

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROMORFOLÓGICAS  
INDUZIDAS POR EXPOSIÇÃO DE LARVAS DE MANDAÇAIA (*Melipona  
quadrifasciata anthidioides*) A IMIDACLOPRIDE**

Hudson Vaner Ventura Tomé  
*Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

T656a  
2011

Tomé, Hudson Vaner Ventura, 1985-  
Alterações comportamentais e neuromorfológicas  
induzidas por exposição de larvas de mandaçaia  
(*Melipona quadrifasciata anthidioides*), a imidaclopride /  
Hudson Vaner Ventura Tomé.  
- Viçosa, MG, 2011.  
vii, 29f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa  
Referências bibliográficas: f. 23-29.

1. Abelha. 2. Inseticidas. 3. Neonicotinóide (Inseticida).  
4. *Melipona quadrifasciata anthidioides*. 5. Abelha -  
Comportamento. 6. Abelha - Morfologia. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

HUDSON VANER VENTURA TOMÉ

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROMORFOLÓGICAS  
INDUZIDAS POR EXPOSIÇÃO DE LARVAS DE MANDAÇAIA (*Melipona  
quadrifasciata anthidioides*) A IMIDACLOPRIDE**

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  
2011

**HUDSON VANER VENTURA TOMÉ**

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROMORFOLÓGICAS  
INDUZIDAS POR EXPOSIÇÃO DE LARVAS DE MANDAÇAIA (*Melipona  
quadrifasciata anthidioides*) A IMIDACLOPRIDE**

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: 21 de fevereiro de 2011

---

**Prof.<sup>a</sup> Maria Augusta L. Siqueira**  
**(Coorientadora)**

---

**Prof. Gustavo Ferreira Martins**  
**(Coorientador)**

---

**Dr.<sup>a</sup> Nelsa Maria Pinho Guedes**

---

**Prof. Eliseu José Guedes Pereira**

---

**Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes**  
**(Orientador)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por conceder sabedoria, paciência e persistência para vencer mais uma etapa em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos. Agradeço também à população brasileira que contribui diretamente com o financiamento dos estudos dos pós-graduandos de todo o país. Espero retribuir aos mesmos todo o conhecimento adquirido ao longo de minha formação acadêmica.

Ao Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela orientação e principalmente pela grande amizade. Obrigado pelos conselhos e pela confiança depositada durante esses dois anos no laboratório de Ecotoxicologia. Muito Obrigado!

Aos conselheiros, Professores Lúcio Antonio de Oliveira Campos, Gustavo Ferreira Martins e Maria Augusta Lima Siqueira que muito me ensinaram e ajudaram na execução dos trabalhos ao longo do mestrado. Obrigado!

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia: Isabela, Danúbia, Katherine, Nathália, Vagner, Eduardo, Hipólito, Lucas, Ronnie, Júlio e Nelsa. Agradeço também ao Conrado e Jéssica que muito me ajudaram na execução dos experimentos. Ao Erick e Alberto pelas sugestões e ajudas quando mais precisei. Obrigado a todos vocês pela convivência gratificante durante todo esse tempo!

Aos amigos do Apiário Rúdo, Hugo, Talitha e Bianca que sempre se mostraram à disposição quando precisei de ajuda. Aos funcionários Íris, Geraldo “Cabrito” e Lulú que passaram um pouco de suas experiências no manejo das abelhas. Muito Obrigado!

Aos amigos do laboratório de Biologia Estrutural que dispuseram o micrótomo para o presente trabalho e principalmente pelas amizades construídas por lá.

Aos meus amigos de república Cacá e Luciano que durante esses dois anos de mestrado foram minha família. Obrigado pela amizade de vocês!

À Cristina pelo amor, companheirismo e confiança depositados em mim durante todo o nosso convívio.

E finalmente ao meu irmão Richardson e aos meus pais Vilma e Tomé, que sempre acreditaram mim e nunca deixaram de me apoiar nas grandes decisões de minha vida. Obrigado a todos vocês!

## **BIOGRAFIA**

Hudson Vaner Ventura Tomé, filho de Valdina Vilma Ventura Tomé e Jair Tomé, nascido no dia 11 de maio de 1985, no município de Ponte Nova, em Minas Gerais, Brasil.

Em março de 2004 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, iniciando o curso de Agronomia. Realizou estágio no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas sob Orientação do Professor Marcelo Coutinho Picanço, onde foi bolsista de iniciação científica da FAPEMIG durante os anos de 2007 e 2008, graduando-se Engenheiro Agrônomo em janeiro de 2009.

Em março de 2009 iniciou o curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, submetendo-se à defesa no dia 21 de fevereiro de 2011.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	05
2.1 Colônias de <i>Melipona quadrifasciata</i> .....	05
2.2 Inseticidas e Solvente .....	05
2.3 Criação de Abelhas .....	05
2.3.1 Abelhas Controle .....	05
2.3.2 Abelhas Tratadas .....	07
2.4 Bioensaio de Sobrevivência .....	07
2.5 Bioensaio de Peso Pupal e Desenvolvimento .....	08
2.6 Bioensaio de Morfometria de Corpos Cogumelares .....	08
2.7 Bioensaio Comportamental .....	09
2.8 Análises Estatísticas .....	10
3. RESULTADOS .....	12
3.1 Bioensaio de Sobrevivência .....	12
3.2 Bioensaio de Peso Pupal e Desenvolvimento .....	13
3.3 Bioensaio de Morfometria Cerebral .....	14
3.4 Bioensaio Comportamental .....	14
4. DISCUSSÃO .....	18
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23

## RESUMO

TOMÉ, Hudson Vaner Ventura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Alterações comportamentais e neuromorfológicas induzidas por exposição de larvas de manducaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*) a imidaclopride** Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-orientadores: Lúcio Antonio de Oliveira Campos, Gustavo Ferreira Martins e Maria Augusta Lima Siqueira.

Nos últimos anos, um declínio acentuado de colônias de abelhas tem ocorrido em diferentes partes do mundo. Dentre os vários fatores descritos na literatura pelos quais têm contribuído para esta diminuição, as aplicações de pesticidas assumem grande importância. Neste trabalho foram estudados efeitos letais e subletais do inseticida imidaclopride na abelha nativa sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* mediante exposição larval. As abelhas foram submetidas à bioensaios de concentração-sobrevivência e à bioensaios focando efeitos subletais na neuromorfologia e no comportamento locomotor. O aumento da concentração do inseticida no alimento larval das abelhas causou alta mortalidade das abelhas ainda no estágio imaturo, sendo que a dose de 0,0056µg por abelha (menor dose testada) promoveu a morte de 60% das abelhas. Os tempos médios de sobrevivência refletiram o efeito da dose do inseticida, visto que doses superiores a 0,28µg por abelha causaram a morte de 100% das abelhas antes dos 21 dias. As abelhas que alcançaram o estágio adulto apresentaram efeitos subletais neuromorfológicos e comportamentais. Houve um menor desenvolvimento dos corpos cogumelares nas abelhas de quatro e oito dias de idade. Além disso, a atividade locomotora das abelhas nestas idades diminuiu à medida que se aumentou a concentração do inseticida no alimento larval. Assim, podemos verificar que a exposição do inseticida imidaclopride às larvas da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* mesmo em baixas concentrações causa efeitos subletais em abelhas adultas, o que pode comprometer a sobrevivência de colônias.

## ABSTRACT

TOMÉ, Hudson Vaner Ventura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2011. **Behavioral and Neuro-morphological alterations induced by imidacloprid in larvae of mandaçaia (*Melipona quadrifasciata anthidioides*)**  
Advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-advisors: Lúcio Antonio de Oliveira Campos, Gustavo Ferreira Martins and Maria Augusta Lima Siqueira.

In recent years, a marked decline of bee colonies has occurred in different parts of the world. Among the various factors described in the literature for which have contributed to this decline, pesticide applications are very important. In this study, were studied lethal and sublethal effects of the imidacloprid insecticide on the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* by larval exposure. Bees were subjected to the method of concentration-survival and bioassays of sublethal effects, focusing on neuromorphological and locomotory behavior. The increasing of insecticide concentration in larval food of bees caused high mortality of the bees still in the immature stage, where the dose of 0.0056µg per bee (lowest dose tested) caused the death of 60% of the bees. The median survival times reflected the effect of the insecticide dose, whereas dose above 0.28µg per bee caused the deaths of 100% of the bees before 21 days. Bees that reached the adult stage showed neuromorphological and behavioral sublethal effects. There was a smaller development of mushroom bodies in bees from four and eight days old. Furthermore, the locomotor activity of the bees at these ages has decreased with increased insecticide concentration in the larval food. Thus, we can see that the exposure of the insecticide imidacloprid on the larvae of the bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* even at low concentrations causes sublethal effects on adult bees, which can compromise the colony survival.

## 1. INTRODUÇÃO

A intensificação agrícola à qual o mundo atravessa atualmente é a principal responsável pela diminuição da biodiversidade no planeta (Robinson & Sutherland, 2002). Retrato desse declínio é o recente impacto de pesticidas sobre a riqueza de espécies de polinizadores (Brittain et al., 2010), que são cruciais no funcionamento de quase todos os ecossistemas terrestres incluindo aqueles dominados pela agricultura, pois são importantes para a produtividade sustentável através da reprodução de plantas (Kevan, 1999).

Existem trabalhos atuais que mostram efeitos de pesticidas em artrópodes benéficos, mas a maioria das evidências de impacto de inseticidas sobre esses organismos vem de testes de toxicidade em laboratório por meio de determinação de valores de DL50 (Desneux et al., 2007; Britain et al., 2010). No entanto, efeitos subletais que muitas vezes são negligenciados vêm sendo cada vez mais pesquisados. Anualmente bilhões de dólares são gastos em programas de polinização no mundo inteiro (Gallai et al., 2008) e devido à isso, pesquisas tem se intensificado para entender melhor os danos causados por pesticidas em polinizadores.

Recentemente, um declínio acentuado de colônias da abelha *Apis mellifera* tem ocorrido em diferentes partes do mundo, fenômeno denominado “colony collapse disorder” ou “CCD”, que dentre outros fatores, pode ser causado por aplicações de inseticidas (Chauzat et al., 2006; Oldroyd, 2007; vanEngelsdorp et al., 2009, Johnson et al., 2010). As principais características das colônias afetadas pelo CCD são a grande quantidade de abelhas imaturas e um número reduzido de abelhas adultas dentro das colônias. Por não apresentar nenhum tipo de sinal de doença ou abelhas mortas dentro da colônia, supõe-se que essas abelhas morram no campo durante o forrageamento (Oldroyd, 2007).

Vários comportamentos realizados pelas abelhas dentro de condições naturais são dependentes de aprendizagem e de processos de memória, sendo que dentre eles o forrageamento ocupa lugar de destaque (Giurfa, 2007). Enquanto coletam alimento para suas colônias, forrageiras memorizam formas, tamanhos e sinais florais como cores e odores, que cumprem um importante papel no reconhecimento das flores durante as coletas subsequentes (Menzel et al., 1993).

A parte do cérebro responsável pela memória das abelhas fica localizada em estruturas específicas chamadas lobos antenais e corpos cogumelares. Todas as informações adquiridas dentro e fora da colônia são armazenadas nessas estruturas, principalmente nos corpos cogumelares que são responsáveis pelas memórias de médio e longo prazo (Hammer e Menzel, 1995; Menzel et al., 2001; Fahrbach, 2006). Essa região do cérebro das abelhas expande com o avanço da idade, apresentando alta plasticidade neuronal ao longo da fase adulta (Sigg et al., 1997; Farris et al., 2001; Fahrbach, 2006).

Durante o forrageamento, toda a chegada de informações ambientais contribui para a expansão cerebral (Fahrbach & Robinson, 1995; Hammer & Menzel, 1995; Sigg et al., 1997). Farris et al. (2001) demonstraram que algumas porções nos cálices dos corpos cogumelares aumentam em volume devido a experiência de forrageamento, refletindo no crescimento da projeção individual de neurônios também denominados de células Kenyon. No entanto, outros trabalhos mostram que o aumento no volume dos corpos cogumelares não depende somente da experiência, mas também da idade (Withers et al., 1995; Fahrbach et al., 1998, 2003).

Alguns trabalhos têm comprovado efeito de diferentes inseticidas comprometendo a aprendizagem, memória e o forrageamento de abelhas, tanto em laboratório quanto em campo (Guez et al., 2001; Decourtye et al., 2003, 2004a, 2004b; Ramirez-Romero, 2005; Aliouane, 2008; El Hassani, 2008; Yang et al., 2008). Apesar disso, um composto tem ocupado lugar de destaque nesse contexto, o inseticida imidaclopride.

O imidaclopride (Bayer CropScience, 1991) é um importante inseticida pertencente ao grupo dos neonicotinóides que age como agonista nos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) (Casida & Quistad, 2004). Esse composto é direcionado para o controle principalmente de insetos sugadores de seiva como pulgões, tripes, cigarrinhas e mosca-branca. Além do amplo espectro de ação, a sistemicidade, a longa permanência na planta e a versatilidade de aplicação fazem do imidaclopride um sucesso de vendas no mundo inteiro (Elbert et al., 2008). Porém, esse inseticida tem sido problema em alguns países da Europa, onde seus resíduos são considerados os principais responsáveis por declínio nas populações de abelhas (Suchail et al., 2000; Chauzat et al., 2006).

Abelhas forrageiras que consomem pequenas quantidades de inseticidas, seja pelo néctar ou pelo pólen contaminados, podem perder suas capacidades cognitivas (aprendizagem e orientação) alterando a atividade de forrageamento (Decourtye et al., 2003; Ramirez-Romero et al., 2005; Rortais, et al., 2005). Girolami et al. (2009) observaram alta mortalidade de abelhas forrageiras quando ingeriam gotas de água advindas da gutação das folhas de plantas que tiveram suas sementes tratadas com inseticidas neonicotinóides. Altos níveis desses inseticidas foram encontrados na água, sendo essa uma nova maneira pela qual as abelhas podem morrer no campo. No entanto, alterações durante o desenvolvimento larval podem ter consequências ainda mais graves para as colônias do que a morte de abelhas adultas, pois podem ocasionar uma diminuição à população de futuras abelhas adultas (Desneux et al., 2007). Isso se deve ao fato das larvas de abelhas se alimentarem no interior das células de cria sendo incapazes de escolherem o próprio alimento. Para se desenvolverem as larvas necessitam de uma dieta complexa, sendo provavelmente mais sensíveis do que abelhas adultas (Brodsgaard et al., 2003).

Há uma carência grande de trabalhos mostrando efeito de inseticidas durante a fase larval em abelhas, sendo que tais estudos contribuiriam muito para a avaliação de riscos de dano às abelhas por pesticidas (Villa et al., 2000). Além disso, a vasta maioria dos trabalhos tem sido desenvolvida com *A. mellifera* e existe a necessidade de se estudar impacto de inseticidas em outros grupos de abelhas (Brittain et al., 2009). Os meliponíneos, por exemplo, ainda são muito pouco estudados nesse contexto, visto que as espécies que compõem esse grupo não vivem em países de clima temperado (O'Toole, 1993; Moraes et al., 2000).

As abelhas indígenas “sem ferrão” pertencentes à subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) estão entre os polinizadores mais comuns nas regiões tropicais sendo muito importantes em polinização de plantas silvestres e cultiváveis (Antonini et al., 2006; Slaa et al., 2006; Bispo dos Santos et al., 2009). Essas abelhas são encontradas em colônias que possuem, desde algumas dúzias, até milhares de operárias. Além disso, possuem castas de fêmeas diferenciadas, tanto no comportamento quanto na morfologia (Michener, 2000).

Os meliponíneos abrangem mais de 400 espécies que variam na fisiologia, morfologia e tamanho (Michener, 2000), sendo que uma das espécies que se destaca

no uso em polinização comercial é a espécie *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (Del Sarto et al., 2005). Conhecida no Brasil como mandaçaia, essa espécie é amplamente distribuída ao longo do leste brasileiro, que vai do Estado do Rio Grande do Sul até a Paraíba (Batalha-Filho et al., 2009).

Apesar da importância ecológica e econômica, muitas das espécies de meliponíneos existentes no Brasil correm o risco de serem extintas (Kerr, 2002). O uso não sustentável dos ecossistemas para produção agrícola, o que inclui a utilização excessiva de inseticidas, tem contribuído para o declínio das populações desses polinizadores (Kevan, 1999; Kremen et al., 2002, De la Rúa et al., 2009). Além disso, poucos são os estudos evidenciando toxicidade de inseticidas em abelhas sem ferrão (Valdovinos-Nunez, et al., 2009), sendo que esses utilizam adaptações de metodologias empregadas nos estudos com *A. mellifera* (Moraes et al., 2000).

Contudo, faz-se necessário um melhor estabelecimento de metodologias para testes toxicológicos em abelhas sem ferrão, visando estudar efeitos subletais que também podem contribuir para o declínio de colônias. Embora perturbações no desenvolvimento larval possam ser uma importante ameaça para colônias de abelhas, estudos com o âmbito de entender tais alterações são raros. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar efeitos subletais neuromorfológicos e comportamentais causados pelo inseticida Imidaclopride quando exposto às larvas da abelha *M. quadrifasciata anthidioides*. Ao final deste estudo, esperamos entender melhor como inseticidas podem comprometer a sobrevivência de colônias pelos distúrbios causados na fase imatura. Além disso, há a necessidade que novos trabalhos surjam para este contexto a fim de compreendermos melhor efeitos de pesticidas em organismos não-alvo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Colônias de *Melipona quadrifasciata*

Cinco colônias de *M. quadrifasciata anthidioides* coletadas no município de Viçosa, MG, Brasil (20°45'S e 42°52'W), mantidas no Apiário da Universidade Federal de Viçosa foram utilizadas nos ensaios experimentais. Favos de cria com ovos foram retirados das colmeias para realização dos testes toxicológicos em laboratório. Todas as abelhas, criadas no laboratório, independentemente do seu estágio foram mantidas em estufas climatizadas do tipo B.O.D., em temperatura, umidade relativa e fotoperíodo regulados para os estudos.

### 2.2 Inseticida e Solvente

O inseticida utilizado no presente trabalho foi o neonicotinóide imidaclopride (Evidence 700WG - Bayer CropScience, São Paulo, SP). Sua formulação é grânulo disperso em água e devido a isso usamos água destilada como solvente nos bioensaios. Os tratamentos feitos nos ensaios foram: 0; 0,0056; 0,014; 0,028; 0,037; 0,051; 0,056; 0,08; 0,112; 0,28; 0,37; 0,56; 1,12; 1,75; 3,5; 7; 14; 28 e 56 µg/abelha do princípio ativo do imidaclopride, totalizando 19 tratamentos. As diluições foram feitas a partir da dose recomendada de campo do inseticida comercial (56 µg i.a./abelha), registrado no Ministério da Agricultura para o controle de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) no Brasil (AGROFIT, 2010) para a cultura do tomate (200g do inseticida/ha) num volume de 350 L de calda/ha.

### 2.3 Criação das abelhas

Toda a realização de bioensaios para a criação e avaliação de toxicidade do inseticida imidaclopride sobre operárias de *M. quadrifasciata anthidioides* foram conduzidas em laboratório nas condições de 28°C de temperatura e 24 horas de escotofase. Na criação, foram utilizadas 1632 ovos de abelhas operárias de cinco colônias diferentes.

**Grupo Controle** - Favos de cria com ovos foram retirados com cuidado das colmeias e levados para o laboratório, onde tiveram suas células individualmente desoperculadas e seus ovos removidos com o auxílio de um estilete de metal com

extremidade dobrada em ângulo reto. Todo o alimento do favo foi retirado com auxílio de uma bomba de vácuo adaptada sob condições assépticas, armazenado em campânulas de vidro estéreis e homogeneizado.

Células artificiais feitas a partir de cera derretida de *A. mellifera* foram confeccionadas para simular as células de um favo de cria natural, a fim de propiciar a criação das abelhas no laboratório. Essas células de cera tiveram placas de Elisa (24 poços) como suporte para manter a posição ereta dentro da B.O.D. similar à de campo. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta de repetição Distriman-Gilson<sup>®</sup>, as células artificiais foram preenchidas com alimento necessário para uma larva de operária de *M. quadrifasciata* se alimentar durante toda a fase larval (130 µl), mais um acréscimo de 10 µl de água destilada. Sendo assim, o conteúdo total de cada célula foi de 140 µl.

Outros favos de cria foram coletados, porém esses foram utilizados para fornecer os ovos para criação das abelhas. Tais ovos foram transferidos com auxílio de um estilete para as células de cria artificiais sendo que cada célula foi mantida em uma cavidade da Placa de Elisa e fechada com opérculos também confeccionados com cera natural. As células foram dispostas em placas de polipropileno de fundo arredondado (Placas de Elisa) e identificadas individualmente. Cada placa contendo 24 indivíduos em seu interior foi colocada em campânulas de vidro e mantida em estufas climatizadas do tipo B.O.D., a 28°C de temperatura, 99% de umidade relativa e 24 horas de escotofase até o término do período de alimentação. Um pedaço de algodão de cinco centímetros de diâmetro e umedecido com água destilada foi mantido no interior dos frascos para controle da umidade. Todos os dias um novo pedaço de algodão umedecido era colocado nos frascos com o objetivo da manutenção da umidade e para evitar crescimento de fungos e bactérias no recipiente.

Passando o período de alimentação das larvas e chegando à fase pupal, todas as abelhas foram retiradas do meio de 99% de umidade (campânulas úmidas) e transferidas para um meio de 70% de umidade, porém ainda, na câmara climatizada com temperatura e fotoperíodo regulados. Além disso, todas as células de cera, por estarem sujas de fezes, foram substituídas por células novas.

Após emergência, as abelhas operárias foram marcadas com tintas atóxicas a base de óleo (Brasilux® São Paulo, SP) de diversas cores, com o objetivo de monitorar a idade de cada indivíduo. Essas abelhas foram mantidas em microcolônias de madeira dentro das B.O.Ds, onde se alimentaram de xarope de mel e pólen. Sabendo-se o dia de emergência de cada abelha pela sua respectiva cor, as abelhas foram coletadas para análise comportamental e neuromorfológica em três faixas etárias diferentes sendo estas de 1, 4 e 8 dias de idade.

**Grupo de abelhas tratadas com imidaclopride** - De maneira similar ao item anterior, favos de cria foram retirados das colmeias. Esses favos tiveram suas células individualmente abertas para retirada do alimento larval. Todo o conteúdo de uma célula que serviria de alimento para uma larva (130 µl), recebeu pequenas doses de imidaclopride (10 µl de água + inseticida) totalizando também 140 µl de volume para cada célula. Após a homogeneização da solução de água + inseticida com o alimento, essa mistura foi transferida para células artificiais de cera com o auxílio de uma pipeta de repetição. Outros favos de cria das colônias foram coletados, porém para fornecer os ovos que foram transferidos um a um para as células. Assim, as larvas provenientes desses ovos receberam alimento contendo inseticida durante todo o desenvolvimento larval (exposição crônica). Após a emergência dessas abelhas cada uma delas foi identificada e monitorada quanto à sua idade. Testes comportamentais e neuromorfológicos foram feitos com essas abelhas da mesma maneira como feito no grupo controle. Toda a metodologia de criação de abelhas em laboratório aqui apresentada foi adaptada de Siqueira et al. (2008).

## 2.4 Sobrevivência

Após a montagem das placas de criação, todas as abelhas foram avaliadas diariamente quanto à sua sobrevivência durante todo o seu desenvolvimento, desde ovo até o estágio adulto.

Como descrito anteriormente, as operárias de *M. quadrifasciata anthidioides* foram criadas em células artificiais e mantidas em câmaras climatizadas no laboratório. Todos os dias a partir da montagem das placas de criação, as células foram abertas e avaliadas individualmente, identificando as abelhas mortas e as que permaneciam vivas. As avaliações foram realizadas usando o mesmo critério para

todos os tratamentos, sendo considerada morta a abelha que não se mexesse e apresentasse aspecto escuro. Nesse experimento foram feitas cinco repetições para cada tratamento citados anteriormente. Cada repetição constituiu-se de uma placa com 24 abelhas de cinco colônias diferentes de *M. quadrifasciata anthidioides*.

## **2.5 Efeito subletal no peso pupal e no tempo de desenvolvimento**

Durante a criação de abelhas no laboratório foram pesadas em balança de precisão todas as abelhas no estágio de pupa de “olho branco”, que são os primeiros 3/4 dias de formação da pupa. Além disso, foram medidos os tempos de desenvolvimento de todas as abelhas criadas no laboratório, sendo considerado um ciclo, a eclosão da larva até a emergência da abelha.

## **2.6 Efeito subletal na morfometria de corpos cogumelares**

Todas as doses onde emergiram abelhas foram testadas neste bioensaio. As abelhas foram mantidas em caixas de madeira 10 x 10 x 3 cm cobertas por vidro dentro das câmaras climatizadas a 28°C, 75% de umidade e 24 horas de escotofase. Estas abelhas foram alimentadas com xarope de mel e pólen durante a fase adulta. Algumas destas abelhas foram coletadas nas idades de 1, 4 e 8 dias ao acaso, e levadas ao laboratório para a dissecação dos cérebros. Os insetos foram dissecados em solução fisiológica para insetos 0,1M, pH 7,4 e fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 durante 24 horas. Os cérebros foram submetidos à desidratação em série crescente etanólica e embebidos durante 24 horas em historesina JB-4 sem endurecedor. Após esse período, os cérebros foram incluídos em blocos de historesina JB-4 com endurecedor de acordo com as recomendações do fabricante para realização da microtomia.

Cinco cérebros de cada grupo de idade provenientes de colônias diferentes foram submetidos a secções seriadas de 7 µm de espessura com navalhas de vidro em micrótomo automático. Os cortes obtidos foram corados em Hematoxilina e Eosina, sendo fotografados por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz com objetiva de quatro vezes de aumento (Fig. 1). Esses cortes tiveram sua área medida com o auxílio do programa de computador Image-Pro Plus® e usadas para determinar

o volume dos corpos cogumelares de cada cérebro pelo método de Cavalieri, como descrito por (Gundersen et al., 1988; Møller et al., 1990).

O cálculo do volume dos corpos cogumelares foi feito com auxílio da seguinte fórmula:

$$Vol. Total = Área Md. \times Esp. \times N;$$

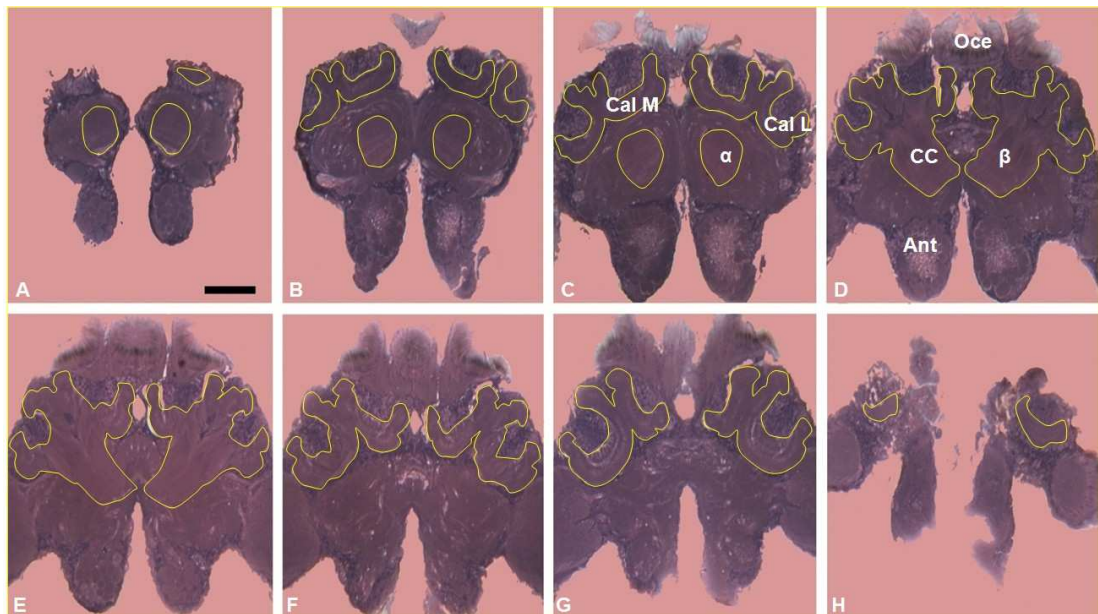
Onde:

*Vol. Total* = Volume Total dos corpos cogumelares

*Área Md.* = Área média dos cortes fotografados

*Esp.* = Espessura dos cortes

*N* = Número de cortes totais da estrutura



**Figura 1.** Fotomicrografias de cortes transversais seriados do cérebro de uma operária de *Melipona quadrifasciata anthidioides* de um dia de idade. A neuroanatomia dos corpos cogumelares é evidenciada por linhas amarelas. Os cortes representados seguem uma ordem de A até H, onde A, D e H representam o início, o meio e o fim da estrutura, respectivamente. Abreviações: Cal M, cálice mediano; Cal L, cálice lateral;  $\alpha$ , lobo  $\alpha$ ;  $\beta$ , lobo  $\beta$ ; CC, corpos cogumelares; Oce, ocelos; Ant, lobo antenal. Barra: 200 $\mu$ m.

Em alguns dos tratamentos realizados neste trabalho, as abelhas não alcançaram o estágio adulto. Sendo assim, os volumes dos corpos cogumelares foram calculados somente para os tratamentos: 0; 0,0056; 0,014; 0,028; 0,037; 0,051; 0,056; 0,08; 0,112  $\mu\text{g}$  i.a./abelha.

## 2.7 Efeito subletal no comportamento

Um ensaio comportamental de caminhamento foi feito com o objetivo de avaliar a atividade das abelhas expostas ao inseticida na fase larval. As arenas foram confeccionadas em placas de Petri com nove centímetros de diâmetro e dois centímetros de altura, cujo fundo foi recoberto com discos de papel-filtro e as paredes revestidas com teflon para evitar o escape dos insetos. O disco de papel-filtro utilizado em todos os tratamentos não foi exposto a nenhum tipo de substância. As características avaliadas foram distância percorrida, velocidade média de caminhamento, tempo parado, e número de paradas na arena, medidas durante um período de 10 minutos. Todos os testes foram realizados em sala com iluminação artificial cuja temperatura média foi de 25 ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ), das 14 às 18 horas.

Todas as doses onde emergiram abelhas foram testadas no bioensaio comportamental. Essas abelhas foram mantidas em microcolônias de madeira 10 x 10 x 3 cm cobertas por vidro dentro das câmaras climatizadas a 28°C, 75% de umidade e escotofase. Estas abelhas foram alimentadas com xarope de mel e pólen durante a fase adulta. A atividade locomotora das abelhas foi avaliada em três diferentes idades sendo elas, 1, 4 e 8 dias de idade. Nessas idades as abelhas de *M. quadrifasciata* não voam e se locomovem apenas por caminhamento (Waldschmidt, 1995). Tais abelhas foram colocadas nas arenas e levadas ao sistema de rastreamento formado por uma câmera de vídeo acoplada a um computador (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal – Canadá) para avaliação dos parâmetros comportamentais por um período de 10 minutos. O experimento foi delineado inteiramente ao acaso e estruturado em 9 doses, 3 idades e 5 repetições, onde cada repetição constituiu-se da determinação média de 5 abelhas de cada colônia avaliadas individualmente. A cada repetição, a placa de Petri e os papéis-filtro foram trocados.

## 2.8 Análises Estatísticas

Os resultados dos bioensaios de tempo de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência usando o procedimento não-paramétrico LIFETEST (SAS Institute, 2002). Esse método permite uma estimativa de curvas de sobrevivência das abelhas obtidas por meio de estimadores Kaplan - Meyer gerados desde o início até o fim do experimento. Além disso, os tempos médios de sobrevivência (TLs50) de cada tratamento foram analisados por regressão linear (PROC REG; SAS Institute, 2002).

Os resultados para peso de pupas, tempo de desenvolvimento e volume dos corpos cogumelares foram submetidos à análise de regressão linear (PROC REG; SAS Institute, 2002), sendo que essas variáveis dependiam da concentração do inseticida. No caso da variável volume, foram realizadas três regressões, uma correspondente a cada idade estudada.

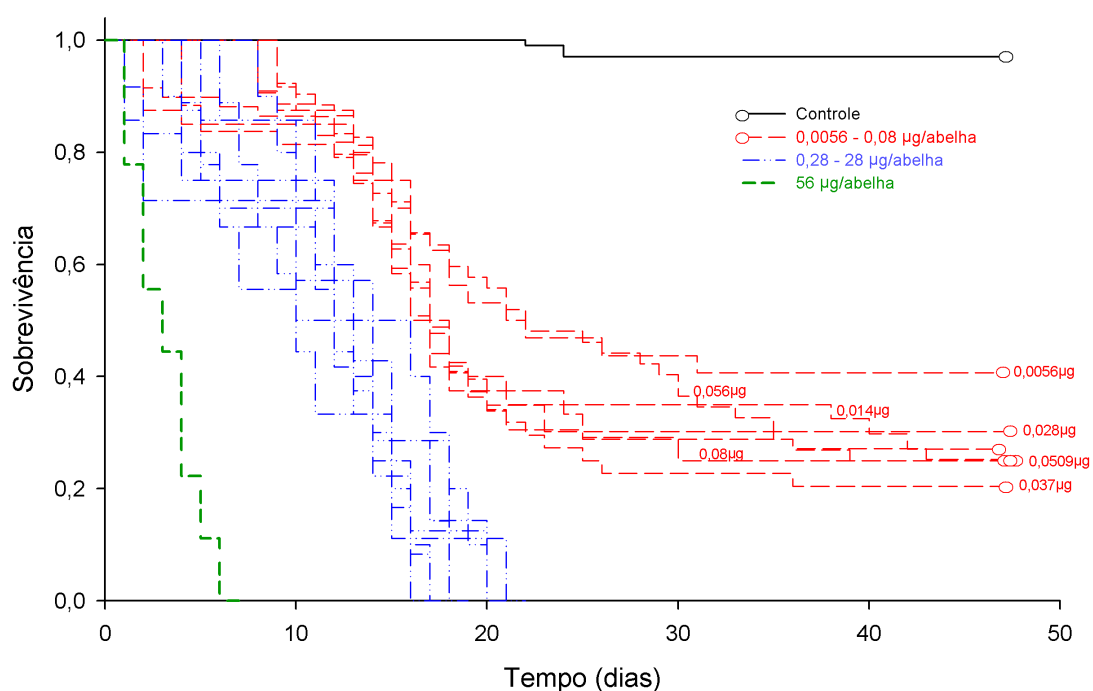
Os resultados para o ensaio comportamental foram submetidos à análise de variância multivariada (PROC GLM com MANOVA Statement; SAS Institute, 2002). Além disso, os resultados foram analisados por uma regressão linear (PROC REG; SAS Institute, 2002) para atividade motora em função da dose do inseticida para três idades distintas.

Os dados referentes a número de paradas e tempo parado no bioensaio comportamental não satisfizeram aos pressupostos de homogeneidade de variância e de normalidade sendo necessário recorrer às transformações LOG (x+1).

### 3. RESULTADOS

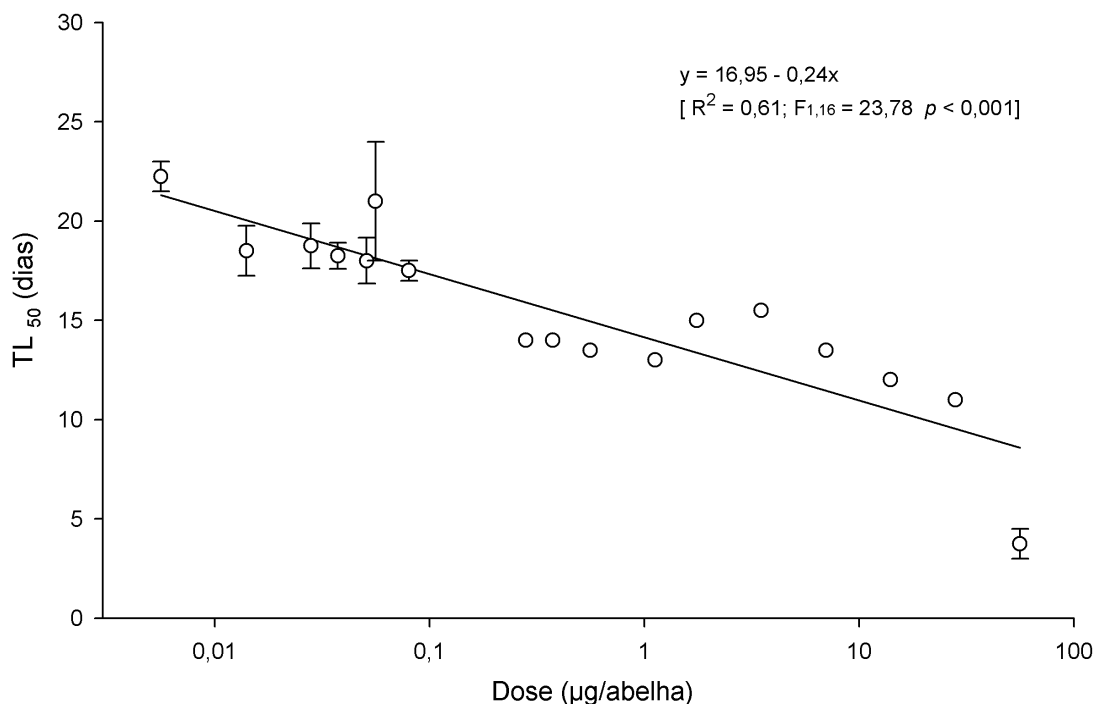
#### 3.1 Sobrevivência

A análise de sobrevivência para *Melipona quadrifasciata anthidioides*, quando larvas foram expostas ao inseticida imidaclopride, mostrou diferença significativa entre os tratamentos (Log-rank test,  $\chi^2 = 136,13$ ; g.l. = 17;  $p < 0,0001$ ). A sobrevivência para as abelhas não expostas ao imidaclopride foi maior que 97% enquanto que no tratamento de 0,0056  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  (menor dose testada com inseticida), a sobrevivência foi de 40% (Fig. 2). Os tratamentos de 0,014  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ , 0,028  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ , 0,037  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ , 0,051  $\mu\text{g}/\text{abelha}$ , 0,056  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  e 0,08  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  não ultrapassaram 30% de sobrevivência. As doses de 0,28  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  e superiores acarretaram 100% de mortalidade larval.



**Figura 2.** Curvas de sobrevivência para larvas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em diferentes doses de imidaclopride.

As diferenças nas sobrevivências foram refletidas nos tempos médios de sobrevivência (TL50s) para cada tratamento, onde a concentração de 0,0056  $\mu\text{g}/\text{abelha}$  apresentou maior tempo médio de sobrevivência (Fig. 3). Como houve baixa mortalidade no tratamento das abelhas não expostas ao inseticida, não foi estimado o tempo médio de sobrevivência para esse tratamento.



**Figura 3.** Tempo médio de sobrevivência de abelhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* expostas a diferentes doses de Imidaclopride durante a fase larval. Os símbolos representam médias  $\pm$  erros padrão.

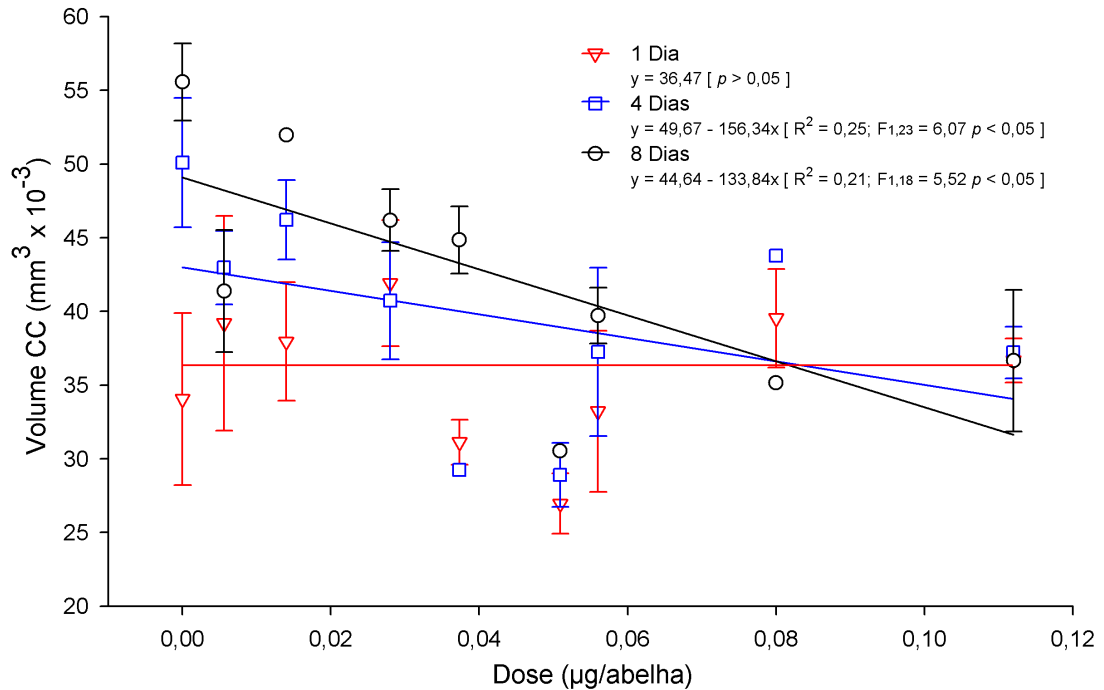
### 3.2 Bioensaio peso pupal e tempo de desenvolvimento

A análise de regressão linear não foi significativa para o peso das pupas ( $0,082 \pm 0,002\text{g}$ ), mostrando que o aumento da concentração de imidaclopride não afeta o peso corporal das abelhas ao longo de seu desenvolvimento. No tempo de desenvolvimento, a regressão linear também não foi significativa ( $42,09 \pm 2$  dias), comprovando que a concentração do inseticida não influencia no tempo de emergência.

### 3.3 Efeito subletal na morfologia de Corpos Cogumelares

As análises de regressão linear para o volume dos corpos cogumelares de *Melipona quadrifasciata anthidioides* mostraram que houve um comprometimento no desenvolvimento dessa estrutura cerebral mediante o aumento da concentração do inseticida (Fig. 4). Somente abelhas com um dia de emergência não tiveram volumes dos corpos cogumelares influenciados pelo aumento da dose de imidaclopride pela qual foram expostas. No entanto, nas idades de quatro e oito dias, onde era esperada

uma maior expansão dos corpos cogumelares, as abelhas mostraram menor expansão do volume dos corpos cogumelares com a elevação da dose de imidaclopride a qual foram expostas.



**Figura 4.** Volume dos corpos cogumelares cerebrais de *Melipona quadrifasciata antidioides* em três idades diferentes mediante exposição de Imidaclopride durante a fase larval. Os símbolos representam médias  $\pm$  erro padrão.

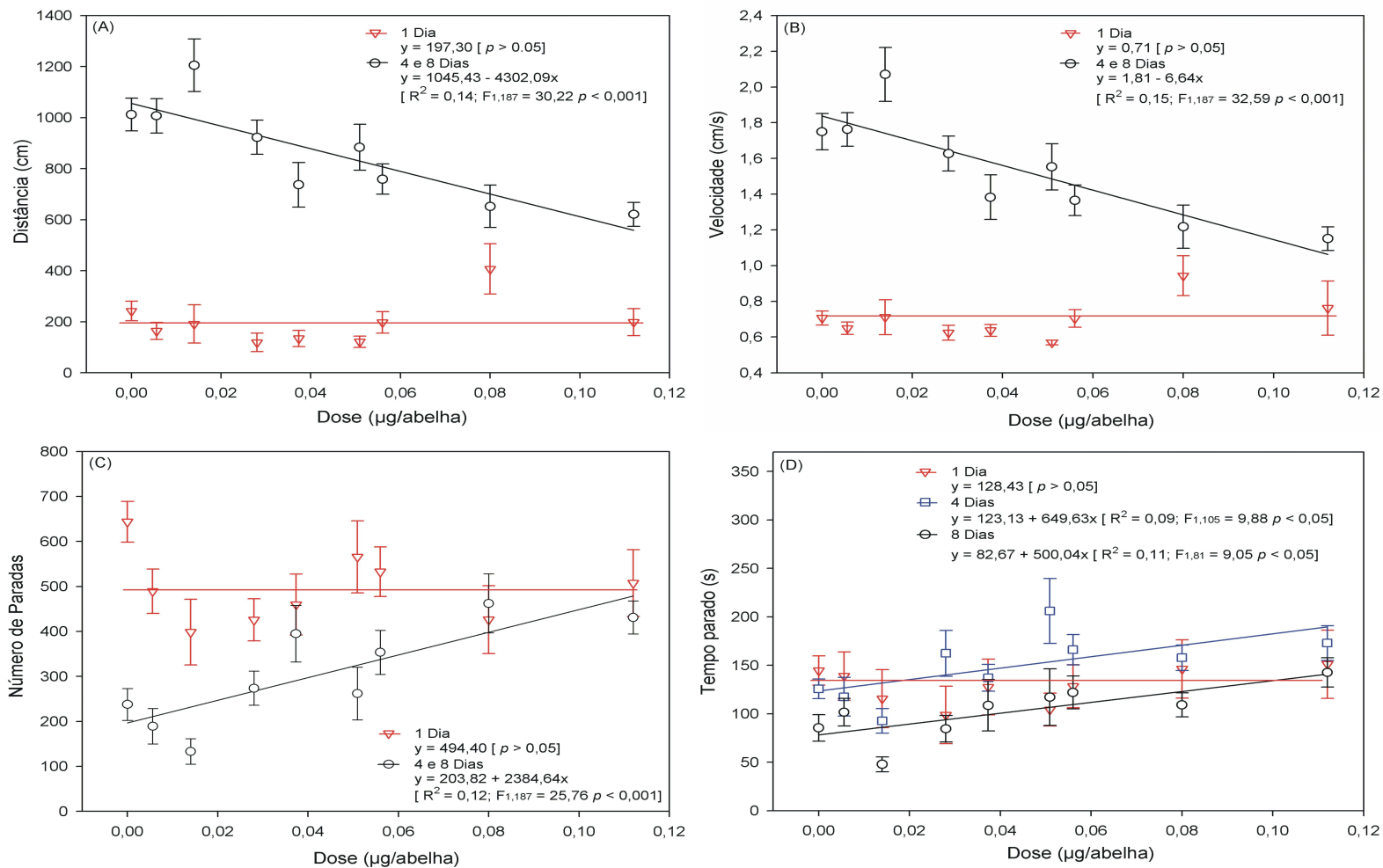
### 3.4 Bioensaio Comportamental

As características comportamentais avaliadas nas abelhas tratadas com imidaclopride durante a fase larval diferiram significativamente para as doses (g.l.num/den = 32/1063,7; Wilks' lambda = 0,7641; F = 2,51;  $p < 0,0001$ ), idade (g.l.num/den = 8/ 576; Wilks' lambda = 0,4099; F = 40,45;  $p < 0,0001$ ) e para a interação concentração x idade (g.l.num/den = 64/1129,7; Wilks' lambda = 0,69011643; F = 1.75;  $p < 0,0003$ ) quando submetidas à análise de variância multivariada.

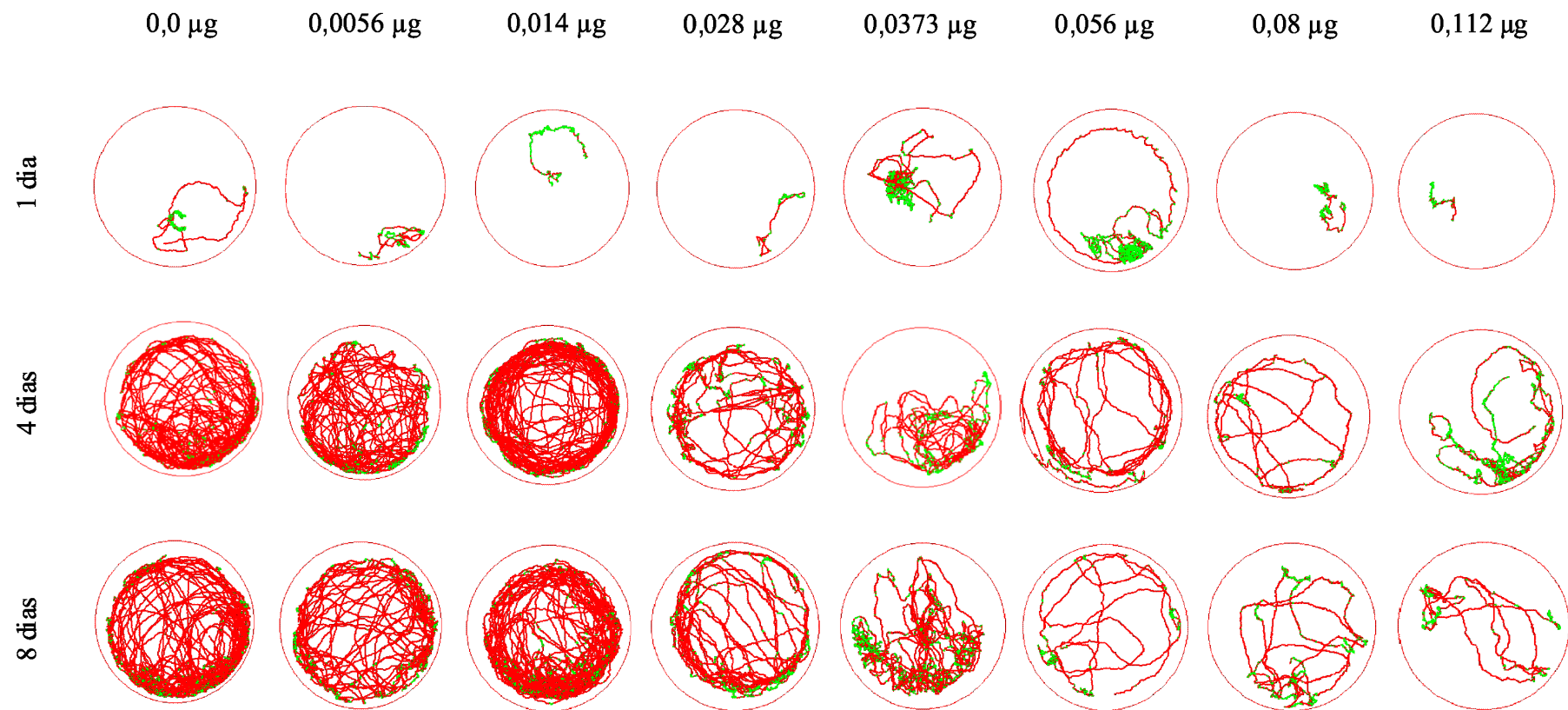
As análises de regressão mostram que a distância percorrida, a velocidade, o tempo parado e o número de paradas das abelhas avaliadas num período de 10 minutos são fortemente influenciados pelo aumento da dose de imidaclopride. Somente nas abelhas de um dia de emergência a atividade motora não respondeu ao aumento de dose para nenhum dos parâmetros, ao contrário do que aconteceu com

abelhas de quatro e oito dias, que tiveram sua atividade comportamental prejudicada com o aumento da dose do inseticida (Fig. 5).

Os resultados das regressões lineares para distância percorrida, velocidade e número de paradas para abelhas de quatro e oito dias de idade foram combinados, pois não houve diferença estatística entre as curvas separadamente (Fig. 5A, 5B e 5C). Os padrões característicos do caminhamento de *M. quadrifasciata anthidioides* são mostrados na Figura 6.



**Figura 5.** Atividade locomotora das operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em três idades diferentes mediante exposição às doses crescentes de imidaclopride durante a fase larval. Nas representações são mostradas médias  $\pm$  erros-padrão.



**Figura 6.** Caminhamento das operárias de *M. quadrifasciata anthidioides* em três idades diferentes expostas a doses crescentes do inseticida imidaclopride. As doses indicadas foram ministradas juntamente ao alimento de cada abelha do seu respectivo tratamento.

#### 4. DISCUSSÃO

As abelhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, quando expostas ao inseticida imidaclopride durante a fase larval, apresentaram problemas tanto na sobrevivência quanto subletais. No entanto, o inseticida não influenciou no ganho ou perda de peso nem tampouco no tempo de emergência, pois tais características são evidenciadas principalmente em inseticidas reguladores de crescimento (Mamatha et al., 2006). Não foi surpresa que o desenvolvimento dos corpos cogumelares das abelhas adultas foi afetado, visto que tais regiões são formadas durante a fase de pupa, e no presente trabalho as abelhas foram expostas à substância tóxica num período que antecede a formação cerebral. Ligado a isso, esses danos à morfologia neural desencadearam problemas no comportamento dos insetos.

O inseticida imidaclopride apresenta alta toxicidade oral para abelhas melíferas. Nauen et al. (2001) observaram uma DL50 oral entre 40 e 102 ng por abelha, Schumuck et al. (2001) encontraram de 3,7 a 40,9 ng por abelha e Suchai et al. (2001) de 40 a 60 ng por abelha. Além disso, a dose de 0,1 ng por abelha pode causar a diminuição no comportamento de habituação (Guez et al., 2001). Porém, todos esses resultados foram obtidos com abelhas adultas de *Apis mellifera*, o que difere de nosso trabalho que expôs o inseticida às larvas de uma espécie de abelha nativa sem ferrão.

Brodsgaard et al. (2003) sugeriram que abelhas na fase larval sejam mais sensíveis em relação a abelhas adultas. Apesar de não termos feito testes em abelhas adultas, nossos resultados mostram que as larvas são muito sensíveis ao imidaclopride, visto que a dose de 0,0056µg por abelha promoveu a mortalidade de 60% dos indivíduos ainda na fase imatura. Todas as abelhas expostas a doses superiores a 0,08 µg/abelha morreram com menos de 21 dias de desenvolvimento. Considerando que a dose de campo (56 µg/abelha) matou 100% das abelhas em menos de sete dias e que a menor dose testada (10000 vezes menor) contribuiu para a mortalidade de 60% das abelhas, é notado que a sensibilidade das abelhas ao inseticida imidaclopride na fase larval é muito elevada. Além disso, foi verificado que as abelhas que sobreviveram até a fase adulta apresentaram efeitos neuromorfológicos e/ou comportamentais.

Os corpos cogumelares de abelhas são formados durante o estágio de pupa (Farhrbach et al., 2006). Neurônios intrínsecos, também chamados de células Kenyon, surgem a partir da proliferação de células chamadas neuroblastos formando assim os corpos cogumelares. No entanto, essas células precursoras sofrem morte celular programada antes da metamorfose, impedindo a formação de novos neurônios durante a fase adulta (Ganeshina et al., 2000). Existe, porém, uma plasticidade dos corpos cogumelares após a emergência que é associada à idade e a experiência das abelhas fora das colônias (Farris, 2001; Durst & Menzel, 1994).

Malun et al., (2002) demonstraram que abelhas adultas alimentadas com hidroxiuréia durante a fase larval apresentam redução parcial dos corpos cogumelares. Esse processo se dá pela morte dos neuroblastos, o que contribuiu para a não formação dos neurônios que constituem os corpos cogumelares. Nossos resultados, no entanto, não podem ser interpretados neste sentido. Se o imidaclopride tivesse sido responsável pela morte de neuroblastos em *M. quadrifasciata*, haveria lesões nos corpos cogumelares das abelhas tratadas com um dia de idade, o que não aconteceu. O que houve em nosso estudo foi um menor desenvolvimento dos corpos cogumelares em abelhas expostas a imidaclopride nas idades de quatro e oito dias. Essas abelhas apresentaram menor volume dessa região comparada com abelhas de mesmas idades do grupo controle (Fig. 3).

O que sabemos é que o imidaclopride interfere principalmente nos cálices dos corpos cogumelares em abelhas adultas de *Apis mellifera*. Ele se liga principalmente a receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) dos neurônios intrínsecos (Déglise et al., 2002) podendo interferir no metabolismo celular (Decourtye et al., 2004). Além disso, o imidaclopride pode agir inespecificamente através de ações antagônicas com receptores GABA, o que aumenta seu potencial inseticida (Déglise et al., 2002). Não podemos afirmar certamente que estas alterações ocorreram nas abelhas aqui estudadas durante a fase adulta, principalmente porque o inseticida foi ingerido antes mesmo dos neurônios intrínsecos terem sido formados. No entanto, a plasticidade neuronal esperada dos corpos cogumelares com o avanço da idade foi comprometida.

O tempo de metabolização da molécula de imidaclopride quando a exposição é larval ainda é desconhecido, mas podemos inferir que seus efeitos sejam

duradouros, pois as larvas de *M. quadrifasciata* se alimentam durante todo o estágio larval (18 dias em média). Além disso, é relatado que abelhas possuem menor aparato enzimático com função destoxicativa em relação a outras espécies mais tolerantes a inseticidas (Claudianos et al., 2006), o que aumenta a chance de um prolongamento da ação tóxica. O presente estudo nos deixa inferir que doses subletais de imidaclopride durante a fase larval também podem acarretar perdas de memória e aprendizagem, visto que lesões nos corpos cogumelares comprometem a memória das abelhas adultas de *Apis mellifera* (Komischke et al., 2005). Aqui, porém, não houve nenhum experimento ligado a esses aspectos, pois as abelhas se mostraram pouco longevas perante as doses aqui testadas e não alcançaram idades para avaliar estes parâmetros.

Como consequência do não desenvolvimento dos corpos cogumelares nas abelhas expostas ao inseticida, houve uma diminuição da atividade locomotora destas abelhas. Todos os parâmetros analisados mostraram que a dose do inseticida influenciou a atividade de caminhamento das abelhas (Fig. 5 e Fig. 6). Apesar de os corpos cogumelares serem importantes para memória e aprendizagem das abelhas, é muito provável que o menor desenvolvimento dessa região é o que contribuiu para a menor atividade de caminhamento nas abelhas de *M. quadrifasciata anthidioides*. A atividade das abelhas do grupo não exposto ao inseticida com quatro e oito dias de idade aumentou em relação a abelhas de um dia. No entanto, este padrão não aconteceu nas abelhas expostas ao imidaclopride. Com o aumento da dose do inseticida houve uma diminuição da distância percorrida e da velocidade média, além do aumento no número de paradas e do tempo em repouso das abelhas. Somente abelhas de um dia de idade não apresentaram diferenças na atividade locomotora entre os grupos. Isso se deu provavelmente porque as abelhas recém-emergidas geralmente não apresentam grande atividade dentro das colônias (Waldshmidt, 1995).

A atividade locomotora das abelhas na dose de 0,014 µg/abelha aumentou em relação ao grupo controle. Esta alteração pode ser explicada pelo efeito de ativação nicotínica pelo inseticida em doses menores, ao passo que doses superiores induzem um efeito tóxico. Resultados parecidos foram encontrados por Lambin et al. (2001), onde a dose de 1,25 ng de imidaclopride exposta em abelhas adultas de *A.*

*mellifera* contribuíram para o aumento na atividade motora, ao passo que doses de 20 ng diminuíram a atividade. Baixas doses de imidaclopride diminuem a atividade de citocromo oxidase no cérebro de *A. mellifera*, ao passo que altas doses aumentam a atividade da enzima (Armengaud et al., 2000; Decourtye et al., 2004).

Em resumo, o presente trabalho demonstra que o inseticida imidaclopride quando não causa mortalidade das abelhas induz efeitos subletais às mesmas. A exposição na fase larval pode reduzir a atividade motora das abelhas e comprometer tarefas das colônias mais complexas como o forrageamento. Visto que abelhas que apresentam esses danos têm suas funções biológicas comprometidas, larvas expostas a inseticidas podem ser uma importante causa para a mortalidade de colônias de abelhas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As abelhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* apresentam alta suscetibilidade ao inseticida imidaclopride quando suas larvas são expostas a esse composto. Os danos são diretamente ligados às doses e se estendem às abelhas adultas.

O presente trabalho mostrou que a dose de 0,0056 $\mu$ g/abelha, matou 60% das abelhas. Sendo assim, doses menores podem ainda causar mortalidade e contribuir com efeitos neuromorfológicos e/ou comportamentais às abelhas. Aqui verificamos que o inseticida interferiu com o desenvolvimento dos corpos cogumelares e prejudicou a atividade locomotora de operárias jovens. Isso nos deixa inferir que outras tarefas mais complexas como o forrageamento também podem ser comprometidas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT. Desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010. Apresenta informações sobre produtos fitossanitários usados na agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agrofit>>. Acesso em: Fev./2010.
- Antonini, Y.; Costa, R. G.; Martins, R. P. Floral preferences of a neotropical stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponina) in an urban forest fragment. *Braz. J. Biol.*, v.66, p.463-471, 2006.
- Aliouane, Y.; El Hassani, A. K.; Gary, V.; Armengaud, C.; Lambim, M.; Gauthier, M. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on Behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.28, p.113-122, 2009.
- Armengaud, C.; Aït-Oubah, J.; Causse, N.; Gauthier, M. Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the honeybee brain, *Neurosci. Lett.*, v.304, p.97–101, 2001.
- Batalha-Filho, H.; Melo, G. A. R.; Waldschmidt, A. M.; Campos, L. A. O.; Fernandes-Salomão, T. M. Geographic distribution and spatial differentiation in the color pattern of abdominal stripes of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia* v.26, p.213-219, 2009.
- Bispo dos Santos, S. A.; Roselino, A. C.; Hrnčir, M.; Bego, L. R. Pollination of tomatoes by stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Research* v.8, p.751-757, 2009.
- Brittain, C. A.; Vighi, M.; Bommarco, R.; Settele, J.; Potts, S. G. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology*, v.11, p. 106-115, 2010.
- Brodsgaard HF, Brodsgaard CJ, Hansen H, Lövei GL. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie* v.34, p.139-145, 2003.

- Cassida, J. E.; Quistad, G. B. Why insecticides are more toxic to insects than people: The unique toxicology of insects. *J. Pestic. Sci.*, v.29, p.81-86, 2004.
- Chauzat, M. P.; Faucon, J. P.; Martel, A. C.; Lachaize, J.; Cougoule, N.; Aubert, M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.*, v.99, p.253-262, 2006.
- Claudianos, C.; Ranson, H.; Johnson, R. M.; Biswas, S.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R.; Feyereisen, R.; Oakeshott, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticides sensitivity an environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.*, v.15, p.615-636, 2006.
- Decourtye, A.; Armengaud, C.; Renou, M.; Devillers, J.; Cluzeau, S.; Gauthier, M.; Pham-Delègue, M. H. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic. Biochem. Phys.*, v.78, p.83-92, 2004a.
- Decourtye, A.; Devillers, J.; Cluzeau, S.; Charreton, M.; Pham-Delègue, M.-H. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-yield and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.57, p.410-419, 2004b.
- Decourtye, A.; Lacassie, E.; Pham-Delègue; M.-H. Learning performances of honeybee (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag. Sci.*, v.59, p.269-278, 2003.
- Déglise, P.; Grünwald, B.; Gauthier, M. the insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci. Lett.*, v.321, p.13-16, 2002.
- De la Rúa, P.; Jaffé, R.; dall' Olio, R.; Muñoz, I.; Serrano, J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybee. *Apidologie*, v.40, p.263-284, 2009.
- Del Sarto, M. C. L.; Peruquetti, R. C.; Campos, L. A. O. Evaluation of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as Pollinator of greenhouse Tomatoes. *J. Econ. Entomol.*, v.98, p.260-266, 2005.
- Desneux, N. D.; Decourtye, A.; Delpuech J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Ann. Rev. Entomol.*, v.52, p.81-106, 2007.

- Durst, C.; Eichmüller, S.; Menzel, R. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. *Behav. Neural Biol.*, v.48, p.259-263.
- Elbert, A.; Hass, M.; Springer, B.; Thielert, W.; Nauen, R. Applied aspects of neonicotinoide uses in crop protection. *Pest. Manag. Sci.*, v.64, p.1099-1105, 2008.
- El Hassani, A. K.; Dacher, M.; Gary, V.; Lambin, M.; Gauthier, M.; Armengaud, C. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Toxicol.*, v.54, p.653-661, 2008.
- Fahrbach, S. E.; Farris, Robinson, G. E. Behavioral development in the honey bee: toward the study of learning under natural conditions. *Learn. Mem.*, v.2, p.199-224, 1995.
- Fahrbach, S. E.; Moore D.; Capaldi, E. A.; Farris, S. M.; Robinson, G. E. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. *Leran. Mem.*, v.5, p.115-123, 1998.
- Fahrbach, S. E.; Farris, S. M.; Sullivan, J. P.; Robinson, G. E. Limits on volume changes in the mushroom bodies of the honey bee brain. *J. Neurobiol.*, v.57, p.141-151, 2003.
- Fahrbach, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Annu. Rev. Entomol.*, v.51, p.209-232, 2006.
- Farris, S. M.; Robinson, G.E.; Fahrbach, S. E. Experience-and Age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *Journal of Neuroscience*, v.21, p.6395-6404, 2001.
- Gallai, N.; Salles, J. M.; Settele, J.; Vaissière, B. Economic valuation of vulnerability of world agriculture confronted to pollinator decliner. *Ecological Economics*, v.68, p.810-821, 2008.
- Ganeshina, O.; Schäfer, S.; Malun, D. Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. *J. Comp. Neurol.*, v.417, p.349-365, 2000.
- Girolami, V.; Greatti, M.; Di Bernardo, A.; Tapparo, A.; Giorio, C.; Squartini, A.; Mazzon, L.; Mazaro, M.; Mori, N. Translocation of neonicotinoid insecticides

- from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J. Econ. Entomol.*, v.102, p.1808-1815, 2009.
- Giurfa, M. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J. Comp. Physiol A*, v.193, p.801-824, 2007.
- Guez, D.; Suchail, S.; Gauthier, M.; Maleszka, R.; Belzunces, L.P. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.*, v.76, p.183-91, 2001.
- Gundersen, H. J. G.; Jemsen, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.*, v.147, p.229-263, 1987.
- Hammer, M.; Menzel, R. Learning and Memory in the Honeybee. *The Journal of Neuroscience*, v.15, p.1617-1630, 1995.
- Johnson, R. M; Ellis, M. D.; Mullin, C. A.; Frazier, M. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, p.1-19, 2010.
- Kerr, W.E. Extinção de espécies: A grande crise biológica do momento e como afeta os meliponínios, In: An. do V Encontro sobre Abelhas. p.4-14, 2002. Garófalo, C.A. & Freita, G., et al. (Eds.). FFCLRP, Ribeirão Preto-SP.
- Kevan, P. G. Pollinators as bioindicators of the state of environment: species, activity and biodiversity. *Agriculture Ecosystems & Environment*, v.74, p.373-393, 1999.
- Komischke, B.; Sandoz, J. C.; Malun, D.; Giurfa, M. Partia unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory leaning in honeybees *Apis mellifera* L.. *European Journal of neuroscience*, v.21, p.477-485, 2005.
- Kremen, C.; Williams, N. M. and Thorp, R. W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, p.16812-16816, 2002.
- Lambin, M.; Armengaud, C.; Raymond, S.; Gauthier, M. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v.48, p.129-134, 2001.
- Malun, D.; Plath, N.; Giurfa, M.; Moseleit, A. D.; Muller, U. Hydroxyurea-Induced Partial Mushroom Body Ablation in the Honeybee *Apis mellifera*: Volumetric analysis and quantitative protein determination. *J. Neurobiol*, v.50, p.31-44, 2002.

- Mamatha, D. M; Cohly, H. P. P.; Raju, A. H. H.; Rao, M. Rajeswara. Studies on the quantitative and qualitative characters of cocoons and silk from methoprene and fenoxycarb treated *Bombyx mori* (L) larvae. African Journal of Biotechnology, v.5, p.1422-1426, 2006.
- Menzel, R. Associative learning in honey bees. Apidologie, v.24, p.157-168, 1993.
- Menzel, R. Searching for the Memory trace in a mini-brain, the honeybee. Learn. Mem., v.8, p.53-62, 2001.
- Michener, C. D. The bees of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. p. 913, 2000.
- Møller, A.; strange, P.; Gundersen, H. J. G. Efficient estimation of cell volume using the nucleator and dissector. J. Microsc., v.159, p.61-71, 1990.
- Moraes, S. S.; Bautista, A. R. L.; Viana, B. F. Avaliação da toxicidade aguda (DL50 e CL50) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) Hymenoptera: (Apidae): via de contato. An. Soc. Entomol. Brasil, v.29, p.31-37, 2000.
- Nauen, R.; Ebbinghaus-Kintscher, U.; Schmuck, R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Pest Managem. Sci., v.57, p.577-586, 2001.
- Oldroyd, B. P. What's killing American honey bees? PLoS Biol. v.5, e168, 2007.
- O'Toole, C. Diversity of native bees and agroecosystems. In: J. Lasalle & I. D. Gauld (Eds.). Hymenoptera and biodiversity. CAB International, Wallingford, p.169-196. 1993.
- Ramirez-Romero, R.; Chaufaux, J.; Pham-Delègue, M. H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. Apidologie, v.36, p.601-611, 2005.
- Robinson, R. A.; Sutherland, W. J. Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. Journal of Applied Ecology, v.39, p.157-176, 2002.
- Rortais, A.; Arnold, G.; Halm, M.; Touffet-Briens, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie, v.36, p.71-83, 2005.
- SAS Institute. SAS/STAT User's Guide v.8. SAS Institute, Cary, NC, USA, 2002.

- Scmuck, R.; Schöning, R.; Stork, A.; Schramel, O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Managem. Sci.*, v.57, p.225-238, 2001.
- Sigg, D.; Thompson, C. M.; Mercer, A. R. Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *The Journal of Neuroscience*, v.17, p.7148-7156, 1997.
- Siqueira, M. A. L. Biossegurança da proteína Cry1Ac, sintetizada pelo algodão geneticamente modificado, em abelhas indígenas sem ferrão e africanizadas. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, p.95, 2008.
- Slaa, E. J.; Sanchez Chaves, L. A.; Malagodi-Braga, K. S.; Hofstede, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, v.37, p.293-315, 2006.
- Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L. P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.19, p.1901-1905, 2000.
- Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem*, v.20, p.2482-2486, 2001.
- Valdovinos-Núñez, G. R.; Quezada-Euán, J. J. G.; Ancona-Xiu, P.; Moo-Valle, H., Carmona, A.; Sánchez, E. R. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *J. Econ. Entomol.*, v.102, p.1737-1742, 2009.
- vanEngelsdorp, D.; Evans, J. D.; Saegerman, C.; Mullin, C.; Haubruge, E.; Nguyen, B. K.; Frazier, M.; Frazier, J.; Cox-Foster, D.; Chen, Y.; Underwood, R.; Tarry, D. R.; Pettis, J. S. Colony Collapse Disorder: A descriptive Study. *PLoS One*, v.4: e6481, 2009.
- Villa, S.; Vighi M.; Finizio, A.; Serini, G. B. Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology*, v.9, p.287-297, 2000.
- Waldschmidt, A. M. Aspectos genéticos da divisão de trabalho em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- Withers, G. S.; Fahrbach, S. E.; Robinson, G. E. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature*, v.364, p.238-240, 1993.

Yang, E. C.; Chuang, Y. C., Chen, Y. L.; Chang, L. H. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, v.101, p.1743-1748, 2008.