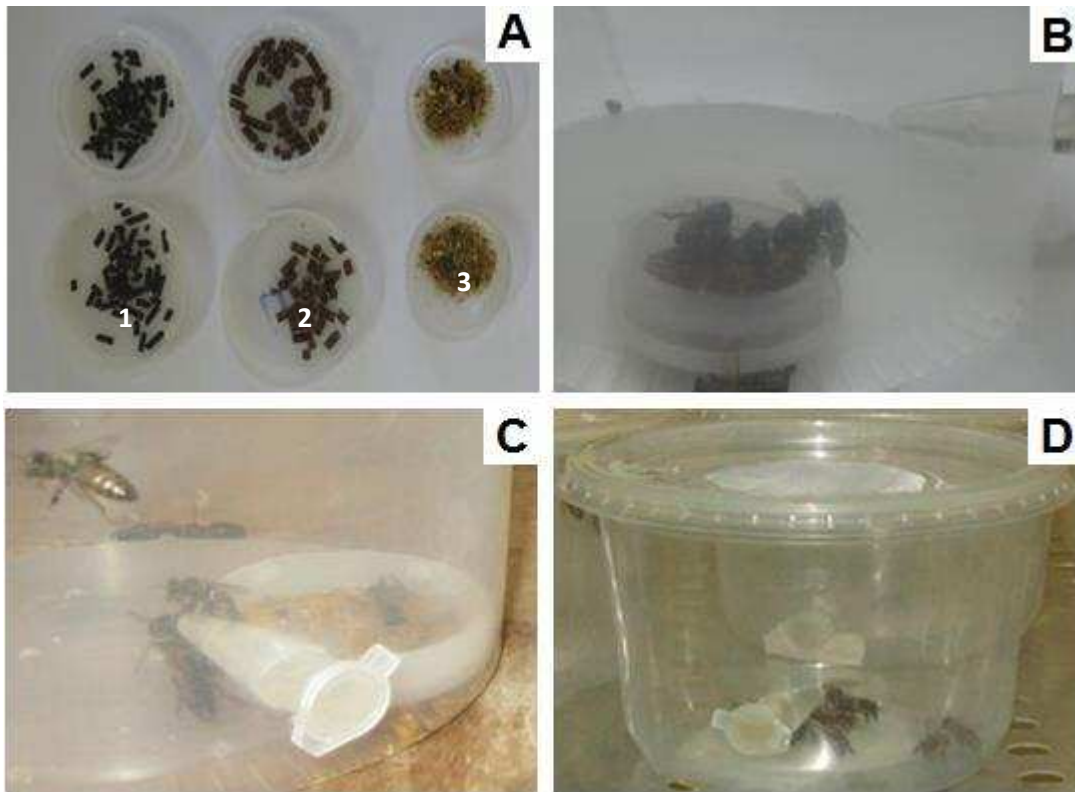


Fig 1. Iscas formicidas (A): sulfloramida (1), fipronil (2) e matriz (sem ativo) (3) sobre tampas plásticas; *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) exposta por contato direto às iscas (B); Abelhas com a matriz sem ativo (C); Forrageiras do controle bebendo xarope (D), nos potes plásticos.

2.4.3 Experimento 3: Voláteis das iscas formicidas são tóxicos as abelhas?

Abelhas foram expostas a um grama de isca formicida seca ou úmida, sobre um recipiente plástico de 4 cm de diâmetro e 4,5 cm de altura coberto com tela plástica, para não permitir o contato da isca com as abelhas por unidade experimental (10 abelhas/pote). A mortalidade de operárias de *A. mellifera* foi avaliada (Fig 2).

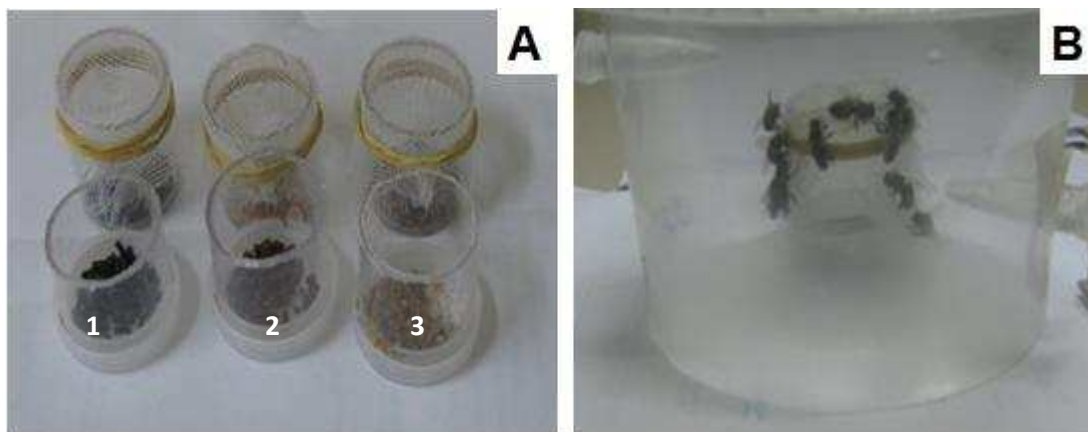


Fig 2. Iscas (A) com: sulfloramida (1), fipronil (2) e matriz sem ativo (3), em recipientes plásticos que impedem o contato da isca com as abelhas; *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) exposta a iscas formicidas (B).

2.4.4 Procedimento experimental

Abelhas operárias coletadas de quatro colônias (repetições) foram mantidas em três incubadoras BOD (experimentos 2 e 3). Uma incubadora foi utilizada para os tratamentos com a isca fipronil (seca e úmida) e controle negativo (xarope); outra recebeu os tratamentos com sulfloramida (seca e úmida) e controle negativo; e a terceira recebeu as iscas matriz sem IA (seca e úmida) e seu respectivo controle negativo. A mortalidade de abelhas após um, dois, quatro, seis, 12, 24 e 48 horas foi registrada e comparada com o controle.

2.5 Experimento 4: Iscas formicidas podem atrair abelhas?

2.5.1 Iscas formicidas colocadas junto ao xarope

Cinco gramas das iscas fumicidas seca e úmida (10 mL água) foram disponibilizados em quatro pratos plásticos a 50 cm do alimentador de xarope de açúcar à 30% no campo para visitação das abelhas no apiário da UFV. Esses pratos tinham uma tela plástica para evitar o contato das abelhas com as iscas, mas permitindo a atração das mesmas pelas iscas formicidas. Os resultados de atração foram comparados com o controle positivo (solução de mel a 50%) (Fig 3).



Fig 3. Iscas formicidas seca (1) e úmida (2) e alimentador com xarope de açúcar à 30% (3).

2.5.2 Iscas colocadas ao nível do solo

Cinco gramas das iscas formicidas com fipronil ou sulfluramida (secas e úmidas) foram colocadas em pratos plásticos ao nível do solo (semelhante à aplicação das iscas para o controle de formigas cortadeiras) a uma distância, aproximada, de 50 m das colônias de *A. mellifera* no apiário da UFV em dias não chuvosos. O número de abelhas atraídas pelas iscas foi registrado e comparadas com o daquelas que visitaram o controle positivo (solução de mel 50%) (Fig 4).

2.5.3 Registro da atividade

No experimento 4, o número de abelhas que fizeram contato ou pousaram sobre as iscas foi registrado após 15 minutos e em intervalos de 30min. Seis observações diárias foram realizadas (uma isca/dia), totalizando 90 minutos e os resultados comparados com o número de abelhas atraídas no controle (solução de mel 50%) disponibilizado em outro dia, por três dias (repetições) (modificado de Malerbo-Souza 2003, Sánchez et al 2008, Cabrera-Marín et al 2015).



Fig 4. Iscas formicidas secas (1) e úmidas (2) colocadas ao nível do solo a 50 m de colmeias no apiário da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.6 Análises de dados

Os experimentos 1, 2 e 3 foram montados em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições (colônias) por tratamento. A mortalidade de abelhas por unidade experimental (10 abelhas/pote) foi transformada em porcentagem e corrigida por aquela no controle negativo usando-se a fórmula de Abbott (1925). Os dados foram submetidos a testes de Kaplan-Meier, para estimar as curvas de sobrevivência, à análise de regressão Probit em função do tempo (h), à análise de variância (ANOVA) e as médias entre tratamentos comparadas pelo teste de médias Tukey. Os dados de atração (experimento 4) foram submetidos a ANOVA e Tukey. As análises foram feitas com o pacote estatístico R (R Core Team 2016).

2 RESULTADOS

3.1 Toxicidade por ingestão das iscas formicidas em abelhas

A sobrevivência de *A. mellifera*, exposta a solução com isca formicida fipronil, diferiu entre as concentrações desse produto em 48 h (Log-rank test, $\chi^2 = 181,4$; g.l.= 5; $p < 0,0001$). A taxa de sobrevivência de abelhas foi menor que 50%, com concentrações de isca fipronil maiores de 125 mg/100 mL xarope (Fig 5).

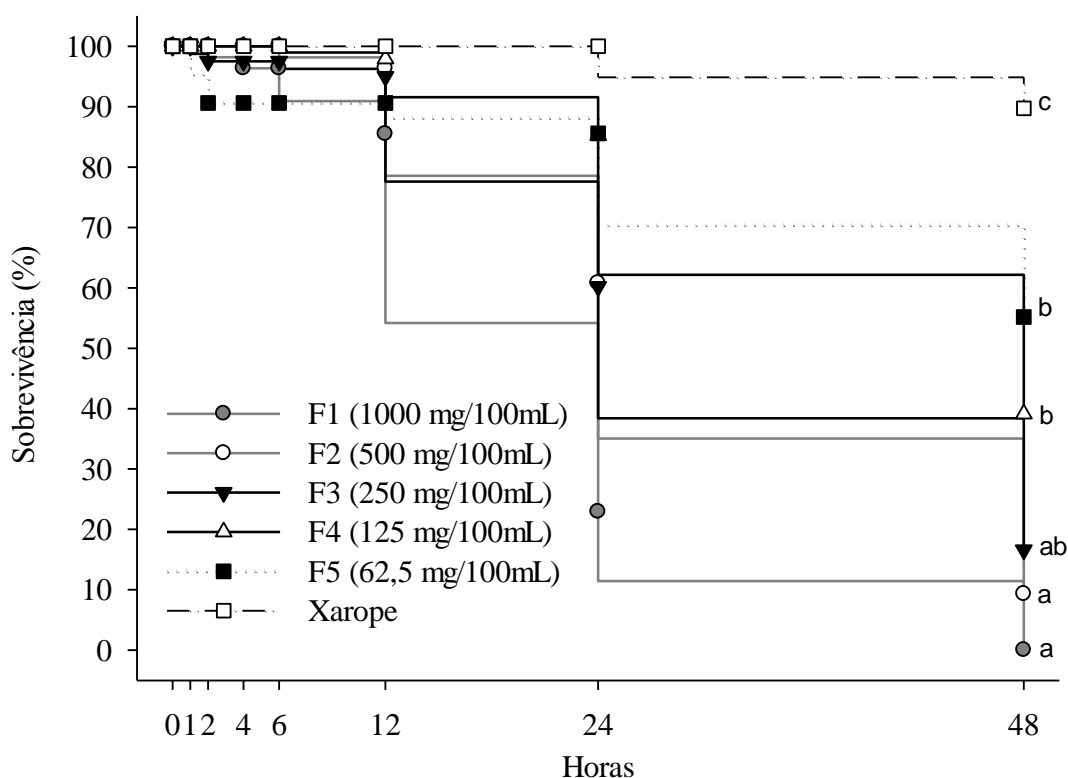


Fig 5. Sobrevivência de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) após da ingestão da solução contendo iscas formicidas com fipronil e o controle. Após de 48 h, médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A DL_{50} 48 h (media \pm erro padrão) por ingestão, para a isca fipronil, foi de $54,49 \pm 12,92$ $\mu\text{g}/\text{abelha}$ ($\chi^2 = 7,94$; g.l.= 4; $p = 0,0093$) e para o IA de $0,0016 \pm 0,0004$ $\mu\text{g}/\text{abelha}$ ($\chi^2 = 5,31$; g.l.= 4; $p = 0,256$), sendo estimada um consumo de 50 μL de solução (xarope), correspondente ao volume médio da vesícula nectarífera de *A. mellifera* (Thompson 2010).

A sobrevivência de operárias de *A. mellifera* após 48 h da ingestão da solução alimentar com a isca formicida com sulfluramida foi semelhante ao tratamento controle (xarope) (Fig 6).

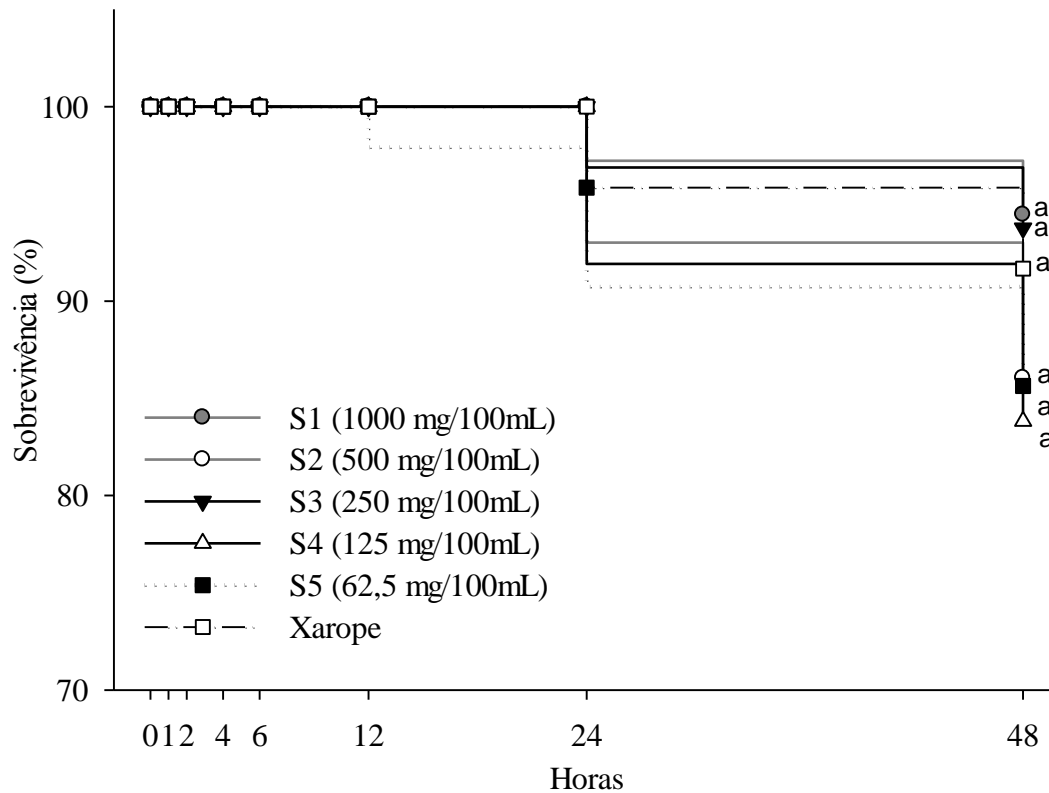


Fig 6. Sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) após ingestão da solução alimentar com a isca formicida com sulfluramida e o controle (xarope). Após de 48 h, médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

3.2.1 Toxicidade por contato direto das iscas formicidas em abelhas

A mortalidade de operárias de *A. mellifera* a partir de 48 h, por contato com as iscas formicidas sulfluramida e fipronil (seca e úmida) oscilou entre 86,0% e 100,0%, maior no controle (Tabela 4, Fig 7).

Tabela 4. Mortalidade (%) de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) após de 24 e 48 h de contato direto com as iscas formicidas

BOD	Tratamentos	24 h	48 h
Um	Fipronil (seca)	29,7 ± 10,4b	86,0 ± 14,0a
	Fipronil (úmida)	36,4 ± 9,8b	100,0 ± 0,0a
Dois	Sulfloramida (seca)	85,7 ± 11,6a	100,0 ± 0,0a
	Sulfloramida (úmida)	87,9 ± 12,1a	100,0 ± 0,0a
Controle sem IA	Matriz (seca)	4,2 ± 3,0b	21,1 ± 13,3b
	Matriz (úmida)	6,0 ± 3,5b	16,7 ± 6,6b
	Dieta (xarope)	6,3 ± 4,0b	10,4 ± 7,9b

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (media ± erro padrão; n=4).

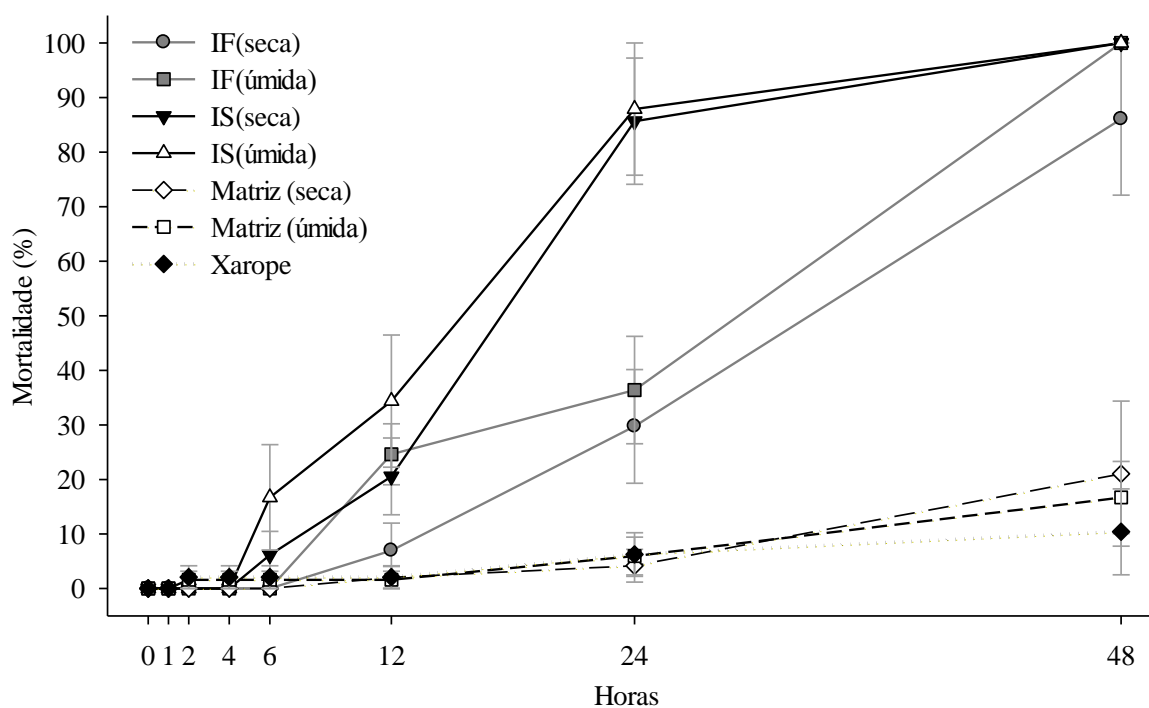


Fig 7. Mortalidade de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) após exposição por contato as iscas formicidas (media ± erro padrão; n=4). IF: isca com fipronil; IS: isca com sulfloramida; Matriz: atraentes da isca sem IA.

3.2.2 Toxicidade por contato dos voláteis das iscas formicidas em abelhas

Iscas com sulfluramida (seca e úmida) causaram mortalidade de 100% das abelhas em 48 h (toxicidade tópica ou inalação), maior que as de fipronil e do controle no BOD sem IA, 14,9% a 10,4% (Tabela 5, Fig 8).

Tabela 5. Mortalidade (%) de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) após 24 e 48 h exposição dos voláteis das iscas formicidas em incubadoras

BOD	Tratamentos	24 h	48 h
Um	Fipronil (seca)	3,6 ± 2,7	14,9 ± 5,0c
	Fipronil (úmida)	6,7 ± 3,1	11,7 ± 3,6c
Dois	Sulfluramida (seca)	5,8 ± 4,8	100,0 ± 0,0a
	Sulfluramida (úmida)	22,9 ± 10,2	100,0 ± 0,0a
Controle sem IA	Matriz (seca)	3,6 ± 0,9	11,1 ± 3,9c
	Matriz (úmida)	0,6 ± 0,6	12,1 ± 7,0c
	Dieta (xarope)	6,3 ± 4,0	10,4 ± 7,9c

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (media ± erro padrão; n=4).

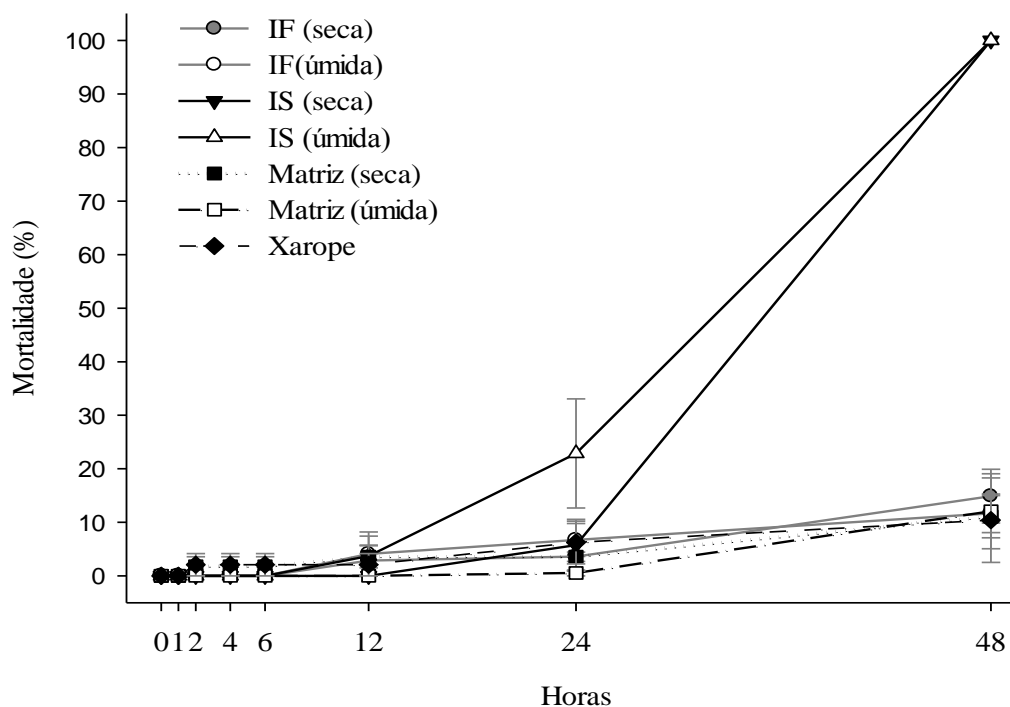


Fig 8. Mortalidade de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) após exposição aos voláteis das iscas formicidas (media ± erro padrão; n= 4). IF: isca com fipronil ; IS: isca com sulfluramida; Matriz: atraentes sem ingrediente ativo.

3.3.1 Atração das iscas formicidas colocadas no campo junto ao xarope

O número de abelhas forrageiras (média \pm erro padrão; $n=3$) que tocou e pousou sobre os recipientes contendo as iscas formicidas com fipronil e sulfluramida (seca e úmida) foi de $11,0 \pm 2,1$; $8,7 \pm 1,7$ e $7,3 \pm 4,5$; $6,3 \pm 3,8$ respectivamente, menor que a daquelas nos recipientes controle (solução de mel à 50%) $143,0 \pm 11,2$ próximos ao alimentador coletivo contendo xarope de sacarose à 30% (Figs 9 e 10).

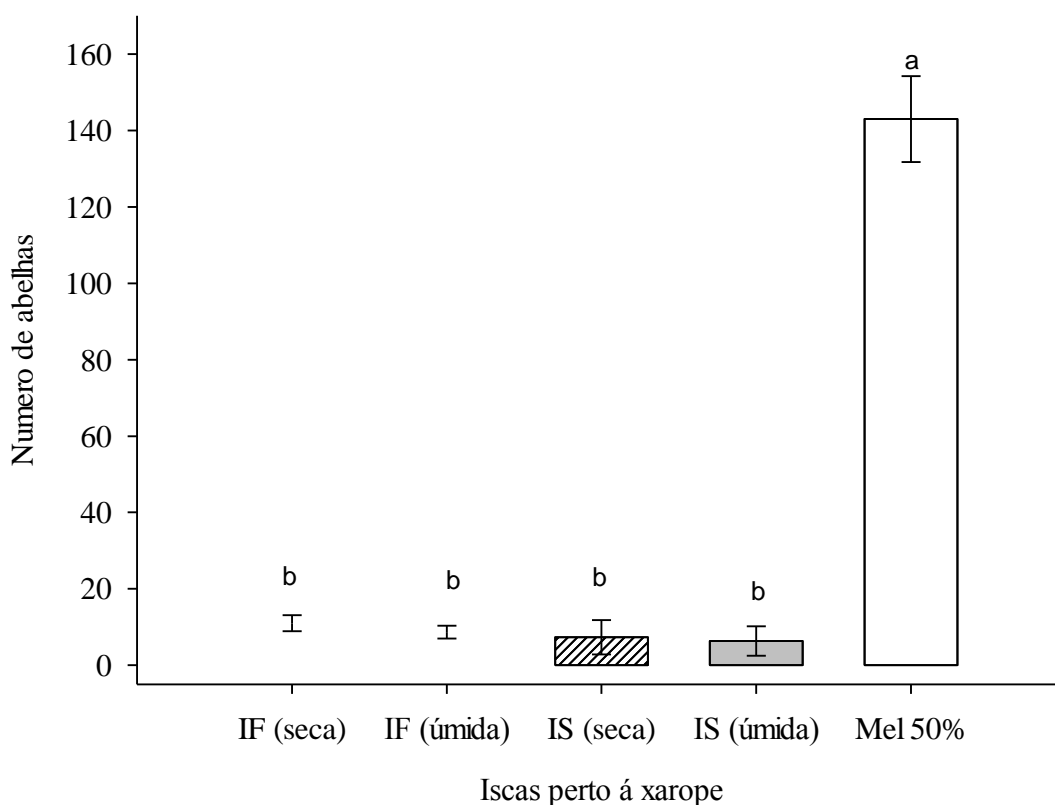


Fig 9. Número de forrageiras de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) que pousaram sobre as isclas formicidas com fipronil ou sulfluramida (secas e úmidas) e no controle (solução de mel à 50%), disponibilizadas junto ao alimentador coletivo de xarope (solução de sacarose à 30%). Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (média \pm erro padrão; $n=3$).

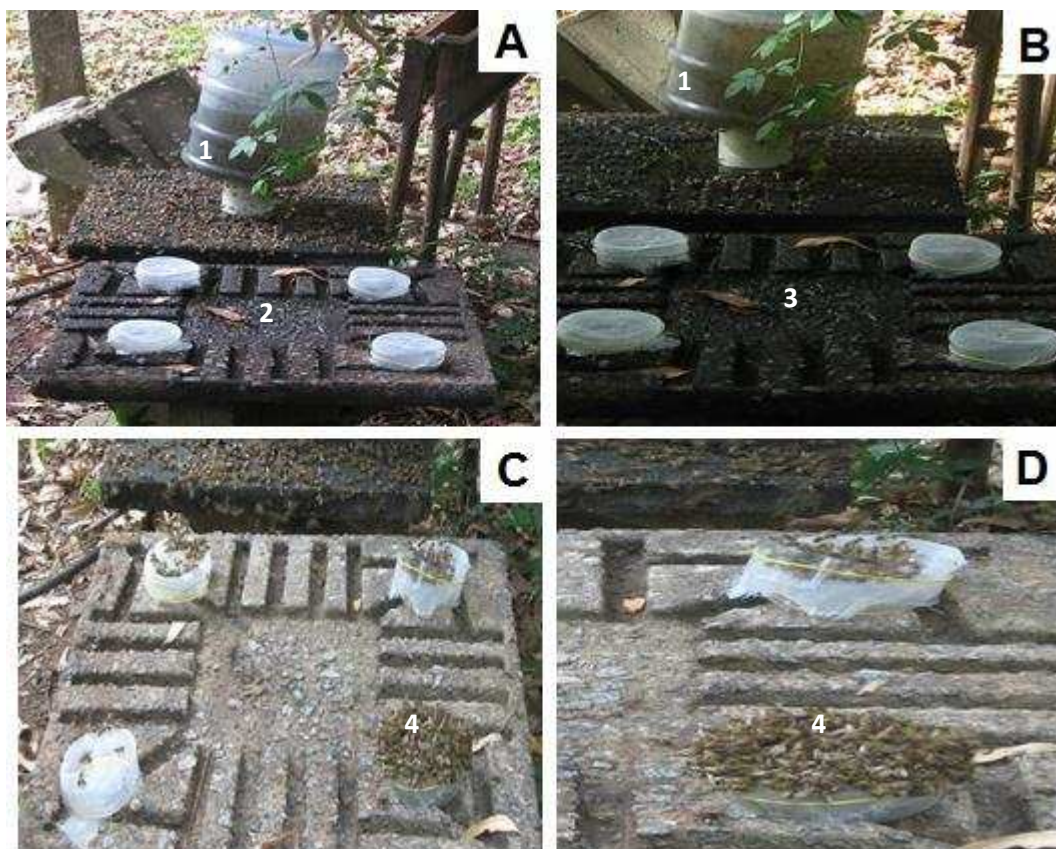


Fig 10. Atração de operárias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) por iscas formicidas. Iscas com fipronil (A) disponibilizados junto ao alimentador coletivo com xarope (solução de sacarose à 30%) (1), isca sulfloramida (B) junto ao alimentador (1), abelhas atraídas ao controle (C) com solução de mel à 50% (C) e detalhe de abelhas pousadas no controle (4).

3.3.2 Atração de iscas dispostos no solo

Operárias de *A. mellifera* não visitaram iscas formicidas com fipronil e sulfloramida seca e úmida dispostas em pratos ao nível do solo, mas localizaram e pousaram sobre a solução controle (solução de mel à 50%) $114,3 \pm 19,3$ (media \pm erro padrão; n= 3) (Figs 11 e 12).

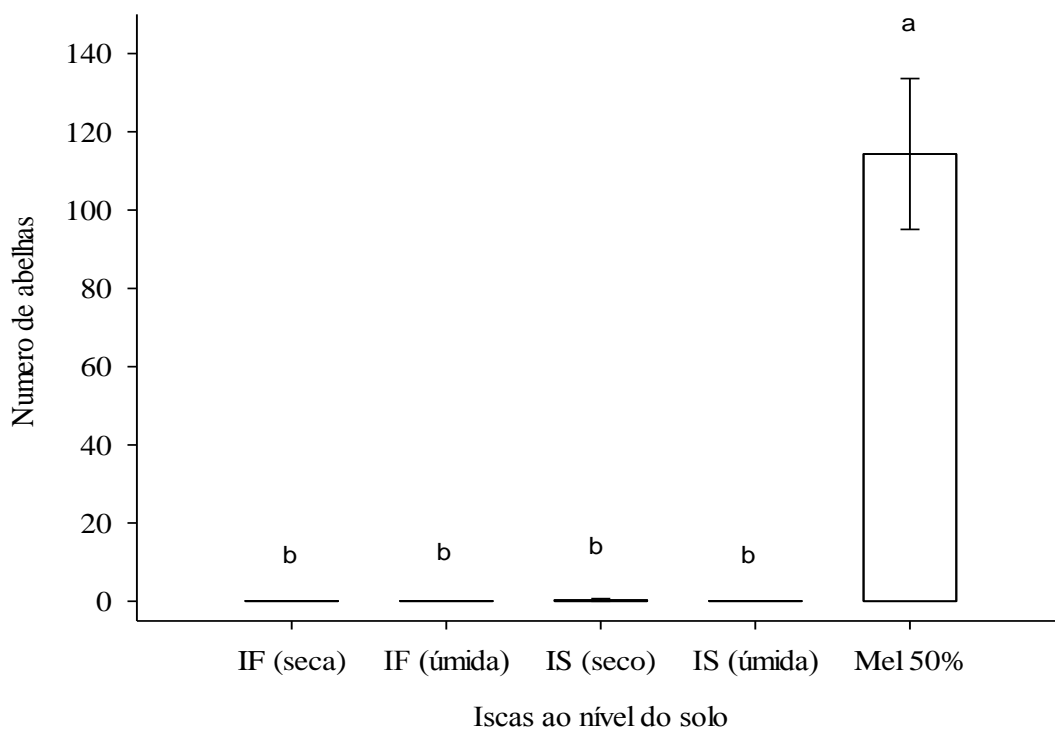


Fig 11. Numero de operárias forrageiras de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) que pousaram sobre as isclas formicidas com fipronil e sulfluramida (seca e úmida) comparado ao controle (solução de mel à 50%), ao nível do solo no Apiário da UFV. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (media \pm erro padrão; n= 3).



Fig 12. Atratividade de isclas formicidas para *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) dispostos ao nível do solo. Isca formicida com fipronil (A), isca com sulfluramida (B) e controle (C) (solução de mel à 50%).

4. DISCUSSÃO

Abelhas são polinizadores importantes de plantas cultivadas e silvestres, mas podem ser afetadas por inseticidas (Valdovinos-Núñez et al 2009, Giannini et al 2015). Iscas formicidas a base de fipronil e sulfluramida são utilizadas em áreas agrícolas, de pecuária e florestais para o controle de formigas cortadeiras (Cardoso et al 2012, Ferreira-Filho et al 2015), pragas importantes e comuns neste sistemas (Zanuncio et al 2000, Zanetti et al 2003b). Esses produtos podem deixar resíduos tóxicos (Kroger et al 2009, Potts et al 2010) e expor as abelhas (insetos não alvo), por contato direto ou através do consumo de água contaminada (Krupke et al 2012). O risco das iscas formicidas as abelhas depende da concentração e toxicidade do ingrediente ativo, método de aplicação e atratividade das mesmas (Thompson 2010, Della Lucia 2011).

A menor sobrevivência de operárias de *A. mellifera* com o ingrediente ativo (IA) fipronil se deve a alta toxicidade oral do mesmo a insetos praga (Martínez et al 2014) e à organismos não alvo (Pisa et al 2015). A concentração letal deste produto CL_{50} - 48 h para *Mysid shrimp* (Mysida: Mysidae) e *Daphnia* (Cladocera: Daphniidae) foi de 140 – 190 ppt (trilhão) e para larvas de mosquito *Aedes* sp. e *Culex* sp. (Diptera: Culicidae) de 0,02 a 0,004 ppm (Tingle et al 2003). Isso ocorre devido à alta sensibilidade dos receptores gamma-ácido aminobútirico (GABA) de insetos a esse IA e à sua atividade no canal íon cloro glutamato (GluCl) de insetos, mas ausente em mamíferos (Zhao et al 2005, Narahashi et al 2010).

A DL_{50} oral (48 h) da isca com fipronil, com IA 0,003% foi medianamente tóxico “perigoso” (11-100 $\mu\text{g}/\text{abelha}$, classe III) para abelhas, contudo seu IA é classificado como “altamente perigoso” ao ambiente (DL_{50} oral 48 h $<2 \mu\text{g}/\text{abelha}$, classe I) pelo órgão ambiental (IBAMA 1996, EPA 2014). Alta toxicidade do IA fipronil foi relatada para *A. mellifera*, 0,39 e 0,004 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ (DL_{50} oral 48 h) (Decourtye et al 2005, Carrillo et al 2013). Esse inseticida teve, também, efeito subletal para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille (Apidae: Meliponini) com tempo letal (TL_{50} 4 dias) com 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fipronil no alimento (Ferreira et al 2013) e de 100% de mortalidade em *A. mellifera* (7 dias) com 0,0001 $\mu\text{g}/\text{abelha}$ de IA no xarope (Aliouane et al 2009).

A ingestão da solução alimentar com a isca formicida com sulfluramida, não reduziu a sobrevivência das abelhas até a concentração de isca testada (>100

µg/abelha), mostrando ser este produto formulado "pouco perigoso" (Classe IV) (IBAMA 1996, EPA 2016a) às abelhas. Isso, provavelmente, se deve ao baixo conteúdo de sulfluramida (0,3%) na isca formicida comercial e a designação desse IA como de moderada toxicidade a polinizadores (EPA 2016b). Esse IA, presente em iscas formicidas, apresenta ação tóxica retardada, porém alta eficiência no controle de formigas (Grosman et al 2002, Forti et al 2007). No entanto, pode acumular no solo, organismos silvestres, seres humanos e no ambiente, e por isto, aplicações de iscas com esse IA são controladas (Isenring & Neumeister 2010, Liu et al 2012, FSC 2014).

A mortalidade de abelhas pelo contato com iscas formicidas após 24 e 48 h pode estar relacionada as características, concentração e suscetibilidade de *A. mellifera* a esses inseticidas (EPA 2014, Bonmatin et al 2015). Os ingredientes ativos das iscas formicidas (30 µg e 3000 µg de IA/g de isca com fipronil e sulfluramida, respectivamente) causaram alta mortalidade (48 h) em operárias de *A. mellifera*, expostas por contato direto. A DL₅₀ 48 h por contato do fipronil está entre 0,000157 e 0,013 µg/abelha (Tingle et al 2003) e abelhas melíferas expostas à dose IA de 1 ng/abelha tópica, tiveram menos atividade motora e aprendizado olfatório (El Hassani et al 2005).

A isca formicida com sulfluramida por contato direto causou alta mortalidade de abelhas, mostrando a toxicidade deste IA recomendado para o controle de cupins (térmitas), baratas, formigas e outros insetos (Alder & Silverman 2005, De Britto et al 2016). A aplicação tópica de 1000 µg/g desse IA, causou taxas de mortalidade de 100% no terceiro dia com CL₅₀ calculada de 9,04; 8,16 e 7,78 µg/g no oitavo; 10º e 14º dias, respectivamente, do cupim subterrâneo *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae) (Grace et al 2000). A sulfluramida interfere na atividade da cadeia respiratória nas mitocôndrias, causando movimentos lentos, redução da energia (ATP), diminuição da agressividade, metabolismo e morte do inseto (UNEP/POPS/POPRC11/FU-SUBM/PFOS-Brazil-2-2016). Isto explica a mortalidade de operárias de *A. mellifera* pelo contato com as iscas.

A mortalidade de abelhas por contato ou inalação de voláteis da isca formicida com sulfluramida em incubadora tipo BOD concorda com o relatado para abelhas em contato com partículas de inseticidas dispersas no ar (Wilms & Eltz 2008, Johnson 2015). Condições experimentais (item 2.2) podem aumentar a volatilidade e toxicidade da sulfluramida no ar (Kromer et al 2004). Voláteis da isca sulfluramida 1% (Raid

Max bait[®]) causaram mortalidade de machos expostos (treis dias) da barata alemã (Dictyoptera: Blattellidae) (Schal 1992). Esse IA é moderadamente volátil, com alto risco tóxico por inalação em mamíferos (CL₅₀ inalação: > 4,4 mg/l (4h) em ratos) (TCHD 2013) e se degrada em sulfonato de perfluorooctano “PFOs”, substância altamente tóxica, incluída na lista de poluentes orgânicos persistentes “POPs” (UNEP/POPS/POPRC.5/10). Estes compostos podem ser transportados através da atmosfera e água e se acumular no ambiente (Nguyen et al 2016). Isto mostra que esse IA, no campo, pode contaminar abelhas ao utilizarem água para refrigerar e umedecer o alimento na colônia (Nicolson 2009, Nguyen et al 2013) e possivelmente com problemas toxicológicos de curto e longo prazo (bioacumulação) (TOXNET 2013).

Isclas formicidas com fipronil e sulfluramida não foram atraentes para abelhas, mostrando que seus componentes: polpa cítrica (45 -90%), óleo vegetal, farinhas de cereais e açúcar (0 - 17%), estão em proporções específicas para atrair formigas cortadeiras (Ramos et al 2003, Castellani et al 2010, Herrera et al 2013) e abaixo do limiar ou do padrão de odor de abelhas forrageiras (Sánchez et al 2011). Abelhas buscam fontes de alimento como pólen (carboidratos a 74-61%, proteínas a 33-16%, lipídios, aminoácidos e antioxidantes) e néctar de flores (16-20% sacarose) (Modro et al 2007, Di Pasquale et al 2013), sendo, também, atraídas a suplementos alimentar com açúcares entre 25 e 60% (Brodschneider & Crailsheim, 2010, El-Wahab & Ghania 2016).

Características físicas das isclas formicidas podem, também explicar a falta de atração para abelhas que não procuram cores escuras, como o marrom das isclas, mas preferem cores como azul e amarelo das flores (Muth et al 2016). Por outro lado as isclas são sólidas, com massa e diâmetro compatíveis para permitir o carregamento pelas formigas cortadeiras (Lima et al 2003, Nagamoto et al 2011), mas inadequadas para as abelhas carregarem (Williams et al 2013, Zheng et al 2014). Abelhas forrageiras podem escolher uma fonte de alimento, a partir de sinais químicas de odor ou visuais como cores, formas, tamanhos e texturas (Sommerlandt et al 2014), aceitando-as ou rejeitando-as (Cabrera-Marín et al 2015).

6. CONCLUSÕES

Iscas formicidas com fipronil e sulfluramida foram “perigosas e pouco perigosas”, respectivamente, para *A. mellifera* por ingestão. Essas iscas apresentam potencial tóxico a abelhas por contato direto e com os voláteis da isca sulfluramida. No entanto, tem baixíssimas chances de ocorrerem no campo, onde essa abelha não foi atraída para as iscas formicidas.

A toxicidade dos IAs fipronil e sulfluramida, utilizados nas iscas para o controle de formigas cortadeiras, deve seguir as recomendações e precauções do fabricante contidas no rótulo do produto, para evitar o contato das abelhas com o produto ou resíduos dos mesmos, minimizando a contaminação ambiental e danos as abelhas.

5. REFERÊNCIAS

- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18(1):265-267
- Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M (2009) Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior. *Environ Toxicol Chem* 28(1):113-122
- Alder P, Silverman J (2005) Effects of interspecific competition between two urban ant species, *Linepithema humile* and *Monomorium minimum*, on toxic bait performance. *J Econ Entomol* 98(2):493-501
- Bartomeus I, Potts SG, Steffan-Dewenter I, Vaissiere BE, Wojciechowski M, Krewenka KM, Tscheulin T, Roberts SPM, Szentgyorgyi H, Westphal C, Bommarco R (2014) Contribution of insect pollinators to crop yield and quality varies with agricultural intensification. *PeerJ* 2(328):1-20
- Bates AJ, Sadler JP, Fairbrass AJ, Falk SJ, Hale JD, Matthews TJ (2014) Changing bee and hoverfly pollinator assemblages along an urban-rural gradient. *PLoS ONE* 6(8):e23459
- Boff S, Araujo AC, Pott A (2013) Bees (Hymenoptera: Apoidea) and flowers in natural forest patches of southern Pantanal. *Biota Neotrop* 13(4):46-56

- Bonmatin J-M, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EAD, Noome DA, Simon-Delso N, Tapparo A (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut R* 22(1):35-67
- Bogdanov S (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie* 37(1):1-18
- Bollazzi M, Forti LC, Moreira S, Roces F (2014) Efficiency and soil contamination during underground application of insecticides: control of leaf-cutting ants with thermal foggers. *J Pest Sci* 87(1):181-189
- Brodschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41(3):278-294
- Cabrera-Marín NV, Liedo P, Vandame R, Sánchez D (2015) Foraging allocation in the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), tuned by the presence of the Spinosad-based pesticide GF-120. *Neotrop Entomol* 44(2):166-172
- Cardoso SRS, Nagamoto NS, Forti LC, Souza ES (2012) Carrying and effect of granulated baits formulated with entomopathogenic fungi among *Atta sexdens rubropilosa* colonies (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 59(3):681-690
- Carrillo MP, Bovi T-S, Negrão AF, Orsi R-O (2013) Influence of agrochemicals fipronil and imidacloprid on the learning behavior of *Apis mellifera* L. honey bees. *Acta Sci Anim Sci* 35(4):431-434
- Castellani MA, Forti LC, Moreira AA, Protti de Andrade AP, Raetano CG, Lima JM, Nagamoto NS (2010) Selectivity of workers of the grass-cutting ants *Atta bisphaerica* and *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae) to vegetable oils. *Sociobiology* 55(2):453-469
- De Britto JS, Forti LC, De Oliveira MA, Zanetti R, Wilcken CF, Zanuncio JC, Loeck AE, N Caldato, Nagamoto NS, Lemes PG, Camargo RD-S (2016) Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int J Res Env Std* 3(2):11-92
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le Menach K, Budzinski H, S Cluzeau Pham-Delegue MH (2005) Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Con Tox* 48(2):242-250

- Della Lucia T. M. C. (2011). Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo. Viçosa, MG: Ed da UFV. 419p.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet J-L, Alaux C (2013) Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. PLoS ONE 8(8):e72016
- Environmental Protection Agency, EPA (2014). Guidance for assessing pesticide risks to bees. United States Environmental Protection Agency. Available online at: https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-06/documents/pollinatorrisk_assessment_guidance_06_19_14.pdf
- Environmental Protection Agency, EPA (2016a). Guidance on exposure and effects testing for assessing risks to bees. United States Environmental Protection Agency. Available online at: www.epa.gov/sites/production/files/2016-07/documents/guidance-exposure-effects-testing-assessing-risks-bees.pdf
- Environmental Protection Agency EPA (2016b) Process for Requiring Exposure and Effects Testing for Assessing Risks to Bees during Registration and Registration Review Process for Requiring Exposure and Effects Testing for Assessing Risks to Bees during Registration and Registration Review. Available online at: www.epa.gov/sites/production/file/2016-08/documents/bee_guidance
- El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C (2005) Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). Pharmacol Biochem Be 82(1):30-39
- El-Wahab ATE, Ghania AMM (2016) Impact of some pollen substitutes in liquid form on the biological activities of honey bee colonies. J Agr Sci Tech 12(6):1035-1041
- Ferreira-Filho PJ, Wilcken CF, Neves DA, Pogetto MHFAD, Carmo JB, Guerreiro JC, Serrao JE, Zanuncio JC (2015) Does Diatomaceous earth control leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae) in the eucalyptus plantations?. J Econ Entomol 108(3):1124-1128
- Ferreira RAC, Zacarin ECM, Malaspina O, Bueno OC, Tomotake MEM, Monroe P A (2013) Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica*

(Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. *Micron* 46(1): 57-65

Forest Stewardship Council - FSC (2014) Pesticides guidance addendum: list of approved derogations for use of 'highly hazardous' pesticides. FSC-GUI-30-001a. Last Updated: 24th March 2014. Available online at: <https://pt.fsc.org/download.fsc-gui-30-001a-v1-0-EN.pdf>

Forti LC, Pretto DR, Nagamoto NS, Padovani CR, Camargo RS, Andrade APP (2007) Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 50(3):1-15

Gandra LC, Amaral KD, Couceiro JC, Della Lucia TMC, Guedes RNC (2016) Mechanism of leaf-cutting ant colony suppression by fipronil used in attractive toxic baits. *Pest Manag Sci* 72(8):1475-1481

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

Gilljam JL, Leonel J, Cousins IT, Benskin JP (2016). Is ongoing sulfluramid use in South America a significant source of perfluoro octanesulfonate (PFOS)? production inventories, environmental fate, and local occurrence. *Environ Sci Technol* 50(2):653-659

Grace JK, Yamamoto RT, Tome CHM (2000). Toxicity of sulfluramid to *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 35(3):457-466

Grosman DM, Upton WW, McCook FA, Billings RF (2002) Attractiveness and efficacy of fipronil and sulfluramid baits for control of the Texas leaf cutting ant (*Atta texana* (Buckley) Hymenoptera; Formicidae). *Southwest Entomol* 27(3-4):251-256

Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS (2007) Environmental fate and toxicology of fipronil. *J Pest Sci* 32(3):189-199

Herrera EE, Sánchez V, Blanco H (2013) Formulación de gránulos bases para la incorporación de ingredientes activos con efecto biológico sobre el hongo

simbiótico cultivado por las hormigas forrajeras del género *Atta*. Agr Costarr 37(2):55-69

Isenring R, Neumeister L (2010). Insecticides for control of pest insects in fsc certified forests in Brazil—recommendations by technical advisors. Recommendations regarding Derogations to use alpha-Cypermethrin, Deltamethrin, Fenitrothion, Fipronil and Sulfluramid in FSC Certified Forests in Brazil. Forest Stewardship Council, Furstenwerder

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (1996) Portaria normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. Available online at: https://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf

Johnson RM (2015) Honey Bee Toxicology. Annu Rev Entomol 60(22):1-20

Kiljanek T, Niewiadowska A, Posyniak A (2016) Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. J Apic Sci 60(2):5-24

Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc R Soc B 274(1):303-313

Kroger R, Lizotte REJ, Moore MT (2009) Survival, growth, and body residues of *Hyalella azteca* (saussure) exposed to fipronil contaminated sediments from non-vegetated and vegetated microcosms. Bull Environ Contam Toxicol 83(3):369-373

Kromer T, Ophoff H, Stork A, Führ F (2004) Photodegradation and volatility of pesticides. Environ Sci Pollut Res 1(2):107-120

Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD., Andino G, Given K (2012) Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. PLoS ONE 7(1):e29268

Laranjeiro AJ, Zanuncio JC (1995) Avaliação da isca à base de sulfluramida no controle de *Atta sexdens rubropilosa* pelo processo dosagem única de aplicação. IPEF (48/49):144-152

Malerbo-Souza DT, Charlier A; Rossi MM, Pinto AS, Nogueira-Couto RH (2003) Métodos para atrair e repelir a abelha *Apis mellifera* (L.) em cultura de maracujá

- amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa flavicarpa* Deg.). *Acta Sci Anim Sci* 25(1):1-8
- Martínez LC, Plata-Rueda A, Zanuncio JC, Serrao JE (2014) Comparative toxicity of six insecticides on the rhinoceros beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *Fla Entomol* 97(3):1056-1062
- Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, et al. (2013) Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *J Apicult Res* 52(4):1-60
- Modro ANH, Message D, Pinto da Luz CF, Meira Neto JAA (2007) Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. *Pesqui Agropecu Bras* 42(8):1057-1065
- Muth F, Papaj DR, Leonard AS (2016) Bees remember flowers for more than one reason: pollen mediates. *Anim Behav* 111(1):93-100
- Nagamoto NS, Barbieri RF, Forti LC, SR Cardoso, Moreira SM, Lopes JFS (2011) Attractiveness of copperleaf-based bait to leaf-cutting ants. *Cienc Rural* 41(6):931-934
- Nagamoto NS, Forti LC, Andrade APP, Boaretto AP, Wilcken CF (2004) Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 44(2):413-431
- Naggar YAl, Tan Y, Rutherford C, Connor W, Griebel P, Giesy JP, Robertson AJ (2016) Effects of treatments with Apivar[®] and Thymovar[®] on *V. destructor* populations, virus infections and indoor winter survival of Canadian honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J Apicult Res* 54(5):548-554
- Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Salgado VL, Yeh JZ (2010) Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pestic Biochem Phys* 97(2):149-152
- Nicolson SW (2009) Water homeostasis in bees, with the emphasis on sociality. *J Exp Biol* 212(3):429-434
- Nguyen TV, Reinhard M, Gin KY-H (2013) Rate laws and kinetic modeling of N-ethyl perfluorooctane sulfonamidoethanol (N-EtFOSE) transformation by hydroxyl radical in aqueous solution. *Water Res* 47(1):2241-2250

- Nguyen TV, Reinhard M, Chen H, Gin KY-H (2016) Fate and transport of perfluoro- and polyfluoroalkyl substances including perfluorooctane sulfonamides in a managed urban water body. *Environ Sci Pollut Res* 23(11):10382-10392
- Lima CA, Della Lucia TMC, Guedes RNC, Da Veiga CE (2003) Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias. *Neotrop Entomol* 32(5):497-501
- Li X, Bao C, Yang D, Zheng M, Li X, Tao S (2010) Toxicities of fipronil enantiomers to the honeybee *Apis mellifera* L. and enantiomeric compositions of fipronil in honey plant flowers. *Environ Toxicol Chem* 29(1):27-132
- Liu W, Dong G, Luo Y, Liu L, Cao Z, Li X, Jin Y (2012) Estimation of reference values for PFOS and PFOA in human biomonitoring and relevance of exposure among family members in China. *J Environ Prot* 3(1):353-361
- OECD (1998a) OECD guideline for testing of chemicals. Test No 213: Honey bees, acute oral toxicity test.
- OECD (1998b) OECD guideline for testing of chemicals. Test No 214: Honey bees, acute contact toxicity test.
- Pernal SF, Currie RW (2000) Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31(3):387-409
- Pisa LW, Amaral-Rogers VR, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD, Van der Sluijs JP, Van Dyck H, Wiemers M (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut R* 22(1):68-102
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25(6):345-353
- Ramos LdeS, Marinho CGS, Zanetti R, Delabie JHC, Schlindwein EMN (2003) Impacto de iscas formicidas granuladas sobre a mirmeco fauna não-alvo em eucaliptais segundo duas formas de aplicação. *Neotrop Entomol* 32(2):231-237

- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>
- Ricketts TH, Regetz J, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Bogdanski A, Gemmill-Herren B, Greenleaf SS, Klein AM, Mayfield MM, Morandin LA, Ochieng' A, Potts SG, Viana BF (2008) Landscape effects on crop pollination services: Are there general patterns?. *Ecol Lett* 11(5):499-515
- Reis M-A, Rodriguez Cunha JPA, Zanetti R, Fernandes BV, Reis JMR (2015) Mechanized systematic application of granulated ants baits in eucalyptus plantations in maintenance phase. *Cerne* 21(3):423-428
- Sanchez-Bayo F, Goka K (2014) Pesticide residues and bees – a risk assessment. *PLoS ONE* 9 (4):e94482
- Sánchez D, Nieh JC, Vandame R (2011) Visual and chemical cues provide redundant information in the multimodal recruitment system of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana* (Apidae, Meliponini). *Insect Soc* 58(4):575-579
- Schal C (1992) Sulfluramid resistance and vapor toxicity in field-collected german cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *J Med Entomol* 29(2):207-215
- Schindler M, Diestelhorst O, Härtel S, Saure C, Schanowski A, Schwenninger HR (2013) Monitoring agricultural ecosystems by using wild bees as environmental indicators. *BioRisk* 8(1):53-71
- Schmidt VM, Schorkopf DLP, Hrnčir M, Zucchi R, Barth FG (2006) Collective foraging in a stingless bee: dependence on food profitability and sequence of discovery. *Anim Behav* 72(6):1309-1317
- Silva IPP, Oliveira FAS, HP Pedroza, Gadelha ICN, Melo MM, Soto-Blanco Benito (2015) Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. *Apidologie* 46(6):703-715
- Sommerlandt FMJ, Huber W, Spaethe J (2014) Social information in the stingless bee, *Trigona corvina* Cockerell (Hymenoptera: Apidae): The use of visual and olfactory cues at the food site. *Sociobiology* 61(4):401-406
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (2009) Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its fifth

- meeting. UNEP/POPS/POPRC.5/10 Persistent Organic Pollutants Review Committee. Fifth meeting. Geneva, 12–16 October 2009
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (2016) Revisão, análise e discussão sobre a viabilidade do uso das alternativas ao PFOs, seus sais e PFOsF, no controle das formigas cortadeiras *atta* e *acromyrmex* dentro de uma abordagem de manejo integrado de pragas 08/01/2016. UNEP/POPS/POPRC11/FU/SUBM/PFOS/Brazil-2-2016. Information on alternatives to perfluorooctane sulfonic acid, its salts, perfluorooctane sulfonyl fluoride and their related chemicals. Document (portuguez)
- Thompson HM (2010) Risk assessment for honey bees and pesticides – recent developments and ‘new issues’. *Pest Manag Sci* 66(11):1157-1162
- Thurston County Health Department - TCHD (2013) Sulfluramid CAS #: 4151-50-2. Health and Social Services. Available online at: <http://www.co.thurston.wa.us/health/ehipm/inscrodntslug>
- Tingle CC, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ (2003) Fipronil environmental fate, ecotoxicology and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol* 176(1):1-66
- Toxicology Data Network - TOXNET (2013) Hazardous Substance Database. Sulfluramid. National Library of Medicine, Revised 3/8/2013. Available online at: <http://toxnet.nlm.nih.gov>
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS (2009) Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* 4(8):e6481
- Valdovinos-Núñez GR, Quezada-Euán JJG, Ancona-Xiu P, Moo-Valle H, Carmona, A, Sánchez ER (2009) Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *J Econ Entomol* 102(5):1737-1742
- Wiese H (2005) *Apicultura, novos tempos*. Guaíba. RS. Agrolivros - Edição e Comercio de livros Ltda, 2ª ed, 378p.
- Williams GR, Alaux C, Costa C, Csáki T, Doublet V, Eisenhardt D, Fries e Kuhn R, McMahon DP, Medrzycki P, Murray TE, Natsopoulou ME, Neumann P, Oliver R, Paxton RJ, Pernal SF, Shutler D, Tanner G, Van Der Steen JJM,

- Brodtschneider R (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *J Apicult Res* 52(1):1-36
- Wilms J, Eltz T (2008). Foraging scent marks of bumble bees: foot print cues rather than pheromone signals. *Naturwissenschaften* 95(2):149-153
- Zanetti R (2007) Monitoramento de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) em florestas cultivadas. *Biológico* 69(2):129-131
- Zanetti R, Zanuncio JC, Mayhé-Nunes AJ, Medeiros AGB, Souza-Silva A (2003a) Combate sistemático de formigas-cortadeiras, com iscas granuladas, em eucaliptais com cultivo mínimo. *Rev Árvore* 27(3):387-392
- Zanetti R, Zanuncio JC, Vilela EF, Leite HG, Jaffé K, Oliveira AC (2003b) Level of economic damage for leaf-cutting ants in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Sociobiology* 42(2):433-442
- Zanetti R., Zanuncio JC, Souza-Silva A, Mendonça LA, Mattos JO, Rizental MS (2008) Eficiência de produtos termonebulígenos no controle de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em plantio de eucalipto. *Cienc Agrotec* 32(4):1313-1316
- Zanetti R, Zanuncio JC, Santos JC, Da Silva WLP, Ribeiro GT, Lemes PG (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests* 5(3):439-454
- Zanuncio JC, Mageste G, Pereira JMM, Zanetti R (2000) Utilización del cebo Mirex-S (sulfluramida 0.3%) para el control de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, (Hymenoptera: Formicidae) en área estratificada de hormigueros. *Rev Colomb Entomol* 26 (3-4): 157-160
- Zheng B, Wu Z, Xu B (2014) The effects of dietary protein levels on the population growth, performance, and physiology of honey bee workers during early spring. *J Insect Sci* 14(191):1-7