

GABRAZANE VENÂNCIO MARQUES TEIXEIRA

TOXICIDADE DO BIOPESTICIDA AZADIRACTINA À VESPA SOCIAL
Polistes versicolor (HYMENOPTERA: VESPIDAE)

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

T266t
2017
Teixeira, Gabrazane Venâncio Marques, 1988-
Toxicidade do biopesticida azadiractina à vespa social
Polistes versicolor (Hymenoptera: Vespidae) / Gabrazane
Venâncio Marques Teixeira. – Viçosa, MG, 2017.
v, 21f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Augusta Lima Siqueira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.11-15.

1. *Polistes versicolor*. 2. Vespas. 3. Agricultura orgânica.
4. Controle biológico. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação
em Biologia Animal. II. Título.

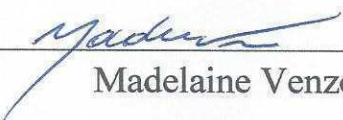
CDD 22 ed. 595.798

Gabrazane Venâncio Marques Teixeira

TOXICIDADE DO BIOPESTICIDA AZADIRACTINA À VESPA SOCIAL
Polistes versicolor (HYMENOPTERA: VESPIDAE)


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

APROVADA: 26 de julho de 2017.


Madelaine Venzon


Fábio Prezoto


Wagner Faria Barbosa
(Coorientador)


Maria Augusta Lima Siqueira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À natureza por ser fonte de inspiração e material para estudos em Biologia.

À população brasileira que através dos impostos fornece subsídios econômicos para a manutenção das pesquisas em Universidades Federais e à CAPES como agência viabilizadora dos recursos.

À comunidade acadêmica, aos integrantes do Laboratório de Abelhas e Vespas do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao doutorando Rodrigo Bernardes pelo apoio nas análises estatísticas. À professora Maria Augusta pela sua excelente orientação. E aos coorientadores pela ajuda imediata nos momentos necessários. Aos estudantes e professor do Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Entomologia, pelo empréstimo de materiais e equipamentos.

Ao secretário da coordenação do programa de mestrado em Biologia Animal, por sanar as minhas dúvidas relacionadas à burocracia.

À minha família por compreender a minha ausência durante datas importantes e por me ajudar na procura pelas vespas.

Aos meus pais pela educação, que através do seu esforço e amor incondicional me ensinaram a importância da disciplina e da persistência.

Ao Adiliano Quintas por estar presente em todos os momentos, principalmente aqueles em que levei ferroadas, e pelo apoio emocional.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ARTIGO	01
RESUMO	01
1 INTRODUÇÃO	02
2 MATERIAL E MÉTODOS	03
2.1 COLÔNIAS, VESPAS E INSETICIDAS	03
2.2 CONSUMO ALIMENTAR	05
2.3 TOXICIDADE ÀS FÊMEAS	06
2.4 TOXICIDADE ÀS COLÔNIAS	06
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	07
3 RESULTADOS	07
3.1 REPELÊNCIA E FAGOINIBIÇÃO	07
3.2 TOXICIDADE ÀS FÊMEAS	07
3.3 TOXICIDADE ÀS COLÔNIAS	08
4 DISCUSSÃO	09
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
6 LEGENDAS	15
7 IMAGENS	17

RESUMO

TEIXEIRA, Gabrazane Venâncio Marques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Toxicidade do biopesticida azadiractina à vespa social *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae)**. Orientadora: Maria Augusta Lima Siqueira. Coorientadores: André Rodrigues de Souza e Wagner Faria Barbosa.

Vespas sociais, como as *Polistes*, são predadores generalistas com potencial para serem utilizadas como agentes de controle biológico. Em cultivos orgânicos é permitido o uso de biopesticidas, como o óleo de nim, para controle de pragas. A compatibilidade dessas duas formas de manejo depende do baixo risco toxicológico da azadiractina, ingrediente ativo do nim, às vespas. Neste estudo avaliamos os efeitos da azadiractina às colônias de *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae). Primeiramente, verificamos que alimentos contaminados com nim não causam repelência ou fago-inibição às vespas adultas, aumentando as chances de exposição das colônias em situações realistas. Depois, as vespas foram cronicamente expostas a alimento contaminado com diferentes concentrações de azadiractina (0, 3, 15 e 30 µg de ingrediente ativo (i.a.)/ml de solução açucarada), ou com o inseticida imidaclopride (96 µg i.a./ml de solução açucarada), utilizado como controle positivo. A ingestão do nim reduziu a longevidade das vespas individualmente e das colônias. A toxicidade da azadiractina foi diretamente proporcional às concentrações do ingrediente ativo. Além disso, o desenvolvimento da cria foi afetado pela ingestão do nim, nas concentrações de 15 e 30 µg i.a./ml. Portanto, este estudo fornece evidências de que colônias de *P. versicolor* mantidas em cultivos pulverizados com nim podem ter sua longevidade reduzida e o desenvolvimento de imaturos prejudicado.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Gabrazane Venâncio Marques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Toxicity of the biopesticide azadirachtin to the social wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae)**. Adviser: Maria Augusta Lima Siqueira. Co-advisers: André Rodrigues de Souza and Wagner Faria Barbosa.

Social wasps, like *Polistes*, are generalist predators that can be used for biological control. In organic crops, the use of biopesticides is allowed. The simultaneous use of both methods of pest control depends of the low toxicological risk of azadirachtin, the active ingredient of neem oil, to the wasps. In this study we evaluated the effects of azadirachtin on the colonies of *Polistes versicolor* wasps (Hymenoptera: Vespidae). Firstly, we found that food contaminated with azadirachtin do not cause repellence or fago-inhibition on adult wasps, increasing the chances of colony exposure in realistic situations. Then, wasps were chronically exposed to food contaminated with different concentrations of azadirachtin (0, 3, 15 and 30µg of active ingredient (a.i.)/ml sugar solution) or imidacloprid insecticide (96 µg a.i./ml sugar solution), used as a positive control. Neem ingestion reduced the longevity of individual wasps and colonies. Azadirachtin toxicity was directly proportional to the concentrations of the active ingredient. In addition, brood development was affected by neem ingestion at concentrations of 15 and 30µg i.a./ml. Therefore, this study provides evidence that colonies of *P. versicolor* maintained on cultures sprayed with neem may have reduced longevity and immature development impaired.

Toxicidade do biopesticida azadiractina à vespa social *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae)

TEIXEIRA, G. V. M.^{1*}; DE SOUZA, A. R.²; BARBOSA, W. F.³ e LIMA, M. A. P.¹

¹ Departamento de Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *E-mail: gabitmarques@gmail.com Telefone: (31) 9 9605-4817

² Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP). Universidade de São Paulo (USP) Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

³ Departamento de Entomologia. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Resumo

Em culturas orgânicas, o uso de biopesticidas e o controle biológico são ferramentas que, se usadas em conjunto e de forma correta, podem reduzir as pragas e minimizar os prejuízos ambientais. Neste estudo, nós verificamos os efeitos toxicológicos que a azadiractina causa às vespas predadoras *Polistes versicolor*, mediante exposição oral e crônica (3 a 4 meses). Primeiramente, nós verificamos que alimentos contaminados com nim não causam repelência nem fago-inibição às vespas. Posteriormente, vespas individualizadas e mantidas em colônias foram submetidas à ingestão de doses crescentes de azadiractina (0, 3, 15 e 30 µg de ingrediente ativo (i.a.)/ml de solução açucarada), e ao inseticida imidaclopride (96 µg i.a./ml de solução açucarada), utilizado como controle positivo. Além disso, comparamos o desenvolvimento dos imaturos em colônias tratadas e não tratadas. A longevidade das vespas foi reduzida em todos os tratamentos em relação ao controle negativo. Ocorreu efeito também no desenvolvimento dos imaturos, que foi interrompido principalmente quando as colônias foram expostas às maiores concentrações de azadiractina. Nosso trabalho mostra que o

biopesticida azadiractina, nas concentrações testadas, deve ser utilizado com cautela em sistemas de cultivo que pretendem utilizar vespas, como *P. versicolor*, como agentes de controle biológico.

1 Introdução

O aumento do uso de inseticidas sintéticos tem ocasionado a evolução de resistência em populações de insetos-alvo, a contaminação ambiental, a toxicidade a organismos benéficos, além de problemas de saúde pública (Geiger et al. 2010; Carvalho 2017). Métodos alternativos para o controle de pragas, principalmente na agricultura orgânica, como o controle biológico e o uso de biopesticidas, estão sendo apontados como formas de minimizar esses problemas (Cook et al. 2010; Garibaldi et al. 2017).

A agricultura orgânica prevê a adoção de processos e produtos naturais para a produção de alimentos, contemplando o uso de biopesticidas para o controle de artrópodes pragas (Verhoog et al. 2003; Isman 2006). O óleo de nim é um biopesticida extraído da planta *Azadirachta indica* Juss (Meliaceae), que possui como ingrediente ativo (i.a.) a azadiractina (Isman 2006). Esse composto pode causar repelência, fago-inibição, alterações no desenvolvimento e inibição na reprodução dos insetos-alvo, sendo efetivo no controle de alguns insetos e ácaros (Schluter et al. 1985; Mordue et al. 1993, 2000; Venzon et al. 2008). Devido à rápida degradação ambiental e à baixa toxicidade a mamíferos, o uso do nim parece contribuir para a segurança alimentar dos consumidores (Stark & Walter 1995; Carboni et al. 2002; Czaja et al. 2015). Em virtude da origem botânica, o nim é geralmente considerado seguro a artrópodes não-alvo, mas estudos recentes têm demonstrado que ele pode ser tóxico a organismos benéficos às culturas, como os polinizadores (Barbosa et al. 2015 a,b; Tomé et al. 2015).

O controle biológico é outra estratégia que pode ser utilizada em culturas orgânicas para o controle de pragas (Cook et al. 2010; Hillocks 2012). Vespas sociais (Hymenoptera: Vespidae) são predadores generalistas que evoluíram uma série de adaptações para localização das presas. Vespas *Polistes* são eficientes caçadoras de artrópodes, principalmente de lagartas de Lepidoptera e têm preferência por predação as

maiores larvas (Rabb & Lawson 1957; Richter 2000). Consequentemente, o uso de *Polistes* no controle biológico pode ser feito em substituição ou complementação a outros métodos de controle, principalmente em cultivos orgânicos (Gould & Jeanne 1984; Bentley et al. 1995). Para que essas vespas sejam usadas de forma eficaz como inimigos naturais de pragas agrícolas, o uso de insumos deve ser manejado de forma a favorecer a sobrevivência e a reprodução das suas colônias. Entretanto, o uso de biopesticidas em culturas orgânicas pode expor inimigos naturais à ingestão desses produtos (Bentley et al. 1995), porém não existem estudos que avaliaram as consequências desse tipo de contaminação às vespas sociais.

Polistes versicolor é uma vespa eussocial neotropical encontrada da Costa Rica à Argentina (Richards 1978). As colônias são fundadas por fêmeas fundadoras e supostamente reprodutoras, que estabelecem uma hierarquia de dominância reprodutiva por meio de comportamentos agonísticos (Ratnieks & Wenseleers 2008; De Souza et al. 2017). A reprodução das fundadoras e o desenvolvimento adequado da cria resultam na sobrevivência da colônia, que realizará maior forrageamento de presas quando forem populosas. Assim, colônias com maior valor adaptativo serão mais eficientes na eliminação de pragas, e uma colônia de *P. versicolor* pode caçar mais de 4000 presas por ano (Prezoto et al. 2006). Além disso, colônias de *P. versicolor* constituem um interessante modelo para estudos toxicológicos, pois os ninhos têm a cria exposta e podem ser mantidos em laboratório. Dessa forma, é possível verificar os efeitos tóxicos de pesticidas não só aos insetos adultos, como também aos imaturos, além de averiguar se a exposição interfere na dinâmica colonial. Neste trabalho, nós verificamos se forrageadoras de *P. versicolor* se alimentam com dieta contaminada com óleo de nim e se a exposição oral e crônica à azadiractina altera a sobrevivência de fêmeas, de imaturos e de colônias de *P. versicolor*.

2 Materiais e métodos

2.1 Colônias, vespas e inseticidas

Todas as vespas utilizadas nos experimentos foram obtidas em colônias de *Polistes versicolor*, coletadas em fases de pré-emergência e pós-emergência (Jeanne

1972) no sudeste do Estado de Minas Gerais, Brasil, no período de setembro a outubro/2015 e de setembro a outubro/2016. As colônias foram posteriormente transferidas para o laboratório e acondicionadas em gaiolas de plástico (1000ml, H=9,5cm e D=13cm), mantidas no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As gaiolas continham microtubos de plástico (2ml) utilizados para alimentar as vespas com uma solução de açúcar com água (1:1 peso/volume, xarope puro). Nas gaiolas, as vespas recebiam larvas e pupas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) *ad libitum*, além de papel toalha e água, utilizados como material para construção do ninho. Em todos os tratamentos, os alimentadores, as presas e o papel eram trocados a cada 48h.

A repelência alimentar, a fago-inibição e os testes de sobrevivência individual foram avaliados utilizando vespas oriundas de colônias de *P. versicolor* em pós-emergência. Os adultos foram removidos das colônias e transferidos individualmente para gaiolas de plástico (1000ml, H=9,5cm e D=13cm), onde recebiam exclusivamente xarope puro *ad libitum*. Posteriormente, essas vespas foram empregadas nos testes de repelência alimentar e fago-inibição. Os ninhos que continham pupas foram armazenados em gaiolas de plástico (1000ml, H=9,5cm e D=13cm) e monitorados diariamente, as fêmeas que emergiam eram removidas do ninho e mantidas separadamente em gaiolas de plástico (200ml, H=6cm e D=7,5cm). Estas fêmeas tinham a idade registrada e eram tratadas apenas com xarope puro, e posteriormente, elas foram utilizadas no teste de toxicidade letal.

A toxicidade do nim às colônias foi avaliada em colônias pré-emergentes de *P. versicolor*. Nesses ensaios, todas as colônias usadas tinham três vespas fundadoras e os experimentos só foram iniciados após a habituação das vespas às gaiolas e após a padronização do tamanho do ninho. As colônias consideradas habituadas foram aquelas em que as fundadoras realizaram forrageio corriqueiro de presas e néctar, vibração do gáster próximo ao ninho, construção do ninho com o papel fornecido, além de permanecerem frequentemente no ninho (Izzo & Tibbets 2012; Richter 2000; De Souza et al. 2008; Gobbi et al. 2009). De modo geral, a habituação durou aproximadamente 45 dias. Após esse período, todos os imaturos foram removidos do ninho e as células foram cortadas e retiradas, de forma que todos os ninhos ficassem com o mesmo número de células. Em todas as colônias, os experimentos foram iniciados após a realização da

primeira postura em laboratório, indicando a presença de, no mínimo, uma fêmea reprodutora.

Em todos os testes de toxicidade, as vespas foram expostas à ingestão do óleo de nim (Cursor, concentrado emulsificado a 10g de azadiractina/l BIO CARB, Curitiba, PR, Brasil) misturado ao xarope em diferentes concentrações de azadiractina (0, 3, 15 e 30µg de i.a./ml de xarope). Para todas essas concentrações foram realizadas conversões matemáticas utilizando como base concentrações do AZAMAX (Concentrado emulsionável a 12 g a.i./L, DVA AgroBrasil). A maior concentração de azadiractina aqui utilizada corresponde à concentração de AZAMAX recomendada para controle de Lepidoptera em plantações de tomate, repolho e milho (AGROFIT 2017). O inseticida imidaclopride (Imidacloprid Nortox, suspensão concentrada a 480g i.a./l, Nortox S. A; Paraná, Brasil) foi utilizado como controle positivo na concentração de 96µg de i.a./ml de xarope, recomendada para o controle de Coleoptera em plantações de tomates, milho e feijão (AGROFIT 2017). As soluções utilizadas nos testes foram feitas semanalmente, a partir de diluições de soluções estoque dos inseticidas e foram armazenadas a 7°C. As soluções fornecidas às vespas eram trocadas a cada 48 horas.

2.2 Consumo alimentar

Como a azadiractina é um composto que pode causar repelência alimentar ou fago-inibição em insetos (Mordue et al. 2000), primeiramente testamos a possibilidade de contaminação das vespas via dieta alimentar. Para isso, realizamos bioensaios com o objetivo de testar o consumo de alimento contaminado pelas vespas, utilizando métodos adaptados de Bernardes et al (2016).

Ao todo 221 fêmeas foram testadas, provenientes de 21 colônias, sendo que cada fêmea foi considerada uma unidade amostral. Após o jejum de 12 horas, as vespas foram transferidas individualmente para uma arena formada por dois tubos de ensaio (15cm comprimento x 2cm de diâmetro), justapostos em suas aberturas, mantida em uma sala escura. No fundo de um dos tubos foi colocado 4µl de xarope contaminado com azadiractina (3, 15 ou 30µg de i.a./ml de xarope), para onde as vespas foram atraídas por uma luz branca, localizada externamente ao fundo do tubo (Barbosa et al. 2015a). No fundo do outro tubo, foi colocado 4µl de xarope puro (0µg de i.a./ml de xarope) para onde as vespas foram posteriormente atraídas, também por meio da mesma iluminação. No controle, os dois tubos da arena continham xarope puro. As vespas

ficavam 10 minutos em cada tubo. Em todos os tratamentos, o xarope foi tingido com anilina verde com a finalidade de facilitar a visualização do consumo do alimento.

Em todos os testes, foi oferecido às vespas primeiramente o alimento contaminado e posteriormente o alimento puro. Nós consideramos que as vespas sofreram repelência alimentar quando elas não ingeriam o alimento contaminado, mas ingeriam o xarope puro. Vespas que ingeriram o xarope contaminado, mas que posteriormente, não ingeriram o xarope puro, foram consideradas fagoínibidas (Bernardes et al. 2016), já as vespas que não ingeriram nenhuma das opções foram desconsideradas na análise.

2.3 Toxicidade às fêmeas

Neste ensaio, testamos a toxicidade letal da azadiractina às vespas adultas, originadas dos ninhos com pupas que foram coletados em campo e que emergiram em laboratório. Logo após a emergência, essas fêmeas foram transferidas individualmente para gaiolas e tratadas com xarope puro. A partir dos 10 dias de idade, as vespas receberam alimento contaminado com azadiractina (0, 3, 15 ou 30 μ g de i.a./ml de xarope) ou imidaclopride (96 μ g de i.a./ml). O bioensaio foi conduzido com 153 fêmeas, coletadas em 25 colônias diferentes. Em todos os tratamentos verificamos a sobrevivência das vespas diariamente, até a morte de todos os indivíduos, com exceção das vespas tratadas com xarope puro, cuja sobrevivência foi censurada 120 dias após o início dos experimentos.

2.4 Toxicidade às colônias

Após a habituação e padronização do tamanho das colônias, a sobrevivência das vespas adultas e o desenvolvimento da cria foram observados diariamente. Também foi verificada a proporção de colônias que não apresentou postura ou que a cria se desenvolveu até os estágios de ovo, larva, pupa ou adulto. Portanto, comparamos o estágio máximo de desenvolvimento alcançado pelas colônias expostas aos diferentes tratamentos. O experimento foi repetido 6 vezes, com cada colônia sendo submetida a um tratamento diferente (0, 3, 15 ou 30 μ g de i.a./ml de xarope, além do controle positivo), totalizando o estudo de 30 colônias (6 repetições x 5 tratamentos). A observação das colônias foi feita durante 90 dias consecutivos e as vespas que não haviam morrido, ao fim desse período, tiveram os dados censurados.

2.5 Análises estatísticas

A proporção de insetos repelidos e fagoiinibidos foi utilizada para ajuste de curvas lineares através de análise de regressão no programa estatístico *SigmaPlot 12.5* (Systat 2007), tendo como variável resposta a proporção de indivíduos que sofreram repelência ou fagoiinibição para o total de indivíduos que foram testados. Os resultados dos bioensaios de toxicidade letal às fêmeas e às colônias foram submetidos à análise de sobrevivência, utilizando estimadores *Kaplan-Meier* para obter curvas e estimativas do tempo médio de sobrevivência (*SigmaPlot 12.5*). A similaridade geral entre as curvas foi testada utilizando o teste *Log-Rank* ($p < 0,05$) e as comparações pareadas foram feitas utilizando o método *Holm-Sidak* ($p < 0,05$). As vespas individualizadas e as colônias que sobreviveram por mais de 120 e 90 dias, respectivamente, foram tratadas como dados censurados. Os dados de desenvolvimento máximo alcançado pelos imaturos foram comparados através de análise de variância ($p < 0,05$). Os dados foram transformados com $\text{Log}_{10} + 1$ para atender os pressupostos da ANOVA, usando o software *R versão 3.3.1* (R. Core Team 2016). Nessa análise, a variável resposta foi o número de colônias que atingiu cada estágio de desenvolvimento que foram categorizados como sem postura (0), estágio de ovo (1), larva (2), pupa (3) e adulto (4).

3 Resultados

3.1 Repelência e fagoiinibição

A maioria das fêmeas de *P. versicolor* testadas (86%) ingeriu todo o alimento oferecido nos dois tubos. As vespas não apresentaram repelência ao xarope contaminado com azadiractina com as concentrações de 3, 15 e 30 μg i.a./ml de xarope ($F_{1,2}=1,65$; $p=0,32$). As vespas também não apresentaram fagoiinibição após a ingestão de alimento contaminado em nenhuma das doses testadas ($F_{1,2}=10,25$; $p=0,08$).

3.2 Toxicidade às fêmeas

A ingestão do xarope contaminado alterou a sobrevivência das fêmeas de *P. versicolor* mantidas individualmente em gaiolas ($X^2=214,89$; $gl=4$; $p < 0,001$) e esse efeito foi dependente do tipo de inseticida e das concentrações de azadiractina testadas

(Fig. 1A). A maior toxicidade causada às vespas foi em decorrência da ingestão do imidaclopride, que causou a morte da maioria das vespas em menos de 10 dias após o início da exposição oral e apresentou curva de sobrevivência significativamente diferente de todos os tratamentos com azadiractina ($p < 0,05$). As concentrações maiores de azadiractina (15 e 30 μg i.a./ml de xarope) causaram a morte de todas as vespas em menos de 20 dias após o início dos experimentos, porém não ocorreu diferença significativa entre a mortalidade causada por essas duas concentrações ($X^2=2,779$; $p=0,095$). A azadiractina em baixa concentração (3 μg i.a./ml) também aumentou a mortalidade das vespas em relação ao controle negativo ($X^2=39,366$; $p < 0,001$), porém esse efeito foi mais lento em relação aos tratamentos com 15 μg i.a./ml ($X^2=76,153$; $p < 0,001$) e 30 μg i.a./ml ($X^2=76,720$; $p < 0,001$). O tempo letal médio das vespas também variou entre os tratamentos ($F_{1,2}=257,73$; $p=0,04$; Fig. 1B), ocorrendo uma correlação negativa entre o tempo de sobrevivência e as concentrações de azadiractina (Fig. 1B).

3.3 Toxicidade às colônias

A sobrevivência das colônias foi alterada pela ingestão de dieta contaminada (Log-rank: $X^2=54,90$; $gl=4$; $p < 0,001$; Fig. 2A). Esse efeito também foi dependente do tipo de inseticida e das concentrações de azadiractina testadas (Fig. 2A). O inseticida imidaclopride foi mais tóxico às vespas do que todos os tratamentos com azadiractina ($p=0,007$). A sobrevivência colonial não diferiu entre os tratamentos com azadiractina com 30 e 15 μg i.a./mL de xarope ($p=0,07$). Essas concentrações, entretanto, foram mais tóxicas às colônias que a concentração de 3 μg i.a./ml de xarope (30 μg i.a./ml: $p=0,002$ e 15 μg i.a./ml $p=0,003$). As maiores concentrações de azadiractina também foram tóxicas em relação ao controle negativo (30 μg i.a./ml: $p=0,003$ e 15 μg i.a./ml: $p=0,003$). Após 90 dias de exposição, as curvas de sobrevivência entre os tratamentos com baixa concentração de azadiractina (3 μg i.a./ml) e controle negativo foram estatisticamente iguais.

A ingestão de azadiractina também interferiu no tempo letal médio das colônias (Fig. 2B). Neste caso, o imidaclopride foi mais tóxico às colônias do que a azadiractina nas concentrações de 15 μg i.a./ml ($p=0,003$) e de 30 μg i.a./ml ($p=0,007$). Entretanto, não ocorreu diferença significativa entre as duas concentrações de azadiractina ($p=0,07$). A concentração de 3 μg i.a./ml de azadiractina e o controle negativo não foram representados, visto que a mortalidade não atingiu 50% das colônias.

Colônias de *P. versicolor* expostas à ingestão de dieta contaminada sofreram alterações no desenvolvimento dos imaturos ($F_{2,27}=57,87$, $p<0,001$; Fig. 2C). Os efeitos causados pela ingestão de azadiractina variaram de acordo com as concentrações do produto. A menor concentração de azadiractina (3µg i.a./ml) não interferiu no desenvolvimento da cria (Fig. 2C). Entretanto, as concentrações de 15µg e 30µg i.a./ml de azadiractina prejudicaram o desenvolvimento pós-embriônico das vespas. A maior toxicidade à cria ocorreu em colônias expostas à maior concentração de azadiractina, que apresentou toxicidade semelhante à do controle positivo (Fig. 2C).

4 Discussão

Neste trabalho, demonstramos que o óleo de nim impõe risco toxicológico à vespa social *P. versicolor*. A ingestão de azadiractina reduziu a longevidade das vespas mantidas em gaiolas individualizadas, das vespas adultas mantidas nas colônias, dos imaturos e das colônias. Estudos sobre a toxicidade de pesticidas às vespas sociais geralmente são realizados para desenvolver estratégias de controle desses insetos, em virtude dos riscos de acidentes com ferroadas (e.g. Pankim et al. 2009; Zhang et al. 2012). Entretanto, vespas sociais realizam o controle biológico de pragas importantes e, para que esse serviço ecossistêmico seja utilizado de forma eficaz, o uso de pesticidas deve ser manejado de forma a minimizar prejuízos à sobrevivência das vespas e ao desenvolvimento das suas colônias.

Nossos resultados demonstram que as atividades repelente e fagoinibidora da azadiractina (Mordue (Luntz) et al. 2010), em concentrações realistas não atuam sobre *P. versicolor*, o que pode expor as vespas que forrageiam em culturas agrícolas à ingestão de pesticidas à base de nim. Esse resultado foi surpreendente, pois a atividade antialimentar da azadiractina foi comprovada em outros Hymenoptera como abelhas sem ferrão e abelhas do gênero *Bombus* (Barbosa et al. 2015a; Bernardes et al. 2016). Além de não terem sofrido repelência e fagoinibição, observamos, nos testes com as colônias, que as fêmeas de *P. versicolor* coletaram xarope contaminado e o transportaram para as colônias, sofrendo intoxicação.

A azadiractina prejudicou *P. versicolor* em todas as fases do seu desenvolvimento, sendo que a maior toxicidade ocorreu mediante exposição à concentração mais alta, porém concentrações inferiores à recomendada para uso em campo (30 µg i.a./ml) causaram efeitos letais às vespas. A interrupção no

desenvolvimento da cria era esperada, uma vez que a azadiractina reduz a produção de ecdisteróides, impedindo a muda e interrompendo o desenvolvimento dos insetos (Rembold et al. 1982). Além disso, a azadiractina causa esterilidade em fêmeas de insetos (Isman 2006), o que provavelmente pode ter ocorrido com as vespas que ingeriram as concentrações de 15 e 30µg i.a./ml do produto, pois elas reduziram significativamente a postura em relação ao controle. No entanto, essa redução pode ter ocorrido devido à alta e rápida mortalidade nessas concentrações. Apesar de o imidaclopride ter inibido a postura em 100% das vespas tratadas, inferimos que isso ocorreu em consequência da alta e rápida mortalidade causada pelo composto, que é neurotóxico, e não devido a uma inibição na reprodução, conforme demonstrado em abelhas do gênero *Bombus* (Laycock et al. 2013). Entretanto, a relação causa-efeito entre a intoxicação com pesticidas e a inibição reprodutiva tem que ser investigada em vespas e em outros insetos sociais (Laycock et al. 2012).

Os métodos desenvolvidos neste estudo para a criação de *P. versicolor*, utilizados pela primeira vez com uma espécie neotropical, foram adequados para os testes toxicológicos, podendo ser adaptados a outros Polistinae. O método de criação das colônias foi bem sucedido e permitiu avaliar, de maneira holística, como um agroquímico pode afetar uma colônia de inseto social. Ensaio toxicológico em laboratório permitem verificar, com maior acurácia, os efeitos nocivos de determinado composto, pois permitem o controle das concentrações estudadas e a determinação dos efeitos causados exclusivamente pelos pesticidas (Arena & Sgolastra 2014). A dificuldade de criação de colônias de insetos sociais em laboratório constitui um grande entrave às pesquisas toxicológicas com esses animais, pois ensaios com as colônias são mais realistas e permitem a observação dos efeitos tóxicos em mais de uma geração (Arce et al. 2016). As interações entre os companheiros de ninho, como a trofaláxis, por exemplo, aumentam as chances de contaminação não somente aos insetos que coletam material em campo, mas aos vários indivíduos das colônias, inclusive à cria. Além disso, ensaios com colônias permitem a realização de avaliações letais e subletais em consequência da exposição crônica aos pesticidas (Arce et al. 2016). O nosso trabalho confirma a importância desse tipo de estudo, pois alguns efeitos causados pela azadiractina, principalmente nos tratamentos com a menor concentração, só foram observados meses após o início da exposição.

Os nossos resultados confirmam que pesticidas de origem natural devem ter a toxicidade sobre organismos não-alvo avaliada, apesar da noção de que produtos de origem natural usados no controle de pragas sejam mais seguros à biodiversidade, ideia que tem sido questionada (Barbosa et al. 2015b). Apesar do potencial de *P. versicolor* para ser utilizada como agente de controle biológico (Prezoto et al. 2006), demonstramos que o uso desse inimigo natural pode ser ineficaz em cultivos tratados com o óleo de nim. Observamos também que a toxicidade da azadiractina ocorreu inclusive em concentrações baixas, embora de forma mais lenta, indicando que mesmo sendo o nim um composto de rápida degradação ambiental, há risco de intoxicação das vespas. Portanto, estratégias de manejo integrado em cultivos que priorizam o controle biológico devem reduzir o uso de insumos como o óleo de nim, para manter com eficácia o controle de pragas por meio da predação realizada por vespas sociais.

5 Referências bibliográficas

Arce AN, David TI et al (2016) Impact of controlled neonicotinoid exposure on bumblebees in a realistic field setting. doi: 10.1111/1365-2664.12792

Arena M, Sgolastra F (2014) A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology* 23:324–334.

Barbosa WF, Meyer L, Guedes RN, Smagghe G (2015a) Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*. doi: 10.1007/s10646-014-1365-9

Barbosa WF, Tomé HVV, Bernardes RC et al (2015b) Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environ Toxicol Chem* 34:2149–2158.

Bentley JW, Castaño-Zapata J, Andrews KL (1995) World integrated pathogen and pest management and sustainable agriculture in the developing world. *Adv Plant Pathol* 11: 249-269.

Bernardes RC, Tome HVV, Barbosa WF et al (2016) Azadirachtin-induced antifeeding in neotropical stingless bees. *Apidologie*. doi:10.1007/s13592-016-0473-3.

Carboni P, Cabras M et al (2002) Persistence of azadirachtin residues on olives after field treatment. *J Agric Food Chem* 50: 3491-3494.

Carvalho FP (2017) Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Security*. doi: 10.1002/fes3.108

Cock MJ et al (2010) Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? *BioControl*. doi: 10.1007/s10526-009-9234-9

Czaja K, Goralczyk K, Strucinski P et al (2015) Biopesticides-towards increased consumer safety in the European Union. *Pest Manag. Sci.* 15:3–6.

De Souza AR, Lino-Neto J, Nascimento FS do (2017) Pushing wasps to work: decentralized aggression induces increased activity in the paper wasp *Polistes versicolor*. *J Insect Behav.* doi: 10.1007/s10905-017-9624-2

De Souza AR, Rodrigues IL, Rocha JVA et al (2008) Foraging behavior and dominance hierarchy in colonies of the neotropical social wasp *Polistes ferreri* (Hymenoptera, Vespidae) in different stages of development. *Sociobiology* 52(2): 293-303.

Eller LE (2006) Perspectives Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest Manag Sci* (in press). doi: 10.1002/ps.1247

Garibaldi LA et al (2017) Farming approaches for greater biodiversity, Livelihoods, and food security. *Trends Ecol Evol*, January. doi: 10.1016/j.tree.2016.10.001

Geiger F et al (2010) Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic Appl Ecol.* doi: 10.1016/j.baae.2009.12.001

Gobbi N, Govane JS, Pinto NPO, Prezoto F (2009) Produtividade em colônias de *Polistes* (Aphanilopterus) *versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae). *Zoociências* 11(3): 191-199.

Gould WP, Jeanne RL (1984) *Polistes* wasps (Hymenoptera: Vespidae) as control agents for lepidopterous cabbage pests. *Environ Entomol* 13: 150-156

Hillocks RJ (2012) Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection*. doi: 10.1016/j.cropro.2011.08.008

Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol* 51: 45–66.

Izzo AS, Tibbets E (2012) Spotting the top male: sexually selected signals in male *Polistes dominulus* wasps. *Anim Behav*. doi: 10.1016/j.anbehav.2012.01.005

Jeanne RL (1972). Social biology of the neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology of Harvard* 144: 63-150.

Laycock I, Cotterell KC, O’Shea-Wheller TA, Cresswell JE (2013) Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.027.

Laycock I, Lenthall KM, Barratt AT, Cresswell JE (2012) Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). doi: 10.1007/s10646-012-0927-y

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, Brazil: Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed 12 June 2017

Mordue AJ, Blackwell A (1993) Azadirachtin: an update. *J Insect Physiol* 39: 903-924.

Mordeu (Luntz) AJ, Morgan ED, Nisbet, AJ (2010) Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert LI, Gill SS (eds) *Insect Control - Biological and Synthetic Agents*. Academic, London, pp. 185–205.

Mordue AJ, Nisbet AJ (2000) Azadirachtin from the neem tree *Azadirachata indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29: 615-632.

Pankiw T (2009) Reducing honey Bee defensive responses and social wasp colonization with methyl anthranilate. *J Med Entomol* 46(4): 782-788

Prezoto F, Santos-Prezoto HH, Machado VLL, Zanuncio JC (2006) Prey captured and used in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) Nourishment. *Neotrop Entomol* 35 (5): 707-709.

R Core Team. (2016). R: a language and environment for statistical computing, version 3.2.4. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>. Accessed 12 June 2017

Rabb RL, Lawson FR (1957) Some Factors influencing the predation of *Polistes* wasps on the Tobacco Hornworm. *J Econ Entomol* 50 (6):778-784.

Ratnieks FLW, Wenseleers T (2008) Altruism in insect societies and beyond: voluntary or enforced? *TRENDS Ecol Evol*. doi: 10.1016/j.tree.2007.09.013

Rembold H, Sharma GK, Czoppelt CH, Schmutterer H (1982) Azadirachtin: a potent insect growth regulator of plant origin. *Z Ang Entomol*. doi: 10.1111/j.1439-0418.1982.tb03564.x

Richards OW (1978) *The social wasps of the Americas: excluding the Vespinae*. British Museum (Natural History).

Richter MR (2000) Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. *Annu Rev Entomol* 45: 121-150.

Schluter V, Bidmon HJ, Grewe S (1985) Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J Insect Physiol 31 (10): 773-777.

SigmaPlot 12.5 (2007) Systat Software Inc. San Jose, CA. www.sigmaplot.com. Accessed 15 may 2017

Stark JD, Walter JF (1995) Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides. J Agric Food Chem 43: 507-512.

Tomé HVV, Barbosa WF et al (2015) Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. An Appl Biology. doi: 10.1111/aab.12217

Venzon M, Rosado MC, Molina-Rugama AJ et al (2008) Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). Crop Protection 27: 869 – 872.

Verhoog H, Matze M, Van Bueren EL, Baars T (2003) The role of the concept of the natural (naturalness) in organic farming. J Agric Environ Ethics. doi: 10.1023/A:1021714632012

Zhang Q-He, Schneidmiller RG, Hoover DR (2012) Essential oils and their compositions as spatial repellents for pestiferous social wasps. doi: 10.1002/ps.3411

6 Legendas

Figura 1A: Curvas de sobrevivência de fêmeas de *Polistes versicolor* mantidas em gaiolas individualizadas e tratadas com xarope contaminado com inseticida. As vespas ingeriram diferentes concentrações de azadiractina (0, 3, 15 e 30µg i.a/ml de xarope), além de imidaclopride (96µg i.a. /ml de xarope; controle positivo). Curvas com cores diferentes correspondem aos diferentes tratamentos e curvas com traçados diferentes são estatisticamente diferentes. No controle negativo (0µg i.a/ml), a circunferência indica

que o tempo máximo de sobrevivência atingido pelas vespas foi censurado aos 120 dias. Os tratamentos foram iniciados quando as vespas tinham idade de 10 dias.

Figura 1B: Tempo letal médio (LT_{50}) de fêmeas de *P. versicolor* submetidas à exposição oral e crônica de concentrações crescentes de azadiractina (0, 3, 15 e 30 μ g i.a/ml de xarope). O inseticida imidaclopride foi usado como controle positivo na concentração de 96 μ g i.a/ml de xarope. Os tratamentos com azadiractina estão representados pelos símbolos pretos e o tratamento com imidaclopride está representado pelo símbolo vermelho.

Figura 2A: Curvas de sobrevivência de colônias de *Polistes versicolor* mantidas em gaiolas e tratadas com xarope contaminado com inseticida. As vespas ingeriram diferentes concentrações de azadiractina (0, 3, 15 ou 30 μ g i.a/ml de xarope), além de imidaclopride (96 μ g i.a. /ml de xarope; controle positivo). Curvas com cores diferentes correspondem aos diferentes tratamentos e curvas com traçados diferentes são estatisticamente diferentes. A colônia foi considerada morta quando a última vespa adulta morreu. As circunferências indicam que o experimento foi censurado aos 90 dias. As colônias tiveram tamanho e número de vespas padronizados antes do início dos experimentos (para detalhes, ver texto).

Figura 2B: Tempo letal médio (LT_{50}) para as colônias de *P. versicolor* submetidas à exposição oral e crônica de azadiractina (15 e 30 μ g i.a/ml de xarope). O inseticida imidaclopride foi usado como controle positivo na concentração de 96 μ g i.a/ml de xarope. Os resultados da mortalidade dos tratamentos com as concentrações de 0 e 3 μ g i.a/ml de xarope não foram inclusos nas análises, pois a mortalidade colonial nesses tratamentos foi inferior a 50%.

Figura 2C: Estágios de desenvolvimento das colônias de *P. versicolor* alcançados em função dos tratamentos com concentrações crescentes de azadiractina (0, 3, 15 e 30 μ g i.a/ml de xarope). O número de colônias que atingiram cada categoria (0-4, sem ovo a adulto) de desenvolvimento foi considerado a variável resposta. O inseticida imidaclopride foi usado como controle positivo na concentração de 96 μ g i.a/ml de xarope. As barras representam o estágio de desenvolvimento médio (\pm SE) atingido pelas colônias. Barras representadas por letras distintas foram consideradas significativamente diferentes por ANOVA ($p < 0.05$).

7 Imagens

Figura 1A

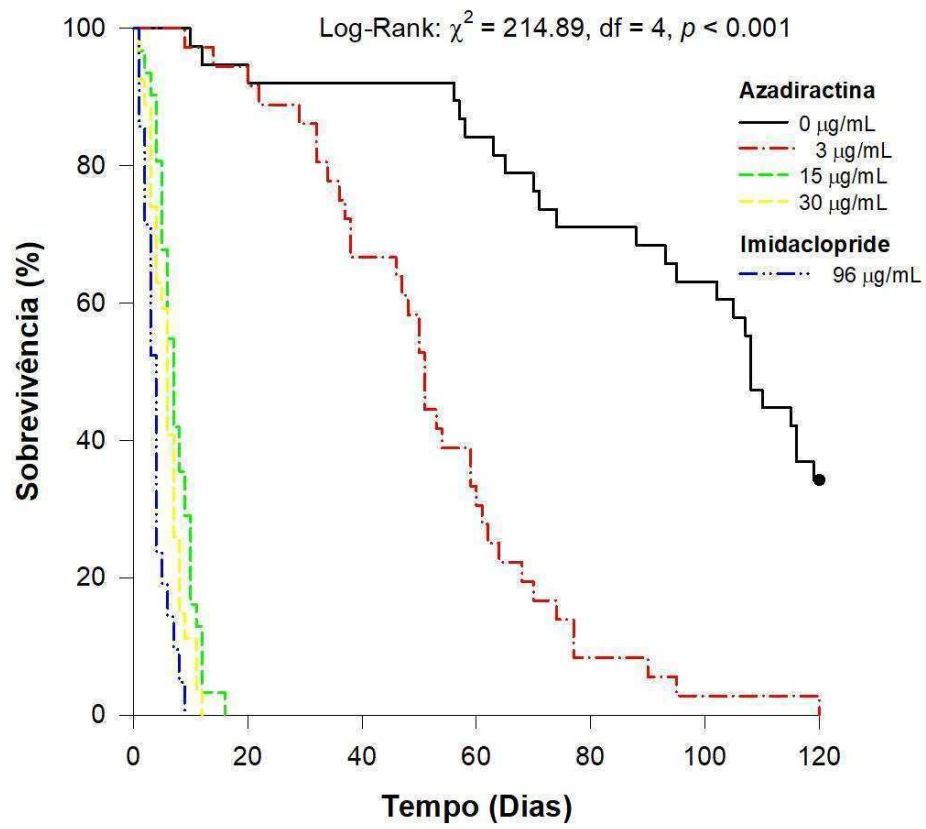


Figura 1B

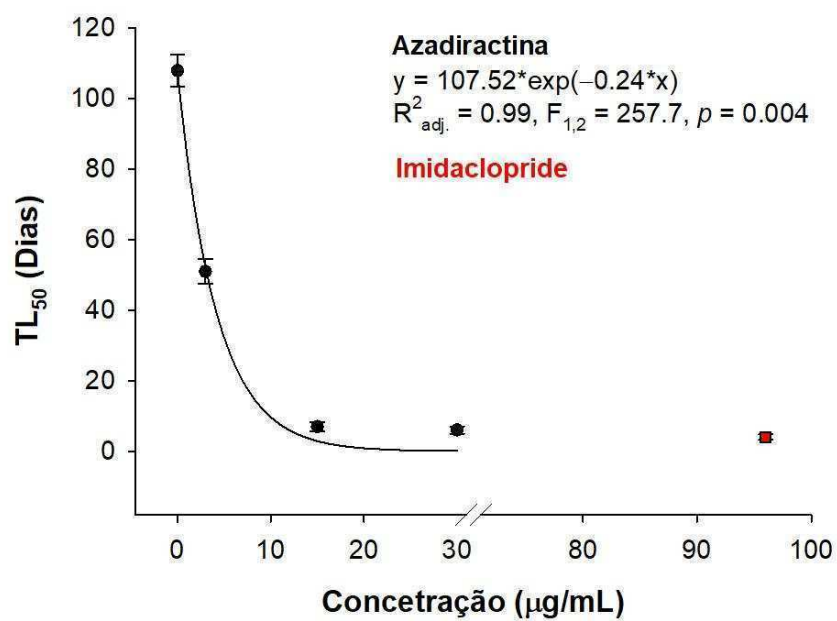


Figura 2A

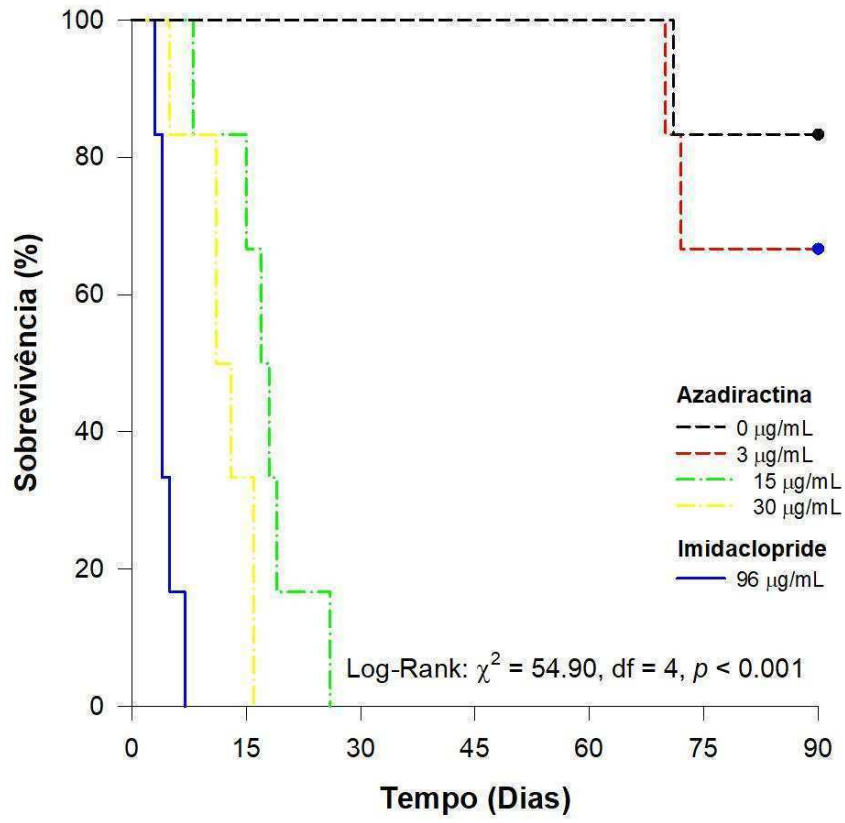


Figura 2B

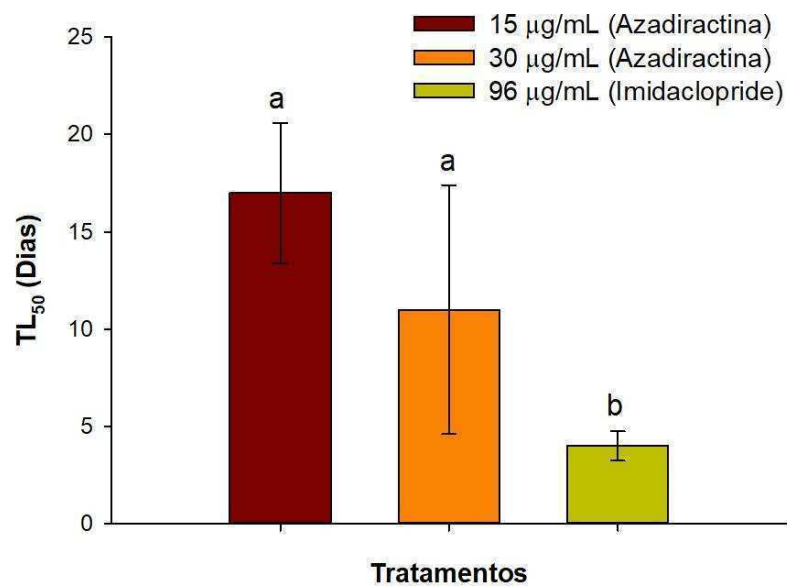


Figura 2C

