

CARLOS HENRIQUE DA SILVA ALMEIDA

**EXPOSIÇÕES SUBLETAIS A PESTICIDAS ALTERAM
COMPORTAMENTOS DE ABELHAS A NÍVEL DE INDIVÍDUOS E DE
COLÔNIAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

A447e
2017 Almeida, Carlos Henrique da Silva, 1989-
Exposições subletais a pesticidas alteram comportamentos de
abelhas a nível de indivíduos e de colônias / Carlos Henrique da Silva
Almeida. - Viçosa, MG, 2017.
vi, 48f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Inseticidas. 2. Fungicidas. 3. Abelhas - Comportamento. I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia.
Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22 ed. 632.9517

CARLOS HENRIQUE DA SILVA ALMEIDA

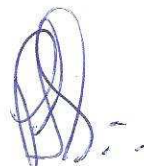
EXPOSIÇÕES SUBLETAIS A PESTICIDAS ALTERAM
COMPORTAMENTOS DE ABELHAS A NÍVEL DE INDIVÍDUOS E DE
COLÔNIAS

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

APROVADA: 18 de agosto de 2017.



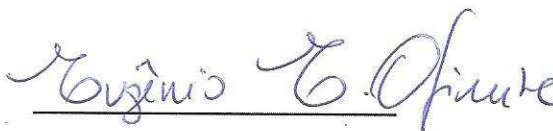
Khalid Haddi



Paulo Henrique Tschoeke



Weyder Cristiano Santana



Eugênio Eduardo de Oliveira
(Orientador)

Agradecimentos

Agradeço:

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo conhecimento adquirido;

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia pela oportunidade de cursar o mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

À equipe do Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados por todo auxílio e bons momentos;

Ao meu Orientador, Professor Eugênio Eduardo de Oliveira por toda assistência, amizade, paciência e confiança na execução deste trabalho;

Ao Dr. Hudson Vaner Ventura Tomé, pelas longas discussões que tanto contribuíram para a confecção desse trabalho;

Ao Dr. Khalid Haddi, por todo apoio e estímulo especialmente durante a execução dos experimentos;

Ao Professor Raul Narciso Cardoso Guedes por disponibilizar toda a estrutura do Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia;

Ao Professor Weyder Cristiano Santana, por todas explicações, atenção, amizade e excelente recepção no apiário;

À toda equipe do Apiário Experimental da UFV, Toninho Alves, Toninho Gaiola, Lulu, Íris e Geraldo (Cabrito), por toda amizade, ensino e apoio;

À Igreja Presbiteriana de Viçosa (IPV), por ter sido uma família durante esses quase oito anos em Viçosa;

À Dona Iraci e ao Coronel Allan Couto, por ter nos recebido tão bem em sua casa quando precisamos;

À meus pais, Marluce e João Carlos e ao meu irmão João Paulo por todo suporte concedido ao longo da minha vida;

À minha esposa, Marjorie, por estar sempre ao meu lado me ajudando e incentivando a seguir em frente;

Ao Senhor Deus, acima de tudo, por me capacitar e dar força nos momentos difíceis dessa curta, mas intensa caminhada do mestrado.

Resumo

ALMEIDA, Carlos Henrique da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Exposições subletais a pesticidas alteram comportamentos de abelhas a nível de indivíduos e de colônias.** Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.

Abelhas da tribo Meliponini e *Apis mellifera* são insetos sociais que possuem grande organização e divisão de trabalhos, no qual a desestruturação da colônia pode ocasionar a sua morte. As pesquisas sobre os efeitos adversos de pesticidas sobre organismos não alvo são escassas, pois produtos apontados como seguros tem sido relatados tão letais quanto os inseticidas neonicotinóides. Com intuito de contribuir para os estudos que abordem os efeitos subletais de pesticidas em polinizadores da região Neotropical, no primeiro capítulo desse trabalho, avaliamos em laboratório a influência do inseticida imidacloprid e dos fungicidas cerconil, clorotalonil e tiofanato-metílico sobre a capacidade de escolha por cores, atividades de caminhamento e taxa respiratória, em abelhas melíferas africanizadas, *Apis mellifera*, e abelhas sem ferrão, *Partamona helleri*. Nossos resultados revelam que *P. helleri* sem exposição a compostos químicos, alteram seu padrão de preferência por cores ao longo dos meses do ano (i.e., amarelo durante o verão e azul durante o inverno) e que concentrações subletais de imidacloprid, cerconil e clorotalonil são capazes de modificar seu padrão de escolha por cores. Em contrapartida, as abelhas melíferas africanizadas mantêm a preferência pela cor amarela independentemente das estações do ano e da exposição a imidacloprid, cerconil e clorotalonil, no entanto, tiofanato-metílico não apresentou diferença significativa na preferência pelas cores. Concentrações subletais de imidacloprid também reduziram a atividade de caminhamento em ambas as espécies e taxa respiratória em *P. helleri*, enquanto o fungicida cerconil alterou a atividade de caminhamento de *P. helleri* e a taxa respiratória de ambas as espécies. No segundo capítulo, buscamos representar as condições encontradas na natureza, sendo que em colônias já estabelecidas introduzimos abelhas marcadas que foram submetidas a concentrações equivalentes as CL₃₀ do inseticida imidacloprid e do fungicida cerconil, onde avaliamos os efeitos na mortalidade e dispersão dos indivíduos dentro da colônia. Nossos resultados mostram que além da mortalidade de indivíduos expostos aos produtos (efeito direto), há também elevada mortalidade de abelhas que não foram expostas diretamente (efeito indireto), e que o fungicida cerconil pode ser capaz de interferir na divisão de tarefas de abelhas operárias na colônia. Em geral, vimos que fungicidas classificados como seguros para as abelhas também podem desencadear uma gama de efeitos subletais prejudiciais. Portanto, demanda-se mais pesquisas sobre os possíveis efeitos de pesticidas ainda pouco explorados sobre o comportamento de abelhas, como é o caso do fungicida cerconil. Além disso, é imprescindível que haja mais estudos com abelhas sem ferrão, por serem mais sensíveis aos pesticidas que as africanizadas e por serem mais representativas do cenário Neotropical.

Abstract

ALMEIDA, Carlos Henrique da Silva, M.Sc., Universidade federal de Viçosa, August, 2017. **Sublethal exposures to pesticides alter bee behaviors at the level of individuals and colonies.** Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira.

Bees are social insects that have great organization and division of labor, in which the destruction of the colony can lead to their death. Research on the adverse effects of pesticides on non-target organisms is scarce since products that are considered safe have been reported to be as lethal as neonicotinoid insecticides. In the first chapter of this study, we evaluated under laboratory conditions, the influence of the insecticide imidacloprid and fungicides cerconil, chlorothalonil and thiophanate-methyl on the ability to choose and physiological activities (walking and respiratory rate) of the Africanized honeybees, *Apis mellifera*, and stingless bees, *Partamona helleri*. Our results show that *P. helleri* in natural conditions, without being exposed to chemical compounds, alter its color preference pattern during the months of the year (i.e. yellow during summer and blue during winter) and that sublethal concentrations of imidacloprid, cerconil and chlorothalonil are able to change their color preferences. In contrast, *A. mellifera* retains the preference for yellow regardless of seasons and exposure to imidacloprid, cerconil and chlorothalonil; however, thiophanate-methyl showed no significant difference in color preference. Sublethal concentrations of imidacloprid also reduced the walking activity of both species and respiration rate of *P. helleri*, while the fungicide cerconil altered the *P. helleri* walking activity and the respiratory rate of both species. In the second chapter, we conducted experiments in the field aiming to represent natural conditions. We introduced tagged bees that were submitted to a concentration equivalent to LC₃₀ of imidacloprid and cerconil in established colonies, and evaluated the effects on mortality and dispersion of individuals inside a observation hive. Our results show that in addition to the mortality of individuals exposed to the products (direct effect), there is also a high mortality of bees that were not exposed directly (indirect effect), and that cerconil may be able to interfere in the division of tasks of worker bees in the colony. In general, we have seen that fungicides classified as safe for bees can also trigger a range of harmful sublethal effects. Therefore, more research is required on the possible pesticide effects on bee behavior that are still little explored, such as the fungicide cerconil. In addition, more studies with stingless bees are needed because they are more sensitive to pesticides compared to Africanized honeybees and consequently more representative in the neotropical scenario.

Sumário

Introdução Geral	1
Referências	3
Sazonalidade, efeitos de pesticidas sobre a preferência por cores e atividades fisiológicas de abelhas africanizadas e sem ferrão	5
1.1 Introdução	8
1.2 Material e Métodos	10
1.2.1 <i>Abelhas</i>	10
1.2.2 <i>Exposição aos pesticidas</i>	10
1.2.3 <i>Bioensaios</i>	11
1.2.3.1 <i>Escolha por cores ao longo do ano</i>	11
1.2.3.2 <i>Escolha por cores após a exposição aos pesticidas</i>	12
1.2.3.3 <i>Atividade de caminhamento</i>	13
1.2.3.4 <i>Taxa respiratória</i>	13
1.2.4 <i>Análises estatísticas</i>	14
1.3 Resultados	14
1.3.1 <i>Escolha por cores ao longo do ano</i>	14
1.3.2 <i>Escolha por cores após a exposição aos pesticidas</i>	16
1.3.3 <i>Atividade de caminhamento</i>	19
1.3.4 <i>Taxa respiratória</i>	21
1.4 Discussões	22
1.5 Referências	24
Exposição subletal a pesticidas altera o comportamento de dispersão de <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae) a nível de colônia	28
2.1 Introdução	31
2.2 Material e Métodos	32
2.2.1 <i>Abelhas</i>	32
2.2.2 <i>Exposição aos pesticidas</i>	32
2.2.3 <i>Bioensaios</i>	33
2.2.3.1 <i>Monitoramento da mortalidade</i>	34
2.2.3.2 <i>Efeito dos tratamentos na dispersão</i>	34
2.2.4 <i>Análise estatística</i>	35
2.3 Resultados	36
2.3.1 <i>Monitoramento da mortalidade</i>	36

Sumário

2.3.2	<i>Efeito dos tratamentos na dispersão</i>	37
2.4	Discussões	40
2.5	Referências	44
	Conclusões Finais	47

Introdução Geral

1 As abelhas são fundamentais para a manutenção da biodiversidade e para a produção
2 de alimentos (Klein et al., 2007). De acordo com dados da Organização das Nações Uni-
3 das para a Alimentação e Agricultura (FAO), estima-se que aproximadamente 73% das
4 espécies vegetais cultivadas no planeta sejam polinizadas por abelhas (FAO, 2004).

5 Apesar de toda importância, as populações de abelhas têm sofrido reduções drásticas
6 ao redor do mundo, principalmente na Europa e em países da América do Norte (Potts
7 et al., 2015). Diversos estudos mostram um grande declínio das abelhas nativas e abelhas
8 melíferas (Kleijn & Raemakers, 2008; Freitas et al., 2009; Biesmeijer et al., 2006).

9 Entre as possíveis causas do decréscimo das populações de abelhas, tem-se o uso in-
10 discriminado de pesticidas, a ocorrência de doenças, patógenos, parasitas e mudanças
11 climáticas (Cox-Foster et al., 2007; Naug, 2009; Brown & Paxton, 2009). Embora ainda
12 não seja conhecido qual é a contribuição de cada agente estressor (Henry et al., 2012),
13 estudos tem apontado os pesticidas como o principal determinante do enfraquecimento
14 das colônias (Oldroyd, 2007).

15 Os inseticidas químicos da classe dos neonicotinóides tem recebido atenção considerá-
16 vel devido aos riscos que representam para o funcionamento e dinâmica do ecossistema
17 (Chagnon et al., 2015). Em particular, os de ação sistêmica, ou seja, que são difundidos
18 em todos os tecidos das plantas, são encontrados no néctar e pólen, principais fontes de
19 alimento das abelhas (Rortais et al., 2005).

20 A exposição aos pesticidas no campo, não é nocivo apenas para as abelhas forrageiras
21 que entram em contato direto com os produtos, mas também para toda a colônia, pois
22 quando retornam ao ninho levam consigo o material contaminado (Rortais et al., 2005;
23 Krupke et al., 2012). Tendo em vista essa situação, o processo de autorização da comer-
24 cialização de pesticidas exige estudos para garantir que as doses encontradas no campo

1 permaneçam abaixo dos níveis letais para as abelhas (Henry et al., 2012).

2 Entretanto, os efeitos subletais de pesticidas sobre abelhas não podem ser negligen-
3 ciados, podendo resultar na diminuição da capacidade de forrageamento (Henry et al.,
4 2012), na longevidade (Wu et al., 2011), no aprendizado (Stanley et al., 2015), na memó-
5 ria (Samuelson et al., 2016) e até mesmo na fecundidade e comportamento de abelhas
6 rainhas (Wu-Smart & Spivak, 2016).

7 A validade dos testes para avaliar a toxicidade de pesticidas agrícolas sobre as abelhas
8 tem sido questionada no contexto brasileiro. Estudos tem mostrado que inseticidas con-
9 siderados de baixo risco, fungicidas que até então eram ditos seguros e até mesmo fer-
10 tilizantes foliares contendo metais pesados, apresentaram alta toxicidade para espécies
11 de abelhas nativas, podendo chegar a causar alterações fisiológicas e comportamentais
12 (Tomé et al., 2015a; 2017; Rodrigues et al., 2016).

13 Tendo em vista a necessidade de um maior respaldo científico sobre os efeitos suble-
14 tais de pesticidas em abelhas nativas Neotropical, bem como uma maior avaliação com-
15 parativa com abelha africanizada, o primeiro capítulo desse trabalho, buscou avaliar a
16 influência dos meses do ano e os efeitos subletais do inseticida imidacloprid e do fungi-
17 cida cerconil e seus dois princípios ativos isolados, tiofanato-metílico e clorotalonil sobre
18 abelhas forrageiras africanizadas, *Apis mellifera*, e abelhas nativas brasileiras, *Partamona*
19 *helleri*.

20 Já no segundo capítulo desse estudo, analisou-se em condições similares as encontra-
21 das no campo, a dispersão e a mortalidade de *A. mellifera* submetidas a doses subletais
22 dos compostos imidacloprid e cerconil, e reintroduzidas em colônias não contaminadas,
23 visando detectar possíveis efeitos desses compostos sobre o comportamento dos indiví-
24 duos dentro da colônia.

25 Espera-se que as pesquisas aqui apresentadas, contribuam para aumentar a compre-
26 ensão dos efeitos dos pesticidas sobre o comportamento das abelhas nativas sem ferrão
27 e africanizadas, com o propósito de conceder informações que possam contribuir para a
28 preservação do ecossistema brasileiro.

1 Referências

- 2 **Biesmeijer J. C.; Roberts, S. P. M.; Reemer, M.; Ohlemüller, R.; Edwards, M.; Peeters,**
3 **T.; Schaffers, A. P.; Potts, S. G.; Kleukers, R., Thomas, C. D.; Settele, J.; Kunin, W.**
4 **E.** 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and The
5 Netherlands. *Science*, v. 313: 351-354.
- 6 **Brown, M. J.; Paxton, R. J.** 2009. The conservation of bees: a global perspective. *Apidolo-*
7 *gie*, 40(3): 410-416.
- 8 **Chagnon, M.; Kreutzweiser, D.; Mitchell, E. A. D.; Morrissey, C. A.; Noome, D. A.;**
9 **Van der Sluijs, J. P.** 2015. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem
10 functioning and services. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1): 119–134.
- 11 **Cox-Foster, D. L.; Conlan, S.; Holmes, E. C.; Palacios, G.; Evans, J. D.; Moran, N. A.;**
12 **Lan Quan, P.; Briese, T.; Hornig, M.; Geiser, D. M.; Martinson, V.; vanEngelsdorp, D.;**
13 **Kalkstein, A. L.; Drysdale, A.; Hui, J.; Zhai, J.; Cui, L.; Hutchison, S. K.; Simons, J. F.;**
14 **Egholm, M.; Pettis, J. S.; Ian Lipkin, W.** 2007. A metagenomic survey of microbes in
15 honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283-287.
- 16 **FAO.** 2004. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - the
17 international response. In: Freitas, B. M.; Pereira, J. O. P. (eds.). *Solitary bees: conserva-*
18 *tion, rearing and management for pollination*. Imprensa Universitária. Fortaleza, Brasil,
19 p: 19-2.
- 20 **Freitas, B. M.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Medina, L. M.; Kleinert, A. M. P.; Galetto,**
21 **L.; Nates-Parra, G.; Quezada-Euán, J. J. G.** 2009. Diversity, threats and conservation of
22 native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40: 332-346.
- 23 **Henry, M.; Beguin, M.; Requier, F.; Rollin, O.; Odoux, J. F.; Aupinel, P.; Aptel, J.; cha-**
24 **mitchian, S.; Decourtye, A.** 2012. A common pesticide decreases foraging success and
25 survival in honey bees. *Science*, 336(6079): 348-350.
- 26 **Kleijn, D.; Raemakers, A.** 2008. A retrospective analysis of pollen host plant use by stable
27 and declining bumblebee species. *Ecology*, by the Ecological Society of America, 89(7):
28 1811–1823.
- 29 **Klein, A. M.; Vaissiere, B. E.; Cane, J. H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S. A.;**
30 **Kremen, C.; Tscharntke, T.** 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for
31 world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274: 303-313.
- 32 **Krupke, C. H.; Hunt, G. J.; Eitzer, B. D.; Andino, G.; Given, K.** 2012. Multiple routes of
33 pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS one*, 7(1): e29268.
- 34 **Naug, D.** 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony
35 collapses. *Biological Conservation*, 142(10): 2369-2372.
- 36 **Oldroyd, B. P.** 2007. What's killing American honey bees?. *PLoS biology*, 5(6): e168.

- 1 **Page, R. E.; Peng, C. Y. S.** 2001. Aging and development in social insects with emphasis
2 on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*, 36(4): 695-711.
- 3 **Potts, S. G.; Roberts, S. P. M.; Dean, R.; Marris, G.; Brown, M.; Jones, R.; Settele, J.**
4 2010. Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural*
5 *Research*, 49: 15-22.
- 6 **Robinson, G. E.** 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual review*
7 *of entomology*, 37(1): 637-665.
- 8 **Rortais, A.; Arnold, G.; Halm, M. P.; Touffet-Briens, F.** 2005. Modes of honeybees ex-
9 posure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar
10 consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36(1): 71-83.
- 11 **Stanley, D. A.; Smith, K. E.; Raine, N. E.** 2015. Bumblebee learning and memory is
12 impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. *Scientific Reports*, 5.
- 13 **Wilson, E. O.** 1987. The causes of ecological success: the case of the ants. *Journal of*
14 *Animal Ecology*, 56: 1-9.
- 15 **Wu-Smart, J.; Spivak, M.** 2016. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide
16 exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific reports*, 6:
17 32108.

1 Sazonalidade, efeitos de pesticidas sobre a
2 preferência por cores e atividades fisiológicas
3 de abelhas africanizadas e sem ferrão

1

2 **Sazonalidade, efeitos de pesticidas sobre a preferência por cores**
3 **e atividades fisiológicas de abelhas africanizadas e sem ferrão**

4 **Resumo**

5 A relevância de temas relacionados à abelhas tem se elevado nos últimos anos devido
6 à redução drástica das populações destes polinizadores ao redor do mundo. Entre as
7 várias causas apontadas, destaca-se o uso indiscriminado de pesticidas, que além de in-
8 seticidas também incluem fungicidas que geralmente são classificados como seguros às
9 abelhas. Estes pesticidas, mesmo presentes em baixas concentrações em plantas visitadas
10 por abelhas, podem impactar direta e indiretamente na sobrevivência, comportamento
11 locomotor e capacidade cognitiva das abelhas como o reconhecimento de cores. Devido
12 à escassez de estudos que abordem esses efeitos subletais de pesticidas em polinizadores
13 da região Neotropical, tivemos como objetivo avaliar a influência do inseticida imida-
14 cloprid e dos fungicidas cerconil, clorotalonil e tiofanato-metílico sobre a preferência por
15 cores, atividade de caminhamento e na taxa respiratória de abelhas *Apis mellifera* africa-
16 nizadas e abelhas sem ferrão *Partamona helleri*. Os resultados mostraram que *P. helleri* al-
17 teram seu padrão de preferência por cores ao longo do ano (i.e., amarelo durante o verão
18 e azul durante o inverno) e que concentrações subletais de imidacloprid, cerconil e dose
19 de campo de clorotalonil foram capazes de modificar o padrão de escolha por cor desta
20 abelha. Em contrapartida, as abelhas melíferas africanizadas mantém a preferência pela
21 cor amarela independentemente das estações do ano e da exposição a imidacloprid, cer-
22 conil e clorotalonil, no entanto, tiofanato-metílico não apresentou diferença significativa
23 na preferência pelas cores. Concentrações subletais de imidacloprid também reduziram
24 a atividade de caminhamento em ambas as espécies e na taxa respiratória em *P. helleri*. Já
25 cerconil reduziu a taxa respiratória em ambas as espécies, e aumentou o caminhamento
26 em *P. helleri*. Nossos resultados demonstraram que *P. helleri* é mais suscetível a pestici-
27 das do que as abelhas africanizadas e que compostos como fungicidas também podem
28 desencadear uma gama de efeitos subletais nesses polinizadores.

29 **Palavras-chave:** meliponini, inseticida, fungicida, preferência por cor

1 **Abstract**

2 The relevance of bee-related themes has been rising in recent years due to the drastic
3 reduction of these pollinators populations around the world. Among the several causes
4 pointed out, the indiscriminate use of pesticides, which in addition to insecticides, fun-
5 gicides that are generally classified as bee-safe, are highlighted. These pesticides even
6 in low concentrations in plants visited by bees, can impact directly and indirectly in the
7 bees survival, locomotive behavior and cognitive capacity (e.g. the recognition of colors).
8 Due to the lack of studies that address these sublethal effects of pesticides on pollina-
9 tors in the neotropical region, this work aimed to evaluate the influence of the insecticide
10 imidacloprid and fungicides cerconil, chlorothalonil and thiophanate-methyl on the co-
11 lor preference, walking activity and respiratory rate of the Africanized honeybees, *Apis*
12 *mellifera*, and stingless bees, *Partamona helleri*. The results showed that *P. helleri* seasonally
13 alter its color preference pattern during the months of the year (i.e., yellow during sum-
14 mer and blue during winter) and sublethal concentrations of imidacloprid, cerconil and
15 chlorothalonil were able to change the color preference pattern of this bee. In contrast,
16 Africanized honeybees maintain their preference for yellow color regardless of seasons
17 and exposure to imidacloprid, cerconil and chlorothalonil; however, thiophanate-methyl
18 showed no significant difference in color preference. Sublethal concentrations of imida-
19 cloprid also reduced the walking activity of both species and respiration rate of *P. helleri*,
20 while the fungicide cerconil altered the *P. helleri* walking activity and the respiratory rate
21 of both species. Our results demonstrated that *P. helleri* is more susceptible to pestici-
22 des compared to Africanized honeybees and that some compounds classified as bee-safe,
23 fungicides for instance, can also trigger a range of sublethal effects in these pollinators.

24 **Key words:** meliponini, insecticides, fungicides, color preference.

1.1 Introdução

Entre as várias atividades exercidas pelo ecossistema, a polinização é sem dúvida uma das que trazem benefícios não somente ao homem, mas também a outros seres vivos (Costanza et al., 1997). Dentre os grupos de animais reconhecidamente como polinizadores, as abelhas assumem a posição relevante, já que promovem a reprodução de plantas, manutenção da biodiversidade e a produtividade de muitos ecossistemas naturais e agrícolas (Devillers, 2002). Embora o papel biológico das abelhas seja de suma importância, as populações desses insetos têm sofrido drásticas reduções ao redor do mundo nos últimos anos, levando a uma crescente investigação a respeito dos prováveis agentes causadores de *stress* e mortalidade à esses polinizadores (Goulson, 2015).

Vários fatores têm sido apontado como os possíveis causadores de redução das abelhas (Alaux et al., 2010). Entre elas, o uso indiscriminado de pesticidas tem sido apontado como um das principais causas (Goulson et al., 2015; Porrini et al., 2003). Ao visitar uma flor na busca de alimento, as abelhas forrageiras podem ser expostas a diversos pesticidas aplicados para o controle de pragas. Essa exposição tem sido alvo de estudos para entender os efeitos ocasionados sobre a saúde, o comportamento das abelhas e as consequências geradas na colônia (Mullin et al., 2010; Dolezal et al., 2016). Vários resíduos de inseticida, acaricida, fungicida ou herbicida podem ser encontrados em abelhas, pólen, mel e/ou cera (Mullin et al., 2010). Em um estudo realizado em colônias de abelhas melíferas na Bélgica foram encontrados vestígios de vários pesticidas, dentre esses há os de uso agrícola, os de uso exclusivo na agricultura e para ambas as finalidades (Ravoet et al., 2015). Estudos mostram que pesticidas em doses subletais podem interferir na capacidade de aprendizagem e memória das abelhas (Decourtye et al., 2003; Williamson & Wright, 2013). A exposição a imidacloprid por exemplo, reduziu a capacidade de aprendizagem visual em *A. mellifera* (Han et al., 2010). Já o tiametoxam induziu uma redução significativa na memória olfativa de *A. mellifera* (Aliouane et al., 2009). Os fungicidas iprodiona e uma mistura comercial dos fungicidas piraclostrobina + boscalida interromperam o reconhecimento do ninho em duas espécies de abelhas solitárias, *Osmia lignaria* e *Megachile rotundata*. (Artz et al., 2015).

Apesar das abelhas terem um cérebro pequeno em relação aos outros animais, esses

1 insetos possuem memória sofisticada (Zhang et al., 2006). Para que uma abelha operária
2 realize o forrageamento é necessário que esta memorize a cor, forma e fragrância das
3 flores, e sobretudo, o caminho de volta à colônia (Srinivasan, 2010). A cor muitas vezes é
4 um dos principais parâmetros para a localização das flores e para a orientação das abelhas
5 (Hsu & Yang, 2012).

6 Testes realizados com abelhas sem experiência de forrageamento mostraram que *A.*
7 *mellifera*, em seus primeiros voos forrageando, tem forte preferência inata por estímulos
8 azuis, pois geralmente flores desta cor apresentam maior recompensa de néctar (Giurfa
9 et al., 1995; Hsu & Yang, 2012; Dyer et al., 2016). A preferência inata é a predisposição
10 que permite a abelha selecionar uma potencial fonte de alimento antes de qualquer experi-
11 riência de forrageamento (Giurfa et al., 1995). No entanto, após o início do forrageamento
12 a preferência pelas fontes de alimentos pode sofrer variação dependendo da diversidade
13 florística do local onde as abelhas se encontram, ou seja, elas se adaptam aos recursos dis-
14 poníveis (condições locais), o que poderá diferir da preferência inata, o qual é chamado
15 de “aprendizagem associativa” (Reverté et al., 2016).

16 No Brasil, para que um pesticida seja comercializado é necessário que se faça avalia-
17 ções agronômicas, toxicológicas e ecotoxicológicas (Godoy & Oliveira, 2004), as quais são
18 baseadas em protocolos internacionais que utilizam *A. mellifera* como modelo de inseto
19 polinizador (Felton et al., 1986). Entretanto, é necessário haver testes que representam
20 melhor o cenário sul americano utilizando abelhas de linhagem africanizada (Whitfield
21 et al., 2006), e também abelhas silvestres, especialmente as abelhas sem ferrão.

22 Tem se observado a fragilidade das avaliações toxicológicas no contexto brasileiro. In-
23 seticidas considerados de baixo risco e fungicidas que até então eram ditos seguros, apre-
24 sentaram alta toxicidade para espécies de abelhas nativas (Tomé et al., 2015a; 2017). Até
25 mesmo fertilizantes foliares contendo metais pesados foram relatados podendo reduzir a
26 sobrevivência de operárias e causar alterações fisiológicas e comportamentais em abelhas
27 sem ferrão Neotropical, *Friesella schrottkyi* (Friese 1900) (Rodrigues et al., 2016).

28 No entanto, poucos estudos abordam os efeitos subletais de pesticidas em abelhas sem
29 ferrão Neotropical, principalmente considerando testes comparativos com abelhas melí-
30 feras africanizadas para entender até que ponto pode haver extrapolação para espécies
31 nativas. Tendo em vista esse contexto, o objetivo foi avaliar a influência da sazonalidade

1 e os efeitos subletais de pesticidas sobre a capacidade de escolha por cores, atividade
2 de caminhamento e taxa respiratória de abelhas *A. mellifera* africanizada e abelhas sem
3 ferrão *P. helleri*.

4 **1.2 Material e Métodos**

5 **1.2.1 Abelhas**

6 Abelhas forrageiras de quatro colônias das espécies *A. mellifera* e *P. helleri* foram cap-
7 turadas no apiário experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG,
8 Brasil, 20°45' S, 42°52' W) para a realização dos bioensaios. As abelhas foram anestesi-
9 adas com CO₂, colocadas em grupos de vinte abelhas em potes plásticos transparentes
10 (polipropileno atóxico) de 500 mL e mantidas em condições controladas correspondentes
11 as encontradas em suas respectivas colônias (28 ± 2°C para *P. helleri* e 34 ± 2°C para *A.*
12 *mellifera*, 70 ± 10% de umidade relativa), alimentadas com solução de água destilada e
13 sacarose (50% v/v) e mantidas no escuro total até a realização dos testes experimentais.

14 **1.2.2 Exposição aos pesticidas**

15 Vinte abelhas foram anestesiadas com CO₂ e colocadas em potes de plástico transpa-
16 rente (polipropileno atóxico) de 500 mL com perfurações na tampa. Quatro repetições
17 foram realizadas por tratamento, sendo que cada repetição correspondeu a uma colônia.
18 Em seguida, foram mantidas em jejum por uma hora antes da submissão aos tratamen-
19 tos de cada composto, que foram disponibilizados por cinco horas misturado ao alimento
20 (solução de sacarose a 50%) e, após esse período, substituídos por uma nova solução de
21 sacarose isenta de pesticida. O período de jejum antes da exposição aos pesticidas foi
22 necessário para padronizar o consumo da dieta pelas abelhas testadas. Todos bioensaios
23 foram realizados após 24 horas do início da exposição aos tratamentos.

24 Os quatro pesticidas selecionados são produtos amplamente utilizados em lavouras
25 comerciais no Brasil, sendo eles: o inseticida neonicotinóide imidacloprid [Evidence®
26 700 WG, 700 g ingrediente ativo (i.a.)/L, grânulos dispersíveis em água; Bayer CropS-
27 cience Ltda, São Paulo, SP, Brasil]; os fungicidas cerconil [Cerconil WP®, 700 g i.a./Kg,
28 pó molhável (WP); Iharabras S.A. Indústrias Químicas, Sorocaba, SP, Brasil], e seus dois

1 constituintes isolados, clorotalonil [Daconil BR[®], 750g i.a./Kg, WP; Iharabras S.A. Indús-
 2 trias Químicas, Sorocaba, SP, Brasil] e tiofanato-metílico [Cercobin 700 WP[®], 700g i.a./Kg,
 3 WP; Iharabras S.A. Indústrias Químicas, Sorocaba, SP, Brasil]. Os tratamentos com imi-
 4 dactoprid e cerconil foram correspondentes as concentrações letais (CL) estabelecidas em
 5 estudos realizados por Tomé et al (2017) (Tabela 1.1). Já clorotalonil e tiofanato-metílico,
 6 por apresentarem altos valores nas concentrações letais, utilizou-se as concentrações cor-
 7 respondentes as doses de campo (D. C.) recomendadas para o controle de diversos fun-
 8 gos, entre eles, *Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx, (1957) na cultura do melão
 9 e *Septoria lycopersici* Speg. (1881) no tomate (AGROFIT, 2017). Além disso, para cada
 10 composto utilizou-se controle contendo apenas solução de água e sacarose à 50%.

Tabela 1.1: Concentrações dos pesticidas utilizadas nos bioensaios.

Pesticidas	<i>Apis mellifera</i>				<i>Partamona helleri</i>			
	CL ₁	CL ₅	CL ₁₀	D. C.	CL ₁	CL ₅	CL ₁₀	D. C.
imidacloprid	1,05x10 ⁻⁴	2,36x10 ⁻⁴	3,64x10 ⁻⁴	-	2,14x10 ⁻⁶	9,87x10 ⁻⁶	2,24x10 ⁻⁵	-
cerconil	1,79x10 ⁻⁵	5,97x10 ⁻⁵	1,14x10 ⁻⁴	-	5,26x10 ⁻⁵	1,12x10 ⁻⁴	1,68x10 ⁻⁴	-
clorotalonil	-	-	-	1,5x10 ⁻³	-	-	-	1,5x10 ⁻³
tiofanato-metílico	-	-	-	4,9x10 ⁻⁴	-	-	-	4,9x10 ⁻⁴

Valores das concentrações em g i.a./mL

D.C.= Dose de campo

11 1.2.3 Bioensaios

12 1.2.3.1 Escolha por cores ao longo do ano

13 Com o intuito de avaliar a influência da sazonalidade sobre a preferência por cores
 14 de abelhas forrageiras, os bioensaios foram conduzidos em meses de todas as estações
 15 do ano. O termo sazonalidade nesse trabalho foi empregado visando facilitar o entendi-
 16 mento do experimento de resposta das abelhas pelas escolhas por cores em vários meses
 17 do ano. Grupos de vinte abelhas forrageiras foram coletadas em cada uma das 4 colônias
 18 estudadas, colocadas em potes plásticos transparente (polipropileno atóxico) de 500 mL,
 19 alimentadas com solução de sacarose 50% e mantidas em condições controladas (28 ±
 20 2°C para *P. helleri* e 34 ± 2°C para *A. mellifera*, 70 ± 10% de umidade relativa) por 24 horas
 21 antes dos testes experimentais. Em cada bioensaio foram avaliadas 40 abelhas de cada

1 colônia de *A. mellifera* e 20 abelhas por colônia de *P. Helleri*.

2 As avaliações dos bioensaios foram feitas utilizando Tubos-T de vidro, como no mé-
3 todo de avaliação proposto por Han et al. (2010). Os tubos foram feitos com dois braços
4 de 12 cm de comprimento cada e uma sessão de entrada com 20 cm de comprimento
5 (diâmetro interno 1,6 cm). Os dois braços foram completamente cobertos com papéis
6 capazes de filtrar raios amarelos ou azuis. Essas cores foram selecionadas por serem es-
7 pectralmente distintas para abelhas (Zhang et al., 1996; Han et al., 2010). As mensurações
8 das cores utilizadas na escala CIE L*a*b* (ou CIELAB) foram feitas utilizando um colorí-
9 metro (Color Reader CR-10 Minolta). A distribuição das cores é feita em três eixos: L*, a*
10 e b*. O eixo L* (vertical), representa a variação da luminosidade (e.g. branco absoluto te-
11 ria um valor de L* igual a 100 e preto absoluto teria um L* igual a 0). O eixo a* representa
12 a variação entre as cores vermelho (+a*) e verde (-a*). E o eixo b* representa a variação
13 entre as cores amarelo (+b*) e azul (-b*) (Marcus, 1998). O amarelo correspondeu a L =
14 83,10; a = -3,80; b = 90,30 (RGB: 231 207 0) e a cor azul L = 32,40; a = -6,80; b = -18,90
15 (RGB:46 80 106).

16 As avaliações foram realizadas em uma sala escura, onde os tubos foram colocados
17 sobre uma base preta contendo luzes de led's equidistantes sobre os braços do tubo. Os
18 insetos foram inseridos individualmente na entrada do Tubo-T, e as escolhas feitas pelas
19 abelhas entre as cores dos braços do Tubo (amarelo ou azul) foram registradas após o
20 trajeto. Para evitar interferências de trilhas de feromônio deixadas pelas abelhas, os tubos
21 eram devidamente higienizados com álcool etílico hidratado 92,8 INPM (álcool 96° GL)
22 e secados com fluxo de ar em alta temperatura antes de serem re-utilizados. Os lados
23 das cores foram alternadas em direita e esquerda com a finalidade de evitar efeito de
24 lateralidade nas escolhas.

25 Os dados radiação (KJm²), temperatura média (°C) e precipitação (mm) para o ano
26 amostral foram coletados da base de dados do Instituto Nacional de Meteorologia - IN-
27 MET (INMET, 2017).

28 **1.2.3.2 Escolha por cores após a exposição aos pesticidas**

29 Para esse bioensaio foram utilizados os mesmos Tubos-T de vidro e a mesma meto-
30 dologia de avaliação descrita anteriormente no item 1.2.3.1. A forma de submissão aos

1 tratamentos também já foram descritas no item 1.2.2. As abelhas foram mantidas em je-
2 jum por uma hora antes dos bioensaios. As abelhas que permaneceram na entrada do
3 tubo por um período maior que um minuto e não escolheram nenhuma das cores foram
4 desconsideradas nos testes. Foram utilizadas 20 abelhas por colônia (repetição), sendo
5 que os lados das cores também foram alternadas em direita e esquerda com a finalidade
6 de evitar efeito de lateralidade nas escolhas.

7 **1.2.3.3 Atividade de caminhamento**

8 Nos bioensaios de caminhamento foram utilizadas abelhas recém emergidas. Os inse-
9 tos foram expostos por ingestão como descrito no item 1.2.2, e subsequentemente trans-
10 feridos para placas de Petri de vidro (9,0 cm de diâmetro) em grupos de 5 abelhas da
11 mesma colônia. Para cada tratamento foram realizados ao todo quatro repetições, sendo
12 cada repetição correspondente a uma colônia.

13 O fundo de cada placa era coberto com papel filtro (Nalgon Equipamentos Científicos
14 Ltda, Itupeva, SP, Brasil) e, para evitar a fuga dos insetos, as placas eram cobertas com
15 filme PVC transparente. A atividade geral de caminhamento do grupo foi digitalmente
16 gravada durante 10 minutos usando um sistema de video-tracking equipado com uma
17 câmera CCD (ViewPoint LifeSciences, Montreal, QC, Canadá). As atividades totais dos
18 insetos foram registradas através de alterações de pixels entre duas imagens subsequen-
19 tes, registradas em intervalos a cada 10^{-2} s. As mudanças de pixels quantificadas entre
20 duas imagens representaram todos os movimentos dentro da arena (incluindo andar,
21 movimentos da parte do corpo e interações) (Tomé et al. 2015a).

22 **1.2.3.4 Taxa respiratória**

23 A taxa respiratória é uma forma de mensurar o nível de *stress* individual dos insetos
24 (Kestler, 1991; Rodrigues et al., 2016). Os bioensaios de respirometria foram realizados
25 24 h após as abelhas forrageiras terem sido expostas, ou não, no caso do controle, a uma
26 solução de sacarose contaminada com pesticida, conforme detalhado no item 1.2.2. A
27 taxa respiratória foi determinada utilizando 72 abelhas por tratamento para *A. mellifera*,
28 sendo colocadas em grupo de 3 abelhas por tubo. Já para *P. helleri* foram colocadas 4
29 abelhas por tubo, totalizando 96 abelhas por tratamento. Os grupos de abelhas foram

1 colocados em tubos de vidro (25 mL), e todo o conjunto de tubos foi conectado a um
2 sistema fechado, com temperatura ambiente de 25°C. A produção de CO₂ pelas abelhas
3 ($\mu\text{l CO}_2 / \text{h} / \text{abelha}$) foi determinada após um período de 3 horas por injeção de ar
4 livre de CO₂ na câmara, a um fluxo de 600 mL min⁻¹, utilizando um respirômetro TR3C
5 equipado com um analisador de CO₂ (Sable Systems International, Las Vegas, NV, EUA)
6 (Tomé et al., 2015b).

7 **1.2.4 Análises estatísticas**

8 Os resultados de escolha por cores ao longo do ano e dos bioensaios com os compostos
9 imidacloprid e cerconil foram submetidos a uma análise de regressão através do software
10 SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

11 Somente os resultados obtidos com os bioensaios para os compostos imidacloprid e
12 cerconil, (i.e., efeito dos pesticidas na preferência por cores; atividade de caminhamento e
13 taxa respiratória), foram analisados através de análise de covariância, efetuada utilizando
14 o pacote estatístico do software SAS (SAS Institute, 2008). Para os resultados obtidos dos
15 bioensaios com os compostos clorotalonil e tiofanato-metílico foram submetidos à análise
16 de variância e ao teste de HSD de Tukey ($P < 0,05$), ambos efetuados no SigmaPlot 12.0
17 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

18 **1.3 Resultados**

19 **1.3.1 Escolha por cores ao longo do ano**

20 Demonstramos que há discriminação de escolha entre as cores amarelo vs azul para
21 abelhas forrageiras nas duas espécies testadas ao longo de um ano. Para *A. mellifera* não
22 foi observado variação significativa da escolha por cores ao longo do ano, onde a prefe-
23 rência média pela cor amarela foi de 70,56% e de 29,44% para a cor azul (Figura 1.1A). Na
24 espécie *P. helleri* observou-se alteração significativa no padrão de preferência pelas cores
25 ao longo do ano ($R^2=0,35$; $F_{2,17}= 4,50$; $P=0,0270$), no qual a escolha pelo amarelo foi inten-
26 sificada nos meses mais quentes do ano (com média de 72,50% em novembro e 67,34% em
27 janeiro), enquanto o aumento da preferência pelo azul se deu nos meses mais frios (com
28 média de 51,50% em maio e de 63,27% em junho) (Figura 1.1B). Os dados radiação solar

1 (KJm²) e temperatura média (°C) para o ano amostral (Figura 1.2 A, B) mostram que os
 2 meses de avaliação mais quentes apresentaram médias de 751KJm²; 21,5°C em novem-
 3 bro e 885KJm²; 22,89°C e janeiro, e os meses mais quentes médias de 598KJm²;19,07°C
 4 em maio e 396KJm²;16,87°C em junho. Os meses de maior preferência pelo amarelo se
 5 encontram em época de maior incidência de chuvas (Figura 1.2 C)

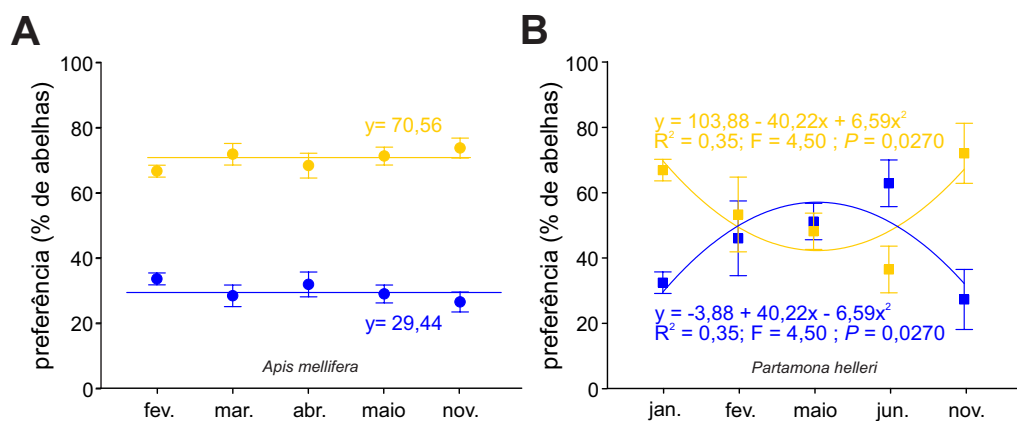


Figura 1.1: Escolha por cores ao longo do ano para *Apis mellifera* (A) e para *Partamona helleri* (B).

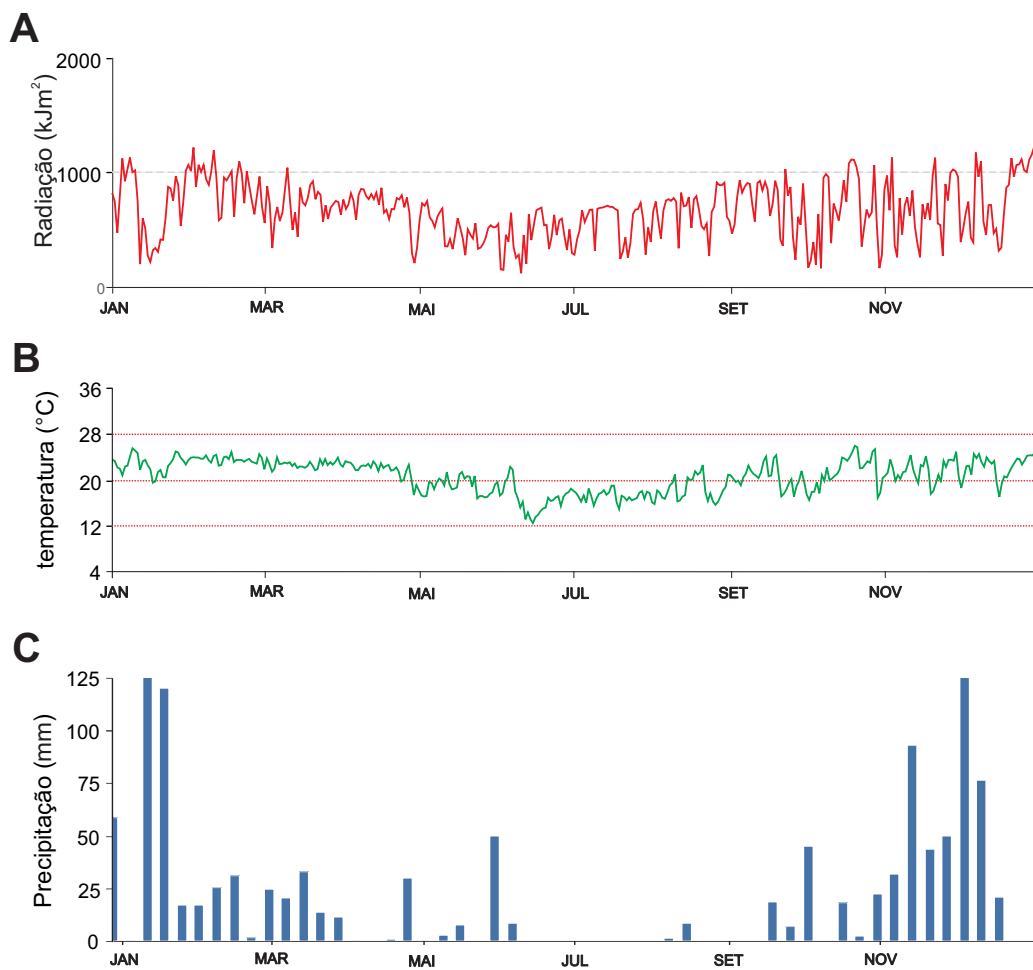


Figura 1.2: . Dados de radiação (A), temperatura (B) e precipitação (C) registradas para o município de Viçosa-MG no ano de 2016. Fonte: INMET.

1 1.3.2 Escolha por cores após a exposição aos pesticidas

2 Novembro foi o mês selecionado para realização dos bioensaios de avaliação do efeito
 3 da exposição a pesticidas na capacidade de escolha por cores. No período avaliado, não
 4 houve diferença significativa quanto a preferência pelas cores entre as espécies estudadas
 5 sem a exposição aos pesticidas, sendo que a média de preferência pela cor amarela foi de
 6 aproximadamente 71% para ambas (n = 430/espécie). Esses valores se assemelham ao
 7 encontrado por Han et al. (2010) em testes com *A. mellifera*.

8 Os modelos de análise de covariância para os testes de preferência por cores para as
 9 duas espécies estudadas, *A. mellifera* e *P. helleri*, após submetidas aos tratamentos foram
 10 significativos (Tabela 1.2). Embora o inseticida imidacloprid não tenha afetado signifi-

1 cativamente a preferência de *A. mellifera* (média de escolha pela cor amarela de 62.5%,
 2 Figura 1.3A), este mesmo inseticida reduziu significativamente a preferência de *P. helleri*
 3 pelo amarelo a partir da menor concentração estudada ($R^2 = 0,51$; $F_{2,13} = 6,82$; $P = 0,0094$)
 4 (Figura 1.3B).

Tabela 1.2: Resultados das análises de covariância para as avaliações de preferência por cores, atividade de caminhamento e taxa respiratória para as duas espécies, *Apis mellifera* e *Partamona helleri*.

Fonte de variação	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P
	Preferência visual			Atividade de caminhamento			Taxa respiratória		
Modelo	7	6,49	<0,0001*	7	14,65	<0,0001*	7	85,36	<0,0001*
Resíduo	56	-	-	72	-	-	376	-	-
Espécie (E)	1	8,42	0,0053*	1	0,60	0,4421	1	547,08	<0,0001*
Pesticida (P)	1	0,74	0,3934	1	62,51	<0,0001*	1	12,95	0,0004*
Concentração (C)	1	25,48	<0,0001*	1	0,87	0,3539	1	28,58	<0,0001*
E x P	1	2,27	0,1379	1	8,33	0,0051*	1	1,49	0,2223
E x C	1	8,05	0,0063*	1	0,92	0,3410	1	1,39	0,2399
P x C	1	0,00	1,0000	1	26,66	<0,0001*	1	4,15	0,0424*
E x P x C	1	0,45	0,5037	1	2,70	0,1048	1	1,89	0,1695

* Significativo a $P < 0,05$

5 De maneira semelhante, o fungicida cerconil não afetou a preferência por cores de *A.*
 6 *mellifera*, tendo média de escolha pelo amarelo de 71.2% (Figura 1.3C). Porém, a pre-
 7 ferência pela cor amarela de *P. helleri* exposta ao cerconil reduziu de forma linear com
 8 o aumento da concentração do fungicida ($R^2 = 0,78$; $F_{1,14} = 49,71$; $P < 0,0001$) (Figura
 9 1.3D). Por outro lado, não houve diferença entre os tratamentos e o controle para as duas
 10 espécies, submetidas as doses de campo dos dois ingredientes ativos isolados, clorotalo-
 11 nil e tiofanato-metílico ($P > 0.05$). No entanto, as concentrações de campo do fungicida
 12 tiofanato-metílico não apresentou diferença entre a preferência por amarelo e azul em *A.*
 13 *mellifera* enquanto o fungicida clorotalonil não apresentou diferença entre a preferência
 14 por cor em *P. helleri*. (Figura 1.3E, F).

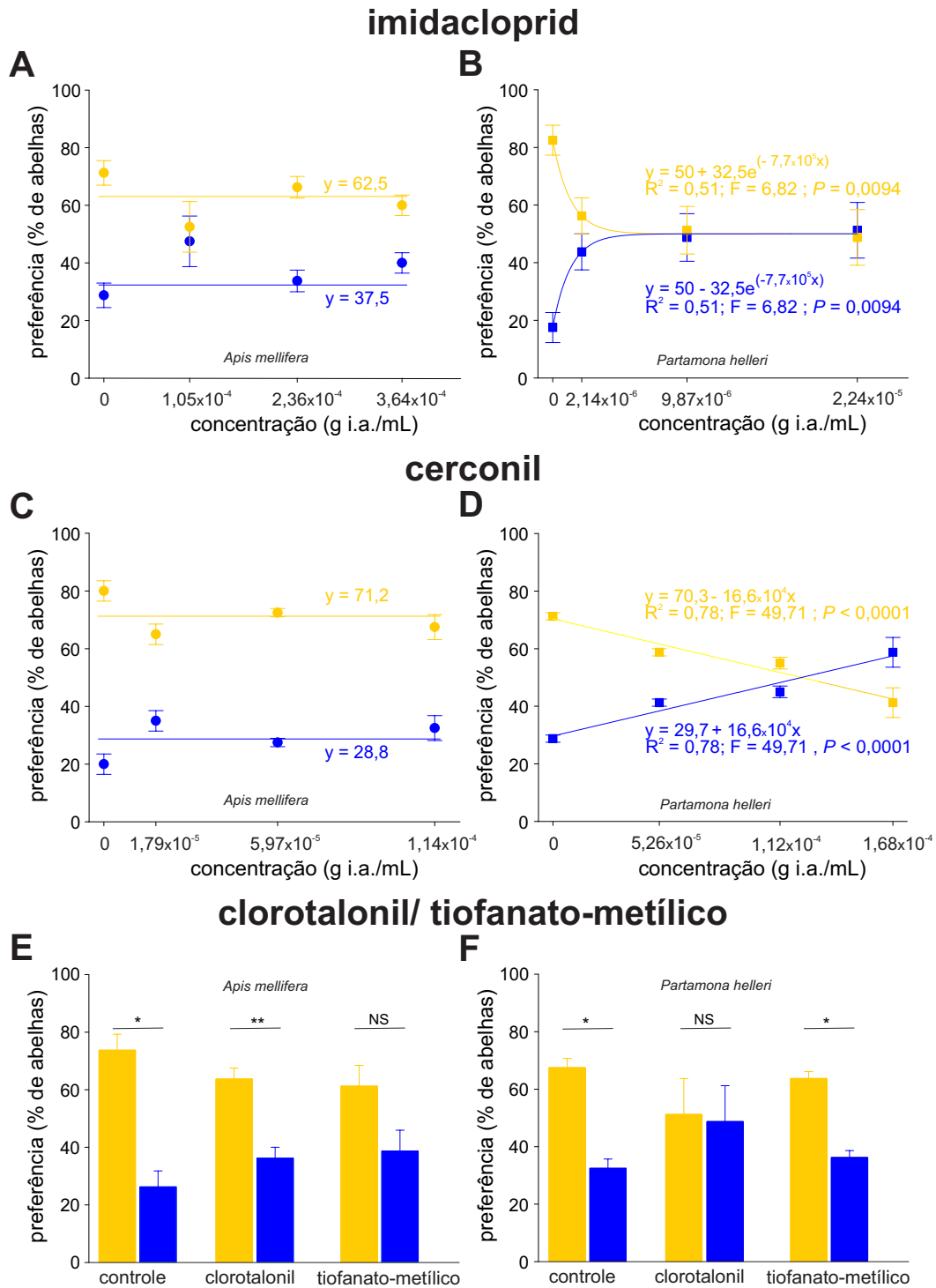


Figura 1.3: . Efeito de pesticidas na preferência por cores de (A, C e E) *Apis mellifera* e (B, D e F) *Partamona helleri*. (N= 80 abelhas /tratamento/ espécie). As diferenças significativas são os resultados pelo teste HSD de Tukey (NS = não significativo, * = $P < 0,001$, ** = $P = 0,002$)

1 **1.3.3 Atividade de caminhamento**

2 Os resultados do modelo de análise de covariância para os testes de atividade de ca-
3 minhamento para as duas espécies estudadas, *A. mellifera* e *P. helleri*, foram significativos
4 (Tabela 1.2). Operárias de *A. mellifera* expostas a imidacloprid tiveram a atividade de
5 caminhamento reduzida linearmente com o aumento da concentração ($R^2 = 0,32$; $F_{1,18} =$
6 $8,31$; $P = 0,0099$) (Figura 1.4A). Já operárias de *P. helleri* tiveram a atividade de caminha-
7 mento reduzida com o aumento das concentrações dos pesticidas ($R^2 = 0,71$; $F_{2,13} = 15,55$;
8 $P = 0,0004$) (Figura 1.4B).

9 O fungicida cerconil não alterou a atividade de caminhamento de *A. mellifera* nas con-
10 concentrações testadas, média registrada para Δ pixels de 419,95 por grupo de abelhas (Fi-
11 gura 1.4C). No entanto, operárias de *P. helleri* tiveram aumento linear na atividade de
12 caminhamento com o aumento da concentração do fungicida ($R^2 = 0,26$; $F_{1,14} = 4,99$; P
13 $= 0,0424$) (Figura 1.4D). Os fungicidas clorotalonil e tiofanato-metílico não alteraram sig-
14 nificativamente a atividade de caminhamento das duas espécies ($P > 0.05$) (Figura 1.4E,
15 F).

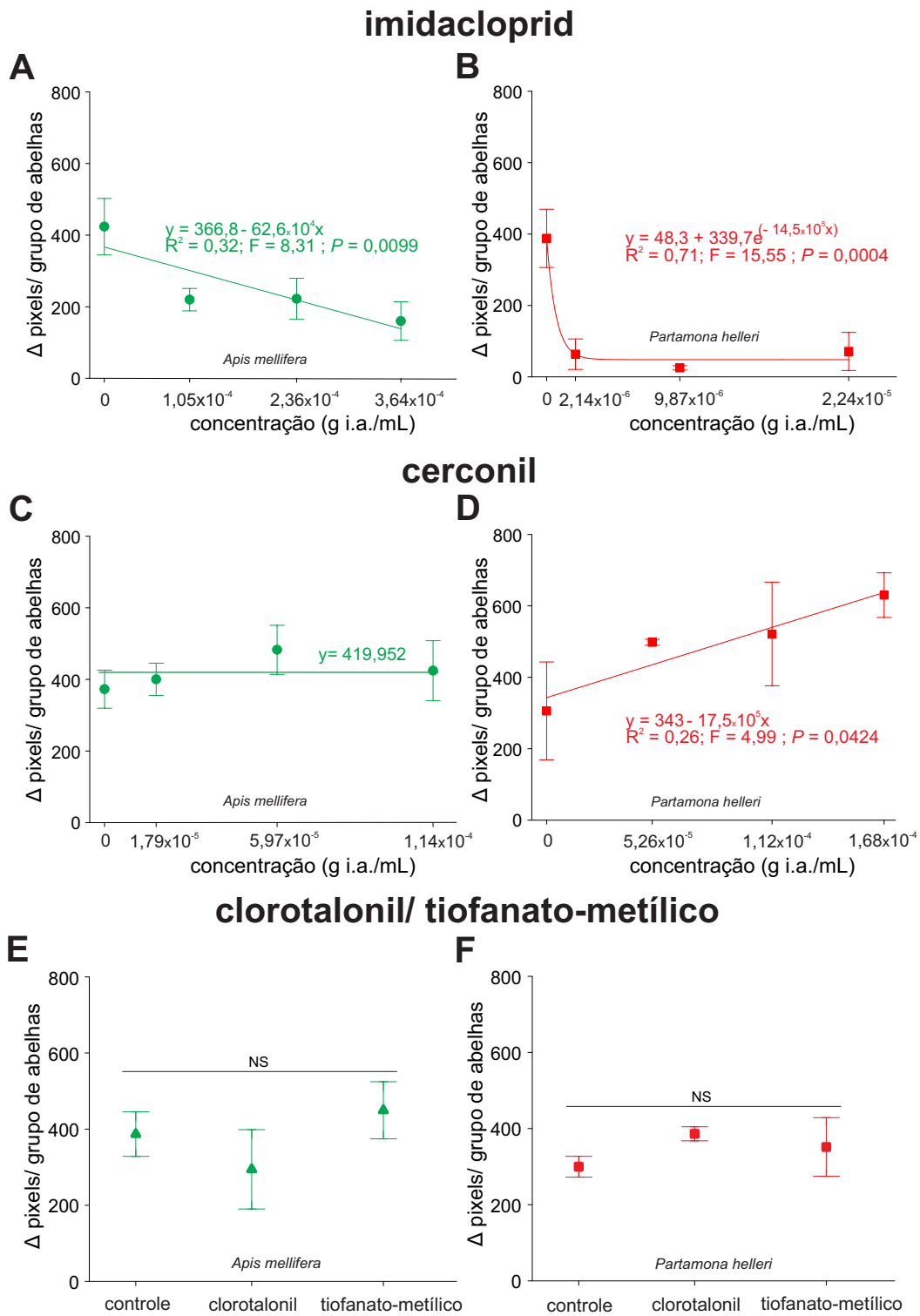


Figura 1.4: Efeito de pesticidas na atividade de caminhada de (A, C e E) *Apis mellifera* e (B, D e F) *Partamona helleri*. (N= 20 abelhas /tratamento/ espécie). As barras são os resultados da ANOVA seguida pelo HSD de Tukey ($P < 0,05$) (NS = não significativo).

1 1.3.4 Taxa respiratória

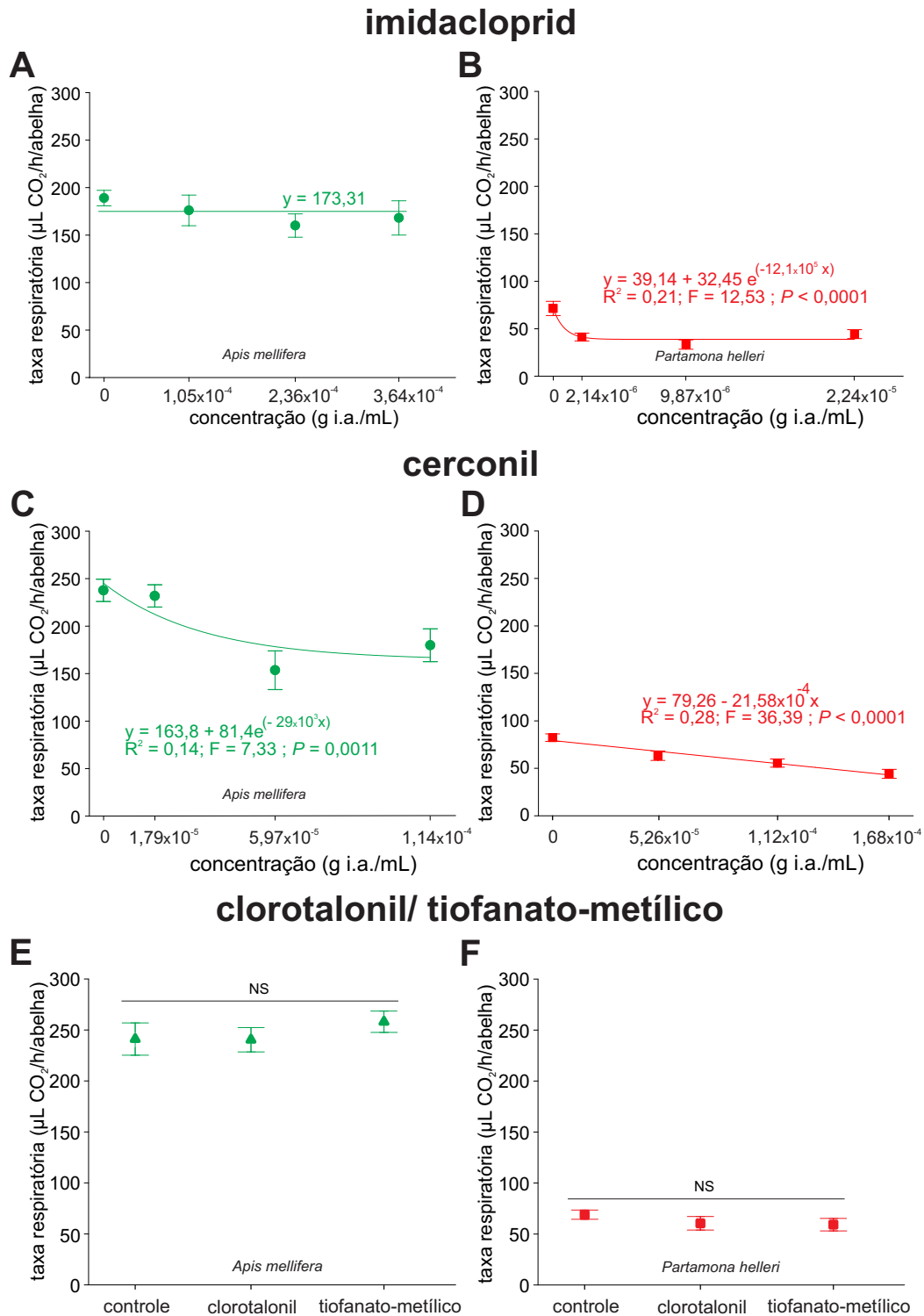


Figura 1.5: Efeito de pesticidas sobre a taxa respiratória de (A, C e E) *Apis mellifera* (N= 72 abelhas/ tratamento) e (B, D e F) *Partamona helleri* (N= 96 abelhas/ tratamento). As barras são os resultados da ANOVA seguida pelo HSD de Tukey ($P < 0,05$) (NS = não significativo).

1 Os resultados do modelo de análise de covariância para os testes de taxa respiratória
2 para as duas espécies estudadas, *A. mellifera* e *P. helleri*, foram significativos (Tabela 1.2).
3 Operárias de *A. mellifera* não tiveram a taxa respiratória alterada com as concentrações de
4 imidacloprid utilizada (Figura 1.5 A). Já operárias de *P. helleri* tiveram a taxa respiratória
5 reduzida a partir da menor concentração de imidacloprid ($R^2 = 0,21$; $F_{2,93} = 12,53$; $P <$
6 $0,0001$) (Figura 1.5 B).

7 Operárias de ambas espécies expostas ao fungicida cerconil também tiveram reduções
8 na taxa de respiração com o aumento da concentração estudada (*A. mellifera*: $R^2 = 0,14$;
9 $F_{2,93} = 7,33$; $P = 0,0011$; *P. helleri*: $R^2 = 0,28$; $F_{1,94} = 36,39$; $P < 0,0001$) (Figura 1.5C, D). Os
10 fungicidas clorotalonil e tiofanato-metílico não afetaram significativamente a taxa respi-
11 ratória das espécies ($P > 0.05$) (Figura 1.5E, F).

12 1.4 Discussões

13 Nesse trabalho, utilizamos o método com Tubo-T desenvolvido por Han et al. (2010),
14 para avaliar a preferência por cores de abelhas forrageiras das espécies *A. mellifera* e *P.*
15 *helleri* ao longo de um ano e também analisamos o efeito de pesticidas sobre essas abelhas
16 tratadas com doses subletais do inseticida imidacloprid e do fungicida cerconil, e doses
17 de campo dos fungicidas clorotalonil e tiofanato-metílico.

18 Primeiro demonstramos que há discriminação de escolha entre as cores amarelo vs
19 azul para abelhas forrageiras nas duas espécies testadas ao longo de um ano. Contudo,
20 chama a atenção que a resposta na escolha da cor durante um ano amostral foi constante
21 em *A. mellifera*, fato este não verificado em *P. helleri*, que apresentou variação na prefe-
22 rência pelas cores amarelo e azul ao longo dos meses. Os meses de maior escolha pelo
23 amarelo apresentaram maiores temperaturas, radiação solar e uma maior concentração
24 de chuvas, indicando maior disponibilidade de pólen e néctar no campo. Já os meses com
25 maior escolha pelo azul apresentaram valores menores tanto de radiação solar quanto de
26 temperatura (Figura 1.2). Isto demonstra que *P. helleri* pode estar respondendo a alte-
27 rações de condições ambientais diferentemente de *A. mellifera*. Fidalgo e Kleinert (2010)
28 descreveram efeitos ambientais sobre a quantidade e a qualidade dos recursos coletados
29 por *Melipona rufiventris* em regiões de Mata Atlântica no Brasil. Por isso, faz-se necessá-

1 rio maiores estudos sobre essa alteração comportamental. Acredita-se que esta alteração
2 esteja relacionada ao ambiente no qual cada espécie evoluiu (e.g. disponibilidade de re-
3 cursos, temperatura, radiação solar) , sendo uma adaptação fisiológica/comportamental
4 relacionada a condição ambiental, especialmente em Meliponini.

5 *Apis mellifera* não apresentou diferença na escolha das cores ao longo do ano, provavel-
6 mente por se tratar de uma espécie de hábito migratório por enxameação em condições
7 de *stress*, como relacionado a variação de temperatura, umidade, radiação solar e baixa
8 disponibilidade de alimento (Burrill & Dietz, 1981; Pereira et al, 2010; Allen, 1955, 1956,
9 1960).

10 Por outro lado, nas abelhas sem ferrão não ocorre migração ou abandono dos ninhos
11 para outro local, haja visto que a rainha fisogástrica é incapaz de voar novamente, ou
12 seja, uma vez estabelecido o ninho, o enxame não abandona o local, sendo utilizado
13 outras estratégias adaptativas da colônia a condições adversas (Wille, 1983).

14 Nos testes para avaliar o efeito de doses subletais de pesticidas sintéticos, imidacloprid
15 e cerconil, na preferência por cores de abelhas forrageiras, encontramos que, as altera-
16 ções decorrentes dos efeitos dos tratamentos mostraram claramente que tanto imidaclo-
17 prid quanto cerconil, a partir de pequenas concentrações (CL₁), podem causar impactos
18 negativos sobre as abelhas sem ferrão forrageiras. Isso implica que as abelhas tratadas
19 realizavam escolhas significativamente distintas das abelhas não tratadas. Uma vez que
20 a cor é um dos parâmetros utilizados pelas abelhas para o reconhecimento das flores das
21 plantas na busca do alimento (Hsu & Yang, 2012), essa alteração no padrão atual de esco-
22 lha, pode impactar diretamente na busca por alimento no campo. Como também o *stress*
23 ocasionado pelo produto provoca alterações na taxa respiratória e no caminhar, re-
24 duzindo a dimensão da área explorada pelas abelhas.

25 Durante o forrageamento, operárias podem ser expostas a diversos pesticidas. Já foi
26 relatado que a formulação do fungicida comercial cerconil, até então dita segura para
27 as abelhas, apresentou toxicidade semelhante aos inseticidas neonicotinóides, tanto para
28 *A. mellifera* quanto *P. helleri* (Tomé et al., 2017). No entanto, nosso trabalho mostrou de
29 forma inédita que esses compostos são capazes de provocar alterações consideráveis no
30 comportamento cognitivo de *P. helleri*, como também alterações na atividade locomotora
31 e respiratória.

1 Os neonicotinóides são um importante grupo de inseticidas neurotóxicos, que atuam
2 como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Elbert et al., 2008). Já
3 foi demonstrado que thiamethoxam, um inseticida neonicotinóide, impacta na eficiência
4 de forrageamento ou na capacidade de retorno para a colônia de abelhas operárias de
5 *Bombus terrestris* L (Samuelson et al., 2016). Por sua vez, não se sabe exatamente o modo
6 de ação do fungicida cerconil no organismo das abelhas, e nem como eles podem estar in-
7 fluenciando nas alterações do comportamento. No entanto, vimos que tiofanato-metílico
8 foi capaz de influenciar na preferência por cores de *A. mellifera* e clorotalonil em *P. helleri*.
9 Experimentos anteriores observaram aumento da toxicidade de timol e tau-fluvalinato
10 ao ser misturado com o fungicida clorotalonil (Johnson et al., 2013).

11 Estudos neurofisiológicos detalhados são necessários para descobrir onde e como os
12 fungicidas atuam no corpo das abelhas. As abelhas nativas Neotropicais respondem a
13 variações que ocorrem ao longo dos meses do ano e também são mais suscetíveis a pes-
14 ticidas do que as abelhas africanizadas, reforçando o argumento de Tomé et al (2017),
15 de que as abelhas nativas são modelos mais adequados para serem usadas em testes de
16 avaliações de risco na região Neotropical.

17 Portanto, é necessário haver estudos mais aprofundados dos efeitos subletais em po-
18 linizadores, como também o efeito de misturas utilizadas no campo, especialmente nas
19 abelhas sem ferrão, para que futuramente se possa desenvolver uma legislação própria
20 que atenda as especificidades dos países da região Neotropical, visando preservar de
21 forma mais eficiente a diversidade de espécies nativas.

22 1.5 Referências

23 **AGROFIT.** 2017. Consulta de produtos formulados. Disponível em: <[http://agro-
24 fit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>.

25 Acesso em: 25 mar. de 2017.

26 **Alaux, C.; Brunet, J. L.; Dussaubat, C.; Mondet, F.; Tchamitchan, S.; Cousin, M.; Bril-
27 lard, J.; Baldy, A.; Belzunces L. P.; Le Conte, Y.** 2010. Interactions between *Nosema*
28 microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Mi-
29 crobiology*, 12(3): 774-782.

30 **Aliouane, Y.; El Hassani, A. K.; Gary, V.; Armengaud, C.; Lambin, M.; Gauthier, M.**
31 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on beha-

- 1 vior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(1): 113-122.
- 2 **Allen, M. Delia.** 1955. Observations on honeybees attending their queen. *The British*
3 *Journal of Animal Behaviour*, 3 (2): 66-69.
- 4 **Allen, M. Delia.** 1956. The behaviour of honeybees preparing to swarm. *The British*
5 *Journal of Animal Behaviour*, 4 (1): 14-22.
- 6 **Allen, M. Delia.** 1960. The honeybee queen and her attendants. *Animal Behaviour*, 8 (3):
7 201-208.
- 8 **Artz, D. R.; Pitts-Singer, T. L.** 2015. Effects of fungicide and adjuvant sprays on nesting
9 behavior in two managed solitary bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. *PloS one*,
10 10(8): e0135688.
- 11 **Burrill, R. M.; Dietz, A.** 1981. The response of honey bees to variations in solar radiation
12 and temperature. *Apidologie*, 12 (4): 319-328.
- 13 **Costanza, R.; d'Arge, R.; Groot, R.; Farber, S.; Grasso, M.; Hannon, B.; Naeem, S.;**
14 **Limburg, K.; Paruelo, J.; O'Neill, R.V.; Raskin, R.; Sutton, P.; Van den Belt, M.** 1997.
15 The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387: 253-260.
- 16 **Decourtye, A.; Lacassie, E.; Pham-Delègue, M. H.** 2003. Learning performances of ho-
17 neybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the sea-
18 son. *Pest Management Science*, 59 (3): 269-278.
- 19 **Devillers, J.** 2002. The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxi-
20 cology. In: Devillers J.; Pham-Dele'gue M. H. *Honey Bees Estimating the Environmental*
21 *Impact of Chemicals*. Taylor & Francis, London, pp 1-332.
- 22 **Dolezal, A. G.; Carrillo-Tripp, J.; Miller, W. A.; Bonning, B. C.; Toth, A. L.** 2016. Pollen
23 contaminated with field-relevant levels of cyhalothrin affects honey bee survival, nu-
24 tritional physiology, and pollen consumption behavior. *Journal of Economic Entomo-*
25 *logy*, 109(1): 41-48.
- 26 **Dyer, A. G.; Boyd-Gerny, S.; Shreshtha, M.; Lunau, K.; Garcia, J. E.; Koethe, S.; Wong,**
27 **B. B. M.** 2016. Innate colour preferences of the Australian native stingless bee *Tetragonula*
28 *carbonaria* Sm. *Journal of Comparative Physiology A*, 202: 603.
- 29 **Elbert, A.; Haas, M.; Springer, B.; Thielert, W.; Nauen R.** 2008. Applied aspects of
30 neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*, 64: 1099-1105.
- 31 **Felton, J. C.; Oomen, P. A.; Stevenson, J. H.** 1986. Toxicity and Hazard of pesticides to
32 honeybees: Harmonization of test methods. *Bee World*, 67 (3): 114-124.
- 33 **Fidalgo, A. O.; Kleinert, A. M. P.** 2010. Floral preferences and climate influence in nec-
34 tar and pollen foraging by *Melipona rufiventris* Lepageletier (Hymenoptera: Meliponini) in
35 Ubatuba, São Paulo State. Brazil. *Neotropical Entomology*, 39(6): 879-884.

- 1 **Giurfa, M.; Nunez, J.; Chittka, L.; & Menzel, R.** 1995. Colour preferences of flower-naive
2 honeybees. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and*
3 *Behavioral Physiology*, 177(3), 247-259.
- 4 **Godoy, R. C. B.; Oliveira, M. I.** 2004. Agrotóxicos no Brasil: processo de registro, riscos à
5 saúde e programas de monitoramento. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos.
- 6 **Goulson, D.** 2015. De-intensify agriculture. *Nature*, 521 (7552); S58-S58.
- 7 **Goulson, D.; Nicholls, E.; Botías, C.; Rotheray, E. L.** 2015. Bee declines driven by com-
8 bined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957.
- 9 **HAN, P.; Niu, C. Y.; Lei, C. L.; Cui, J. J.; Desneux, N.** 2010. Use of an innovative T-
10 tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects
11 of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L.
12 *Ecotoxicology*, 19 (8): 1612-1619.
- 13 **Hsu, P. S.; Yang, E. C.** 2012. The critical cue in pattern discrimination for the honey bee:
14 Color or form?. *Journal of Insect Physiology*, 58 (7): 934-940.
- 15 **INMET.** 2017. Consulta de rede de estações. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>.
16 Acesso em: 10 ago. de 2017.
- 17 **Johnson, R. M.; Dahlgren, L.; Siegfried, B. D.; Ellis, M. D.** 2013. Acaricide, fungicide
18 and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 8 (1): e54092.
- 19 **Kestler, P.** 1991. Cyclic CO₂ release as a physiological stress indicator in insects. *Compa-*
20 *rative Biochemistry and Physiology*, 100: 207–211.
- 21 **Marcus, R. T.** 1998. The measurement of color. In: *Color for Science, Art and Technology*.
22 Amsterdam, Elsevier Science: 31–96.
- 23 **Mullin, C. A.; Frazier, M.; Frazier, J. L.; Ashcraft, S.; Simonds, R.; vanEngelsdorp, J.;**
24 **Pettis, J. S.** 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries:
25 implications for honey bee health. *PLoS one*, 5(3): e9754.
- 26 **Pereira, A. M.; Chaud-Netto, J.; Bueno, O. C.; Arruda, V. M.** 2010. Relationship among
27 *Apis mellifera* L. stings, swarming and climate conditions in the city of Rio Claro, SP,
28 Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16 (4): 647-
29 653.
- 30 **Porrini, C.; Sabatini, A. G.; Girotti, S.; Fini, F.; Monaco, L.; Celli, G.; Bortolotti, L.;**
31 **Ghini, S.** 2003. The death of honey bees and environmental pollution by pesticides: the
32 honey bees as biological indicators. *Bulletin of Insectology*, 56(1): 147-152.
- 33 **Ravoet, J.; Reybroeck, W.; Graaf, D. C.** 2015. Pesticides for apicultural and/or agri-
34 cultural application found in Belgian honey bee wax combs. *Bulletin of Environmental*
35 *Contamination and Toxicology*, 94(5): 543-548.

- 1 **Reverté, S.; Retana, J.; Gómez, J. M.; Bosch, J.** 2016. Pollinators show flower colour
2 preferences but flowers with similar colours do not attract similar pollinators. *Annals of*
3 *Botany*, 118(2): 249-257.
- 4 **Rodrigues, C. G.; Kruger, A. P.; Barbosa, W. F.; Guedes, R. N. C.** 2016. Leaf Fertilizers
5 Affect Survival and Behavior of the Neotropical Stingless Bee *Friesella schrottkyi* (Melipo-
6 nini: Apidae: Hymenoptera). *Journal of Economic Entomology*, 109 (3): 1001-1008.
- 7 **Samuelson, E. E.; Chen-Wishart, Z. P.; Gill, R. J.; Leadbeater, E.** 2016. Effect of acute
8 pesticide exposure on bee spatial working memory using an analogue of the radial-arm
9 maze. *Scientific Reports*, 6: 38957.
- 10 **Srinivasan, M. V.** 2010. Honey bees as a model for vision, perception, and cognition.
11 *Annual Review of Entomology*, 55: 267–284.
- 12 **Tomé, H. V. V.; Ramos, G. S.; Araújo, M. F.; Santana, W. C.; Santos, G. R.; Guedes, R. N.**
13 **C.; Maciel, C. D.; Newland, P. L.; Oliveira, E. E.** 2017 Agrochemical synergism imposes
14 higher risk to Neotropical bees than to honeybees. *Royal Society Open Science*, 4: 160866.
- 15 **Tomé, H. V. V.; Barbosa, W. F.; Corrêa, A. S.; Gontijo, L. M.; Martins, G. F.; Guedes,**
16 **R. N. C.** 2015a. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on
17 survival and activity. *Annals of Applied Biology*, 167 (2): 186–196.
- 18 **Tome, H. V. V.; Barbosa, W. F.; Martins, G. F.; Guedes, R. N. C.** 2015b. Spinosad in the
19 native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsec-
20 ticide. *Chemosphere*, 124: 103–109.
- 21 **Whitfield, C. J.; Behura, S. K.; Berlocher, S. H.; Clarck, A. G.; Jonhston, S. J.; Sheppard,**
22 **W. S.; Smith, D. R.; Suarez, A. V.; Weaver, D.; Tsutsui, N. D.** 2006. Thrice out of África:
23 Ancienl and recente expansionsof the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314 (5799): 642-
24 645.
- 25 **Wille, A.** 1983. Biology of the stingless bees. *Annual Review of Entomology*, 41-64.
- 26 **Williamson, S. M.; Wright, G. A.** 2013. Exposure to multiple cholinergic pesticides im-
27 pairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 216
28 (10): 1799-1807.
- 29 **Zhang, S. W.; Bartsch, K.; Srinivasan, M. V.** 1996. Maze learning by honeybees. *Neuro-*
30 *biology of Learning and Memory*, 66 (3): 267-282.
- 31 **Zhang, S.; Schwarz, S.; Pahl, M.; Zhu, H.; Tautz, J.** 2006. Honeybee memory: a honeybee
32 knows what to do and when. *Journal of Experimental Biology*, 209: 4420-4428.
- 33

1 Exposição subletal a pesticidas altera o
2 comportamento de dispersão de *Apis*
3 *mellifera* (Hymenoptera: Apidae) a nível de
4 colônia

1

2 **Exposição subletal a pesticidas altera o comportamento de**
3 **dispersão de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) a nível de**
4 **colônia**

5 **Resumo**

6 As abelhas possuem papel indispensável na manutenção da biodiversidade. O uso
7 indiscriminado de pesticidas tem sido apontado como um dos principais fatores para
8 o decréscimo das populações de abelhas no mundo. Até mesmo produtos ditos segu-
9 ros, como o fungicida cerconil, tem demonstrado causar efeitos negativos nas colônias.
10 Nesse sentido, esse trabalho buscou analisar os efeitos das doses subletais do inseticida
11 imidacloprid e do fungicida cerconil nas abelhas africanizadas em condições que se as-
12 semelham as encontradas na natureza. Quatro colônias foram estabelecidas em núcleos
13 de observação e duzentas abelhas submetidas aos tratamentos equivalentes as CL₃₀ de
14 cada produto foram reintroduzidas em cada núcleo. Com intuito de identificar as abe-
15 lhas tratadas, marcou-se as abelhas com tinta atóxica, sendo que para cada tratamento
16 foi selecionado uma cor distinta. Na entrada de cada núcleo foram colocadas bandejas
17 plásticas para coletar as abelhas mortas que foram eliminadas durante os cinco primeiros
18 dias. Essas abelhas foram diariamente contabilizadas. Também efetuou-se filmagens em
19 ambos os lados dos núcleos nos cinco primeiros dias e no décimo dia após a reintrodução
20 das abelhas tratadas. Por intermédio dos vídeos gravados foi avaliada a dispersão das
21 abelhas marcadas. Nossos resultados mostraram que além da mortalidade dos indiví-
22 duos tratados (marcados) há uma mortalidade considerável de indivíduos não tratados
23 (não marcados) e que, cerconil pode ser capaz de interferir na divisão de tarefas na colô-
24 nia, sendo observado uma migração precoce das abelhas da área central para a periferia
25 do ninho. Diante dos resultados desse trabalho, percebe-se a necessidade de ampliar as
26 pesquisas sobre o efeito de fungicidas em organismos não alvo, inclusive abelhas nativas,
27 que tem demonstram sofrer impactos mais significantes.

28 **Palavras chave:** *Apis mellifera*; inseticida; imidacloprid; fungicida; cerconil.

1 **Abstract**

2 Bees play an essential role in maintaining biodiversity. The indiscriminate use of pes-
3 ticides has been pointed out as one of the main factors for the decrease of bee popula-
4 tions in the world. Even so-called safe products, such as the fungicide cerconil, have
5 been shown to cause negative effects on bee colonies. In this sense, this work sought to
6 analyze the effects of sublethal doses of the insecticide imidacloprid and fungicide cerco-
7 nil on Africanized bees under field conditions that resemble those found in nature. Four
8 colonies were established in observation hives and two hundred bees were submitted to
9 the LC₃₀ of each product and were reintroduced in each hive. In order to identify the
10 bees treated, the bees were tagged with non-toxic paint, and for each treatment a diffe-
11 rent color was selected. We placed a plastic tray at the entrance of each observation hive
12 to collect the dead bees that were eliminated during the first five days. These bees were
13 counted daily. Filming was also performed on both sides of the hives in the first five days
14 and on the tenth day after the introduction of the treated bees. By means of the videos
15 recorded the dispersion of the marked bees was evaluated. Our results showed that in
16 addition to the mortality of the treated individuals (marked) there was a considerable
17 mortality of untreated (unmarked) individuals and that, cerconil may be able to interfere
18 in the division of tasks in the colony, being observed an early bee migration from the cen-
19 tral area of the hive to the periphery. Considering the results of this work, it is noticeable
20 the need to broaden the research on the effects of fungicides on non-target organisms,
21 such as the Brazilian native bees, that have shown to suffer significant effects of these
22 chemicals.

23 **Key words:** *Apis mellifera*; insecticide; imidacloprid; fungicide; cerconil.

2.1 Introdução

O forte decréscimo nas populações de abelhas tem intensificado o interesse em compreender as razões desse problema. Vários estudos têm destacado o papel dos pesticidas agrícolas como uma das possíveis causas desse declínio (Oldroyd, 2007; Ellis et al., 2010; Potts et al., 2010; VanEngelsdorp & Meixner, 2010; Blacquièrre et al., 2012; Henry et al., 2012). Recentemente, tem se obtido fortes evidências de que produtos ditos seguros para polinizadores afetam tanto a sobrevivência quanto o comportamento das abelhas (Rodrigues et al., 2016; Tomé et al., 2017).

Os insetos eussociais têm como característica marcante a organização e a divisão do trabalho entre os indivíduos da colônia, sendo isso crucial para o sucesso ecológico desse grupo (Wilson, 1987). Em colônias de abelhas eussociais há a presença de uma rainha, alguns ou nenhum zangão e várias operárias (Page & Peng, 2001). As operárias são a casta mais numerosa dentro da colônia e suas funções são modificadas a medida que envelhecem (Robinson, 1992; Page & Peng, 2001).

Geralmente, quando as abelhas operárias adultas emergem, elas se concentram nas regiões próximas ao centro dos quadros de cria, exercendo a função de limpeza das células. Entre o 3º e o 5º dia, elas deixam essa função e passam a ficar encarregadas de alimentar as larvas e a rainha (Sagili et al., 2011; Seeley & Kolmes, 1991). Com aproximadamente 10 - 12 dias, migram para a periferia da colônia, próximo à saída, onde ficam encarregadas de receber, processar e armazenar alimentos; e posteriormente proteger a entrada. A última função é exercer atividades fora da colônia, transformando-se em forrageiras (Seeley & Kolmes, 1991).

Contudo, a transição das atividades não é unidirecional, pois o ambiente interno e externo tem grande influência na dinâmica da divisão do trabalho. De acordo com a necessidade da colônia, as abelhas operárias podem antecipar essa transição, retardando ou até mesmo regressando a uma atividade anterior (Robinson, 1992).

Caso algum fator externo seja capaz de desestruturar a organização ou a divisão de tarefas das operárias, é possível que haja a morte da colônia (Russell et al., 2013). Por exemplo, o tiametoxam, um inseticida neonicotinóide de ação sistêmica, é capaz de causar redução na sobrevivência e na capacidade de forrageamento de *A. mellifera* (Henry et

1 al.,2012). Já o glifosato, um herbicida amplamente utilizado na agricultura para o controle
2 de ervas daninhas, é capaz de afetar a trajetória de vôo em *A. mellifera* (Balbuena et al.,
3 2015). O impacto na capacidade de forrageamento interfere diretamente na quantidade
4 de alimento que entra na colônia (Feltham et al., 2014).

5 Poucos trabalhos analisam os efeitos dos pesticidas na mortalidade e na organização
6 das tarefas na colônia em condições que se assemelham a realidade encontrada no campo.
7 Em condições reais, as abelhas são expostas ao pesticidas durante o forrageamento e ao
8 voltar para a colônia levam esses produtos. Isto é, não é a colônia inteira que é exposta
9 diretamente aos pesticidas, e sim uma parte dos indivíduos.

10 Portanto, o objetivo desse trabalho foi monitorar a mortalidade de *Apis mellifera* sub-
11 metidas a doses subletais dos compostos imidacloprid e cerconil, e reintroduzidas em
12 colônias não contaminadas; bem como o efeito desses compostos sobre a dispersão dos
13 indivíduos dentro da colônia.

14 **2.2 Material e Métodos**

15 **2.2.1 Abelhas**

16 Abelhas recém nascidas de até um dia de vida da espécie *A. mellifera* foram obtidas
17 em quatro colônias já estabelecidas do apiário experimental da Universidade Federal de
18 Viçosa (UFV, Viçosa, MG, Brasil, 20°45' S, 42°52' W) para a realização dos bioensaios.
19 O pronoto de cada abelha foi marcado com tinta atóxica para que fosse possível identi-
20 ficar os indivíduos tratados, sendo que, para cada tratamento foi definida uma cor. As
21 abelhas foram mantidas em condições controladas, semelhante as encontradas na colônia
22 (34±2°C, 70±10% de umidade relativa); acondicionadas em potes de plástico transparente
23 (polipropileno atóxico) de 500 mL com perfurações na tampa; alimentadas com solução
24 de água destilada e sacarose (50% v/v) e mantidas no escuro total até a realização dos
25 testes experimentais.

26 **2.2.2 Exposição aos pesticidas**

27 Quatro repetições foram realizadas por tratamento, sendo que cada repetição corres-
28 ponde a uma colônia. As abelhas foram mantidas em jejum por uma hora antes da sub-

1 missão aos tratamentos equivalente a CL_{30} de cada produto (imidacloprid e cerconil).
2 O período de jejum antes da exposição aos pesticidas foi necessário para padronizar o
3 consumo da dieta pelas abelhas testadas. Além disso, um grupo de controle foi alimen-
4 tado apenas com solução de água destilada e sacarose (50% v/v), sendo disponibilizados
5 por cinco horas em condições controladas ($34\pm 2^\circ\text{C}$, $70\pm 10\%$ de UR). Após esse período,
6 um total de duzentas abelhas marcadas e expostas a cada tratamento foram reintrodu-
7 zidas em colônias estabelecidas em núcleos de observação. Cada núcleo recebeu apenas
8 abelhas de um único tratamento por teste.

9 Os dois pesticidas selecionados são produtos amplamente utilizados em lavouras co-
10 merciais no Brasil, sendo eles: o inseticida neonicotinóide imidacloprid [Evidence[®] 700
11 WG, 700 g ingrediente ativo (i.a.)/L, grânulos dispersíveis em água; Bayer CropScience
12 Ltda, São Paulo, SP, Brasil] e o fungicida cerconil [Cerconil WP[®], 700 g i.a./Kg, pó mo-
13 lhável (WP); Iharabras S.A. Indústrias Químicas, Sorocaba, SP, Brasil]. Os tratamentos
14 foram correspondentes as concentrações, de imidacloprid $8,96\times 10^{-4}$ g i.a./mL e, para o
15 cerconil $4,35\times 10^{-4}$ g i.a./mL, as quais equivalem a CL_{30} de cada composto, estabelecidas
16 em estudos realizados por Tomé et al (2017).

17 **2.2.3 Bioensaios**

18 Quatro colônias foram estabelecidas em núcleos de observação, que consiste em uma
19 moldura de madeira (52,5 x 43,5 x 5,5 cm) com dois vidros em ambos os lados e dois
20 quadros (um quadro de melgueira e um quadro de ninho com cria). Os núcleos de ob-
21 servação foram colocados dentro de um galpão protegido e com ligação para o exterior
22 através de túneis de acrílicos transparentes.

23 As filmagens foram realizadas em três etapas entre os meses de maio e junho de 2017.
24 Os tratamentos foram alternados de modo com que cada colônia recebesse em períodos
25 diferentes todos os tratamentos (imidacloprid, cerconil e controle), totalizando quatro
26 repetições para cada tratamento.

27 Após a reintrodução das abelhas, tratadas e controle, nas colônias estabelecidas nos
28 núcleos de observação, foram realizadas filmagens de 10 minutos em ambos os lados dos
29 núcleos, simultaneamente, durante os cinco primeiros dias e uma ao décimo dia. Em
30 volta de cada núcleo era montado uma cúpula confeccionada em tecido preto para evitar

1 a formação de reflexo nos vidros laterais dos núcleos e uma lâmpada de led era instalado
2 para iluminar o interior da cúpula (Figura 2.1). No primeiro dia de avaliação, as abelhas
3 foram introduzidas nos núcleos. Para possibilitar a aclimatação delas, aguardou-se o
4 período de uma hora antes de realizar as filmagens.

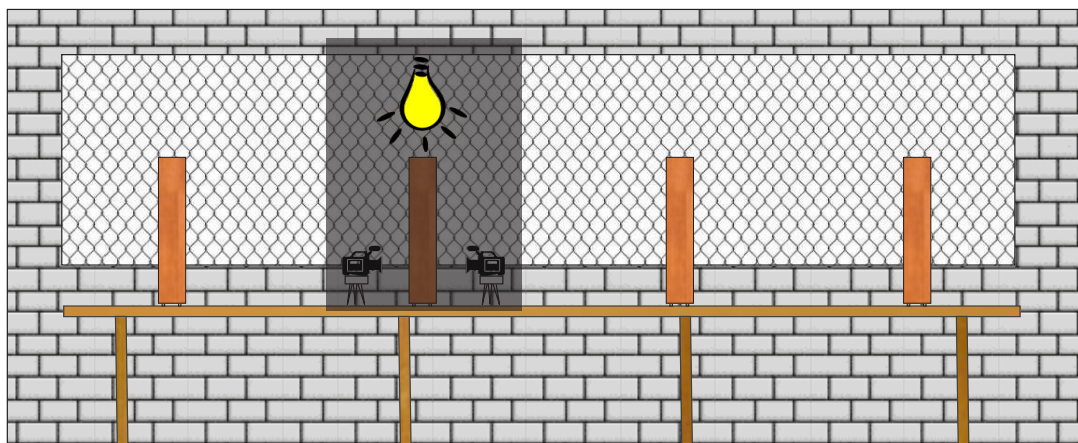


Figura 2.1: Representação da disposição dos núcleos de observação com as colônias de *Apis mellifera* no interior do galpão onde foram avaliados os experimentos. A região em negrito representa a cúpula de tecido feita para o isolamento do núcleo durante a filmagem e a lâmpada representa a fonte de luz.

5 .

6 **2.2.3.1 Monitoramento da mortalidade**

7 Para avaliar o efeito dos produtos na mortalidade dos núcleos, colocou-se uma bandeja
8 de plástico (40,0 x 26,0 x 7,0 cm) na entrada de cada núcleo, com vaselina nas paredes para
9 evitar o ataque de formigas. Dessa forma, foi possível coletar uma amostra das abelhas
10 mortas que foram descartadas. A contagem e o descarte das abelhas mortas (marcadas e
11 não marcadas) presentes nas bandejas de cada núcleo foram realizadas diariamente até o
12 quinto dia.

13 **2.2.3.2 Efeito dos tratamentos na dispersão**

14 As tarefas exercidas pelas abelhas dentro do ninho estão diretamente associadas à sua
15 localização. Para avaliar se os compostos estudados são capazes de interferir na capa-
16 cidade de dispersão, realizou-se a contagem das abelhas aderidas aos quadros de cria e
17 de mel através dos vídeos, dos dois lados simultaneamente, dos cinco primeiros dias da

1 introdução das abelhas tratadas, e depois, somente no décimo dia. Nos vídeos os núcleos
2 foram divididos, virtualmente, em nove quadrantes (Figura 2.2). Cada vídeo possui 10
3 minutos de duração, por isso, em cada gravação foram realizadas ao todo 10 contagens,
4 uma a cada minuto, das abelhas presentes em cada um dos 9 quadrantes

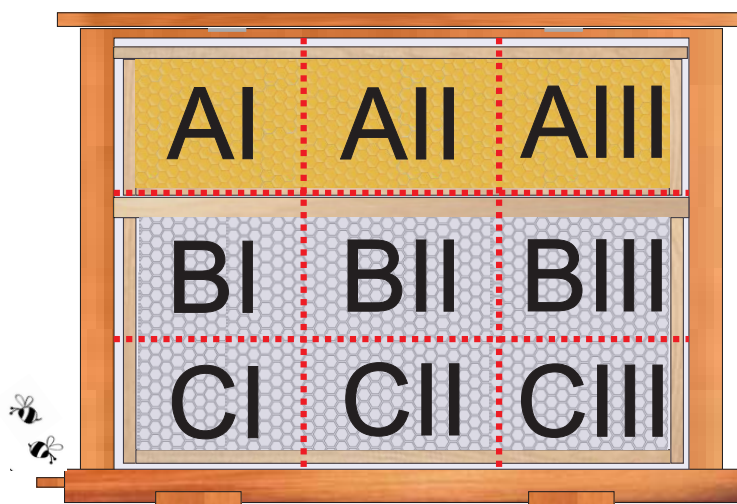


Figura 2.2: Representação da divisão da área amostral da colônia de *Apis mellifera* em quadrantes para a realização das avaliações de dispersão. Quadrantes **A** representam o quadro de melgueira e os quadrantes **B** e **C** representam o quadro de ninho com cria.

5 .

6 **2.2.4 Análise estatística**

7 As análises estatísticas executadas para os dados obtidos no monitoramento da morta-
8 lidade foram: i) Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($P < 0,05$), ambos efetu-
9 ados no SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA); ii) Análise de Covariância,
10 efetuada utilizando o pacote estatístico do software SAS (SAS Institute, 2008); e iii) Aná-
11 lise de Regressão usando o procedimento de ajuste de curva do Software SigmaPlot 12.0.

12 Já para a dispersão, efetuou-se a Análise de Regressão usando o procedimento de ajuste
13 de curva do Software SigmaPlot 12.0 para detectar tendências nos parâmetros diários de
14 dispersão das abelhas marcadas ao longo do tempo. O modelo de regressão foi selecio-
15 nado com base na parcimônia, em erros padrões mais baixos e com R^2 mais altos. Sendo
16 que, para cada tratamento os modelos de regressão foram considerados diferentes entre
17 si, se os limites de confiança de seus parâmetros não foram justapostos.

2.3 Resultados

2.3.1 Monitoramento da mortalidade

Os resultados do modelo de análise de covariância para mortalidade foram significativos, demonstrando haver diferença entre os tratamentos imidacloprid, cerconil e controle ($F_{8,162} = 61,63; P = <0,0001$) (Figura 2.3A).

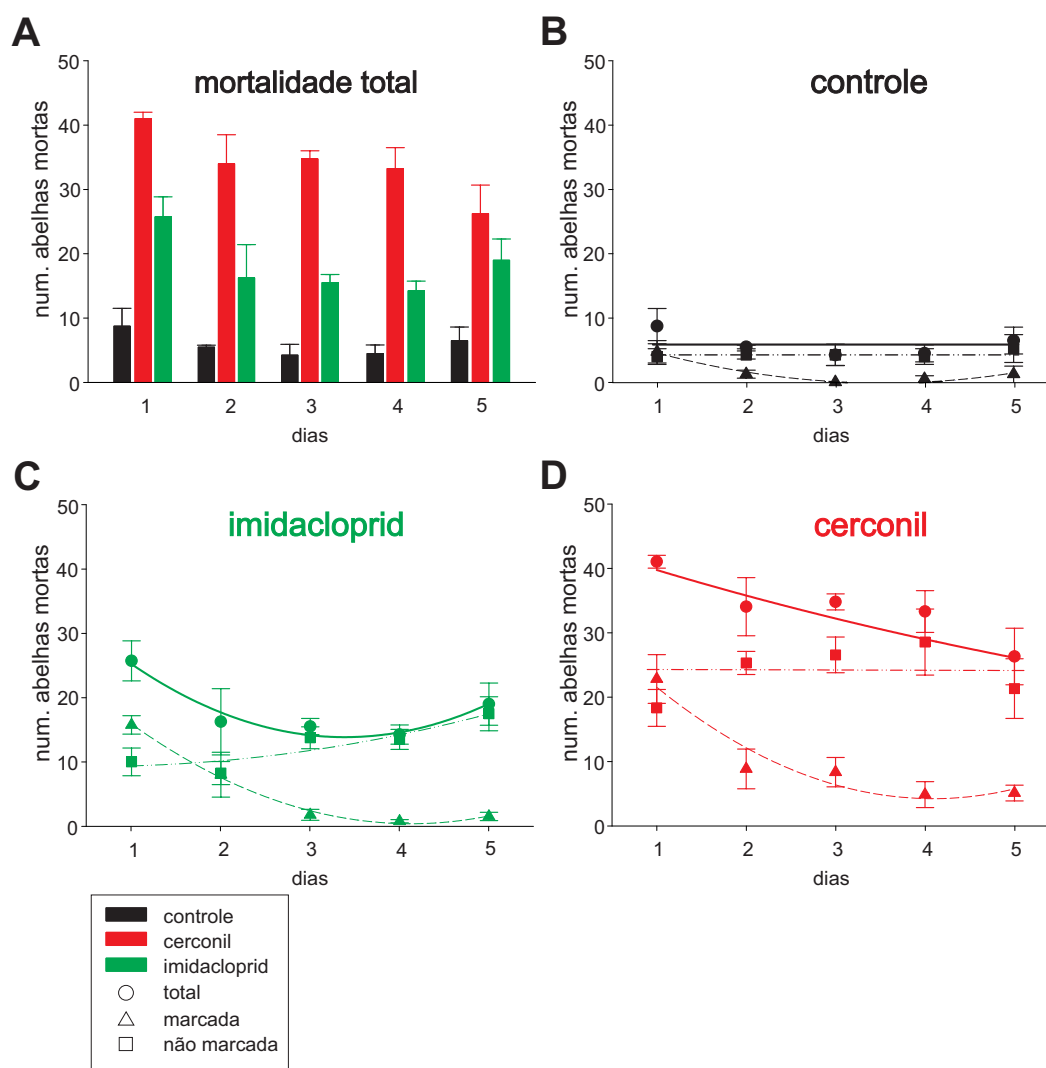


Figura 2.3: Efeito de doses subletais dos pesticidas, CL_{30} , (C) imidacloprid e (D) cerconil na mortalidade de *Apis mellifera* expostas aos pesticidas por ingestão e a abelhas que não foram expostas diretamente.

Por outro lado, não houve diferenças significativas ao longo dos dias para o grupo controle ($F = 1,01; P = 0,435$) na análise de variância (ANOVA), mostrando que a média

1 de mortalidade diária é de aproximadamente seis abelhas (Figura 2.3B).

2 Já para imidacloprid, os resultados da ANOVA apresentaram diferenças na mortali-
3 dade tanto de abelhas marcadas ($F= 13,27; P = <0,001$) quanto de abelhas não marcadas
4 ($F= 3,19; P = 0,044$). Sendo que, a mortalidade das abelhas marcadas respondeu de forma
5 quadrática ($R^2 = 0,78; F_{2,17} = 29,47; P = <0,0001$), tendo uma alta mortalidade no primeiro
6 dia, média de 16 abelhas, mas não apresentando diferença significativa a partir do se-
7 gundo dia, média de três abelhas. A mortalidade de abelhas não marcadas foi crescente
8 ao longo dos dias avaliados ($R^2 = 0,38; F_{2,17} = 5,32; P = 0,0161$) (Figura 2.3C).

9 No caso do fungicida cerconil, o resultado da ANOVA para a mortalidade foi signifi-
10 cativo para abelhas marcadas ($F= 7,90; P = 0,001$), apresentando uma redução quadrática
11 na mortalidade ao longo dos dias ($R^2 = 0,6250; F_{2,17} = 14,1672; P = 0,0002$). Não houve
12 diferença significativa na mortalidade ao longo dos dias ($F= 1,28; P = 0,322$) para abelhas
13 não marcadas, no qual a média de mortalidade diária foi de 24 abelhas (Figura 2.3D).

14 **2.3.2 Efeito dos tratamentos na dispersão**

15 Os resultados da análise de regressão para a dispersão não demonstraram diferenças
16 nos tratamentos – imidacloprid, cerconil e controle – entre os quadrantes no primeiro dia,
17 isto é, uma hora após a liberação das abelhas marcadas dentro dos núcleos.

18 A partir do segundo dia até o quinto, os resultados dos grupos controle e imidacloprid
19 mostraram maior concentração de abelhas na região central da área avaliada, ou seja, um
20 pico no gráfico correspondente ao quadrante BII (Figura 2.4B-E). Houve redução do pico
21 no décimo dia, apresentando uma maior concentração na região inferior da área avaliada
22 (Figura 2.4F, Tabelas 2.1 e 2.2).

Tabela 2.1: Resumo das análises de regressão não-linear do parâmetro de dispersão das abelhas, *Apis mellifera*, encontradas nos quadros (mostrados na Figura 2.4).

Variável	Modelo	Tratamento	Parâmetros estimados			
			a	b	c ou y0	x0
Dia 2	$f = y_0 + a / (1 + ((x-x_0)/b)^2)$	Controle	0,2399 [(-0,1887) - (0,6685)] a	0,4930 [(-0,6712) - (1,6571)] ab	0,0718 [(0,019) - (0,1246)] a	5,2037 [(4,3538) - (6,0536)] a
Dia 2	$f = a * (c * (1 / (1 + ((x-x_0)/b)^2)) + (1 - c) * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2))$	Imidacloprid	0,3525 [(0,1793) - (0,5157)] a	0,8268 [(0,2924) - (1,3613)] a	1,0 [(-0,5891) - (2,5891)] -	5,2610 [(4,9018) - (5,6201)] ab
Dia 2	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Cerconil	0,3280 [(0,1287) - (0,5273)] a	0,4666 [(0,0828) - (0,8504)] ab	0,0681 [(0,033) - (0,1031)] a	5,1908 [(4,6849) - (5,6968)] a
Dia 3	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Controle	0,2020 [(0,1147) - (0,2893)] a	0,6620 [(0,3542) - (0,9697)] a	0,0739 [(0,0396) - (0,1081)] a	4,9769 [(4,5887) - (5,3652)] a
Dia 3	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Imidacloprid	0,2372 [(0,1457) - (0,3286)] a	0,6457 [(0,3696) - (0,9218)] a	0,0684 [(0,0332) - (0,1037)] a	5,0884 [(4,7441) - (5,4328)] ab
Dia 3	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Cerconil	0,2912 [(0,2096) - (0,3727)] a	0,6502 [(0,4446) - (0,8559)] a	0,0584 [(0,0271) - (0,0896)] a	5,1139 [(4,8669) - (5,3609)] a
Dia 4	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Controle	0,2175 [(0,1251) - (0,3099)] a	0,6348 [(0,3218) - (0,9477)] a	0,0726 [(0,038) - (0,1073)] a	5,1368 [(4,7647) - (5,509)] a
Dia 4	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Imidacloprid	0,2526 [(0,1562) - (0,3489)] a	0,6636 [(0,3906) - (0,9366)] a	0,0644 [(0,0266) - (0,1023)] a	5,0319 [(4,6895) - (5,3743)] a
Dia 4	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Cerconil	1,2098 [(0,7502) - (1,6693)] b	0,2989 [(0,1587) - (0,4390)] ab	0,0164 [(-0,0412) - (0,0739)] a	6,0086 [(5,2954) - (6,7218)] ab
Dia 5	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Controle	0,9923 [(0,6104) - (1,3741)] b	0,1398 [(0,0803) - (0,1994)] b	0,0725 [(0,0426) - (0,1024)] a	4,907 [(4,5633) - (5,2506)] a
Dia 5	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Imidacloprid	1,1195 [(0,6784) - (1,5606)] b	0,1391 [(0,0779) - (0,2004)] b	0,0678 [(0,0322) - (0,1033)] a	5,1322 [(4,7639) - (5,5006)] a
Dia 5	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Cerconil	1,2204 [(0,7486) - (1,6921)] b	0,3983 [(0,1982) - (0,5983)] ab	0,0018 [(-0,0583) - (0,0619)] a	6,7298 [(5,3748) - (8,0848)] b
Dia 10	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Controle	0,7252 [(0,4109) - (1,0395)] b	0,3948 [(0,1749) - (0,6147)] ab	0,0459 [(0,0054) - (0,08630)] a	6,6468 [(5,1993) - (8,0943)] ab
Dia 10	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Imidacloprid	0,9055 [(0,4856) - (1,3255)] b	0,3905 [(0,1575) - (0,6235)] ab	0,0302 [(-0,0237) - (0,0840)] a	6,6355 [(5,1143) - (8,1567)] ab
Dia 10	$f = a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Cerconil	1,2529 [(0,9687) - (1,5370)] b	0,4560 [(0,2532) - (0,6588)] a	-	7,5158 [(5,425) - (9,6066)] ab

Tabela 2.2: (Continuação). Resumo das análises de regressão não-linear do parâmetro de dispersão das abelhas, *Apis mellifera*, encontradas nos quadros (mostrados na Figura 2.4).

Variável	Modelo	Tratamento	gl	F	P	R ²
Dia 2	$f = y_0 + a / (1 + ((x-x_0)/b)^2)$	Controle	35	5,2705	0,0045	0,3307
Dia 2	$f = a * (c * (1 / (1 + ((x-x_0)/b)^2)) + (1-c) * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2))$	Imidacloprid	35	8,3876	0,0003	0,4402
Dia 2	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Cerconil	35	15,0562	<0,0001	0,5853
Dia 3	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Controle	35	7,7137	0,0005	0,4197
Dia 3	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Imidacloprid	35	9,8278	<0,0001	0,4795
Dia 3	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Cerconil	35	18,9284	<0,0001	0,6396
Dia 4	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Controle	35	8,4053	0,0003	0,4407
Dia 4	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * ((x-x_0)/b)^2)$	Imidacloprid	35	9,9084	<0,0001	0,4816
Dia 4	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Cerconil	35	10,0589	<0,0001	0,4853
Dia 5	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Controle	35	10,2466	<0,0001	0,4900
Dia 5	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Imidacloprid	35	9,3641	0,0001	0,4675
Dia 5	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Cerconil	35	10,4276	<0,0001	0,4943
Dia 10	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Controle	35	8,2543	0,0003	0,4363
Dia 10	$f = y_0 + a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Imidacloprid	35	7,1577	0,0008	0,4016
Dia 10	$f = a * \exp(-0,5 * (\ln(x/x_0)/b)^2 / x)$	Cerconil	35	16,6853	<0,0001	0,5028

- 1 O grupo cerconil demonstrou padrões de distribuição semelhantes ao controle e imi-
- 2 dactoprid até o terceiro dia avaliado (Figura 2.4B-C). Já a partir do quarto dia observou-se
- 3 uma redução no pico de distribuição, tendo aumentado a incidência do número de abe-
- 4 lhas marcadas na região inferior da área avaliada (Figura 2.4D-F, Tabelas 2.1 e 2.2).

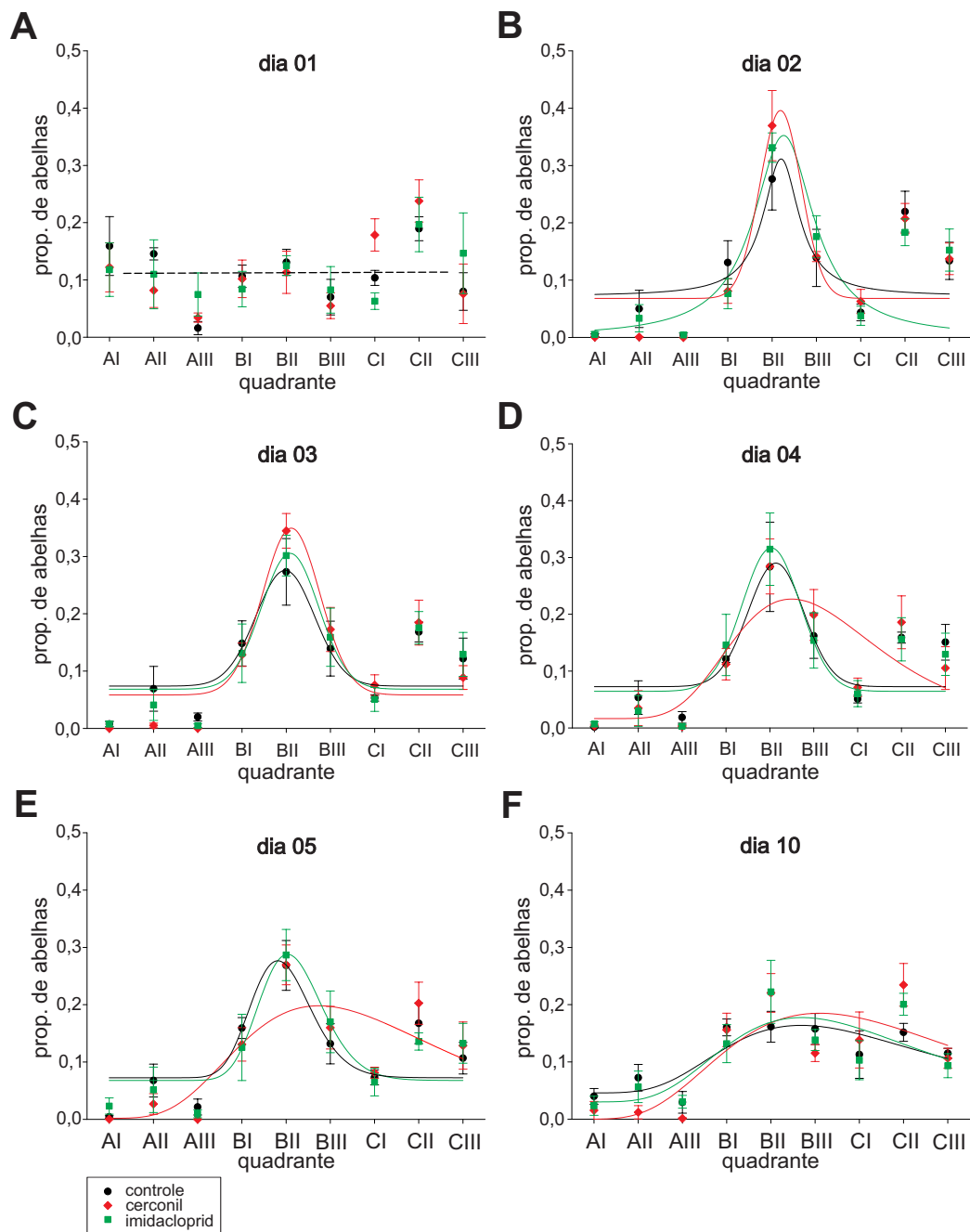


Figura 2.4: Efeitos de imidacloprid e cerconil na dispersão de *Apis mellifera*.

1 2.4 Discussões

2 Como a finalidade dos fungicidas não é matar insetos, e, no geral, a toxicidade para
 3 abelhas é baixa, estes pesticidas não possuem restrições de rotina eficazes para reduzir
 4 a exposição das abelhas a estes produtos (Johnson, 2015). Os inseticidas neonicotinói-

1 des são considerados “vilões” quando se fala em mortalidade de abelhas. No entanto,
2 alguns fungicidas têm demonstrado ser tão tóxicos para abelhas quanto os neonicotinói-
3 des (Tomé et al.,2017). Em nossos experimentos, os efeitos do fungicida cerconil foram
4 muito mais severos.

5 Efeitos diretos e indiretos foram verificados nas avaliações de mortalidade de ambos
6 pesticidas. Os efeitos diretos da exposição aos compostos referem-se à mortalidade dos
7 indivíduos que foram submetidos aos tratamentos, imidacloprid e cerconil, já os efeitos
8 indiretos referem-se a mortalidade de abelhas que não foram submetidas aos tratamen-
9 tos, mas que tiveram contato com os indivíduos contaminados. A mortalidade nos nú-
10 cleos controle permaneceu com nível baixo e constante durante todo o período avaliado,
11 considerado dentro da normalidade.

12 Nas colônias que receberam indivíduos tratados com imidacloprid, os efeitos diretos
13 foram maiores no início, sendo que não foram observados efeitos a partir do terceiro dia,
14 isto é, a mortalidade das abelhas tratadas cessou nesse período. Já os efeitos indiretos se
15 mostraram crescentes até o final da avaliação, ou seja, os indivíduos tratados que perma-
16 neceram vivos continuaram contaminando as abelhas saudáveis, levando-as a morte.

17 Porém, o fungicida cerconil apresentou ser mais letal para abelhas que o inseticida
18 imidacloprid. Tomé et al. (2017) já haviam relatado que cerconil era tão letal para *Apis*
19 *mellifera* e *Partamona helleri* quanto inseticidas neonicotinóides. O cerconil apresentou
20 efeitos diretos maiores, em termos de quantidade de indivíduos mortos e duração, pois
21 a mortalidade não cessou ao longo de todo o período avaliado, não sendo identificado,
22 portanto, o término do efeito. Os efeitos indiretos também foram maiores do que ob-
23 servado com o imidacloprid, pois a taxa de mortalidade foi mais elevada, mantendo-se
24 constante durante todo o período avaliado. Como não foi observado o fim de todos os
25 efeitos – diretos e indiretos – de cerconil e imidacloprid sobre as colônias, é necessário
26 que sejam feitos maiores testes para aprofundamento do assunto.

27 Até o momento há pouco conhecimento sobre o modo de ação do cerconil no orga-
28 nismo das abelhas, sendo assim, tampouco se sabe como pode ser a influência desse
29 produto nas alterações de comportamento do indivíduo na colônia. No entanto, um dos
30 ingredientes ativos do cerconil, o clorotalonil, foi encontrado em células epiteliais colu-
31 nares do intestino médio de larvas de *A. mellifera*, induzindo a morte celular apoptótica

1 elevada nos insetos (Gregorc & Ellis, 2010).

2 Uma vez que, todos os núcleos estavam expostos as mesmas condições climáticas, es-
3 ses dados também sugerem que os pesticidas são transmitidos para as demais abelhas
4 da colônia horizontalmente por dispersão de alimentos, possivelmente por trofalaxia,
5 ou seja, a transferência de alimentos entre os membros de uma comunidade através da
6 alimentação boca a boca (Smodiš Škerl et al., 2010). É possível que os compostos armaze-
7 nados no papo das abelhas tenham sofrido metabolização (i.e. as abelhas passariam para
8 a colônia um composto mais tóxico que o produto consumido por elas). Já foi relatado o
9 risco de abelhas forrageiras contaminarem a colônia com pesticidas coletados no campo
10 por trofalaxia (Crane & Walker, 1983).

11 A abelha rainha é alimentada com secreções das glândulas mandibulares e hipofarín-
12 geanas (geleia real) de abelhas nutrizes por trofalaxia (Wu-Smart & Spivak, 2016). Por-
13 tanto, a presença de pesticidas em indivíduos da colônia pode reduzir o desempenho e
14 mesmo a formação de novas rainhas. Foi detectado que imidacloprid é capaz de diminuir
15 a viabilidade do espermatozoide armazenado na espermateca de rainhas (Chaimanee et
16 al., 2016), e mesmo coumafós, um pesticida organofosforado, afeta o peso de rainhas em
17 desenvolvimento (Pettis et al., 2004).

18 A respeito dos resultados de dispersão dos indivíduos marcados dentro das colônias
19 experimentais, percebeu-se nos núcleos controle padrão normal de dispersão, sendo que
20 inicialmente houve uma maior concentração de indivíduos na região central do quadro
21 de cria (quadrante BII) (Figura 2.2). Nosso experimento foi executado com abelhas recém
22 emergidas, as quais tem suas funções iniciais de limpeza das células e de alimentação
23 das crias novas. A maior concentração das crias novas se encontra na região central dos
24 quadros, o que explica termos observados um maior número de abelhas nessa região. A
25 medida que as abelhas envelhecem, elas tendem a migrar para regiões mais periféricas,
26 onde passarão a receber o pólen e o néctar, depois se tornarão guardiãs da entrada e, en-
27 fim sairão da colônia para atuar como forrageiras, o que é coerente com o fato de termos
28 encontrado uma migração das abelhas do grupo controle para as regiões periféricas do
29 quadro no décimo dia (Figura 2.4F).

30 Os resultados da dispersão com a concentração estudada de imidacloprid apresenta-
31 ram padrão semelhante ao encontrado no controle em todos os dias avaliados (Figura

1 2.4, Tabelas 2.1 e 2.2). No entanto, a concentração testada de cerconil foi capaz de ante-
2 cipar a migração das abelhas tratadas para a região periférica a partir do quarto dia de
3 avaliação. Esse fato pode estar associado a alterações fisiológicas que ocasionaram a mu-
4 dança precoce da atividade exercida pelas abelhas. Estudos demonstraram que abelhas
5 adultas, expostas ainda na fase de larvas a doses subletais de imidacloprid, é capaz de
6 apresentar anormalidades comportamentais, originadas por disfunções neurais (Yang et
7 al., 2012; Peng & Yang, 2016; Wu et al., 2017).

8 A divisão do trabalho em insetos eussociais representa uma transição evolutiva im-
9 portante, mas os mecanismos fisiológicos que regulam ainda são pouco compreendidos
10 (Norman et al., 2016). Não se sabe ao certo onde o cerconil pode estar agindo para causar
11 mudança no padrão de dispersão das abelhas. No entanto, sabe-se que várias substân-
12 cias, como o Hormônio Juvenil (HJ) influencia o ritmo do desenvolvimento comporta-
13 mental em abelhas (Sullivan et al., 2003), ou seja, os níveis do HJ aumentam com a idade
14 de acordo com um padrão de desenvolvimento geneticamente determinado (Robinson,
15 1987), sendo os níveis do HJ bem mais altos em forrageiras que os encontrados em abe-
16 lhas nutrizes (Elekonich et al., 2001).

17 A colméia é um organismo integrado, havendo cooperação entre os membros indivi-
18 duais do grupo para dificultar a entrada, estabelecimento e disseminação de doenças e
19 parasitas (Cremer et al., 2007). Abelhas das colônias podem detectar e remover as abelhas
20 adultas infectadas por aplicação tópica, provavelmente reconhecendo os perfis de hidro-
21 carbonetos cuticulares de indivíduos doentes (Baracchi et al., 2012). No entanto, em
22 nosso trabalho não registramos ocorrência significativa de comportamento que eviden-
23 ciam a tentativa de eliminação dos indivíduos contaminados, sendo registrado apenas
24 quatro ataques a indivíduos expostos a imidacloprid e seis a indivíduos expostos a cer-
25 conil. Por terem sido expostas por ingestão, as colônias podem não ter sido capazes de
26 detectar as abelhas contaminadas. Esse resultado pode indicar que a colônia é vulnerável
27 quanto a defesa de contaminações por ingestão de pesticidas.

28 Por isso, são necessárias mais pesquisas para proporcionar uma melhor compreensão
29 dos mecanismos fisiológicos envolvidos na divisão do trabalho, bem como os efeitos dos
30 pesticidas sobre a organização das abelhas nas colônias. Além disso, a partir dos resul-
31 tados encontrados com o cerconil, torna-se imprescindível que os efeitos dos fungicidas

1 sejam mais amplamente estudados sobre o comportamento das abelhas. Com intuito de
2 complementar as informações obtidas nesse trabalho, recomenda-se que sejam efetuados
3 estudos sobre a ação de pesticidas e fungicidas nas abelhas sem ferrão Neotropicais em
4 condições que assemelham as de campo, pois sabe-se que as abelhas nativas são mais
5 frágeis que as africanizadas.

6 2.5 Referências

- 7 **Balbuena, M. S.; Tison, L.; Hahn, M. L.; Greggers, U.; Menzel, R.; Farina, W. M.** 2015.
8 Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *Journal of Experimental*
9 *Biology*, 218(17): 2799-2805.
- 10 **Baracchi, D.; Fadda, A.; Turillazzi, S.** 2012. Evidence for antiseptic behaviour towards
11 sick adult bees in honey bee colonies. *Journal of Insect Physiology*, 58(12): 1589-1596.
- 12 **Blacquièrre, T.; Smagghe, G.; Van Gestel, C. A.; Mommaerts, V.** 2012. Neonicotinoids in
13 bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4):
14 973-992.
- 15 **Chaimanee, V.; Evans, J. D.; Chen, Y.; Jackson, C.; Pettis, J. S.** 2016. Sperm viability and
16 gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicoti-
17 noid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of*
18 *Insect Physiology*, 89: 1-8.
- 19 **Crane, E.; Walker, P.** 1983. The impact of pest management on bees and pollination.
20 London: International Bee Research Association. 129p.
- 21
- 22 **Cremer, S.; Armitage, S. A.; Schmid-Hempel, P.** 2007. Social immunity. *Current biology*,
23 17(16): R693-R702.
- 24 **Elekonich, M. M.; Schulz, D. J.; Bloch, G.; Robinson, G. E.** 2001. Juvenile hormone
25 levels in honey bee (*Apis mellifera* L.) foragers: foraging experience and diurnal variation.
26 *Journal of Insect Physiology*, 47(10): 1119-1125.
- 27 **Ellis, J. D.; Evans, J. D.; Pettis, J. S.** 2010. Colony losses, managed colony population de-
28 cline and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*,
29 49(1): 134-136.
- 30 **Feltham, H.; Park, K.; Goulson, D.** 2014. Field realistic doses of pesticide imidacloprid
31 reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology*, 23(3): 317-323.
- 32 **Gregorc, A.; Ellis, J. D.** 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee
33 (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*,
34 99(2): 200-207.

- 1 **Henry, M.; Béguin, M.; Requier, F.; Rollin, O.; Odoux, J. F.; Aupinel, P.; Aptel, J.; Tcha-**
2 **mitichian, S.; Decourtye, A.** 2012. A common pesticide decreases foraging success and
3 survival in honey bees. *Science*, 336(6079): 348-350.
- 4 **Norman, V. C.; Hughes, W. O.** 2016. Behavioural effects of juvenile hormone and their
5 influence on division of labour in leaf-cutting ant societies. *Journal of Experimental Bio-*
6 *logy*, 219(1): 8-11.
- 7 **Oldroyd, P. B.** 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biology*, 5: e168.
- 8 **Page, R. E.; Peng, C. Y. S.** 2001. Aging and development in social insects with emphasis
9 on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36(4): 695-711.
- 10
- 11 **Peng, Y. C.; Yang, E. C.** 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglome-
12 rular density of honey bee mushroom bodies. *Sci. Rep.* 6, 19298-19311.
- 13
- 14 **Pettis, J. S.; Collins, A. M.; Wilbanks, R.; Feldlaufer, M. F.** 2004. Effects of coumaphos
15 on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 35(6): 605-610.
- 16 **Potts, S. G.; Roberts, S. P. M.; Dean, R.; Marris, G.; Brown, M. A.; Jones, R.; Neumann,**
17 **P.; Settele, J.** 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal*
18 *of Apicultural Research*, 49(1): 15-22.
- 19 **Robinson, G. E.** 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual review*
20 *of Entomology*, 37(1): 637-665.
- 21 **Robinson, G. E.** 1987. Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone.
22 *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20(5): 329-338.
- 23 **Rodrigues, C. G.; Kruger, A. P.; Barbosa, W. F.; Guedes, R. N. C.** 2016. Leaf Fertilizers
24 Affect Survival and Behavior of the Neotropical Stingless Bee *Friesella schrottkyi* (Melipo-
25 nini: Apidae: Hymenoptera). *Journal of Economic Entomology*, 109 (3): 1001-1008.
- 26 **Russell, S.; Barron, A. B.; Harris, D.** 2013. Dynamic modelling of honey bee (*Apis melli-*
27 *fera*) colony growth and failure. *Ecological Modelling*, 265: 158-169.
- 28 **Sagili, R. R.; Pankiw, T.; Metz, B. N.** 2011. Division of labor associated with brood
29 rearing in the honey bee: how does it translate to colony fitness?. *PLoS One*, 6(2): e16785.
- 30 **Schulz, D. J.; Sullivan, J. P.; Robinson, G. E.** 2002. Juvenile hormone and octopamine in
31 the regulation of division of labor in honey bee colonies. *Hormones and behavior*, 42(2):
32 222-231.
- 33 **Seeley, T. D.; Kolmes, S. A.** 1991. Age polytheism for hive duties in honeybees - illusion
34 or reality? *Ethology*, 87: 284-297.
- 35 **Škerl, M. I. S.; Kmecl, V.; Gregorc, A.** 2010. Exposure to pesticides at sublethal level and
36 their distribution within a honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Bulletin of Environmental*
37 *Contamination and Toxicology*, 85(2): 125-128.

- 1 **Sullivan, J. P.; Fahrbach, S. E.; Harrison, J. F.; Capaldi, E. A.; Fewell, J. H.; Robinson,**
2 **G. E.** 2003. Juvenile hormone and division of labor in honey bee colonies: effects of
3 allatectomy on flight behavior and metabolism. *Journal of Experimental Biology*, 206(13):
4 2287-2296.
- 5 **Tomé, H. V. V.; Ramos, G. S.; Araújo, M. F.; Santana, W. C.; Santos, G. R.; Guedes, R. N.**
6 **C.; Maciel, C. D.; Newland, P. L.; Oliveira, E. E.** 2017 Agrochemical synergism imposes
7 higher risk to Neotropical bees than to honeybees. *Royal Society Open Science*, 4: 160866.
- 8 **VanEngelsdorp, D.; Meixner, M. D.** 2010. A historical review of managed honey bee
9 populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal*
10 *of Invertebrate Pathology*, 103: S80–S95.
- 11 **Wilson, E. O.** 1987. The causes of ecological success: the case of the ants. *Journal of*
12 *Animal Ecology*, 56: 1–9.
- 13 **Wu, M. C.; Chang, Y. W.; Lu, K. H.; Yang, E. C.** 2017. Gene expression changes in honey
14 bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Bioche-*
15 *mistry and Molecular Biology*.
16
- 17 **Wu-Smart, J.; Spivak, M.** 2016. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide
18 exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports*, 6:
19 32108.
20
- 21 **Yang, E. C.; Chang, H. C.; Wu, W. Y.; Chen, Y. W.** 2012. Impaired olfactory associative
22 behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage.
23 *PLoS One*. 7, e49472-e49480.

1 Conclusões Finais

2 Nesse trabalho, buscamos analisar a influência de doses subletais de pesticidas sobre o
3 comportamento das abelhas, visando identificar alterações comportamentais que pode-
4 riam comprometer a integridade da colônia. Dentre os resultados obtidos ao longo desse
5 estudo, os experimentos do primeiro capítulo mostraram que *Partamona helleri* é mais
6 sensível a alterações sazonais que *Apis mellifera*, e também mais suscetível quanto aos
7 efeitos dos pesticidas – imidacloprid e cerconil – sobre a preferência por cores, atividade
8 locomotora e respirômetria.

9 Os testes relacionados a escolha por cores ao longo do ano mostraram diferenças na
10 escolha entre as cores amarelo e azul para abelhas forrageiras nas duas espécies testadas
11 ao longo de um ano. A resposta na escolha pelas cores durante o ano amostral foi cons-
12 tante em *Apis mellifera*, já *Partamona helleri* apresentou variação na preferência pelas cores
13 amarelo e azul ao longo dos meses.

14 O efeito dos pesticidas no comportamento das abelhas mostrou que a partir de peque-
15 nas concentrações (CL_1) o inseticida imidacloprid e o fungicida cerconil foram capazes
16 de causar impactos negativos sobre as abelhas forrageiras de *Partamona helleri*, o que não
17 foi observado nas forrageiras de *Apis mellifera*. Esses achados, reforçam a tese de que abe-
18 lhas sem ferrão são mais suscetíveis a pesticidas do que as abelhas africanizadas, sendo
19 assim, modelos mais adequados para serem usadas em testes de avaliações de risco na
20 região Neotropical.

21 Por outro lado, vimos nos resultados do segundo capítulo que, *Apis mellifera* não trata-
22 das considerando a concentração CL_{30} , não foram capazes de detectar a presença de indi-
23 víduos contaminados na colônia com imidacloprid ou cerconil, em um experimento que
24 buscou representar condições próximas as de campo. O número de agressões observado
25 não foi significativo, demonstrando uma considerável vulnerabilidade no mecanismo de
26 defesa da colônia como um todo. Além disso, notamos uma grande mortalidade de indi-

1 víduos não contaminados. É importante ressaltar que, cerconil demonstrou ser capaz de
2 alterar a organização da divisão de tarefas nas colônias.

3 Em termos gerais, nosso trabalho mostrou que níveis subletais são capazes de causar
4 problemas cognitivos e organizacionais nas abelhas e conseqüentemente em suas colô-
5 nias, pois forrageiras contaminadas ao retornarem levam consigo material capaz de cau-
6 sar mortalidade maior do que o número de indivíduos expostos diretamente.

7 Diante dos resultados apresentados, recomenda-se que estudos futuros explorem de
8 forma mais profunda o efeito de fungicidas no comportamento de abelhas, pois esse
9 pesticida demonstrou alto grau de mortalidade. Poucos trabalhos buscam entender os
10 efeitos de fungicidas em abelhas, e, sabendo-se que as abelhas nativas demonstram ser
11 mais sensíveis, abre-se um leque de possibilidades relacionados a continuidade aos estu-
12 dos dos efeitos subletais de fungicidas no comportamento social de abelhas sem ferrão
13 Neotropicais.