

Mário César Laboissière Del Sarto

Toxicidade de inseticidas para as abelhas
Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera
(Hymenoptera: Apidae)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

Mário César Laboissière Del Sarto

Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009

Prof. Raul Narciso de Carvalho Guedes
(Co-Orientador)

Prof. José Eduardo Serrão
(Co-Orientador)

Prof. Dejair Message

Pesq. Leandro Bacci

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Orientador)

A "Deus" senhor da minha vida, pois tudo que tenho e sou é fruto de sua gratuidade e de seu infinito amor.

A minha família, mãe: Carmem Laboissière de Carvalho e ao meu pai Ídolo Del Sarto Filho, os maiores responsáveis pela minha formação pessoal e profissional e por eu ter chegado até aqui.

A minhas irmãs Breda, Ivana, Paula e minha queridíssima sobrinha Amanda, que me deram muita força para persistir e vencer as dificuldades.

À minha namorada Eurenice C. B. V. F. de Godoy e sua filha Raissa Godoy, pela compreensão e companheirismo.

DEDICO

Agradecimentos

Agradecer através de breves palavras é apenas um pequeno gesto da minha mais sincera gratidão àqueles que colaboraram direta, ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família: mãe Carmem Laboissière de Carvalho e ao meu pai Ídolo Del Sarto Filho, os maiores responsáveis por eu ter chegado até aqui. Minhas irmãs Brêda, Ivana, Paula e minha queridíssima sobrinha Amanda, que me deram muita força para persistir e vencer as dificuldades.

Especialmente ao Professor Dr. Raul Narciso de Carvalho Guedes, pela amizade, paciência e disponibilidade na orientação dos trabalhos. Também agradeço aos Professores Dr. Lucio Antonio de Oliveira Campos e o Dr. José Eduardo Serrão, pela Co-orientação.

Aos Professores Dr. Rogério Parentonni Martins e a Dra. Yasmine Antonini, da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, por terem me iniciado na carreira científica e tanto ter contribuído para minha formação.

Aos Professores do Apiário Central - UFV, Prof. Dr. Dejair Message e Prof. Alfredo Alcides Goicochea Hertas, aos amigos em especial à, Janina Gonçalves de Carvalho, Maria Augusta Siqueira, Evaldo Pires Martins, Cristina Message e João Alfredo Marinho Ferreira pela amizade e ajuda nos trabalhos.

E também aos funcionários Geraldo Paiva “o cabrito”, Geraldo Ferreira Neri, Íris Stanciola, Sr. Osmar, Gecelmino Correa “Lulu”, e Antonio Araújo “gaiola”. A experiência de vocês, o auxílio e o companheirismo nos trabalhos de campo foram fundamentais.

Ao programa de pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, na pessoa do Prof. Dr. Ângelo Pallini e a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gérias - FAPEMIG, pelo fornecimento dos subsídios para a realização deste trabalho.

As empresas Arysta LifeSciences pela pessoa do Dr. Almir José Peretto; Syngenta (Dra. Nilceli Fernandez Bazzario); Dow AgroSciences (Dr. Luiz Antonio Pavan) pelo apoio técnico com o fornecimento dos produtos avaliados.

Meu muito obrigado a todos!!!

SUMÁRIO

| | página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT..... | x |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVO GERAL..... | 9 |
| 2.1. Objetivos Específicos..... | 9 |
| 2.1.1. Avaliar a toxicidade aguda letal (DL ₅₀), por exposição oral das formulações dos inseticidas abamectina, espinosade, deltametrina e metamidofós para a abelha-sem-ferrão <i>M. quadrifasciata</i> (mandaçaia) e para <i>A. mellifera</i> (africanizada)..... | 9 |
| 2.1.2. Avaliar a toxicidade aguda letal (DL ₅₀), por exposição tópica dos ingredientes ativos abamectina, deltametrina e metamidofós para a abelha-sem-ferrão <i>M. quadrifasciata</i> (mandaçaia) e para <i>A. mellifera</i> (africanizada)..... | 9 |
| 2.1.3. Avaliar a toxicidade aguda letal (DL ₅₀), exposição por contato dos ingredientes ativos abamectina, deltametrina e metamidofós para a abelha-sem-ferrão <i>M. quadrifasciata</i> (mandaçaia) e para <i>A. mellifera</i> (africanizada)..... | 10 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 11 |
| 3.1. Espécie de abelha escolhida..... | 11 |
| 3.2. Inseticidas testados..... | 12 |
| 3.3. Testes de toxicidade aguda letal (DL ₅₀)..... | 13 |
| 3.3.1. Testes de letalidade para operárias adulta por via oral..... | 13 |
| 3.3.2. Testes de letalidade para operárias adulta por via tópica..... | 17 |
| 3.3.3. Testes de letalidade para operárias adulta por via de contato..... | 19 |
| 3.4. Análises Estatísticas..... | 21 |
| 4. RESULTADOS..... | 22 |
| 4.1. Toxicidade oral para operárias adultas..... | 22 |

| | |
|---------------------------------------------------------|----|
| 4.2. Toxicidade tópica para operárias adultas..... | 26 |
| 4.3. Toxicidade por contato para operárias adultas..... | 29 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 33 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 42 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

RESUMO

DEL SARTO, Mário César Laboissière. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-orientadores: Raul Narciso de Carvalho Guedes e José Eduardo Serrão.

A *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1836) é considerada um potencial polinizador da cultura do tomateiro em ambiente protegido. No entanto, esse polinizador pode ser afetado diretamente por compostos tóxicos pulverizados na cultura para o controle de pragas e/ou doenças. O objetivo foi avaliar os efeitos letais (DL_{50}) dos inseticidas abamectina, deltametrina, espinosade e metamidofós para a abelha-sem-ferrão *M. quadrifasciata* (Lepeletier, 1836) e para *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) africanizada (Hymenoptera: Apidae), utilizando metodologias adaptadas de ensaios com *A. mellifera* por diferentes vias de exposição. Nos testes de exposição por via oral, as formulações os inseticidas abamectina, deltametrina, espinosade e metamidofós se mostraram altamente tóxicos ($DL_{50} < 1,0 \mu\text{g}$ i.a./abelha) para operárias da *M. quadrifasciata*. Assim como para a *A. mellifera*, com exceção do metamidofós foi moderadamente tóxico (DL_{50} 1-10 μg i.a./abelha). Na exposição tópica os ingredientes ativos abamectina, deltametrina e metamidofós foram considerados virtualmente atóxicos ($DL_{50} > 100 \mu\text{g}$ i.a./abelha) para *M. quadrifasciata*. Assim como para a *A. mellifera*, com exceção da abamectina foi moderadamente tóxica (DL_{50} 1-10 μg i.a./abelha). Na aplicação por contato, abamectina e deltametrina apresentaram toxicidade moderada (DL_{50} 1-10 μg i.a./abelha) e o metamidofós mostrou-se ligeiramente tóxico (DL_{50} 10-100 μg i.a./abelha) para *M. quadrifasciata*. Porém, para operárias de *A. mellifera* a deltametrina apresentou toxicidade moderada (DL_{50} 1-10 μg i.a./abelha),

abamectina foi ligeiramente tóxica (DL_{50} 10-100 μg i.a./abelha) e o metamidofós virtualmente atóxico (DL_{50} >100 μg i.a./abelha).

ABSTRACT

DEL SARTO, Mário César Laboissière. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February 2009. **Insecticide Toxicity to the bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Advisor: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-advisors: Raul Narciso de Carvalho Guedes and José Eduardo Serrão.

The *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1836) is considered a potential pollinator of tomatoes in greenhouse. However, this pollinator may be directly affected by toxic compounds sprayed on the crop to control pests and diseases. The objective was to evaluate the lethal effects (LD₅₀) of the insecticides abamectin, deltamethrin, spinosad and methamidophos to the stingless bee *M. quadrifasciata* (Lepeletier, 1836) and the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae), using methods adapted from tests with *A. mellifera* by different routes of exposure. In tests of oral exposure, the insecticide formulations of abamectin, deltamethrin, spinosad and methamidophos were highly toxic (LD₅₀ <1,0 µg a.i./bee) for workers of *M. quadrifasciata*. The same took place for *A. mellifera*, with the exception of methamidophos, which was moderately toxic (LD₅₀ 1-10 µg a.i./bee). Topical toxicity of the active ingredients abamectin, deltamethrin and methamidophos was low and these insecticides were virtually non-toxic (LD₅₀ > 100 µg a.i./bee) to *M. quadrifasciata* and *A. mellifera*, except for abamectin, which was moderately toxic to *A. mellifera* (LD₅₀ 1-10 µg a.i./bee). The contact toxicity of abamectin and deltamethrin was moderate (LD₅₀ 1-10 µg a.i./bee) and methamidophos was found to be slightly toxic (LD₅₀ 10-100 µg a.i./bee) for *M. quadrifasciata*. In contrast, deltamethrin exhibited moderate toxicity to workers of *A. mellifera* (LD₅₀ 1-10 µg a.i./bee), abamectin was slightly toxic (LD₅₀ 10-100 µg

a.i./bee) and methamidophos virtually non toxic ($LD_{50} >100 \mu\text{g}$ a.i./bee).

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma hortaliça pertencente à família Solanaceae originária da América tropical sendo de grande interesse econômico em diversos países (Pouvreau, 1984). No Brasil é uma das principais hortaliças cultivadas (Valarini *et al.*, 2007), com produção estimada em 3,3 milhões de toneladas (2006/2007) em uma área de 58 mil hectares, sendo 27% da produção destinada à indústria e 73% ao consumo *in natura* (IBGE, 2007). Dentre os estados produtores de tomate, São Paulo destaca-se em primeiro lugar com uma produção anual estimada de tomate *in natura* de 76 mil toneladas (Produtos..., 2005), seguido por Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Agriannual, 2006).

A produção de tomate no Brasil é feita tradicionalmente em extensas áreas onde diferentes variedades são conduzidas no sistema de produção tutorado (tomates destinados principalmente ao consumo *in natura*) ou rasteiro (tomates destinados à indústria de molhos de tomate), com uso intensivo de pesticidas para o combate de pragas e vetores de viroses (Filgueira, 2003).

Tradicionalmente, a cultura do tomate emprega grande quantidade de pesticidas sendo realizadas até 80 pulverizações durante o ciclo da cultura (120 dias) para o controle de ácaros (*Aculops lycopersici*); brocas (*Helicoverpa zea*); pulgões (*Myzus*

persicae); traças (*Tuta absoluta*) dentre outros insetos e doenças (Filgueira, 2003), o que pode representar até 35% do custo de produção da cultura (Melo, 2003). Tal sistema de produção limita a presença de polinizadores bióticos na área de cultivo.

A produção de tomate orgânico também vem aumentando devido ao uso de novas técnicas agronômicas. Neste sistema de cultivo, os custos de produção são cerca de 20% menores e os ganhos 73% maiores em comparação ao sistema tradicional. A demanda por produtos orgânicos associada à crescente necessidade de aumento da disponibilidade de alimentos, possibilidade de controle das condições climáticas e de agregação de valor ao produto agrícola, favoreceu o crescimento do sistema de produção pela técnica do cultivo em ambiente protegido (Villar, 2003).

Também no cultivo em ambiente protegido, os produtores de tomates sofrem com a ação de pragas e doenças (p.ex. mosca-branca, ácaros, fungos etc.), tendo que recorrer à utilização de inseticidas, acaricidas e/ou fungicidas em algumas situações para o controle. Uma alternativa seria a adoção de práticas menos agressivas, como controle biológico no controle de pragas e doenças que garantissem o uso racional de insetos polinizadores.

A polinização como um serviço do ecossistema prestado em benefício do homem foi valorada em cerca de 200 bilhões de dólares anuais (Constanza *et al.* 1997). A polinização constitui-se em um

fator de produção fundamental na condução de muitas culturas agrícolas ao redor do mundo e a diminuição da disponibilidade de polinizadores para as plantas que deles necessitam pode causar limitações na quantidade de frutos (Roubik 2002), qualidade dos frutos (Wallace & Lee, 1999) e número de sementes (Kalinganire *et al.* 2001), constituindo-se em (um dos maiores) problema quando se trata de produção agrícola.

Em relação ao cultivo do tomateiro em sistema de plantio convencional, a polinização pode não ser o grande problema. Apesar das flores possuírem anteras poricidas, são autopolinizáveis e o vento ou a visita de insetos é suficiente para garantir a vibração das anteras para a remoção do pólen e a polinização (McGregor, 1976; Picken, 1984; Free, 1992, Del Sarto *et al.*, 2004). Assim, a polinização não é fator limitante à produção do tomateiro cultivado em sistemas convencionais.

Em ambientes protegidos, o grande problema para a produção do tomate é a escolha de um modo adequado de polinização, já que ventos e insetos polinizadores são muito raros ou ausentes nesse sistema (McGregor, 1976; Picken, 1984; Free, 1992; Hochmuth, 2001). Quando cultivado nestas condições, duas técnicas podem ser usadas pelos produtores para a polinização artificial do tomateiro. Uma é a vibração manual das flores usando dispositivos mecânicos ou não. A outra é o emprego de fluxos de ar dentro do cultivo protegido (Dogterom *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2000). Contudo, estas técnicas

não são satisfatórias e podem afetar a qualidade dos frutos. Ao se vibrar o tomateiro, os fitilhos (tutores) podem danificar os frutos e estes têm seu valor comercial reduzido. A vibração artificial também aumenta a necessidade de mão-de-obra e os custos de produção (McGregor, 1976; Kevan *et al.*, 1991; Dogterom *et al.*, 1998).

A maioria dos estudos e esforços para melhorar a polinização das culturas agrícolas tem sido realizada com a abelha *Apis mellifera* (Apidae) (Free, 1970; McGregor, 1976; Crane & Walker, 1984; Robinson *et al.*, 1989). No entanto, esta espécie não é uma boa opção para solanáceas com anteras poricidas, como o tomateiro porque é incapaz de vibrar as flores no momento da coleta do pólen (Danka & Rinderer, 1986; Cauich *et al.*, 2003). Além disso, estas abelhas podem ser extremamente defensivas e picar os trabalhadores, a exemplo do híbrido africanizado presente nas Américas.

Na Comunidade Européia, Estados Unidos, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Colômbia e Chile, a utilização de abelhas dos gêneros *Bombus* e *Xylocopa* (Apidae) em programas de polinização comercial tem sido um dos principais responsáveis pela produtividade e rentabilidade da cultura do tomateiro em ambiente protegido (Freitas, 1998; Velthuis, 2002). Estas abelhas realizam a polinização por vibração das flores, diminuindo os custos de produção, melhorando a produtividade e agregando valor ao fruto produzido (McGregor, 1976;

Kevan *et al.*, 1991; O'Toole, 1993; Dogterom *et al.*, 1998; Hogendoorn *et al.*, 2000; Richards & Kevan, 2002; Willians, 2002).

Apesar de, no Brasil, existirem seis espécies de *Bombus* e cerca de 50 de *Xylocopa* (Silveira *et al.*, 2002), ainda não existem técnicas adequadas de manejo para que essas espécies possam ser usadas em programas de polinização comercial (Freitas, 1998). Entretanto, muitas outras abelhas vibram flores para a coleta de pólen, entre elas, as abelhas-sem-ferrão do gênero *Melipona* (Buchmann 1983; Roubik, 1989; Heard, 1999; King e Buchmann 2003). O gênero *Melipona* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) agrupa cerca de 50 espécies distribuídas na região Neotropical (Camargo, 1970). São abelhas de tamanho moderado (8-15 mm) e seus ninhos podem ser encontrados principalmente em ocos em troncos e galhos de árvores, mas há espécies que nidificam no chão e ocasionalmente podem ser abrigados em ninhos abandonados de pássaros, cupinzeiros etc. (Kerr *et al.*, 1996; Michener, 2000). *Melipona* apresenta complexo sistema de comunicação (Nieh & Roubik, 1995; Jarau *et al.*, 2000).

Uma espécie particularmente interessante para a polinização da cultura do tomateiro é *Melipona quadrifasciata* (Lepelletier, 1836), popularmente conhecida como mandaçaia. Isto porque: (1) as abelhas do gênero *Melipona* frequentemente usam o pólen das flores de solanáceas como recurso (Wilms e Wiechers, 1997; Melo, 2004); (2) existem tecnologias bem estabelecidas para a multiplicação de suas colônias (Nogueira-Neto, 1970); (3) são tradicionalmente

criadas em áreas rurais (Kerr *et al.*, 2001) e (4) é uma espécie relativamente comum e abundante na maior parte da sua distribuição geográfica (Silveira *et al.*, 2002), a qual inclui as maiores áreas de plantio de tomates do Brasil (Agrianual, 2003). Além disso, pode ser usada na polinização de tomates em cultivo protegido (Del Sarto *et al.*, 2004; Del Sarto *et al.*, 2005).

O declínio das populações de polinizadores (Kearns *et al.* 1998, Roubik 2001) tem sido causado principalmente pelo uso não-sustentável dos ecossistemas para produção agrícola (Aizen & Feinsinger, 1994; Kevan, 1999; Kremen *et al.*, 2002, Richards & Kevan 2002). Dentre os diversos aspectos relacionados ao uso não sustentável de agroecossistemas, a utilização excessiva de inseticidas no cultivo tradicional do tomate (Filgueira, 2003), com certeza impõe risco às populações de espécies de abelhas polinizadoras neste sistema (Paschoal, 1979; Kevan, 1999).

Graves prejuízos são causados por inseticidas às populações de polinizadores (Allen-Wardell *et al.*, 1998, Kevan, 1999; Richards & Kevan, 2002). Os efeitos dos pesticidas em *Apis mellifera* podem ser representativos dos efeitos em outros polinizadores, incluindo outras espécies de abelhas (Johansen *et al.*, 1990; Desneux *et al.*, 2007). As abelhas (Apidae) constituem um grupo bastante diversificado, e abelhas de diferentes grupos taxonômicos diferem muito em sua vulnerabilidade a exposição aos pesticidas (Desneux *et al.*, 2007). Mesmo com estas limitações, as abelhas são frequentemente usadas

como bioindicadores de poluição ambiental (Kevan, 1999; Thompson, 2002; Desneux *et al.*, 2007).

O efeito dos inseticidas sobre a fauna de polinizadores dos agroecossistemas tem sido bem evidenciado, sendo diretamente responsável pela redução das populações de abelhas e indiretamente pelas perdas econômicas decorrentes do declínio das populações desses polinizadores (Allen-Wardell *et al.*, 1998, Kevan, 1999; Richards & Kevan, 2002).

A toxicidade de inseticidas em abelhas começou a ser estudada nos países de clima temperado, os quais foram os principais realizadores deste tipo de estudo, mesmo antes da introdução do DDT em 1942 (Paschoal, 1979; Moraes *et al.*, 2000). Isso ocorreu principalmente no caso da espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Apidae), devido à sua importância nos serviços de polinização comercial de várias culturas (Free, 1970; McGregor, 1976; Crane & Walker, 1984) e a importância econômica e social da Apicultura (Williams, 1994; Pham-Delègue *et al.*, 2002).

Os estudos sobre a toxicidade de inseticidas na fauna de abelhas tropicais, no caso dos meliponíneos, ainda são relativamente escassos, já que estas espécies não ocorrem em países de clima temperado (O'Toole, 1993; Moraes *et al.*, 2000; Pinheiro-Machado *et al.*, 2002). Muitos dos testes de toxicidade de pesticidas descritos e padronizados utilizam somente a espécie *A. mellifera* (Felton *et al.*

1986). Os estudos da toxicidade de inseticidas em meliponíneos, utilizam adaptações de metodologia empregadas nos estudos com *A. mellifera* (Moraes *et al.*, 2000).

Muitos pesticidas, mesmo em baixas concentrações, podem ser extremamente tóxicos para as abelhas (Thompson 2001; 2002; Van der Steen, 2001a; Gallo, 2003; Rortais *et al.*, 2005). Quando as abelhas são expostas (tópica ou oral), mesmo a baixas concentrações de pesticidas, estes podem desencadear efeitos subletais. A interferência na capacidade cognitiva das abelhas, na habilidade de orientação, e no comportamento, por exemplo, afetam sua atividade de forrageamento (Pham-Delègue *et al.*, 2002; Rortais *et al.*, 2005).

É necessário estabelecer uma metodologia aplicável às abelhas-sem-ferrão sob as condições tropicais e avaliar os danos (letais e sub-letais) que inseticidas podem causar-lhes. Isto contribuirá para a preservação de espécies nativas e para melhoria qualitativa e quantitativa da produção agrícola através da polinização, além de minimizar a contaminação ambiental e riscos ao homem. O estabelecimento de metodologias para testes de toxicidade aguda de inseticidas específicos para a fauna de abelhas brasileiras é necessário para melhor compreender os efeitos dos pesticidas recomendados para a cultura do tomateiro sobre os seus polinizadores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos letais (DL₅₀) de inseticidas usados na cultura do tomateiro para a abelha-sem-ferrão *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1836) em contraposição aos efeitos letais (DL₅₀) para *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae) africanizada.

2.2. Objetivos Específicos:

2.2.1. Avaliar a toxicidade aguda letal (DL₅₀), por exposição oral das formulações dos inseticidas abamectina, deltametrina, espinosade e metamidofós, para a abelha-sem-ferrão *M. quadrifasciata* (mandançaia) e para *A. mellifera* (africanizada);

2.2.2. Avaliar a toxicidade aguda letal (DL₅₀), por exposição tópica dos ingredientes ativos abamectina, deltametrina e metamidofós, para a abelha-sem-ferrão *M. quadrifasciata* (mandançaia) e para *A. mellifera* (africanizada);

2.2.3. Avaliar a toxicidade aguda letal (DL₅₀), por exposição por contato dos ingredientes ativos abamectina, deltametrina e metamidofós para a abelha-sem-ferrão *M. quadrifasciata* (mandaçaia) e para *A. mellifera* (africanizada).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos utilizados para avaliar a toxicidade aguda letal (DL₅₀) de inseticidas são preconizados pela “European and Mediterranean Plant Protection Organization” (EPPO), “International Commission for Plant-Bee Relationships” (ICPBR) e “Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)”, que estabelecem métodos para testes de laboratório para avaliar o impacto de pesticidas em abelhas (OEPP/EPPO, 2001; Felton *et al.*, 1986; OECD/OCDE – 213a e 214b, 1998).

3.1. Espécies de abelhas escolhidas

Os experimentos para determinar a toxicidade dos inseticidas usados na cultura do tomateiro foram realizados com operárias adultas (forrageiras) de sete colônias da abelha-sem-ferrão *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1836), e sete colméias da espécie africanizada *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758). Ambas as espécies são mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

A espécie de abelha-sem-ferrão foi escolhida, principalmente, por ser considerada potencial polinizadora da cultura do tomateiro em ambiente protegido (Del Sarto *et al.*, 2004; Del Sarto *et al.*, 2005) e por ser relativamente comum na região. *A. mellifera* foi utilizada por

ser espécie indicadora em protocolos padronizados para testes ecotoxicológicos (OECD/OCDE, 213a e 214b, 1998; OEPP/EPPO, 2001), face à sua importância ecológica e a elevada viabilidade econômica nos serviços de polinização comercial de diversas culturas em áreas agrícolas (Free, 1970; McGregor, 1976; Crane & Walker, 1984; Kevan, 1991; Williams, 1994; Freitas, 1998).

3.2. Inseticidas testados

Foram testadas quatro formulações de inseticidas - acaricidas registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para a cultura do tomateiro e freqüentemente utilizados na região de Viçosa - MG, com as seguintes classes de compostos: produtos de fermentação microbiana (espinosade - Tracer 480 g/L) e (abamectina - Vertimec CE, 18 g/L); organofosforado (metamidofós - Tamaron BR 600 g/L); piretróide (deltametrina - Decis EC, 25 g/L). Para os testes de exposição oral foram utilizadas as formulações comerciais dos inseticidas. Nos testes de exposição tópica (dérmica) e contato foram utilizados os ingredientes ativos (i.a.) dos inseticidas.

O inseticida espinosade (Tracer) apenas foi utilizado nos testes de exposição oral, porque o produto é formulado fora do Brasil e a empresa (Dow Agrosiences) não disponibiliza o ingrediente ativo em grau técnico (L. A. Pavan, comunicação pessoal).

Os inseticidas foram classificados (toxicidade oral e tópica) de acordo as categorias toxicológicas sugeridas por Felton *et al.* (1986) baseado em valores da DL₅₀ (µg de ingrediente ativo) onde: altamente tóxico (DL₅₀ < 1,0 µg i.a./abelha); moderadamente tóxico (DL₅₀ de 1-10 µg i.a./abelha); ligeiramente tóxico (DL₅₀ de 10-100 µg i.a./abelha); virtualmente atóxico (DL₅₀ > 100 µg i.a./abelha).

3.3. Testes de toxicidade aguda letal (DL₅₀)

A metodologia empregada para avaliar a toxicidade aguda de inseticidas sobre a abelha-sem-ferrão *Melipona quadrifasciata* e para *Apis mellifera*, foi com base nas metodologias adaptadas da OECD e EPPO - Guia para Testes Químicos, estabelecidas para *A. mellifera* (OEPP/EPPO, 2001; Felton *et al.*, 1986; OECD/OCDE, 213a e 214b, 1998).

3.3.1. Testes orais de letalidade para operárias adultas

Para a realização dos testes de toxicidade por via oral de exposição foram utilizadas as formulações comerciais dos inseticidas. As concentrações para cada inseticida testado foram determinadas através de bioensaios, com base na concentração de ingrediente ativo indicado no rótulo das formulações (18, 25, 480 e 600 g/L para

abamectina, deltametrina, espinosade e metamidofós, respectivamente), em duas etapas: 1) testes preliminares para reconhecer a faixa das doses onde há resposta (variação de resposta), através de seis diluições em série (fator 1:10) da concentração estoque dos inseticidas em água destilada; a partir do reconhecimento da faixa de doses incorrendo em variações de mortalidade, estabeleceu-se cinco doses intermediárias aos extremos de resposta (0 e 100% mortalidade) a serem usadas nos testes definitivos; 2) testes definitivos, reconhecida a faixa de resposta dos teste preliminares, para a concentração-estoque foi diluída em água destilada para o estabelecimento de 6 a 8 doses em concentrações crescentes de seus ingredientes ativos a serem aplicadas. Os inseticidas foram veiculados mediante dieta (xarope de mel/água, 50%), de acordo com as doses pré-estabelecidas.

As abelhas da espécie *M. quadrifasciata* foram coletadas, utilizando um tubo plástico com diâmetro de 20 mm conectado na entrada das colônias em gaiolas de madeira (9 x 9 x 3 cm) cobertas com tela plástica e forradas com papel de filtro, de modo que as forrageiras eram presas ao saírem. Para a coleta das operárias da espécie *A. mellifera*, as gaiolas foram posicionadas na entrada das colméias (alvado) (Figura 2 A e B).

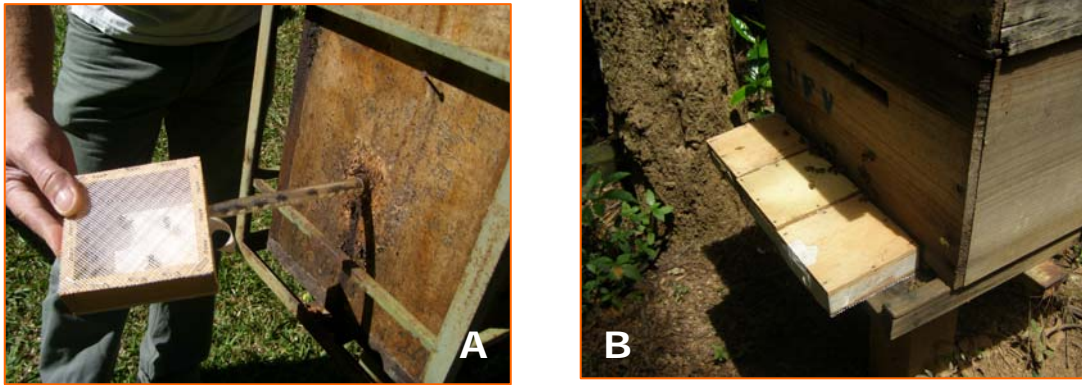


Figura 2. Sistema de coleta das abelhas (operárias) para exposição oral. A) *M. quadrifasciata*; B) *A. mellifera*.

Em cada gaiola-teste foi adaptado um alimentador (tubo de Eppendorf de 2,0 mL furado na base) por onde o grupo de operárias (aproximadamente 7 abelhas) teve contato com o alimento contendo as doses do inseticida testado (Figura 3 A). Com este método também foi possível monitorar e calcular o consumo da solução pelas abelhas após a exposição às doses de inseticidas (p.ex. medição do volume/massa do alimento restante), para o estabelecimento mais preciso dos valores das DL_{50} .

Para aplicação das concentrações-testes, as soluções (doses) dos inseticidas testados foram veiculadas junto ao alimento equivalendo a 10% do volume deste, variando as concentrações do ingrediente ativo. Antes do início do teste as abelhas foram privadas de alimento por um período de uma hora. Após o período de cinco horas de exposição ao alimento com o inseticida, foi trocado o alimentador teste e as abelhas receberam alimentação normal

(xarope, 50%) e calculado o consumo de alimento com inseticida (Figura 3 B).

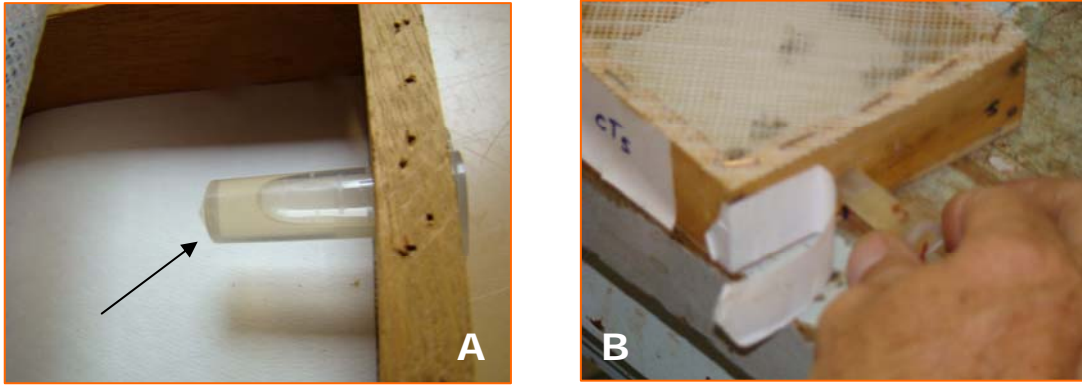


Figura 3. Sistema de aplicação das doses por exposição oral. A) Alimentador - tubo Eppendorf (2,0 mL), furado na base (seta); B) Remoção do alimentador após a exposição.

Para cada tratamento (concentração do inseticida) foram utilizadas sete repetições, cada uma contendo sete operárias adultas de diferentes colônias para cada espécie. As gaiolas foram mantidas em estufa B.O.D. a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $65 \pm 5\%$ de umidade relativa, durante todo o experimento.

Os testes para avaliação da toxicidade oral tiveram a duração de 24 horas. Ao final de cada teste, foi anotada a taxa de mortalidade para cada tratamento, sendo consideradas mortas às abelhas que se mostraram incapazes de se locomoverem após o período de exposição.

3.3.2. Testes tópicos de letalidade em operárias adultas

Para a realização dos testes por via tópica de exposição foram utilizados os ingredientes ativos comerciais em grau técnico (pureza $\geq 85\%$). As concentrações dos inseticidas a serem utilizadas foram determinadas através de bioensaios (ver item 3.3.1.), com base na concentração estoque dos ingredientes ativos (10 mg/mL para abamectina, deltametrina e metamidofós). As soluções testadas foram diluídas em acetona (P. A.) e em concentrações crescentes do ingrediente ativo. O controle, no ensaio, foi feito apenas com o solvente utilizado (acetona).

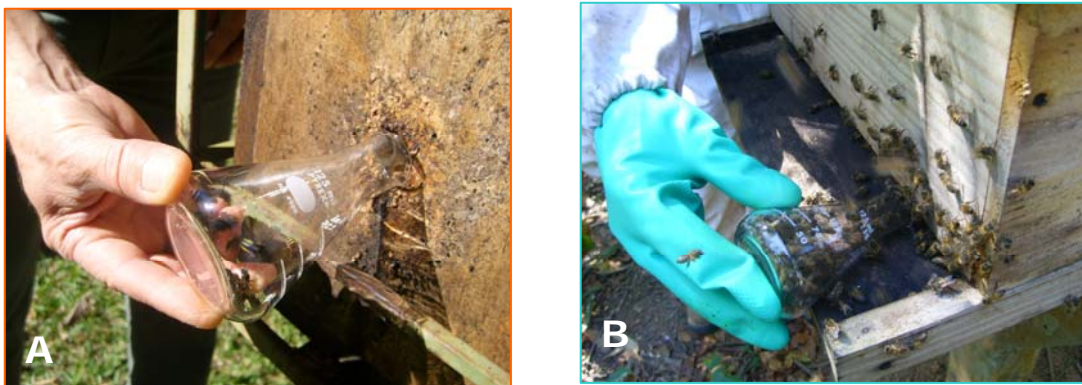


Figura 4. Sistema de coleta das abelhas (operárias) para exposição tópica. A) *M. quadrifasciata*; B) *A. mellifera*.

Para os testes de exposição tópica, as abelhas (operárias) foram coletadas na entrada das colônias com auxílio de frascos de boca larga (Figura 4 A e B) e anestesiadas em gelo (resfriadas). A exposição foi feita mediante aplicação de $1\mu\text{l}$ da solução com auxílio

de um micro-aplicador automático (Burkard – Manufacturing Co Ld.), na face ventral do tórax, entre o 2º e 3º par de pernas (Figura 5 A e B).

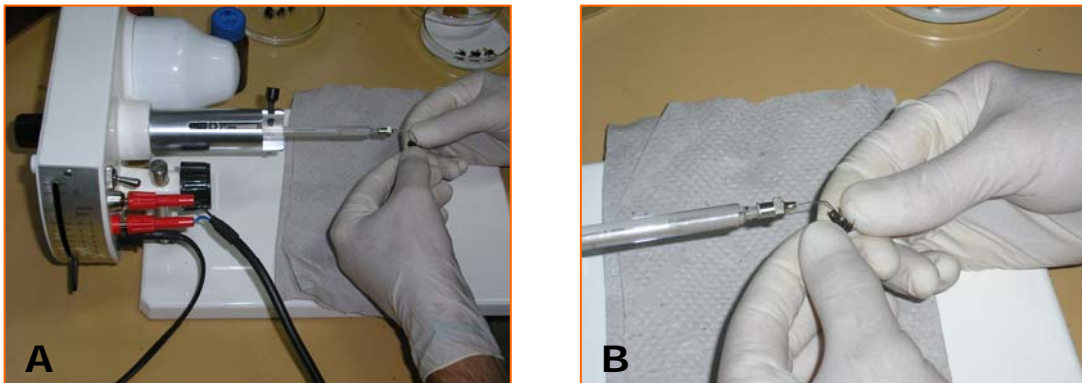


Figura 5. Aplicação tópica das doses. A) Micro-aplicador automático; B) aplicação solução teste na face ventral do tórax, entre o 2º e 3º par de pernas.

Posteriormente, as abelhas foram transferidas para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro por 3,0 cm de altura), forradas com um círculo de papel de filtro. Em cada placa de Petri foi colocado um alimentador (tampa de refrigerante, forrada com uma tela para que as abelhas não se afogassem) com alimento (xarope de água/mel, 50%) (Figura 6).

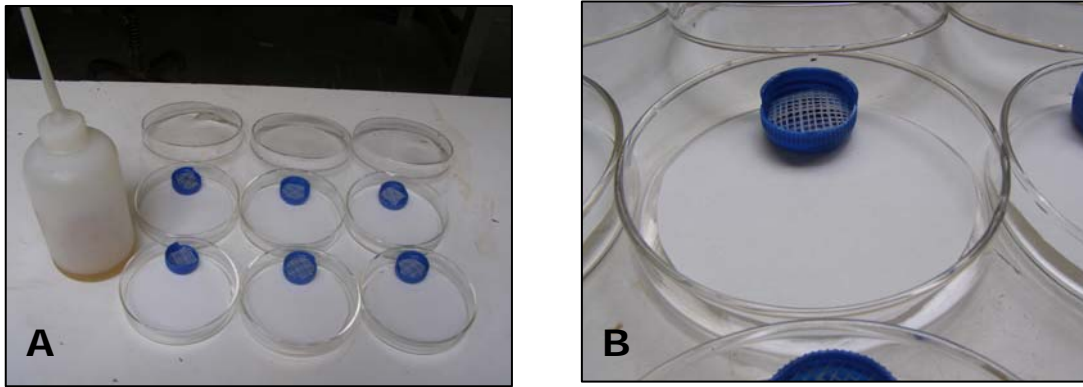


Figura 6. A) Sistema de alimentação, exposição tópica e contato; B) Detalhe do alimentador.

Em cada tratamento (concentração de inseticida) foram utilizadas cinco repetições, cada uma contendo oito abelhas adultas de diferentes colônias para cada espécie avaliada. As placas de Petri com as abelhas foram mantidas em estufa B.O.D. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $65 \pm 5\%$ de umidade relativa durante o experimento.

Os testes para avaliação da toxicidade aguda por via tópica tiveram a duração de 24 horas e, ao final de cada teste, foi anotada a taxa de mortalidade para cada concentração, sendo consideradas mortas às abelhas que se mostraram incapazes de se locomoverem após o período de exposição.

3.3.3. Testes por contato de letalidade em operárias adultas

Para a realização dos testes de exposição por via contato foram utilizados os ingredientes ativos comerciais em grau técnico (pureza

$\geq 85\%$). As concentrações dos inseticidas foram determinadas através de bioensaios (ver item 3.3.1.), com base na concentração estoque dos ingredientes ativos (10 mg/mL para abamectina, deltametrina e metamidofós). As soluções do inseticida testado foram diluídas em acetona (P. A.) e em concentrações crescentes de seus ingredientes ativos. O controle, no ensaio, foi feito com o solvente utilizado (acetona). As abelhas foram coletadas na entrada das colônias com auxílio de frascos de boca larga (Figura 4 A e B) e anestesiadas em gelo (resfriadas) para que pudessem ser manipuladas e transferidas para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro por 3,0 cm de altura) forradas com um círculo de papel de filtro.

Neste procedimento a exposição se deu por meio do contato das abelhas com o círculo de papel de filtro (9,0 cm de diâmetro), impregnado com 1.000 μl da solução do inseticida testado e seco ao ar, o qual forrava o fundo da placa de Petri onde as abelhas foram mantidas (Figura 7).



Figura 7. Aplicação das doses (Contato/filtro), 1.000 μl da solução do inseticida testado no círculo de papel de filtro e seco ao ar.

Em cada placa de Petri foi colocado um alimentador (tampa plástica de refrigerante, forrada com uma tela para que as abelhas não se afogassem) e fornecida alimentação (xarope de água/mel, 50%) durante o experimento (Figura 6).

Para cada tratamento (concentração do inseticida), foram utilizadas cinco repetições, cada uma contendo dez abelhas adultas de diferentes colônias de cada espécie. As placas de Petri teste foram mantidas em estufa B.O.D. a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $65 \pm 5\%$ de umidade relativa durante todo o experimento.

Os testes para avaliação da toxicidade aguda por via de exposição por contato tiveram a duração de 24 horas e ao final de cada teste foi anotada a taxa de mortalidade para cada concentração, sendo consideradas mortas às abelhas que se mostraram incapazes de se locomoverem após o período de exposição.

3.4. Análises Estatísticas

As curvas dose ou concentração-mortalidade (DL_{50}) foram estimadas pelo procedimento Probit utilizando o programa SAS (SAS Institute, 1997). Para cada inseticida testado foram obtidos os índices de toxicidade relativa entre os inseticidas ($ITxR_{50} = DL_{50}$ do inseticida menos tóxico para a abelha/ DL_{50} do inseticida mais tóxico para abelha) e de tolerância relativa entre as espécies ($ITR_{50} = DL_{50}$ do

inseticida para espécie de abelha mais tolerante/ DL₅₀ do inseticida para a abelha mais susceptível), e seus limites de confiança a 95% foram calculados seguindo Robertson e Preisler (1992).

4. RESULTADOS

Os valores do teste de qui-quadrado (χ^2 e p) foram usados para verificar a adequabilidade do modelo de probit aos dados de mortalidade obtidos para cada inseticida e espécie de abelha. Os valores preditos pelo modelo de probit não diferem significativamente dos valores obtidos nos bioensaios (baixos valores de χ^2 e $p > 0,05$). Assim o modelo de probit mostrou-se adequado para a estimativa dos parâmetros de toxicidade (DLs.) obtidos dele (Tabelas 1, 3 e 5).

4.1. Toxicidade oral para operárias adultas

Nos testes de exposição por via oral os inseticidas espinosade, abamectina, metamidofós e deltametrina, se mostraram altamente tóxicos (DL₅₀ < 1,0 µg i.a./abelha) para operárias adultas da *M. quadrifasciata*.

Entre os inseticidas avaliados, deltametrina apresentou menor toxicidade para *M. quadrifasciata* possuindo a maior DL₅₀ (Tabela 1).

Seu índice de toxicidade relativa ($ITxR_{50}$) foi tomado como igual a um (1), e utilizado como referencial nas comparações, indicando quantas vezes um inseticida é mais tóxico que outro.

O inseticida espinosade foi o que apresentou a maior toxicidade para *M. quadrifasciata*, possuindo a menor DL_{50} e sendo cerca de 20x mais letal que a deltametrina, seguido pela abamectina e metamidofós (Tabelas 1 e 2).

Nos testes para *A. mellifera*, as formulações dos inseticidas abamectina, espinosade e deltametrina também foram consideradas altamente tóxicas ($DL_{50} < 1,0 \mu\text{g i.a./abelha}$). Apenas o metamidofós foi moderadamente tóxico ($DL_{50} 1 - 10 \mu\text{g i.a./abelha}$).

O inseticida metamidofós foi o que apresentou a menor toxicidade, possuindo a maior DL_{50} para a espécie africanizada *A. mellifera* (Tabela 1). Seu índice de toxicidade relativa ($ITxR_{50}$) foi tomado como igual a um (1), e utilizado como referencial nas comparações, indicando quantas vezes um inseticida é mais tóxico que outro. A abamectina foi o inseticida mais tóxico à espécie *A. mellifera*, possuindo a menor DL_{50} , sendo cerca de 340x mais letal que o metamidofós, seguido pelo espinosade e deltametrina (Tabelas 1 e 2).

Entre as espécies avaliadas, a espécie africanizada *A. mellifera* foi cerca de 56x mais tolerante (ITR_{50}) ao metamidofós, 35x mais tolerante ao espinosade e 10x mais tolerante à deltametrina que a

espécie nativa *M. quadrifasciata*. Já a abelha nativa *M. quadrifasciata* foi ligeiramente mais tolerante à abamectina que à espécie africanizada (Tabela 2).

Tabela 1. Toxicidade oral de inseticidas para abelhas adultas da espécie nativa *Melipona quadrifasciata* e africanizada *Apis mellifera*. Temperatura de 28 ± 2 °C e 65 ± 5% de U.R.

| Inseticidas | Espécies | N | Inclinação ± SE | DL ₅₀ (IF - 95%) (µg i.a./ abelha) ¹ | DL ₉₅ (IF - 95%) (µg i.a./ abelha) | qui-quadrado | P |
|--------------|--------------------------|-----|--------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|------|
| Abamectina | <i>M. quadrifasciata</i> | 322 | 4,7 ± 0,50 | 0,015 (0,013 - 0,016) | 0,033 (0,028 - 0,042) | 1,67 | 0,80 |
| | <i>A. mellifera</i> | 284 | 6,07 ± 0,99 | 0,011 (0,010 - 0,012) | 0,020 (0,012 - 0,026) | 0,10 | 0,99 |
| Deltametnina | <i>M. quadrifasciata</i> | 284 | 2,7 ± 0,35 | 0,082 (0,065 - 0,097) | 0,32 (0,24 - 0,48) | 0,33 | 0,33 |
| | <i>A. mellifera</i> | 246 | 1,8 ± 0,44 | 0,85 (0,40 - 1,17) | 7,00 (4,20 - 27,98) | 4,00 | 0,12 |
| Espinosade | <i>M. quadrifasciata</i> | 277 | 5,3 ± 0,61 | 0,004 (0,004 - 0,005) | 0,009 (0,008 - 0,012) | 0,001 | 0,97 |
| | <i>A. mellifera</i> | 262 | 4,22 ± 0,55 | 0,14 (0,13 - 0,17) | 0,35 (0,28 - 0,51) | 5,3 | 0,15 |
| Metamidofós | <i>M. quadrifasciata</i> | 399 | 3,7 ± 0,47 | 0,066 (0,050 - 0,093) | 0,18 (0,13 - 0,31) | 0,28 | 0,99 |
| | <i>A. mellifera</i> | 343 | 9,57 ± 2,37 | 3,68 (3,32 - 3,93) | 5,46 (4,83 - 7,61) | 0,55 | 0,76 |

¹ (µg i.a./ abelha) = micrograma de ingrediente ativo por abelha.

Tabela 2. Índice toxicidade relativa oral (ITxR₅₀) e tolerância relativa oral (ITR₅₀) de inseticidas para abelhas adultas da espécie a nativa *Melipona quadrifasciata* e para africanizada *Apis mellifera*.

| Inseticidas | ITxR ₅₀ ¹ (IC - 95%) | | ITR ₅₀ ² (IC - 95%) ³ |
|--------------|--------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------|
| | <i>M. quadrifasciata</i> | <i>A. mellifera</i> | Ap./ Mq. |
| Abamectina | 5,47 (4,80 – 6,55) | 336,36 (292,86 – 392,40) | 0,73 (0,64 – 0,86) |
| Deltametrina | – | 4,35 (2,75 – 6,71) | 10,36 (7,25 – 15,15) |
| Espinosade | 20,50 (13,87 – 24,60) | 26,43 (22,83 – 29,09) | 35,0 (28,59 – 36,44) |
| Metamidofós | 1,24 (0,79 – 1,87) | – | 56,06 (49,60 – 60,90) |

¹ ITxR₅₀ = DL₅₀ do inseticida menos tóxico / DL₅₀ do inseticida testado.

² ITR₅₀ = DL₅₀ do inseticida para *A. mellifera* / DL₅₀ do inseticida para *M. quadrifasciata*.

³ Intervalo Confiança a 95% probabilidade (Robertson e Preisler, 1992).

4.2. Toxicidade tópica para operárias adultas

Nos testes de laboratório para avaliação da toxicidade aguda por via de exposição tópica para operárias adultas de *M. quadrifasciata*, os ingredientes ativos abamectina, deltametrina e metamidofós foram considerados virtualmente atóxicos (DL₅₀ >100 µg i.a./abelha). Para *A. mellifera*, a abamectina foi moderadamente tóxica (DL₅₀ 1 - 10 µg i.a./abelha), e a deltametrina e o metamidofós foram virtualmente atóxicos (DL₅₀ >100 µg i.a./abelha) (Tabela 3).

Entre os inseticidas testados, metamidofós apresentou menor toxicidade para ambas as espécies *M. quadrifasciata* e *A. mellifera*, possuindo a maior DL₅₀. Seus índices de toxicidade relativa (ITxR₅₀) foram tomados como igual a um (1), e utilizados como referencial

nas comparações, indicando quantas vezes um inseticida é mais tóxico que outro.

O inseticida deltametrina foi o que apresentou a maior toxicidade, possuindo a menor DL_{50} para a espécie nativa *M. quadrifasciata* sendo cerca de duas vezes mais letal que o metamidofós, seguido pela abamectina (Tabelas 3 e 4).

O inseticida abamectina foi o que apresentou a maior toxicidade para espécie africanizada *A. mellifera*, possuindo a menor DL_{50} , sendo cerca de 60x mais letal que o metamidofós, seguido pela deltametrina (Tabelas 3 e 4).

Entre as espécies avaliadas, *M. quadrifasciata* foi cerca de 17x mais tolerante (ITR_{50}) ao abamectina e mostrou susceptibilidade similar à deltametrina e ao metamidofós, em relação à espécie africanizada (Tabela 4).

Tabela 1. Toxicidade tópica de inseticidas para abelhas adultas da espécie nativa *Melipona quadrifasciata* e africanizada *Apis mellifera*. Temperatura de 28 ± 2 °C e 65 ± 5% de U.R.

| Inseticidas | Espécies | N | Inclinação ± SE | DL ₅₀ (IF - 95%) (µg i.a./ abelha) ¹ | DL ₉₅ (IF - 95%) (µg i.a./ abelha) | qui-quadrado | P |
|--------------|--------------------------|-----|--------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|------|
| Abamectina | <i>M. quadrifasciata</i> | 224 | 3,02 ± 0,39 | 134,64 (109,68 - 168,94) | 471,62 (336,09 - 799,63) | 3,8 | 0,28 |
| | <i>A. mellifera</i> | 264 | 6,7 ± 1,54 | 7,82 (6,54 - 8,87) | 13,75 (11,49 - 20,83) | 4,7 | 0,32 |
| Deltametrina | <i>M. quadrifasciata</i> | 288 | 3,0 ± 0,38 | 129,17 (105,03 - 155,66) | 460,61 (347,94 - 707,87) | 5,31 | 0,38 |
| | <i>A. mellifera</i> | 267 | 3,3 ± 0,47 | 112,20 (90,78 - 134,80) | 359,58 (272,90 - 564,62) | 2,14 | 0,71 |
| Metaridofós | <i>M. quadrifasciata</i> | 224 | 2,03 ± 0,44 | 296,60 (215,66 - 428,78) | 1916,0 (1006,0 - 8695,0) | 0,94 | 0,62 |
| | <i>A. mellifera</i> | 208 | 2,5 ± 0,48 | 408,47 (295,58 - 603,63) | 1853,0 (1077,0 - 5544,0) | 0,14 | 0,93 |

¹ (µg i.a./ abelha) = micrograma de ingrediente ativo por abelha.

Tabela 4. Índice toxicidade relativa tópica (ITxR₅₀) e tolerância relativa tópica (ITR₅₀) de inseticidas para operárias adultas da espécie nativa *Melipona quadrifasciata* e africanizada *Apis mellifera*.

| Inseticidas | ITxR ₅₀ ¹ (IC – 95%) | | ITR ₅₀ ² (IC – 95%) ³ |
|--------------|--------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------|
| | <i>M. quadrifasciata</i> | <i>A. mellifera</i> | Mq. / Ap. |
| Abamectina | 2,20 (1,64 - 2,96) | 61,48 (43,34 - 63,03) | 17,23 (14,28 - 20,78) |
| Deltametrina | 2,30 (1,75 - 3,01) | 4,28 (2,79 - 4,76) | 1,15 (0,88 – 1,50) |
| Metamidofós | – | – | 0,62 (0,46 – 1,16) |

¹ ITxR₅₀ = DL₅₀ do inseticida menos tóxico / DL₅₀ do inseticida testado.

² ITR₅₀ = DL₅₀ do inseticida para *M. quadrifasciata* / DL₅₀ do inseticida para *A. mellifera*.

³ Intervalo Confiança a 95% (Robertson e Preisler, 1992).

4.3. Toxicidade por contato para operárias adultas

Na aplicação por contato (papel filtro), os inseticidas abamectina e deltametrina foram considerados moderadamente tóxicos (DL₅₀ 1 – 10 µg i.a./mL) e o metamidofós ligeiramente tóxico (DL₅₀ 10 – 100 µg i.a./mL) para operárias de *M. quadrifasciata*. Estes resultados foram distintos dos observados para operárias de *A. mellifera*, para o qual a deltametrina mostrou-se moderadamente tóxica (DL₅₀ 1 – 10 µg i.a./mL), a abamectina foi ligeiramente tóxica (DL₅₀ 10 – 100 µg/ abelha) e o metamidofós virtualmente atóxico (DL₅₀ >100 µg i.a./mL) (Tabela 5).

Entre os inseticidas avaliados, o metamidofós apresentou menor toxicidade para ambas as espécies de abelhas mostrando a maior DL₅₀. Seus índices de toxicidade relativa (ITxR₅₀) foram

tomados como igual a um (1), e utilizados como referencial nas comparações, indicando quantas vezes um inseticida é mais tóxico que outro (Tabela 6).

O inseticida abamectina foi o que apresentou a maior toxicidade, possuindo a menor DL_{50} para a espécie nativa *M. quadrifasciata*, sendo cerca de 25x mais letal que o metamidofós, seguido pela deltametrina (Tabelas 5 e 6).

Deltametrina foi o inseticida que apresentou a maior toxicidade por contato para *A. mellifera* africanizada possuindo a menor DL_{50} , 67x mais letal que o metamidofós, seguido pelo abamectina (Tabelas 5 e 6).

Entre as espécies avaliadas, a espécie africanizada *A. mellifera* foi cerca de 5x mais tolerante (ITR_{50}) ao metamidofós, 4x mais tolerante à abamectina e similarmente mais tolerante à deltametrina em relação à abelha-sem-ferrão *M. quadrifasciata* (Tabela 6).

Tabela 1. Toxicidade por contato de inseticidas para abelhas adultas da espécie nativa *Melipona quadrifasciata* e africanizada *Apis mellifera*. Temperatura de 28 ± 2 °C e 65 ± 5% de U.R.

| Inseticidas | Espécies | N | Inclinação ± SE | DL ₅₀ (IF - 95%) (µg i.a./ abelha) ¹ | DL ₉₅ (IF - 95%) (µg i.a./ abelha) | qui-quadrado | P |
|--------------|--------------------------|-----|--------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|------|
| Abamectina | <i>M. quadrifasciata</i> | 330 | 2,80 ± 0,42 | 3,81 (3,16 - 4,92) | 14,74 (9,67 - 31,08) | 1,3 | 0,52 |
| | <i>A. mellifera</i> | 330 | 2,25 ± 0,34 | 15,37 (12,10 - 19,00) | 83,02 (55,72 - 166,11) | 1,2 | 0,56 |
| Deltametrina | <i>M. quadrifasciata</i> | 330 | 2,27 ± 0,25 | 5,63 (4,44 - 6,95) | 29,91 (21,88 - 46,76) | 6,8 | 0,34 |
| | <i>A. mellifera</i> | 330 | 4,11 ± 0,81 | 6,59 (4,98 - 7,86) | 16,56 (13,15 - 25,97) | 2,3 | 0,32 |
| Metamidofós | <i>M. quadrifasciata</i> | 390 | 3,94 ± 0,73 | 96,06 (81,97 - 113,62) | 251,07 (186,92 - 456,04) | 0,2 | 1,00 |
| | <i>A. mellifera</i> | 330 | 3,04 ± 0,47 | 442,63 (336,01 - 582,04) | 1537,00 (1014,0 - 3257,0) | 3,28 | 0,35 |

¹ (µg i.a./ abelha) = micrograma de ingrediente ativo por abelha.

Tabela 6. Índice toxicidade relativa por contato (ITxR₅₀) e tolerância relativa por contato (ITR₅₀) de inseticidas para abelhas adultas da espécie nativa *Melipona quadrifasciata* e africanizada *Apis mellifera*.

| Inseticidas | ITxR ₅₀ ¹ (IC – 95%) | | ITR ₅₀ ² (IC – 95%) ³ |
|--------------|--------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------|
| | <i>M. quadrifasciata</i> | <i>A. mellifera</i> | Ap. / Mq. |
| Abamectina | 25,21(18,75 - 33,90) | 28,80 (21,24 - 39,06) | 4,03 (2,97 - 5,47) |
| Deltametrina | 17,06 (12,53 - 23,26) | 67,17 (50,28 - 89,79) | 1,17 (0,88 - 1,56) |
| Metamidofós | – | – | 4,61 (3,39 - 6,27) |

¹ ITxR₅₀ = DL₅₀ do inseticida menos tóxico/ DL₅₀ do inseticida testado.

² ITR₅₀ = DL₅₀ do inseticida para *A. mellifera*/ DL₅₀ do inseticida para *M. quadrifasciata*.

³ Intervalo Confiança das DL₅₀ a 95% de probabilidade (Robertson e Preisler, 1992).

5. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento do presente estudo ficou claro que a utilização dos compostos abamectina, deltametrina, espinosade e metamidofós, dependendo do modo de exposição para as abelhas, podem acarretar maior ou menor impacto (mortalidade) para as espécies potencialmente comprometendo programas de polinização racional em ambiente protegido mediados por abelha-sem-ferrão. Isto porque os resultados mostraram que estes inseticidas, em alguns casos (p.ex. exposição oral) foram altamente tóxicos para as abelhas, especialmente para *M. quadrifasciata*.

A metodologia utilizada nos experimentos foi adequada para realização dos testes de toxicidade aguda de inseticidas sobre operárias da *M. quadrifasciata*. Estes foram então empregados para determinar a dose letal média (DL₅₀) e verificar o impacto de inseticidas. O método também pode ser aplicado a outras espécies de abelhas-sem-ferrão, desde que o mecanismo de aplicação das doses e o tamanho da espécie de abelha seja adaptado para cada via de exposição. Os procedimentos estabelecidos para avaliação de toxicidade aguda (DL₅₀) para *A. mellifera*, por via oral e tópica, são bem conhecidos (OECD/OCDE - 213a e 214b, 1998; Thompson, 2001; OEPP/EPPO, 2001; Ladurner *et al.*, 2003). Estes podem ser aplicados para outras espécies de abelhas após devidamente adaptados, a exemplo do que se conseguiu para *Bombus terrestris* L.

(Apidae) (Tasei, 1987; 1993 e 1994; Van der Steen, 1994; 1996; 2001a; Thonpson, 2001; 2002), *Megachile rotundata* e *Nomia melanderi* Cockerell (Halictidade) (Mayer and Lunden, 1999).

Os testes de laboratório realizados demonstraram que as formulações dos inseticidas, dependendo do modo de exposição, apresentaram níveis de toxicidade diferentes para as espécies de abelhas avaliadas. Além disso, o estabelecimento da dose letal média (DL₅₀) foi fundamental, permitindo inferir sobre a classificação toxicológica dos inseticidas de acordo as categorias para classificação sugeridas por Felton *et al.* (1986). Segundo esses autores, a classificação toxicológica para os inseticidas nos testes de toxicidade aguda, ambos oral e tópica, são baseados em valores das DL₅₀ expressa em µg i.a./ abelha. Estas categorias reconhecidas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), são as dos inseticidas altamente tóxicos (classe I) e muito tóxicos (classe II) para o meio ambiente (AGROFIT, 2009).

Na exposição por via oral, a ação do inseticida ocorre através do contato com o sistema digestivo, ou seja, pela ingestão do ingrediente ativo. A alta toxicidade oral das formulações de espinosade, abamectina, metamidofós e deltametrina, para as abelhas *M. quadrifasciata* (com DL₅₀ de 0,004 – 0,082 µg i.a./abelha) e *A. mellifera* (DL₅₀ entre 0,015 – 0,85 µg i.a./abelha), pode estar relacionada ao modo de ação e/ou baixa destoxificação dos mesmos. Isto porque, frente à ingestão, os inseticidas são alvos de enzimas

destoxificadoras abundantes no sistema digestivo e tubos de Malpighi dos insetos, mas tal capacidade destoxificativa parece ser reduzida nestas espécies avaliadas (Dauterman, 1994; Yu, 2002; Miranda *et al.*, 2003; Yu, 2004).

Os resultados obtidos confirmam aqueles obtidos por Miles, (2003) quanto à toxicidade do espinosade; por Hunt *et al.* (2003), Carvalho (2006) e Rhodes *et al.* (2006) para abamectina; e por Nica *et al.* (2004) para o piretróide deltametrina, como produtos de alta toxicidade para operárias adultas de *A. mellifera* por via oral de exposição. Em relação à deltametrina, os resultados obtidos na presente pesquisa, divergem dos resultados encontrados por Carvalho, *et al.* (2002a), que classificaram o inseticida deltametrina como moderadamente tóxico as operárias de *A. mellifera*.

Quando a exposição foi por via tópica, essa tendência não se manteve. Os inseticidas deltametrina e metamidofós mostraram-se virtualmente atóxicos para as espécies *M. quadrifasciata* (DL₅₀ 129,17 – 296,60 µg i.a./abelha) e para *A. mellifera* (DL₅₀ 112,20 – 408,47 µg i.a./abelha). Apenas a abamectina (DL₅₀ 7,82 µg i.a./abelha) foi moderadamente tóxica para *A. mellifera*, e atóxica para *M. quadrifasciata*. No caso de abamectina, resultados semelhantes aos obtidos nessa pesquisa foram encontrados por outros autores (Mayer *et al.*, 1999; Hunt *et al.*, 2003; Carvalho, 2006; Rhodes *et al.*, 2006), e sugeriram que o mesmo não fosse aplicado em locais onde ocorresse à presença de abelhas. A baixa toxicidade tópica dos

inseticidas para as abelhas pode se atribuída a mecanismos tais como a menor taxa de penetração destes produtos pela cutícula das abelhas.

O processo de penetração via cutícula de um inseticida envolve características importantes como a espessura e a composição da cutícula, que podem influenciar na taxa de penetração do inseticida. O caráter lipofílico de alguns inseticidas é potencialmente pela espessura e composição lipídica da cutícula dos insetos maior ou menor taxa de penetração do inseticida na cutícula e sua translocação até o alvo de ação (Hollingworth, 1976; Yu, 1987 e 1988; Guedes, *et al.*, 1992; Gusmão *et al.*, 2000; Oliveira, *et al.*, 2002).

Em abelhas, especialmente em abelhas-sem-ferrão, são raros os estudos sobre a composição da cutícula. Segundo Abdalla (2003), existem diferenças qualitativas e quantitativas dos hidrocarbonetos que compõem a cutícula da *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Meliponini) permitindo diferenciar entre castas e entre o sexo das abelhas. Em *A. mellifera*, os perfis de hidrocarbonetos cuticulares, são em parte, geneticamente determinados e diferem entre linhagem de operárias (Arnold *et al.*, 2000).

Na exposição por contato, a ação do inseticida ocorre através da cutícula do abdômen do inseto (parte ventral) e principalmente

nos tarsos, pelo contato com a superfície contaminada. Ao contrário do observado na aplicação tópica, quando a exposição foi por contato (papel de filtro), os inseticidas abamectina e deltametrina (DL_{50} 3,81 e 5,63 $\mu\text{g i.a./mL}$, respectivamente) se mostraram moderadamente tóxicos e o metamidofós (DL_{50} 96,06 $\mu\text{g i.a./mL}$) foi ligeiramente tóxico para *M. quadrifasciata*. Em contraste, para *A. mellifera* a deltametrina (DL_{50} 6,59 $\mu\text{g i.a./mL}$) se mostrou moderadamente tóxica, a abamectina (DL_{50} 15,37 $\mu\text{g i.a./mL}$) foi ligeiramente tóxica e o metamidofós virtualmente atóxico (DL_{50} 442,63 $\mu\text{g i.a./mL}$).

Durante os testes de exposição por contato observamos que as operárias da *M. quadrifasciata* tiveram o comportamento de macerar (roerem, mastigarem) o papel de filtro que forrava o fundo das placas de Petri contendo a solução do inseticida testado. Isso pode ter influenciado na susceptibilidade delas aos inseticidas devido à sobreposição de exposição por contato e ingestão (e/ou contato com aparelho bucal), uma vez que o mesmo comportamento não foi observado nas operárias de *A. mellifera*.

As diferenças dos resultados da toxicidade dos inseticidas entre as vias de aplicação oral, tópica e contato dependem de uma variedade de fatores, e pode variar entre os inseticidas (modo de ação) e entre as espécies de abelhas (diferenças morfológicas e fisiológicas).

Entre os inseticidas, cada ingrediente ativo possui mecanismos de ação específicos, envolvendo diferentes processos e reações, desde a movimentação do inseticida no inseto (penetração, transporte/distribuição e o metabolismo) até a interação com o seu sítio de ação (Matsumura, 1985, Yu, 2008).

Os piretróides, com ação neurotóxica (evento axônico), agem nos canais de Sódio (Na^+) mantendo-os abertos por mais tempo, levando a intensa hiperatividade e falta de coordenação (ataxia) no inseto (Bloomquist *et al.*, 1996). Quando aplicados a campo, reduzem a atividade de forrageamento das abelhas (Bendahou *et al.*, 1999). Em especial a deltametrina pode interferir na habilidade do aprendizado de vôo (em baixos níveis afetam os músculos de vôo e coordenação) e na orientação do retorno para a colônia (Vandame, 1995; Pham-Delègue *et al.*, 2002; Thompson, 2002).

O metamidofós, do grupo dos organofosforados, age como inibidores da acetilcolinesterase (AChE) por fosforilação da enzima, bloqueando a hidrólise da acetilcolina (ACh), levando a hiperexcitação do sistema nervoso que causa a perda da coordenação muscular (Eto, 1990).

A abamectina pertence ao grupo das avermectinas que são produtos de fermentação dos actinomicetos de solo *Streptomyces avermitilis*. Estes compostos atuam como agonistas do ácido gama-amino butírico (GABA) ligando-se aos receptores dele e estimulando o

fluxo de cloro (Cl^-) para o interior da membrana, bloqueando a transmissão do estímulo nervoso e causando imobilização e paralisia, seguida de eventual morte do organismo (Bloomquist, 1996).

O espinosade age como modulador dos receptores (nicotínicos) da acetilcolina (ACh) levando á abertura de canais iônicos na membrana pós-sináptica e à condução do estímulo nervoso. Também pode agir sobre os receptores GABA (ácido gama-amino) no sistema nervoso central de insetos comprometendo o funcionamento destes (Salgado, 1997).

Portanto, diferentes espécies respondem de formas distintas quando expostas a um inseticida. Mesmo dentro de uma espécie, pode haver grandes diferenças entre os indivíduos, atribuída a polimorfismo genético. Estas diferenças podem ser responsáveis por reações idiossincrásicas a um produto e na resposta tóxica entre os indivíduos (Gallo, 2003). Dessa forma, a susceptibilidade dos insetos a inseticidas depende de uma variedade de fatores e pode variar entre os inseticidas (modo de ação) e entre espécies de inseto, devido a diferenças morfológicas e fisiológicas. As abelhas (Apidae) constituem um grupo bastante diversificado, e abelhas de diferentes grupos taxonômicos diferem muito em sua vulnerabilidade a exposição aos pesticidas (Desneux, 2007).

Os experimentos mostraram diferenças na susceptibilidade aos inseticidas entre as espécies avaliadas, indicando que a *M.*

quadrifasciata foi mais susceptível quando a exposição se deu por via oral e de contato em relação à *A. mellifera*. Os valores obtidos dos índices de tolerância relativa (ITR₅₀) para *M. quadrifasciata* variaram entre os inseticidas e entre as vias de exposição. Portanto, diferentes vias de exposição e também formas diversas em uma mesma via, podem possibilitar susceptibilidade diferenciada entre inseticidas distintos (Moraes *et al.*, 2000).

As diferenças de susceptibilidade podem estar relacionadas ao tamanho/peso corporal das abelhas. Uma operária de *A. mellifera* pesa em média 125 mg (n=60), quase o dobro do peso de uma operária de *M. quadrifasciata* que pesa em média 78 mg (n=60). O tamanho/peso corporal pode estar influenciando na susceptibilidade das abelhas aos inseticidas e entre as vias de exposição avaliadas. Resultado semelhante foi encontrado para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera), outra espécie de abelha-sem-ferrão. Moraes *et al.* (2000) observaram que existe uma relação entre o tamanho/peso corporal da abelha e a susceptibilidade ao inseticida. Nossos resultados, quando comparados com resultados de estudos para as espécies *Trigona spinipes* (Fabr.) (Macieiras & Hebling-Beraldo, 1989), *A. mellifera* (Batista *et al.*, 1975), *Nannotrigona testaceicornis testaceicornis* (Lepeletier) e *Tetragonisca angustula angustula* (Lepeletier) (Balestieri, 1989), parecem confirmar a existência de uma relação entre superfície /volume, como sugerido por Johansen (1977, id. 1979).

A susceptibilidade de *A. mellifera* a inseticidas deve diminuir com o aumento de peso do indivíduo (Ladas, 1972; Gerig, 1975), como foi observado por Nogueira-Couto *et al.*, (1996) quando expôs a africanizada *A. mellifera* ao herbicida paraquat. Tal fato também foi observado por Van der Steen (2001), que encontrou uma importante ligação entre o tamanho da abelha *Bombus terrestris* L. e sua susceptibilidade. Quanto maior é a abelha, menos suscetível ela é a pesticidas concluindo que existe uma relação significativa entre o tamanho e sua susceptibilidade. Thompson (2001), citando estudos de Van der Steen (1994), mostrou que a toxicidade aguda do dimetoato por via de exposição contato e oral para a espécie *B. terrestris* é correlacionado ao tamanho da abelha. Portanto, diferenças de tamanho e peso entre abelhas parecem ser componentes importantes de susceptibilidade das abelhas a inseticidas.

O tamanho também pode influenciar na exposição das abelhas aos pesticidas. Na exposição por contato para a maioria dos inseticidas, as abelhas são mais susceptíveis provavelmente em função do tamanho corporal, o que corresponde a uma maior superfície de contato proporcionando maior aderência do inseticida ao corpo da abelha Johansen *et al.* (1983) citado por Mayer and Lunden (1999).

6. CONCLUSÕES

| | <i>M. quadrifasciata</i> | | | | <i>A. mellifera</i> | | | |
|---------|--------------------------|------|-------|-------|---------------------|------|-------|-------|
| | aba. | esp. | delt. | meta. | aba. | esp. | delt. | meta. |
| Oral | AT | AT | AT | AT | AT | AT | AT | MT |
| Tópica | VA | x | VA | VA | MT | x | VA | VA |
| Contato | MT | x | MT | LT | LT | x | MT | LT |

aba. = abamectina
 esp. = espinosade
 delt. = deltametrina
 met. = metamidofós

AT = altamente tóxico
 MT = moderadamente tóxico
 LT = ligeiramente tóxico
 VA = virtualmente atóxico

- as formulações dos inseticidas Decis EC, 25 g/L (deltametrina), Tamaron BR 600 g/L (metamidofós), Tracer 480 g/L (espinosade) e Vertimec CE, 18 g/L (abamectina), em geral, foram altamente tóxicas quando a exposição se deu por via oral;
- os ingredientes ativos abamectina, espinosade, deltametrina e metamidofós, em geral, são menos tóxicos quando a exposição se dá por via tópica;
- A utilização de cada via de exposição apresenta resultados distintos dos demais. Portanto, para a realização de testes para avaliar a toxicidade de inseticidas sugere-se a aplicação de testes pelas três vias de exposição.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla, F. C.; Jones, G. R.; Morgan, E. D. and Landin, C. C. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Meliponini) workers and queens. *Genetics Molecular Research*, 2: 191-199.

Agriannual 2003. FNP – Consultorias & Associados. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP – Consultorias & Associados, 544p.

Agriannual 2006. FNP – Consultorias & Associados. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP – Consultorias & Associados, p.473-482.

AGROFIT, Sistema de Informações sobre Agrotóxicos. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
Acesso em 10 de janeiro de 2009.

Aizen, M. A. And Feinsinger, P. 1994. Forest Fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology*, 75: 330-351.

Allen-Wardell, G.; Bernhardt, P.; Bitner, R.; Burquez, A.; Buchmann, S.; Cane, J.; Cox, P. A.; Dalton, V.; Feisinger, P.; Ingram, M.; Inouye, D.; Jones, C. E.; Kennedy, K.; Kevan, P.; Koopowitz, H., Medellin, R., Medellin-Morales, S., Nabhan, G. P., Pavlik, B.; Tepedino, V.; Torchio, P. And Walker, S. 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology*, 12: 8-17.

Arnold, G., Quenet, B, Masson, C. 2000. Influence of social environment on genetically based sub-family signature in the honeybee. *J. Chem. Ecol.*, 26: 2321- 2333.

Balestieri, J. B. P. 1989. Toxicidade de inseticidas e efeitos respiratórios em duas espécies de meliponíneos *Tetragonisca angustula angustula* (Latreille, 1807) e *Nannotrigona testaceicornis testaceicornis* Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae). Dissertação de Mestrado, Rio Claro, Inst. Bioc., Univ. Est. Paulista Júlio de Mesquita Filho, 116p.

Batista, G. C.; Amaral, E.; Passarela Neto, A. 1975. Toxicidade de alguns inseticidas e acaricidas para operárias híbridas de *Apis*

mellifera L. e *Apis mellifera andansonii* L. (Hymenoptera: Apidae). An. Soc. Entomol. Brasil, 4: 73-77.

Bendahou, N.; Fleche, C. And Bounias, M. 1999. Biological and Biochemical effects of chronic exposure to very low levels of dietary Cypermethrin (Cymbush) on honeybee colonies (Hymenoptera: Apidae). Ecotoxicology and Environmental Safety, 44: 147-153.

Bloomquist, J. R. 1996. Ion channels as Targets for Insecticides. Ann. Rev. Entomol., 41: 163-190.

Buchmann, S. 1983. Buzz pollination in angiosperms, pp. 73-113. In C. E. Jones e R. Little (Eds.) Handbook of Experimental Pollination Biology. Van Nostrand, New York.

Camargo, J. M. F. 1970. Ninhos e biologia de algumas espécies de meliponídeos (Hymenoptera: Apidae) da região de Porto Velho, Território de Rondônia, Brasil. Rev. Biol. Trop., 16: 207-239.

Carvalho, S. M.; Carvalho, E. M.; Carvalho, G. A.; Carvalho, C. F.; Souza, B. 2002a. Efeito de alguns inseticidas usados em cucurbitáceas sobre adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758

(Hymenoptera: Apidae). *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande. Anais... Campo Grande.

Carvalho, S. M. 2006. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros a operárias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) / Stephan Malfitano Carvalho - Lavras: UFLA, 72 p.

Cauich, O.; Quezada-Euán, J. G.; Macias-Macias, J. O.; Reyes-Oregel, V.; Medina-Peralta, S.; Parra-Tabla, V. 2003. Behaviour and pollination efficiency of *Nannotrigona perilampoides* (Hymenoptera: Meliponini) on greenhouse tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) in Subtropical México. *J. Econ. Entomol.*, 97: 475-481.

Costanza, R.; D'arge, R.; De Groot, R.; Farber, S. and Grasso, M. 1997. The value the world's service and natural capital. *Nature*, 387:253-260.

Crane, E.; Walker, P. 1984. Pollination directory for world crops. International Bee Research Association, London, UK 183p.

Danka, R. G.; Rinderer, T. E. 1986. Africanized bees and pollination. *Am. Bee J.*, 126: 680-682.

Dauterman, W. C. 1994. Metabolism of toxicants: phase II reactions, *In: Hodgson, E.; Levi, P. E. (Eds.), Introduction to Biochemical Toxicology, Appleton and Lange, Norwalk, CT, pp. 5-20.*

Del Sarto, M. C. L.; Peruquetti, R. C.; Campos L. A. O. 2004. Polinização Em Ambiente Protegido: Uso da Abelha-Sem-Ferrão Mandaçaia na Polinização do Tomateiro em Sistema Orgânico de Produção, pp. 241-252. *In: Aguiar, L. A.; Darezzo, R. J.; Rozane, D. E.; Aguilera, G. A. H.; Silva, D. J. H. (eds.) Cultivo Em Ambiente Protegido Histórico, Tecnologia e Perspectiva. Viçosa: UFV - DFT, 332p.*

Del Sarto, M. C. L.; Peruquetti, R. C.; Campos, L. A. O. 2005. Evaluation of the Neotropical Stingless Bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as Pollinator of greenhouse Tomatoes. *J. Econ. Entomol.*, 98: 260-266.

Desneux, N. D.; Decourtye, A.; Delpuech J. M. 2007. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Ann. Rev. Entomol.*, 52: 81-106.

Dogterom, M. H.; Matteoni, J. A.; Plowright, R. C. 1998. Pollination of greenhouse tomatoes by the North American *Bombus vosnesenskii* (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol., 91: 71-75.

Eto, M. 1990. Biochemical Mechanisms of Insecticidal activities, pp 82-89. In: BROWERS, W. S.; EBING, W; MARTIN, D. (Eds.). Chemistry of Plant Protection Spring, Berlin.

Felton, J. C.; Oomen, P. A. and Stevenson, J. H. 1986. Toxicity and Hazard of pesticides to honeybees: Harmonization of test methods. Bee World, 67: 114-124.

Filgueira, F. A. R. 2003. Novo manual de olericultura - agrotecnologia moderna na produção e comercialização de Hortaliças. Ed. Universidade Federal de Viçosa, 412p.

Free, J. B. 1970. Insect pollination of crops. Academic Press Inc., London, UK, 544p.

Free, J. B. 1992. Insect pollination of crops. Academic New York.

- Freitas, B. M. 1998. Uso de programas racionais de polinização em áreas agrícolas. *Mensagem Doce*, 46: 1-6.
- Gallo, M. A. 2003. History and scope of toxicology, pp 3-4. In: Klaassen, C. D. & Watkins, J. B (Eds.). *Essentials of Toxicology*. Nova York, McGraw-Hill.
- Gerig, I. 1975. Susceptibility to poisoning of honeybees of different body weights. *Schweiz Bienen-Ztg*, 98: 293-300.
- Guedes, R. N. C.; Lima, J. O. G.; Zanuncio, J. C. 1992. Seletividade dos inseticidas deltametrina, fenvalerato, fenitrothion para *Podisus connexivus* (Heteroptera: Pentatomidae). *An. Soc. Entomol. Brasil, Porto Alegre*, 21: 339-346.
- Gusmão, M. R.; Picanço, M.; Goring, A. H. R.; Moura, M. F. 2000. Seletividade Fisiológica de inseticidas a Vespidae Predadores do Bicho-Mineiro-do-Cafeeiro. *Pes. Agropec. Bras.*, Brasília, 35: 681-686.
- Heard, T. A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Ann. Rev. Entomol.*, 44: 183-206.

- Hockmuth, G. J. 2001. Production of greenhouse tomatoes. University of Florida, Gainesville. FL.
- Hogendoorn, K.; Steen, Z.; Schwarz, M. P. 2000. Native Australian carpenter bees as a potential alternative to introducing bumble bees for tomato pollination in greenhouses. *J. Api. Res.*, 39: 67-74.
- Hollingworth, R. M. 1976. The biochemical and physiological basis of selective toxicity. *In*: Wilkinson, C. F. (Ed.). *Insecticide biochemistry and physiology*. New York: Plenum, 431-506.
- Hunt, G.; Edwards, R.; Foster, R. E. 2003. Protecting honey bees from pesticides. *Beekeeping: E-53-W*. Purdue University Cooperative extension Service, 8 p.
- IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA; Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/bda/prevsaf>>. Acesso em 05 mar 2007.
- Jarau, S.; Hrncir, M.; Zucchi, R.; Barth, F. G. 2000. Recruitment behavior in stingless bees, *Melipona scutellaris* and *M.*

quadrifasciata. I. Foraging at food sources differing in direction and distance. *Apidologie*, 31: 81-91.

Johansen C. A. 1977. Pesticides and pollinators. *Ann. Rev. Entomol.*, 22: 177-192.

Johansen C. A. 1979. Honeybee poisoning by chemicals: signs, contributing factors, current problems and prevention. *Bee World*, 60: 109-127.

Johansen C. A.; Mayer, D. F.; Eves, J. D.; Kious, C. W. 1983. Pesticides and bees. *Environ. Entomol.*, 12: 1513-1518.

Johansen C. A.; Mayer D. F. 1990. Pollinator Protection. A Bee and Pesticide Handbook. New Haven, CT: Wicwas, 212 pp.

Kalinganire, A.; Harwood, C. E.; Slee, M. U. And Simons, A. J. 2001. Pollination and fruit-set of *Grevillea robusta* in western Kenya. *Austral Ecology*, 26: 637-648.

- Kearns, C. A.; Inouye, D. W. and Waser, N. M. 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 29: 83-112.
- Kerr, W. E.; Carvalho, G. A.; Nascimento, V. A. 1996. Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú, 143p.
- Kerr, W. E.; Petrere, M.; Diniz Filho, J. A. F. 2001. Informações biológicas e estimativas do tamanho ideal da colméia para a abelha tíuba do Maranhão (*Melipona compressipes fasciculata* Smith - Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira Zoologia*, 18: 45-52.
- Kevan, P. G.; Straver, A. W.; Ofeer, M.; Laverty, T. W. 1991. Pollination of greenhouse tomatoes by bumble bee in Ontario. *Proceedings of the Entomological Society of Ontário*, 122: 15-17.
- Kevan, P. G. 1999. Pollinators as bioindicators of the state of environment: species, activity and biodiversity. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 74: 373-393.

- King, M. J.; Buchmann, S. L. 2003. Floral sonication by bees: mesosomal vibration by *Bombus* and *Xylocopa*, but not *Apis* (Hymenoptera: Apidae), ejects pollen from poricidal anthers. J. Kans. Entomol. Soci., 76: 295-305.
- Kremen, C.; Williams, N. M. and Thorp, R. W. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 16812-16816.
- Ladas, A. 1972. Effect of certain internal factors on the resistance of honeybees to insecticides. Apidologie, 3: 55-78.
- Ladurner, E.; Bosch, J.; Maini, S.; Kemp, W. P. 2003. A method to feed individual bees (Hymenoptera: Apiformes) Known amounts of pesticides. Apidologie, 34: 597- 602.
- Macieira, O. J. D.; Hebling-Berald, M. J. A. 1989. Laboratory toxicity of insecticides to workers of *Trigona spinipes* F., 1793 (Hymenoptera: Apidae). J. Apic. Res., 28: 3-6.

- Matsumura, F. 1985. Toxicology of Inseticide. Plenum, New York, 598p.
- Mayer, D. F.; Johansen, C. A.; Baird, C. R. 1999. How to reduce bee poisoning from pesticides. Pacific Northwest Extension: Washington State University, 15 p.
- Mayer, D. F.; Lunden, J. D. 1999. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. J. Apic. Res., 38: 191-197.
- McGregor, S. E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. Agricultural Reserch service. Agriculture Handbook, 496: 357-361.
- Melo, P. C. T. 2003. Desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do tomate para consumo *in natura* no Brasil e os desafios do melhoramento genético. 43^o. Congresso Brasileiro de Olericultura, pp. 1-10.
- Melo, M. A. 2004. Efeito de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) sobre a utilização de fontes de pólen por

Melipona quadrifasciata Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apidae) na região de Viçosa, MG. UFV. 58p. Tese de Doutorado em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa.

Michener, C. D. 2000. The bees of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 913p.

Miles, M. 2003. The effects of spinosad, a naturally derived insect control agent to the honeybee, *Bulletin of Insectology*, 56: 119-124.

Miranda, J. E.; Navickiene, H. M. D.; Couto, R. H. N.; Bortoli, S. A.; kato, M. J.; Bolzani, V. S.; Furlan, M. 2003. Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, na amide isolated from *Piper tuberculatum* (Pipeaceae). *Apidologie*, 34: 409-415.

Moraes, S. S.; Bautista, A. R. L. E Viana, B. F. 2000. Avaliação da toxicidade aguda (DL₅₀ e CL₅₀) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) Hymenoptera: (Apidae): via de contato. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 29: 31-37.

Nica, D.; Bianu, E.; Chioveano, G. 2004. A case of acute intoxication with deltamethrin in bee colonies in Romania. *Apiacta*, 39: 71-77.

Nieh, J. C.; Roubik, D. W. 1995. A stingless bee (*Melipona panamica*) indicates food location without using a scent trail. *Behav. Sociobiol.*, 37: 63-70.

Nogueira-Couto, R. H.; Abe, C. S.; Pitelli, R. A. 1996. Efeito do paraquat na mortalidade de operárias de *Apis mellifera* (abelhas africanizadas), *Naturalia*, 21: 49-55.

Nogueira-Neto, P. 1970. A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). 2^o ed. São Paulo, Chácaras e Quintas, 365p.

OECD/OCDE, 1998a. Guidelines For The Testing Of Chemicals Number 213, Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, OECD. Environmental Health and Safety Division, Paris.

OECD/OCDE, 1998b. Guidelines For The Testing Of Chemicals Number 214, Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, OECD. Environmental Health and Safety Division, Paris.

OEPP/EPPO, 2001. Revised draft of EPPO Guidelines PP 1/170: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products: side effects on honeybees. Appendix 1, *In*: Belzunces L. P., Pélissier, C., Lewis G. B. (Eds.), Hazards of pesticides to bees, Volloques de I' INRA, Paris, pp. 279-288.

Oliveira, E. E.; Aguiar, R. F. S.; Sarmento, R. A.; Tuelher, E. S.; Guedes, R. N. C. 2002. Seletividade de Inseticidas a *Theocolax elegans* Parasitóide de *Sitophilus zeamais*. *Riasei, J.*, 18: 11-16.

O'Toole, C. 1993. Diversity of native bees and agroecosystems, pp. 169-196. *In*: J. Lasalle and I. D. Gauld (eds.). Hymenoptera and biodiversity. CAB International, Wallingford.

Paschoal, A. D. 1979. Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções. Fundação Getulio Vargas, 106 p.

Pereira, C.; Marchi, G.; Silva, E. C. 2000. Produção de tomate-caqui em estufas. Lavras: ESAL 26p.

Picken, A. J. F. 1984. A review of pollination and fruit set in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Hortic. Sci.*, 59: 1-13.

Pinheiro-Machado, C. A.; Alves-dos-Santos, I.; Silveira, F. A.; Kleinert, A. M. P. and Imperatriz-Fonseca, V. L. 2002. Brazilian bee surveys: state of knowledge, conservation and sustainable use, pp. 115-129. In: Kevan, P. G. and Imperatriz-Fonseca, V. L. (eds.) - Pollinating bees: a conservation link between agriculture and nature. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

Pham-Delègue, M. H.; Decourtye, A.; Kaiser, L.; Devillers, J. 2002. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, 33: 425-432.

Pouvreau, A. 1984. Quelques productions potagères: tomate et autres Solanées, melon et autres Cucurbitacées. In: P. Pessa, and J. Louveaux editors. *Pollinisation et productions végétales*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. pp. 445-469.

Produtos Orgânicos: Brasil. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005. 1 folder.

Richards, K. W.; Kevan, P. G. 2002. Aspects of bee biodiversity, crop pollination, and conservation in Canada. pp. 77-94. In: P. G. Kevan & V. L. Imperatriz-Fonseca (eds) - *Pollinating Bees - The*

Conservation Link Between Agriculture and Nature - Ministry of Environment / Brasília.

Rhodes, J.; Scott, M. 2006. Pesticides: a guide to their effects on honey bees. NSW Department of Primary Industries: Primefacts 149, 4 p.

Robertson, J. L. e Preisler, H. K. 1992. Pesticide Bioassays with Arthropods. CRC, Boca Raton, FL, USA.

Robison, W. S.; Nowogrodski, R.; Morse, R. A. 1989. The value of honeybees as pollinators of US crops. *American Bee J.*, 128: 411-423; 129: 477-487.

Rortais, A.; Arnold, G.; Halm, M.; Touffet-Briens, F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36: 71-83.

Roubik, D. W. 1989. Nesting and reproductive biology. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. Cambridge. Cambridge Univ. Press., 514p.

Roubik, D. W. 2001. Ups and downs in pollinator populations: When is there a decline? *Conservation Ecology*, 5: 2- AD.

Roubik, D. W. 2002. The value of bees to the coffee harvest. *Nature*, 417: 708-708.

Salgado V. L. 1997. The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth, Dow Agro – Sciences*, 52: 35-43.

SAS Institute, 1997. *SAS/STAT User's Guide: Statistics, Version 6.12*. SAS Institute, Cray, NC, USA.

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

Tasei, J. N.; Carrè, S.; Grondeau, C.; Hureau, J. M. 1987. Effects d'application insecticides à l'égard d'apoids pollinisateurs autres que l'abeille domestique (*Megachile rotundata* F. et *Bombus terrestris* L.), *Conf. Int. sur les ravageurs en agriculture*. Pais, ACTA, pp. 127-136.

Tasei, J. N.; Sabik, H.; Pirastru, L.; Langiu, E.; Blanche, J. M.; Fournier, J.; Taglioni, J. P. 1993. A sequential study on the effects of deltamethrin (Decis CE) on bumble bees, Proc. 5th Int. Symp. on the hazard of pesticides to bees (ICPBR), October 25-28, Wageningen, The Netherlands, pp. 155-160.

Tasei, J. N.; Sabik, H.; Pirastru, L.; Langiu, E.; Blanche, J. M.; Fournier, J.; Taglioni, J. P. 1994. Effects of sublethal doses deltamethrin (Decis) on *Bombus terrestris*, J. Apic. Res., 33: 129-135.

Thompson, H. M. 2001. Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus sp.*). Apidologie, 32: 305-321.

Thompson, H. M. 2002. Behavioral effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. Ecotoxicologia, 12: 317-330.

Valarini, P. J.; Frighetto, R. T. S.; Schiavinato, R. J.; Campanhola, C.; Sena, Mm.; Balbinot, L.; Poppi, R. J. 2007. Análise integrada de sistemas de produção de tomateiro com base em indicadores edafobiológicos. Horticultura Brasileira, 25: 060-067.

- Vandame, R.; Meled, M.; Colin, M. E.; Belzunce, L. P. 1995. Alteration of the horning-flight in the honeybee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltametrina. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 855-860.
- Van Der Steen, J. J. M. 1994. Method development for the determination of the contact LD₅₀ of pesticides to bumblebees (*Bombus terrestris* L.), *Apidologie*, 25: 463-465.
- Van Der Steen, J. J. M.; Grentekord, C.; Schaefer, H. 1996. Methods to determination the acute contact and oral LD₅₀ of pesticides for bumble bees (*Bombus terrestris* L.), *Proc. 6th Int. Symp. on the hazard of pesticides to bees. Setember 17-18, Braunschweig (Germany), appendix 28.*
- Van Der Steen, J. J. M. 2001a. Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. *Apidologie*, 32: 399-406.
- Velthuis, H. H. W. 2002. The historical background of the domestication of the bumble-bee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture, pp. 177-184. In: P. G. Kevan & V. L. Imperatriz-Fonseca (eds) - *Pollinating Bees - The Conservation*

Link Between Agriculture and Nature - Ministry of Environment / Brasília.

Villar, L. 2003. Tomate orgânico já atinge a produtividade do tradicional. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.panoramabrasil.com.br/por/noticia_completa.asp?p=c conteudo/txt/.../20704578.htm. Arquivo capturado em 26/03/2003.

Wallace, H. M. & Lee, L. S. 1999. Pollen source, fruit set and xenia in mandarins. *J. Hort. Sci. Biotechn.*, 74: 82-86.

Williams, I. H. 1994. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees, *Agric. Zool. Rev.*, 6: 229-257.

Williams I. H. 2002. Insect Pollination and Crop Production: A European Perspective, pp. 59-65. In: P. G. Kevan and V. L. Imperatriz Fonseca (eds) - *Pollinating Bees - The conservation link between agriculture and nature* - Ministry of Environment / Brasília.

- Wilms, W.; Wiechers, B. 1997. Floral resource partitioning between native *Melipona* bees and the introduced Africanized honey bee in the Brazilian Atlantic rain forest. *Apidologie*, 28: 339-355.
- Yu, S. J. 1987. Biochemical defense capacity in the spined soldier bug (*Podisus maculiventris*) and its lepidopterous prey. *Pesticides Biochemistry Physiology*, San Diego, 28: 216-223.
- Yu, S. J. 1988. Seletivity of insecticides to the spined soldier bug (Heteroptera: Pentatomidae) and its lepidopterous prey. *J. Econ. Entomol.*, Lanham, 81: 119-122.
- Yu, S. J. 2002. Substrate specificity of glutathione S- transferases from the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74: 41-51.
- Yu, S. J. 2004. Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80: 113-122.
- Yu, S. J. 2008. *The toxicology and Biochemistry of insecticides*. Taylor & Francis Group. Boca Raton, 276p.