

RENATA OLIVEIRA DE FERNANDES

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS, SEUS  
COMPONENTES E AFINS: TESTE PARA O PARÂMETRO ABELHAS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

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

T

F363a  
2012

Fernandes, Renata Oliveira de, 1976-  
Avaliação ecotoxicológica de agrotóxicos, seus  
componentes e afins: teste para o parâmetro abelhas / Renata  
Oliveira de Fernandes. – Viçosa, MG, 2012.  
xi, 42f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Evaldo Ferreira Vilela  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 32-42

1. *Apis mellifera*. 2. Nim. 3. Inseticidas. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

RENATA OLIVEIRA DE FERNANDES

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS, SEUS  
COMPONENTES E AFINS: TESTE PARA O PARÂMETRO ABELHAS**

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

APROVADA: 31 de julho de 2012.

---

Eraldo Rodrigues de Lima  
(Coorientador)

---

Weyder Cristiano Santana

---

Francys Mara Ferreira Vilella

---

Evaldo Ferreira Vilela  
(Orientador)

Aos meus pais, Maria Eunice e Teófilo Fernandes, pelo amor incondicional e pela  
base sólida com que me educaram;  
Ao meu irmão, Ricardo, pela amizade e alegria de sempre;  
Ao meu sobrinho Kauan, por manter viva a criança dentro de mim;  
Aos amigos da Entomologia, pelos ensinamentos, apoio e companheirismo em todos  
os momentos.  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Nosso Senhor, por me conceder a dádiva da vida, força e perseverança para seguir a jornada.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e à concessão da bolsa pela Capes, que permitiu a realização deste projeto e a obtenção do título de mestre.

Ao Professor Evaldo Ferreira Vilela, responsável pelo Laboratório de Comportamento e Feromônios e meu orientador, que me deu a oportunidade de trabalhar com um assunto diferente, mas de grande importância ao meio ambiente. Agradeço pela confiança, ajuda e conselhos nas horas em que precisei.

Ao Professor Eraldo Lima, que além de me acolher no Laboratório de Semioquímicos e Comportamento se tornou um grande amigo.

Ao Professor Raul Guedes, pela ajuda na parte experimental, por me ceder o Laboratório de Ecotoxicologia para iniciar os meus experimentos e pela disponibilidade em ajudar quando foi necessário.

Ao Professor Weyder Cristiano, pelos ensinamentos, paciência, companheirismo e conselhos desde a disciplina de Apicultura Avançada até a minha parte experimental no Apiário, tornando possível a execução desse projeto.

Aos Professores, José Magid Waquil e Eliseu José Guedes Pereira, pela ajuda e conselhos na parte final do meu trabalho.

À Maria Luiza e Francys, pela amizade, pela confiança, por acreditarem na minha capacidade e sempre estarem juntas nos momentos necessários e importantes.

Ao Professor Alberto José Centeno, pela amizade e experiência compartilhada nos tempos em que trabalhamos juntos, pelos conselhos e ensinamentos ímpares na área de ecotoxicologia.

À Cida Bitarelli, Lucila Kloth, Maria Cristina Sampaio, pelo carinho e amizade de tantos anos.

Aos amigos que conquistei no Departamento de Entomologia pelos momentos de alegria compartilhados, pelo apoio e conforto nos momentos mais difíceis, pela paciência e ensinamentos.

À Sandra pela companhia e ajuda na dissecação e fotografias tiradas para o meu trabalho.

À Sharine Omari, pela amizade, ajudas nas horas difíceis, longas e aventureiras viagens, e conversas sempre muito agradáveis e proveitosas.

À Katherine pela amizade, socorro e apoio num momento importante. Pela ajuda, explicações, ensinamentos, colaboração e pelas deliciosas “arepas colombianas” na hora da fome.

À Silvana pela amizade desde os primeiros dias de laboratório até os dias finais de mestrado, quando mais precisei de uma força.

Ao André Sanches por ter me escolhido como amiga e por ter se tornado uma pessoa muito importante na minha vida.

Às amigas Andreza Kerr, Juliana Oliveira, Aline Pedrosa, Natália Maria, Morgana Porto, Elisa Faria, por todos os momentos alegres que compartilhamos.

Aos colegas do Laboratório de Ecotoxicologia, Wagner, Alberto, Hudson e Conrado pela ajuda que precisei durante o desenvolvimento do meu trabalho.

À Michelle que sempre esteve presente nos momentos de saudade e que tanto me ajudou com nossas conversas.

Aos técnicos do Apiário Central pela ajuda, especialmente ao “Lulu”, com quem me aventurei em minhas coletas, muito aprendi sobre criação de *Apis mellifera* africanizada, que cuidou muito bem das colônias que utilizei, sempre com um bom humor contagiante.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional na realização desse sonho, pela presença intensa mesmo na ausência. Pela poesia e música que nos rodeia e deixa a vida mais bela e pela fé e sensibilidade que me fazem acreditar que sou capaz.

Ao Kiko e Kauan por serem mais que especiais na minha vida.

A todos os amigos e companheiros, de Brasília e de Viçosa, que, de uma forma ou outra, fizeram parte desta trajetória, fizeram a diferença e me permitiram chegar ao final desta jornada.

A todos o meu muito obrigado!

# **Pesquisa de Campo**

Gália de Miranda

**Néctar e pólen  
um trabalho de todo dia  
por toda uma vida.**

**Uma surgência que muito  
intriga: criador e criatura.  
A flor e a abelha se misturam.  
Que asa ancestral da sua pétala?  
Que pétala ancestral da sua asa?**

**As flores, o néctar, o pólen: des-sedução?**

**A rainha, os zangões, as operárias: a colméia.**

**A que fim leva para onde se levam?**

**Que esconderijo**

**lhes serve de abrigo ou de cemitério?**

**Diplomacia entomológica:**

**as mesmas razões de fronteiras demarcadas.  
Fome e desnutrição em voos desgovernados.**

**As pequeninas,**

**à imitação das borboletas, se encasulam  
e aguardam uma nova estação das cores.  
Sem a nociva presença química nas águas  
de banho das flores. Sem os torturantes voos  
agônicos nas asas do desamor e do desencanto!**

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS . . . . .	viii
LISTA DE FIGURAS . . . . .	ix
LISTA DE ABREVIACOES. . . . .	x
RESUMO . . . . .	xi
ABSTRACT . . . . .	xii
1 Introdução Geral . . . . .	1
2 Justificativa . . . . .	2
3 Objetivos . . . . .	4
3.1 Objetivo Geral . . . . .	4
3.2 Objetivos Específicos. . . . .	4
4 Revisão de Literatura. . . . .	4
4.1 Agrotóxicos no Brasil e no mundo. . . . .	4
4.2 Legislação para o Registro de Agrotóxicos no Brasil . . . . .	6
4.3 Diretrizes e Protocolos utilizados para avaliação ambiental da toxicidade de agrotóxicos para abelhas. . . . .	9
4.4 Aspectos gerais de <i>Apis mellifera</i> africanizada. . . . .	10
4.5 <i>Colony Collapse Disorder</i> – CCD. . . . .	11
4.6 Divisão de trabalho na colônia. . . . .	12
4.7 Glândulas hipofarngeanas. . . . .	13
4.8 Efeitos do Nim (Azadiractina) em <i>Apis mellifera</i> . . . . .	14
4.9 PER – Proboscis Extension Reflex. . . . .	16
5 Material e Métodos . . . . .	17
5.1 Local e condução dos experimentos. . . . .	17
5.2 Coleta das amostras. . . . .	17
5.3 Taxa de Sobrevivência . . . . .	18
5.4 Exposição em longo prazo . . . . .	19
5.5 Morfologia das glândulas hipofarngeanas de operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada . . . . .	19
5.6 Teste de caminhamento . . . . .	19
5.7 PER - <i>Proboscis Extention Reflex</i> . . . . .	20



5.8	Análises Estatísticas .....	21
6	Resultados .....	22
6.1	Taxa de Sobrevivência .....	22
6.2	Morfologia das Glândulas Hipofaríngeas .....	23
6.3	Caminhamento .....	25
6.4	PER – <i>Proboscis Extension Reflex</i> .....	26
7	Discussão .....	27
8	Conclusão .....	30
9	Referências Bibliográficas .....	32

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Coleta das abelhas *A. mellifera* africanizadas. A) Fechamento da colônia para a coleta. B) Pote com mangueira para auxílio na coleta.

**Figura 2** – Coleta das abelhas *A. mellifera* africanizadas recém-emergidas. A) Favo de cria em estufa B.O.D. à  $34 \pm 2$  °C. B) Colela com auxílio de pinça entomológica.

**Figura 3** – Aparelho de *Videotrack* utilizado no experimento de caminhamento.

**Figura 4** – PER – A) Abelha preparada para o teste. B) Extensão da probóscide ao receber o estímulo na antena.

**Figura 5** – Taxa de Sobrevivência estimada por Kaplan-Meyer de forrageiras de *A. mellifera* africanizada alimentadas com dietas com diferentes concentrações de Azamax<sup>®</sup>.

**Figura 6** – Área média dos ácidos de glândulas hipofaríngeas de operpárias de *A. mellifera* submetidas aos diferentes tratamentos. Letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro do tratamento; letras maiúsculas iguais não diferem entre si entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Figura 7** – Ácidos de *A. mellifera* africanizadas expostas a diferentes concentrações do inseticida Azamax<sup>®</sup>. A) Controle – Sem Azamax<sup>®</sup>; B) 1/10 de concentração de campo (3 mg i.a./L); C) Concentração de campo (30 mg i.a./L) e D) 10x a concentração de campo (300 mg i.a./L). Aumento de 100x.

**Figura 8** – PER das abelhas expostas aos diferentes tratamentos de Azamax<sup>®</sup> em 24 horas. Barras representam a porcentagem de resposta e desvio padrão.

**Figura 9** – PER das abelhas expostas aos diferentes tratamentos de Azamax<sup>®</sup> em 48 horas. Barras representam a porcentagem de resposta e desvio padrão.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Tempos letais das abelhas operárias forrageiras *A. mellifera* Africanizas submetidas a diferentes concentração de Azamax<sup>®</sup>.

**Tabela 2** – Análise de variância das áreas dos ácinos das glândulas hipofaringeanas de *A mellifera* africanizadas.

## LISTA DE ABREVIACÕES

- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APPA – Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental
- B.O.D. - *Biochemical Oxygen Demand*
- CCD – *Colony Colapse Disorder*
- DCC – Desordem do Colapso das Colônias
- DDT – Dicloro-Difenil-Tricloro-Etano
- DL<sub>50</sub> – Dose letal que mata 50% dos indivíduos em estudo
- EPPO – *European and Mediterranean Plant Protection Organization*
- FAO – *Food and Agriculture Organization*
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MMA – Ministério do Meio Ambiente
- MS – Ministério da Saúde
- OECD – *Organisation for Economic Cooperation and Development*
- ONU - Organização das Nações Unidas
- OPPTS – *Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances*
- PER – *Proboscis Extention Reflex*
- PIOR – Produto Impeditivo de Registro
- US-EPA – *United States Environmental Agency*
- UFV – Universidade Federal de Viçosa

## RESUMO

FERNANDES, Renata Oliveira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Avaliação Ecotoxicológica de Agrotóxicos, seus Componentes e Afins: Teste para o Parâmetro Abelhas.** Orientador: Evaldo Ferreira Vilela. Coorientadores: Eraldo Rodrigues de Lima e Angelo Pallini Filho.

A legislação brasileira para o Registro de Produtos Agrotóxicos, seus Componentes e Afins, tem como base a avaliação e classificação do Potencial de Periculosidade desses produtos, com previsão da Avaliação do Risco Ambiental e Toxicológico, fundamentados em protocolos internacionais para diversos parâmetros, inclusive estudos em abelhas, que podem não refletir a realidade brasileira. Um fator de preocupação no Brasil e no mundo é o Colapso das Colônias (CCD), fenômeno de desaparecimento das abelhas, onde uma das hipóteses discutidas para tal fato seria o uso indiscriminado de agrotóxicos. Este trabalho teve como objetivo levantar e estudar os protocolos existentes para a avaliação da toxicidade dos agrotóxicos em abelhas, bem como a discutir estudos alternativos para melhor adequá-los ao cenário brasileiro. Neste sentido, foram conduzidos estudos de sobrevivência, comportamento de caminamento, extensão de probóscide e de nutrição sobre as glândulas hipofaríngeas em *Apis mellifera* africanizadas expostas ao inseticida Azamax<sup>®</sup>. Os resultados demonstraram que a sobrevivência das abelhas pode ser reduzida quando expostas ao inseticida na dose de campo e que as abelhas apresentaram alterações morfológicas nas áreas dos ácinos das glândulas hipofaríngeas em operárias jovens expostas a três doses diferentes do inseticida. Esses achados indicaram a importância de testar os efeitos subletais dos agrotóxicos em insetos, observando parâmetros como comportamento de caminamento, PER (*Proboscis Extension Response*), nutrição sobre glândulas hipofaríngeas, ao invés de considerar apenas estudos de toxicidade aguda como acontece nos dias de hoje para a revisão dos protocolos de testes vigentes, considerando não apenas a avaliação do perigo, mas também da dose e o cenário de exposição.

## ABSTRACT

FERNANDES, Renata Oliveira de, M.Sc.; Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Ecotoxicological Evaluation of Pesticides and their Components: Honeybees Protocols.** Adviser: Evaldo Ferreira Vilela. Co-advisers: Eraldo Rodrigues de Lima and Angelo Pallini Filho.

In order to register a Pesticide, Brazilian Law is based on the evaluation and classification of the Pesticides Potential Hazard of the products. Also planned is the introduction of the Environmental and Human Health Risk Assessment for pesticides both based on study results that follow internationally recognized protocols, however, all these those study protocols, including bee toxicity, may not be adequate to represent the Brazilian reality, once they are applied mostly in temperate countries. In this sense, there is growing concern about bees and other pollinators that possess universal importance to the economy, agriculture and environmental balance on the planet. The disappearance of these insects of the hives, a phenomenon commonly known as CCD (Colony Collapse Disorder) has been discussed nowadays in Brazil and worldwide. This study aimed to identify and study the existing protocols for assessing the toxicity of pesticides to bees, as well as to discuss alternative studies to better adapt the protocols used abroad to the Brazilian scenario. In order to do that, studies were conducted on survival, walking behavior, proboscis extension response (P.E.R), nutrition and morphology of hypopharyngeal glands in africanized *Apis mellifera* exposed to the insecticide Azamax<sup>®</sup>. Results have demonstrated that bee survival can be diminished when those insects are exposed to the insecticide at field doses and also that bees present morphological changes in the areas of acini hypopharyngeal glands, preventing its development when young worker bees were exposed to three different doses of insecticide. These findings indicated the importance of exploring pesticides sub lethal effects on insects, observing parameters such as walking behavior, PER (Proboscis Extension Response), nutrition and morphology of hypopharyngeal glands, instead of only consider acute toxicity studies, like it happens nowadays, when reviewing the test protocols that already exists, considering not only hazard evaluation, but also the dose and exposition scenery.

## 1 Introdução Geral

Os polinizadores são considerados componentes principais dos ecossistemas agrícolas, sendo que cerca de 73% das espécies agrícolas cultivadas mundialmente são polinizadas por abelhas (FAO, 2004). No Brasil, oito culturas responsáveis por US\$ 9,3 bilhões em exportações dependem de polinizadores (Freitas & Imperatriz-Fonseca, 2004, 2005). Segundo Buchmann & Nabhan, 1996, a polinização é essencial para a reprodução e manutenção da diversidade de espécies de plantas e provê alimentos para humanos e animais, influenciando também, o aspecto qualitativo da produção. No entanto, o aumento da atividade de forrageamento das abelhas tem levado a redução no número de espécies em função do contato com inseticidas, geralmente utilizados no controle de insetos-praga, nas áreas de cultivo (Malaspina & Silva-Zacarin, 2006).

A utilização de agrotóxicos no Brasil é uma questão que deve ser constantemente discutida, tendo em vista que entre 1964 e 2004 o consumo desses produtos aumentou em 700% (Spadoto *et al.*, 2004).

A legislação vigente no Brasil regulamenta a avaliação dos agrotóxicos, classificando-os quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) e quanto à Toxicidade para a saúde humana, baseada em resultados de estudos que seguem protocolos internacionalmente reconhecidos (IBAMA, 2009). No entanto, a aplicação desses protocolos nem sempre correspondem à realidade brasileira, uma vez que foram criados, em sua maioria para a aplicação em países de clima temperado.

Atualmente não se conta com informações suficientes nos protocolos internacionais como, por exemplo, estudos utilizando doses subletais e estudos conduzidos com espécies nativas para a avaliação do parâmetro abelhas que suportem a adequação desses documentos à realidade brasileira. Os protocolos de toxicidade de agrotóxicos descritos e padronizados utilizam somente *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) (Felton *et al.*, 1986). No entanto Witfield *et al.*, 2006; Kerr *et al.*, 1996) demonstram que *Apis mellifera* africanizada, bem como as demais abelhas nativas, representariam melhor o cenário brasileiro. Desneux *et al.* (2007) afirma que as abelhas (Apoidea) fazem parte de um grupo muito diversificado, distribuídos em diferentes grupos taxonômicos e apresentam vulnerabilidade variadas, no que diz respeito aos agrotóxicos.

A mortalidade de abelhas, pelo uso inadequado de agrotóxicos, é um assunto discutido atualmente no Brasil e no mundo (Malaspina & Souza, 2008; Malaspina *et al.*, 2008; Pinto & Miguel 2008).

Na literatura existem inúmeros relatos do desaparecimento de abelhas das colmeias ao longo dos anos de 1880, 1920 e 1960 (Pareja, *et al.*, 2011), os quais foram conhecidas como Mal de outono, Colapso de outono, Doença de Maio e Doença do desaparecimento (De Jong, 2009) com descrições semelhantes ao que hoje os Estados Unidos denominam CCD (*Colony Collapse Disorder*) (Pareja *et al.*, 2010), no entanto sem a magnitude e velocidade dos recentes acontecimentos (Williams *et al.*, 2010). Mais especificamente, a partir dos anos 2006 e 2007 a perda de centenas de milhares de colmeias das abelhas melíferas (*A. mellifera*) sem uma explicação clara, não somente em países como os Estados Unidos, mas também na Europa e no Canadá (Williams *et al.*, 2010).

Este trabalho teve como objetivo levantar e estudar os protocolos internacionais utilizados na avaliação de toxicidade de agrotóxicos para abelhas, bem como discutir alternativas para melhor adequá-los ao cenário brasileiro. Neste sentido foram conduzidos estudos de mortalidade e morfologia das glândulas hipofaríngeas em *A. mellifera* africanizadas expostas ao inseticida Azamax<sup>®</sup>.

## **2 Justificativa**

As abelhas da espécie *A. mellifera* são polinizadores universais e de comprovada importância ecológica e econômica, uma vez que polinizam uma grande variedade de plantas silvestres e culturas comerciais (Pham-Delègue *et al.*, 2002). Segundo Williams (1994), o valor econômico da atividade das abelhas não resulta apenas dos produtos da colmeia como o mel, a geleia real e a cera, mas também da polinização de culturas agrícolas.

Os protocolos internacionais mais utilizados para avaliação da toxicidade dos agrotóxicos às abelhas em laboratório são os elaborados pela EPPO – *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (1992), US-EPA – *United States Environment Protection Agency* (1996) e OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development* (1998 a,b) (Pinheiro & Freitas, 2010). Tais protocolos indicam somente *A. mellifera* (*Hymenoptera: Apidae*) como modelo de teste (Felton *et al.*, 1986). Contudo, Whitfield *et al.* (2006) menciona a necessidade da realização desses testes sob condições que melhor representem o cenário



brasileiro com o poli-híbrido oriundo do cruzamento das abelhas *A. mellifera scutellata* x *A. mellifera carnica* x *A. mellifera mellifera* x *A. mellifera ligustica*, conhecidas como abelhas africanizadas. Outro grupo de abelhas sociais que merece maior atenção são os meliponíneos, que constituem um grupo de abelhas nativas sociais do Brasil e que são responsáveis pela polinização de 40 a 90 % das espécies vegetais silvestres (Kerr *et al.* 1996).

Publicados há mais de dez anos, os protocolos internacionais não fazem menção à avaliação da toxicidade em crias das abelhas, larvas e pupas. Lidam exclusivamente com as abelhas adultas e de uma única espécie, *A. mellifera*. Ao final do ano 2009, em resposta à preocupação pública sobre o destino de certos agrotóxicos no meio ambiente, a US-EPA concordou em rever os registros de todos os pesticidas em um período de 15 anos (Burlew, 2010).

Estes protocolos destacam de modo enfático o tipo de efeito específico a ser relatado em relação as doses subletais (Freitas & Pinheiro 2010). Tanto Desneux, *et al.* (2007) quanto Freitas & Pinheiro (2010) mencionam que os efeitos subletais de agrotóxicos às abelhas e outros artrópodes são tão importantes quanto os efeitos letais, uma vez que a ação desses produtos nas fases adultas e jovens dos insetos são relevantes quanto à interferência nas mudanças fisiológicas e comportamentais, impactando nas colônias de várias espécies de abelhas. Como exemplo de alteração do estado fisiológico, Cruz-Landim (2009), Seehuus *et al.* (2007) e Gatehouse *et al.* (2004) citam o papel da qualidade do alimento coletado por abelhas sobre a ativação das glândulas hipofaríngeas.

Importante mencionar que a nutrição adequada das colônias pode atuar como barreira contra patógenos e epizootias como a CCD, que rendem perdas de milhões de dólares para a apicultura mundial (Brodschneider & Crailsheim, 2010), o que aumenta a preocupação de apicultores e principalmente agricultores, os quais dependem das abelhas para a polinização de suas culturas (De Jong, 2009).

Estudos já publicados ou ainda em fase de investigação são ferramentas úteis na pesquisa de alternativas ao estudo da toxicidade de agrotóxicos para abelhas quanto à Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental, bem como da Avaliação de Risco Ambiental.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Geral:**

Discutir os protocolos utilizados para avaliação de toxicidade a agrotóxicos para organismos não alvos, como as abelhas, por meio do estudo do efeito de diferentes concentrações do produto Azamax<sup>®</sup> (DVA Agro do Brasil- Comércio Importação e Exportação de Insumos Agropecuários S.A.) em abelhas *A. mellifera* africanizadas.

#### **3.2 Específicos:**

- Realizar uma revisão de literatura sobre o histórico do emprego de agrotóxicos no Brasil e no mundo.
- Realizar um levantamento dos protocolos existentes para os estudos de toxicidade para abelhas utilizados pela legislação brasileira e internacional relacionados à Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental de produtos agrotóxicos no Brasil e no mundo.
- Avaliar a sobrevivência e o efeito de diferentes concentrações do agrotóxico Azamax<sup>®</sup> em abelhas operárias adultas da espécie *A. mellifera* africanizada.
- Avaliar o caminhar e extensão da probóscide - PER em operárias adultas de *A. mellifera* africanizada submetidas as diferentes concentrações do agrotóxico Azamax<sup>®</sup>.
- Verificar o efeito de diferentes concentrações do agrotóxico Azamax<sup>®</sup> na ativação das glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada.

### **4 Revisão de Literatura**

#### **4.1 Agrotóxicos no Brasil e no mundo**

Desde a pré-história até hoje, a humanidade agiu para evitar danos causados por pragas aos cultivos agrícolas. Neste sentido, documentos atestam o uso de “agrotóxicos” desde a antiguidade. Há mais de 1.000 anos AC o poeta grego Homero já citava as utilidades anti-pragas do enxofre. Os romanos foram conhecidos por terem usado o sal para destruir as colheitas de seus inimigos e Demócrito, o

filósofo grego, chamou a atenção para efeitos curativos de pragas com a aplicação de resíduo de processamento de azeite (Ware & Whiteacre, 2004).

Os primeiros compostos químicos começaram a ser sintetizados durante a Primeira Guerra Mundial com a manipulação de substâncias químicas letais pelas principais potências bélicas e econômicas durante o conflito militar. O fim da guerra direcionou os organo-sintéticos ociosos para os fins militares para o uso agrícola, tornando-os úteis ao combate de insetos causadores da quebra da produção (Moragas & Schneider, 2003).

Ainda segundo Moragas & Schneider (2003), no Brasil os venenos botânicos extraídos de plantas como o crisântemo (piretro), o fumo (nicotina) e os artificiais inorgânicos como o arsênio, mercúrio, enxofre, entre outros, foram os mais utilizados até 1930, sendo que alguns desses são utilizados até os dias atuais.

Durante as décadas de 1960 e 1970 iniciou-se o debate sobre a utilização de agrotóxicos, particularmente em países industrializados e mais desenvolvidos (Solomon *et al.*, 2010).

Segundo os mesmos autores, a partir de 1962 com a publicação do livro *Silent Spring* (Primavera Silenciosa) de autoria da bióloga Rachel Louise Carson, o aparente e ilimitado otimismo sobre os agrotóxicos contrastou com um grande número de problemas ambientais que emergiram do uso persistente de inseticidas e alguns dos efeitos colaterais insuspeitos de herbicidas.

Esta obra certamente foi um grande marco para a história, traduzindo a preocupação, não só da escritora, mas de vários cientistas com a displicência humana face à contaminação sistemática provocada por ações extremamente poluidoras. A autora expôs de maneira clara e científica os problemas ambientais causados pelo uso abusivo de agrotóxicos incentivados a partir da Segunda Guerra Mundial. Uma das primeiras substâncias que envolvia o novo campo das moléculas de carbono foi o Arsênio, primeiro produto de ação cancerígena com alto poder de contaminação constatado. Em seguida surgiram os hidrocarbonetos clorados e um deles é representado pelo DDT (Dicloro-Difenil-Tricloro-Etano), sintetizado em 1874 por Othmar Zeidler (Universidade de Estrasburgo, Alemanha) e aplicado como inseticida a partir de 1939. Esse produto passou a ser produzido em grande escala e aplicado de forma aérea em paisagens inteiras, inclusive em áreas urbanizadas. Logo após, surgiu a Dieldrina com uma ação tóxica 50 vezes maior que o DDT (Carson, 1962).

Com a proibição da utilização desses compostos para fins agrícolas em meados da década de 80, novos compostos passaram a ser utilizados com destaque para os inseticidas organofosforados e piretróides (Guedes *et al.*, 1995).

Na última década, os neonicotinóides, representantes mais recentes dos agrotóxicos comercializados mundialmente, tornaram-se suspeitos de causarem mortalidades de abelhas ligando esses produtos aos problemas relacionados com o CCD (Lu *et al.*, 2012).

No Brasil o uso de agrotóxicos assumiu grandes proporções. Entre 2001 e 2008 a venda saltou de pouco mais de US\$ 2 bilhões para mais US\$ 7 bilhões, colocando o país na posição de maior consumidor mundial desses produtos (Londres, 2011).

Embora o uso de agrotóxicos tenha aspectos positivos, existe o risco inerente de contaminação ambiental e há necessidade de se ordenar seu comércio e uso, mantendo sua eficiência do ponto de vista agrônomo, minimizando os seus efeitos danosos ao meio ambiente e à saúde humana. Nesse contexto a legislação deve ser um dos instrumentos existentes para disciplinar e organizar o tema, evitando os excessos e o uso indevido dos agrotóxicos (Tomyta, 2005).

#### **4.2 Legislação para o Registro de Agrotóxicos no Brasil**

O Brasil possui uma das legislações mais completas no que diz respeito aos agrotóxicos, seus componentes e afins (Ribeiro, 2005) ao dispor sobre o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, bem como sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação e o destino final dos resíduos e das embalagens desses produtos agrotóxicos (IBAMA, 2009), a qual está em conformidade com o que foi estabelecido pela Constituição Federal de 1988.

A Constituição Federal de 1988 em seu art. 225, parágrafo 1º, inciso V, dispõe que:

*“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.”*

*Par. 1º - Para assegurar a efetividade desse direito, incumbe ao Poder Público:*

*V - controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente”.*

No Brasil a primeira legislação criada para regulamentar o uso de agrotóxicos data de 1934 com a publicação do Decreto nº 24.114, onde até então o registro se processava apenas com a participação do Ministério da Agricultura (IBAMA, 2009). Este decreto vigorou até 1989 quando foi aprovada a Lei Federal nº 7.802 que dispõe especificamente sobre agrotóxicos, seus componentes e afins (Tomyta, 2005), a qual foi substituído pelo Decreto nº 98.816/90 que passou a estabelecer normas mais rigorosas para o registro de agrotóxicos, impondo regras mais rígidas para a liberação desses produtos (Ribeiro, 2005).

A Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, define agrotóxicos como:

*“produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes hídricos e industriais, cuja finalidade seja a de evitar a ação danosa de seres vivos considerados nocivos.”*

A Lei nº 7.802 trouxe uma série de inovações e benefícios para o uso seguro dos agrotóxicos no País, dentre os quais a introdução de órgão e meio ambiente e da saúde compartilhando a responsabilidade na avaliação do potencial de periculosidade ambiental e da toxicidade para mamíferos dos agrotóxicos, seus componentes e afins, bem como, a possibilidade de reavaliação de produtos registrados. Exemplo concreto aconteceu com produtos à base de organoclorados, que culminou com a proibição da maioria deles no Brasil (IBAMA, 2009).

Atualmente o Decreto 4.074 de 2 de janeiro de 2002 foi alterado pelos Decretos nº 5.549 de 2005, nº 5981 de 2006 e nº 6.913 de 2009 e diversas normas complementares regulamentam a Lei nº 7.802/89.

De acordo com a Lei nº 7.802/89 o registro de um agrotóxico, seus componentes e afins, é uma atribuição compartilhada por três órgãos federais: Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Ministério da Saúde

– MS e Ministério do Meio Ambiente – MMA, que possuem igual poder decisório sobre a concessão ou não do registro, resguardadas as suas respectivas áreas de atuação e de competências institucionais. Os três órgãos realizam a avaliação dos produtos e emitem pareceres conclusivos em suas áreas, cabendo apenas a um desses órgãos, a depender do tipo de produto, a incumbência de expedir o Certificado de Registro ou comunicar o Indeferimento do pleito (IBAMA, 2009).

O MAPA é o responsável pela avaliação da eficácia e praticabilidade agrônômica dos produtos a serem registrados para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas de uso agrícolas.

O MS é o responsável pela avaliação da toxicidade a mamíferos, implementada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, enquadrando os produtos agrotóxicos nas seguintes classes toxicológicas: Classe I – Produtos Extremamente Tóxicos, Classe II – Produtos Altamente Tóxicos, Classe III – Produtos Medianamente Tóxicos, Classe IV – Produtos Pouco Tóxicos (Brasil, 1991).

Cabe ao MMA a Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental dos agrotóxicos, seus componentes e afins, executada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

*“A classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental baseia-se nos parâmetros bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico, carcinogênico, obedecendo a seguinte graduação: Classe I – Produto Altamente Perigoso; Classe II – Produto Muito Perigoso; Classe III – Produto Perigoso; Classe IV – Produto Pouco Perigoso.”* (Brasil, 1996).

No caso de um produto agrotóxico se enquadrar em pelo menos um dos seguintes casos, será conferida a classificação PIOR:

*“a) não houver disponibilidade no país de métodos para a sua desativação e de seus componentes; b) apresentar características mutagênicas, teratogênicas ou carcinogênicas; ou c) a classificação do PPA e/ou avaliação do risco ambiental indicar índices não aceitáveis de*

*periculosidade e/ou risco, considerando os usos propostos”*  
(Brasil, 1996).

### **4.3 Diretrizes e Protocolos utilizados para avaliação ambiental da toxicidade de agrotóxicos para abelhas**

Dentro das competências específicas de cada órgão regulamentador no Brasil são estabelecidas diretrizes e exigências, publicadas em legislação, para efeito da avaliação e registro de agrotóxicos (IBAMA, 2009).

Em relação às diretrizes e exigências envolvidas na APPA, realizada especificamente pelo IBAMA, avaliam-se os estudos realizados com organismos não alvos a fim de se estimar a toxicidade dos agrotóxicos (IBAMA, 2009). Dentre esses organismos as abelhas exercem papel fundamental nesta avaliação, uma vez que além de sua importância econômica ao país são polinizadores de grande parte das culturas comerciais existentes.

Para a avaliação da toxicidade em abelhas analisadas pelo IBAMA, os resultados dos estudos conduzidos seguem protocolos internacionalmente reconhecidos.

Atualmente todos os protocolos utilizados OECD – 213 e OECD – 214 de 1998, US-EPA OPPTS 850.3020 de 1996 e EPPO 2000 avaliam a toxicidade de agrotóxicos via oral e contato através da definição das  $DL_{50}$  de *A. mellifera*.

A determinação da  $DL_{50}$  permanece até hoje como o método mais aplicado em estudos de laboratório para estimar os efeitos dos agrotóxicos em artrópodes não alvos. Entretanto, a falta de atenção aos efeitos subletais associados a esses métodos tradicionais gera discussões para a revisão dos protocolos existentes em face do aumento da importância desses organismos no cenário agrícola (Desneux *et al.*, 2007).

Para reforçar este ponto de vista Bortolotti *et al.* (2003) e Pinheiro & Freitas (2010) afirmam que a contaminação por agrotóxicos de plantas em pleno florescimento é uma das principais causas de mortalidade de polinizadores (efeito agudo), porém níveis mais baixos de doses podem afetar o comportamento de forrageamento das abelhas, reduzindo assim o vigor das colônias (efeitos subletais).

Segundo Freitas & Pinheiro (2010), os protocolos hoje existentes e utilizados no Brasil contemplam mais estudos com a exótica *A. mellifera* do que todas as espécies de abelhas sem ferrão somadas. Essas abelhas destacam-se no

cenário brasileiro devido às altas taxas de polinização, diversidade e por serem nativas (Kerr *et al.*, 1996). Freitas & Pinheiro (2010) também mencionam uma grande variação na tolerância dos meliponínios aos agrotóxicos em função da espécie de abelha estudada.

Tal fato se deve ao estudo de toxicidade de inseticidas em abelhas iniciado nos países de clima temperado (Paschoal, 1979; Moraes *et al.*, 2000 *citado por* Del Sarto, 2009). Esse seria outro aspecto desconsiderado pela legislação brasileira para se alcançar precisão na avaliação dos efeitos sofridos em abelhas nativas do País.

#### **4.4 Aspectos gerais de *Apis mellifera* africanizada**

A apicultura com *A. mellifera* iniciou-se no Brasil com a introdução de abelhas européias em 1839 (sendo as principais raças de abelhas que formaram a abelha híbrida do país: a alemã *A. mellifera mellifera*, a italiana *A. mellifera ligustica* e a cárnica *A. mellifera carnica*) (Da Silva, 2004). De acordo com a mesma autora, apesar das várias tentativas de introdução de outras raças de abelhas europeias entre os anos de 1870 e 1880, a produtividade da apicultura nacional não obteve o aumento esperado pelo fato de que todas as abelhas provinham de clima temperado/frio, não adaptadas ao clima tropical brasileiro.

Mello *et al.* (2003) e Da Silva (2004) relatam a inexpressividade da apicultura brasileira até a metade do século XX e a necessidade de se obter uma abelha adaptada ao clima tropical.

Em 1956 o pesquisador Warwick Estevam Kerr introduziu a subespécie africana *A. mellifera scutellata* para dar início a um programa de melhoramento que obtivesse a mansidão das abelhas europeias e a produtividade das africanas (Stort e Gonçalves, 1979; Gonçalves, 1992; Gonçalves e Stort, 1994; Kerr, 1967; Stort e Gonçalves, 1994, *citado por* Cristino, 2003, Kerr, 1996). Após a fuga acidental para a natureza, ocorreu o cruzamento da *A. m. scutellata* com as abelhas europeias mestiças já criadas no país, o qual gerou insetos poli-híbridos hoje encontrados no Brasil.

Dessa forma, a abelha africanizada resultante, mesmo apresentando características exteriores similares à europeia, possui quase todas as características fenotípicas comportamentais da abelha africana, e precisou, portanto, de uma



adaptação no manejo para se ter sucesso com a criação deste híbrido, que de certa forma deixou de ser vista como uma ameaça, desenvolvendo a apicultura e aumentando a produtividade como os cientistas brasileiros previram inicialmente (Da Silva, 2004).

#### **4.5 Colony Collapse Disorder - CCD**

A polinização é um serviço ambiental de grande relevância para a manutenção da integridade dos ecossistemas e para a sustentabilidade da agricultura, necessitando assim, haver maior atenção no manejo agrícola e nas ações conservacionistas. O déficit de polinização resulta em perdas de produtividade e de qualidade dos produtos agrícolas. A agricultura e a diversidade dos agroecossistemas estão ameaçados pelo declínio das populações de polinizadores. A maior contribuição para esse declínio, entre outros, é a fragmentação de habitat, o uso de produtos químicos agrícolas e industriais, parasitas, doenças e introdução de espécies exóticas (MMA, 2006).

A ocorrência do CCD, também conhecido em português como Desordem do Colapso das Colônias (DCC) (Freitas & Pinheiro, 2010), tem sido reportada com maior ênfase desde 2006/2007 e trata do desaparecimento de grande número de abelhas de suas colônias sem uma razão específica (van Engelsdorp *et al.*, 2009) em áreas onde práticas agrícolas intensivas constituem importante atividade econômica (Pareja *et al.*, 2011).

De Jong (2009) e Stockstad (2007a) descrevem os sintomas atribuídos do CCD quando as abelhas deixam as caixas cheias de mel, pólen, cria operculada, uma rainha e em alguns casos, algumas operárias jovens. Abelhas mortas não são encontradas dentro ou próximas das colmeias com CCD, o que dificulta os estudos em relação a esse fenômeno.

Na literatura existem inúmeros relatos do desaparecimento de abelhas das colmeias ao longo dos anos de 1880, 1920 e 1960 com descrições semelhantes às atuais causas atribuídas ao CCD, porém ainda não se sabe ao certo se os problemas ocorridos no passado têm a mesma relação com o CCD (Pareja, *et al.*, 2011).

Nos últimos anos vários estudos demonstraram que as abelhas são expostas a uma ampla gama de agrotóxicos e que alguns desses produtos têm efeitos interativos com outros produtos ou estado de saúde das abelhas, como parasitas e/ou vírus nas abelhas. Em conjunto, estes estudos suportam a hipótese de que o CCD é

uma síndrome de *stress* causado por muitos fatores que agem individualmente e/ou combinados (USDA, 2010).

De Jong (2009) afirma que, embora no Brasil as perdas não cheguem aos níveis Americanos, existe a preocupação com problemas já identificados no país semelhantes aos descritos para o CCD. A grande vantagem brasileira é a abelha africanizada, que tem demonstrado adaptação e resistência acentuada às doenças e parasitas já reportadas para raças de abelhas europeias (De Jong, 2009).

Segundo o mesmo autor, os agrotóxicos são foco de estudos relacionados ao CCD por afetarem a mortalidade de abelhas e em doses subletais, afetarem o comportamento de orientação desses insetos. Além disso, as falhas no sistema imunológico, que deixam as abelhas mais suscetíveis às doenças, são atribuídas à ação de vários agrotóxicos. Dentre esses produtos De Jong (2009) e Pareja *et al.* (2011) mencionam os neonicotinóides, pertencentes à última geração de agrotóxicos, os quais são pouco tóxicos para mamíferos e bastante tóxicos para insetos. Por serem produtos sistêmicos (Halm *et al.*, 2006) aplicados no solo e que são translocados por toda a planta, chegando as flores, néctar e pólen, são cada vez mais usados nas culturas agrícolas brasileiras. As preocupações quanto aos efeitos do CCD em consequência do uso desses produtos advêm, mesmo em quantidades reduzidas, do fato da acumulação desses produtos na colmeia. As abelhas jovens, em especial, podem ser expostas a doses subletais durante o seu ciclo de vida com efeitos significativos danosos sobre a colônia e consequente diminuição do número de indivíduos da colônia e da população de insetos benéficos (Pareja *et al.*, 2011).

#### **4.6 Divisão de trabalho na colônia**

Um importante atributo da sociedade entre abelhas é a integração da colônia como um nível biológico de organização e não somente um agregado de indivíduos (Holldobler & Wilson, 2008).

Tautz (2010) caracteriza as propriedades especiais de uma colônia da seguinte forma: “A colônia é uma comunidade animal complexa e adaptativa, composta de muitos milhares de indivíduos em permanente atividade e que reage às condições ambientais e à presença de seus parceiros de ninho. Não existe uma instância superior de controle, mas sim o comportamento geral da colônia resulta da cooperação e da competição entre as abelhas”. Ainda segundo o mesmo autor a

divisão de trabalho é a receita de sucesso em insetos sociais, e em abelhas essa divisão é preferencialmente dependente da idade para a execução de algumas tarefas.

De acordo com Winston (1987) abelhas são insetos sociais que vivem juntas em colônias contendo milhares de indivíduos e são organizadas por uma complexa e sofisticada divisão de trabalho. Cada colônia contém uma única rainha, especializada em reproduzir e passa a maior parte da sua vida ovipositando. Os machos, chamados zangões, são relativamente raros e também apresentam uma única função que é acasalar. Nas operárias a capacitação é alcançada através da maturação fisiológica para seu desempenho, adquirida por etapas, com o avanço da idade, o polietismo etário, onde as estruturas glandulares endócrinas e exócrinas desempenham importante papel (Cruz-Landim & Silva de Moraes 2000). A maioria dos indivíduos na colônia são operárias estéreis responsáveis por todas as demais atividades da colônia. Entre a 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> semanas da vida adulta, as operárias apresentam funções de cuidados com as crias e outras atividades dentro da colmeia, como construção dos favos de mel, armazenar comida nessas células ou até mesmo, guardar a entrada da colônia contra invasores (Ament, *et al.*, 2010; Winston, 1987). Os cuidados com as crias e o forrageamento distinguem as principais fases de vida das abelhas (Robinson, 1992). Nas últimas duas semanas de vida, as abelhas operárias saem das colônias para a função de forrageamento do néctar e pólen, as principais fontes de alimento das colônias (Winston, 1987).

A função de operária nutridora dura aproximadamente 1 semana, do 4<sup>o</sup> ao 12<sup>o</sup> dia, e nessa fase são responsáveis por alimentar as larvas com uma substância proteica glandular (geleia real) aumentando a sua taxa de crescimento. Além de alimentar as larvas, as abelhas nutridoras transferem essa substância proteica para as outras abelhas da colônia, bem como para a rainha. Abelhas nas idades entre 12 e 21 dias, já não apresentam mais interesse pelas crias, e sim por receber e processar o néctar recebido, além de guardar a entrada da colônia. Uma vez que a transição para o forrageamento acontece, as abelhas focam em forragear as quatro fontes necessárias para a colônia: própolis, água, néctar e pólen (Johnson, 2010).

#### **4.7 Glândulas hipofaringeanas**

As glândulas hipofaringeanas de operárias de *A. mellifera* têm sido estudadas morfológicamente e fisiologicamente devido ao seu papel na produção de geleia real (Cruz-Landim, 2009; Seehuus *et al.*, 2007; Gatehouse *et al.*, 2004).

A glândula hipofaringeana juntamente com a glândula mandibular presentes na cabeça, produzem a geleia real, substância de base proteica, responsável pela diferenciação de castas e também utilizada na alimentação de larvas jovens, rainhas e zangões (Feng *et al.*, 2009; Kamakura, 2011).

A geleia real como padrão de dieta na colmeia é o ponto de partida nas diferentes rotas de desenvolvimento das abelhas, uma vez que a diferenciação de castas é condicionada justamente pela composição desta geleia. O conteúdo de 35% de hexose (um açúcar) determina o desenvolvimento de uma rainha e o conteúdo de 10% determina o desenvolvimento de uma simples operária. Operárias estéreis e rainhas férteis representam as duas castas de uma colônia. Já larvas de rainhas chegam a ser visitadas dez vezes mais pelas operárias nutridoras do que as larvas de operárias, de modo que as larvas que resultam em rainhas ingerem quantidades maiores de geleia real e de melhor qualidade com maior frequência (Tautz, 2010). Também há a presença de substâncias que promovem a diferenciação fenotípica das larvas das rainhas (Kamakura, 2011).

O desenvolvimento e ativação da glândula hipofaringeana é influenciada diretamente pela quantidade e qualidade da proteína (pólen) ingerida pelas operárias. O tamanho das glândulas representado pela medida do diâmetro dos ácinos está relacionado ao total de proteínas consumido (Pernal & Currie, 2000, Pinto *et al.*, 2012).

Vários fatores podem alterar a fisiologia das estruturas glandulares de abelhas e, conseqüentemente, seu papel dentro da colméia, e um dos os fatores mais importantes é o seu estado nutricional (Pinto *et al.*, 2012). Nas operárias que não produzem geleia real, essas glândulas se atrofiam e em caso de necessidade, mesmo após a atrofia, é possível ocorrer uma nova ativação de operárias com idades próximas, o que demonstra uma enorme plasticidade da colônia e de seus membros (Tautz, 2010).

#### **4.8 Efeitos do Nim (Azadiractina) em *Apis mellifera***

A busca de alternativas ambientalmente corretas no trato com as culturas agrícolas, bem como as restrições impostas pelos mercados nacional e internacional por alimentos sem resíduos de agrotóxicos, levaram os agricultores brasileiros a dedicarem-se mais ao uso de produtos naturais de origem vegetal, como

a planta popularmente conhecida como nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) e seus extratos.

O nim é utilizado há séculos na Índia e desde 1986 utilizada no Brasil como planta inseticida (EPAMIG, 2002). Freitas & Pinheiro (2010) explicam que, por ser de origem vegetal, acredita-se que produtos derivados do nim oferecem uma grande margem de segurança ambiental para aplicações de campo.

Planta da família Meliaceae, cuja característica comum é a presença de triterpenos oxigenados, onde o componente mais significativo é a azadiractina que está presente nas folhas, frutas e sementes. A azadiractina caracteriza-se pela solubilidade em água e a sensibilidade aos raios ultravioleta, bem como aos meios mais ácidos ou básicos, apresentando rápida biodegradação (Neves & Oliveira, 2006).

Os autores acima corroboram com a importância da observação dos efeitos subletais da exposição ao nim nos insetos como: repelência, impedimento da alimentação e postura, inibição do crescimento, perturbação do acasalamento e esterilização química, já que do ponto de vista de um manejo integrado do controle de pragas são mais desejáveis do que uma morte instantânea. O nim e seus derivados chegam a afetar mais de 400 espécies de insetos das mais diversas ordens além de alguns fungos.

A azadiractina utilizada como agrotóxico pode interferir no comportamento de alimentação de diferentes formas: possuem efeitos de repelência, apresentam ação antifagocitárias, evitando a possibilidade de insetos se alimentarem e, finalmente, podem alterar a capacidade de localização do alimento, pela redução da capacidade olfativa (Decourtye & Pham-Dèlegue, 2002; Haynes, 1988). Além da fagoinibição, produtos a base de nim também interferem no sistema hormonal dos insetos, especialmente na ecdise, além de promover a infertilidade (Schmutterer, 1990).

Alves (2010) ressaltou que o pólen e o néctar de nim parecem ser tóxicos para larvas e adultos de *A. mellifera*. Também verificou que colônias criadas em áreas com nim, durante o período de escassez de flores no campo, apresentaram aumentos significativos na taxa de mortalidade das larvas. Da mesma forma ao realizar a criação artificial de larvas de *A. mellifera* alimentadas com diferentes proporções do pólen de nim e de outras plantas comprovadamente não tóxicas, ele

observou 100% de mortalidade das larvas que receberam em sua dieta apenas o pólen de nim.

Também como Alves (2010), Melathoupolos *et al.* (2000a,b) sugerem que a ação tóxica do nim em *A. mellifera* ocorre mais pela ação sistêmica no pólen e néctar contaminados, quando são transferidos para a colmeia.

#### **4.9 PER – *Proboscis Extension Reflex***

O condicionamento olfatório clássico de resposta da extensão da probóscide das abelhas (PER) é um método bem desenvolvido e bastante utilizado para analisar diferentes aspectos da capacidade olfativa, da aprendizagem e da formação da memória nos insetos (Gil & Demarco, 2005).

A habilidade das abelhas para identificar e habituar-se aos odores baseada em sinais é denominada de resposta condicionada, a qual pode ser afetada pela exposição à agrotóxicos e isso pode ter grande impacto sobre as colônias ao acarretar a redução na capacidade de detecção dos odores florais e associação com a recompensa (néctar, pólen, óleos essenciais florais, etc.) (Freitas & Pinheiro, 2012).

Mamood & Waller (1990) verificaram este efeito em *A. mellifera* expostas a doses subletais de Permetrina, demonstrando que a dificuldade nas respostas olfativas deve-se mais a falhas na identificação que na memória olfativa, com recuperação das respostas de identificação após a diminuição do efeito residual do inseticida.

A formação da memória olfativa é um processo de múltiplos estágios que envolve diferentes áreas do cérebro dos insetos. O PER em abelhas provou ser um sistema muito poderoso para estudar a aprendizagem relacionada a mecanismos neurais, permitindo que os principais elementos neurais das vias olfativas e das respostas comportamentais no cérebro das abelhas pudessem ser identificados, bem como as várias vias moleculares envolvidas neste comportamento (Grünewald, 2003).

Como consequência, a aprendizagem associativa torna-se um componente essencial em abelha no comportamento de forrageamento (Menzel, 1985; Gould, 1993 citado Gil & Demarco, 2005).

O açúcar é um dos estímulos mais importantes para as abelhas por ser a principal fonte de carboidratos, o que resulta um bom forrageamento e

recrutamento, respostas comportamentais e ainda força o estímulo para a aprendizagem associativa (Scheiner *et al.*, 2004).

## 5 Material e Métodos

### 5.1 Local de condução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Ecotoxicologia e no Apiário Central do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG (20°45'14''S e 42°52'53''W).

### 5.2 Coleta das amostras

As colônias de abelhas *A. mellifera* africanizada foram mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizadas cinco colônias, das quais foram coletadas as abelhas operárias para o experimento de taxa de sobrevivência, teste de caminhamento, PER e para o experimento de ativação das glândulas hipofaríngeas.

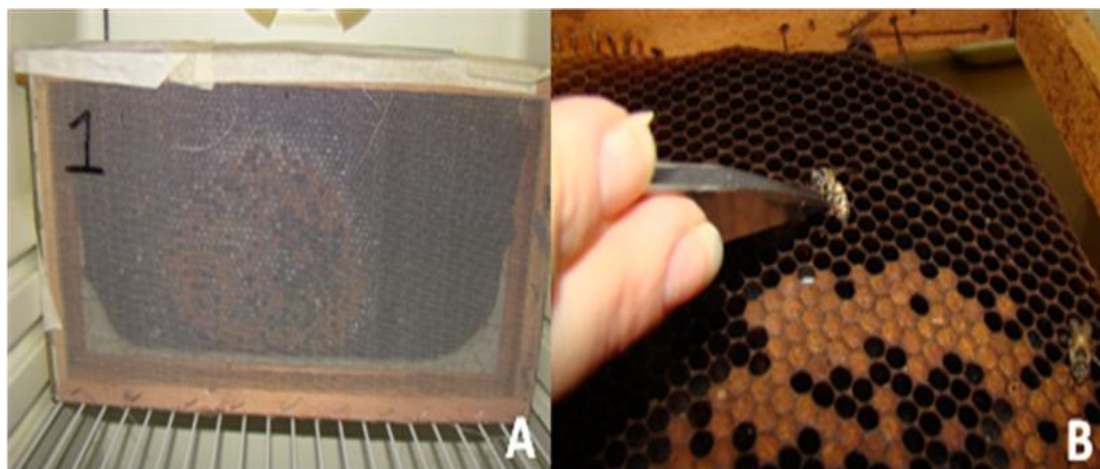
As abelhas foram obtidas diretamente da entrada das colônias, a qual foi vedada com espuma e com auxílio de uma mangueira plástica as operárias foram coletadas em potes plásticos (Fig. 1).



**Fig. 1** – Coleta das abelhas *A. mellifera* africanizadas. A) Fechamento da colônia para a coleta. B) Pote com mangueira para auxílio na coleta.

Para o teste de ativação das glândulas hipofaríngeas em abelhas operárias recém-emergidas, três favos de cria contendo imagos foram coletados de três colônias experimentais e deixados em estufa B.O.D. a  $34 \pm 2$  °C na tarde do dia

anterior a obtenção das operárias. Cada abelha foi coletada com auxílio de pinça entomológica e colocada em potes plásticos perfurados, os quais receberam as diferentes concentrações de Azamax<sup>®</sup> (Fig. 2).



**Fig. 2** – Coleta das abelhas *A. mellifera* africanizadas recém-emergidas. A) Favo de cria em estufa B.O.D. à  $34 \pm 2$  °C. B) Coleta com auxílio de pinça entomológica.

### 5.3 Taxa de Sobrevivência

A partir da dose comercial indicada pelo fabricante no rótulo do produto Azamax<sup>®</sup> para a cultura do tomate (30 mg i.a./L), cujo princípio ativo é Azadiractina A/B (AGROFIT, 2012), foram selecionadas as concentrações do ingrediente ativo a serem testadas. As doses foram selecionadas para representar o cenário real (dose de campo) e situações extremas (1/10 e 10x a dose de campo).

Operárias de *A. mellifera* africanizada coletadas nas saídas das suas respectivas colônias foram expostas a dietas a base de mel de *A. mellifera* africanizada diluído em água destilada (1:1, v/v), as quais receberam concentrações conhecidas de Azamax<sup>®</sup> nos seguintes tratamentos: A) Sem Azamax<sup>®</sup> – Controle; B) 1/10 de concentração de campo – 3 mg i.a./L; C) Concentração de campo – 30 mg i.a./L e D) 10x a concentração de campo – 300 mg i.a./L.

Estes foram mantidos em potes de plástico de 500 ml (11 cm de diâmetro e 8 cm de altura), perfurados na parte inferior para ventilação. As tampas foram cobertas com papel filtro e utilizou-se *eppendorfs* de 1,5 ml perfurados na extremidade como alimentadores, os quais foram instalados na lateral de cada pote.

Todos os tratamentos receberam a dieta e a água *ad libitum*, as quais foram diariamente trocadas durante o período do experimento. Estes conjuntos foram mantidos em estufa B.O.D. a  $34 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 24 horas escuro e umidade relativa entre 70-80%.



Coletou-se as abelhas operárias de três colônias diferentes para cada tratamento. A cada hora foi registrado a quantidade de abelhas mortas por pote. Foram consideradas mortas as abelhas que não apresentaram nenhum tipo de movimento no período observado.

#### **5.4 Exposição em longo prazo**

A partir das mesmas doses utilizadas no experimento anterior, 30 operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada foram coletadas diretamente dos favos de crias de três colônias e acondicionadas nas mesmas condições experimentais anteriores. Estas foram submetidas aos tratamentos A, B, C e D, os quais também foram oferecidos água e pólen retirados dos favos da própria colônia *ad libitum*. As dietas foram trocadas diariamente e verificado o consumo diário.

As operárias foram alimentadas por um período entre 1 a 14 dias nessas dietas. Posteriormente foram retiradas e fixadas em solução fixadora Dietrich (30 ml de Álcool, 10ml de Formol 40%, 2ml de Ácido Acético e 58ml de água destilada) para análise da morfologia das glândulas hipofaríngeas (item 5.5).

#### **5.5 Morfologia das glândulas hipofaríngeas de operárias de *Apis mellifera* africanizada**

As abelhas recém-emergidas utilizadas no experimento de exposição de longo prazo foram mantidas por 48 horas em solução fixadora Dietrich e posteriormente acondicionada em solução de álcool 70%. As abelhas foram dissecadas para a extração das glândulas hipofaríngeas com auxílio de estereomicroscópio (Zeiss Stemi 2000-C), as quais tiveram suas imagens capturadas em microscópio ótico (Zeiss Axio Imager A1) com câmera acoplada. Posteriormente as áreas de 10 ácidos por abelha foram medidas com auxílio do *software* Image-Pro Plus<sup>®</sup>.

#### **5.6 Teste de caminamento**

Para avaliar o efeito do inseticida em abelhas *A. mellifera* recém-emergidas foi conduzido um ensaio comportamental de caminamento, no qual utilizou-se o aparelho de *Videotrack* (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal – Canadá), composto por um sistema de rastreamento formado por uma câmera de

vídeo acoplada a um computador para avaliação por um período de 10 minutos (Fig. 3).

Foram realizados quatro repetições para cada tratamento, todas em arenas confeccionadas por placas de Petri com nove centímetros de diâmetro e dois centímetros de altura, forradas ao fundo com discos de papel-filtro não exposto a nenhuma substância e as bordas revestidas com talco para evitar o escape dos insetos (Corrêa, 2009). Em cada placa de Petri foi colocada uma abelha.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo de exposição ao inseticida após 24, 48 h e 7 dias, distância caminhada, velocidade média de caminhamento, tempo parado e número de paradas.

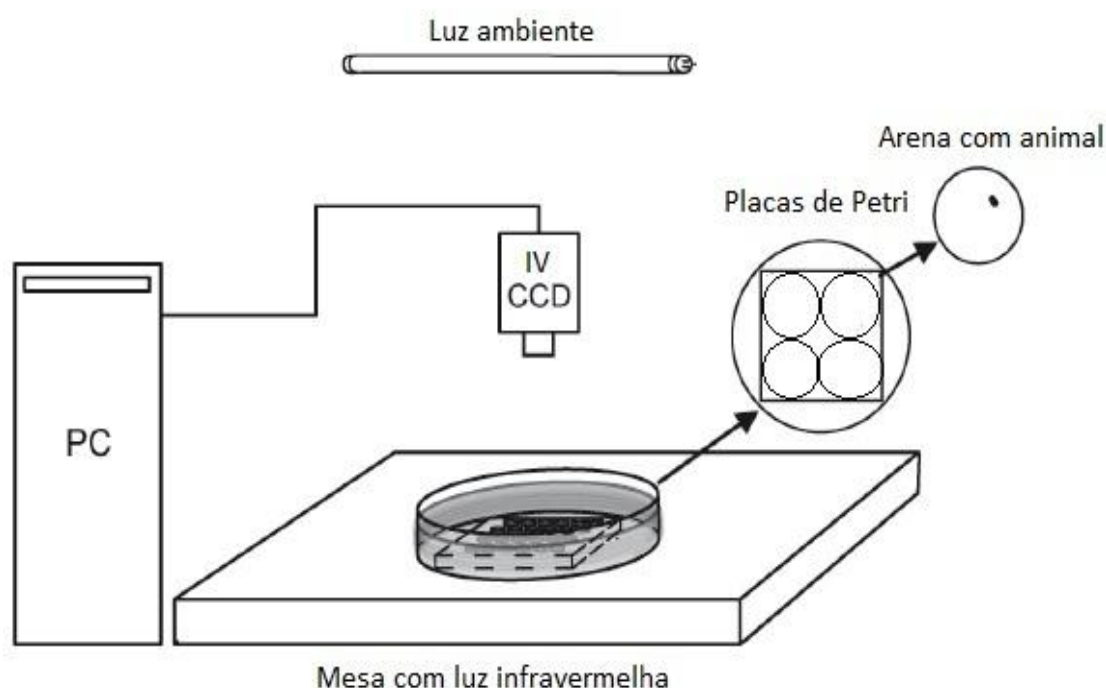


Fig. 3 – Aparelho de *Videotrack* utilizado no experimento de caminhamento.

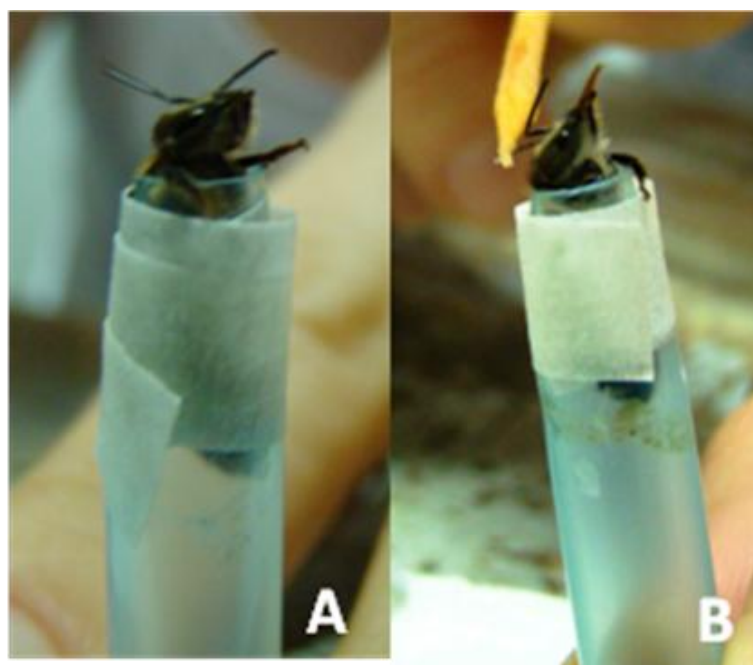
### 5.7 PER - Proboscis Extention Reflex

Abelhas operárias forrageiras de *A. mellifera* africanizada foram coletadas diretamente de três colônias (Fig. 1) e acondicionadas nos mesmos tipos de potes e condições do experimento anteriores (item 6.3). Foram coletadas 30 abelhas para cada um dos quatro tratamentos (A, B, C e D), as quais foram expostas ao agrotóxico Azamax<sup>®</sup> durante 24 e 48 horas.

Os limiares de resposta gustativa dos indivíduos foram verificados a partir de diferentes doses de solução de sacarose tocadas nas antenas das abelhas,

tempo suficiente para que elas identificassem ou não a solução e estendessem a probóscide. Foram utilizadas soluções de sacarose nas seguintes concentrações: a 0% (controle), 0,1%, 0,3%, 1%, 3%, 10%, 30% e 50%, sendo avaliadas 10 abelhas expostas a cada tratamento, totalizando 50 abelhas por tratamento.

Para as avaliações, as abelhas foram contidas em frascos de vidro do tipo *erlenmeyer* e anestesiadas em gelo por 10 minutos até a imobilização para permitir a preparação do teste. Cada abelha foi presa individualmente em um pequeno tubo de plástico (ponteira de micropipeta) com uso de fita adesiva, de modo que ela fosse capaz de movimentar livremente a cabeça e a probóscide (Fig. 4) (Aliouane *et al.*, 2009).



**Fig. 4** – PER – A) Abelha preparada para o teste. B) Extensão da probóscide ao receber o estímulo na antena.

### **5.8 Análises Estatísticas**

Os resultados do teste de tempo de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência usando o procedimento não paramétrico geradas pelo estimador Kaplan-Meier, que permitiu a estimativa de curvas de sobrevivência do início até o fim do tempo experimental. Além disso, os tempos médios de sobrevivência ( $TL_{50}$ ) de cada tratamento foram analisados por regressão linear utilizando pacote estatístico SigmaPlot<sup>®</sup> 12.0 (SigmaStat<sup>®</sup>).

Os resultados dos testes de caminhamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA), análise de variância multivariada (one-way MANOVA) (PROC GLM com MANOVA Statement; SAS<sup>®</sup> Institute, 2000) e (teste F ( $\alpha=5\%$ )).

A porcentagem de resposta do PER foi analisada utilizando-se o teste Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance on Ranks e teste *posthoc* de médias Dunn. As análises foram realizadas através do pacote estatístico SigmaPlot<sup>®</sup> 12.0 (SigmaStat).

Os resultados do efeito causado pelo produto Azamax<sup>®</sup> nas glândulas hipofaríngeas das operárias jovens, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tuley ( $p < 0,05$ ) (PROC GLM; SAS<sup>®</sup> Institute, 2000).

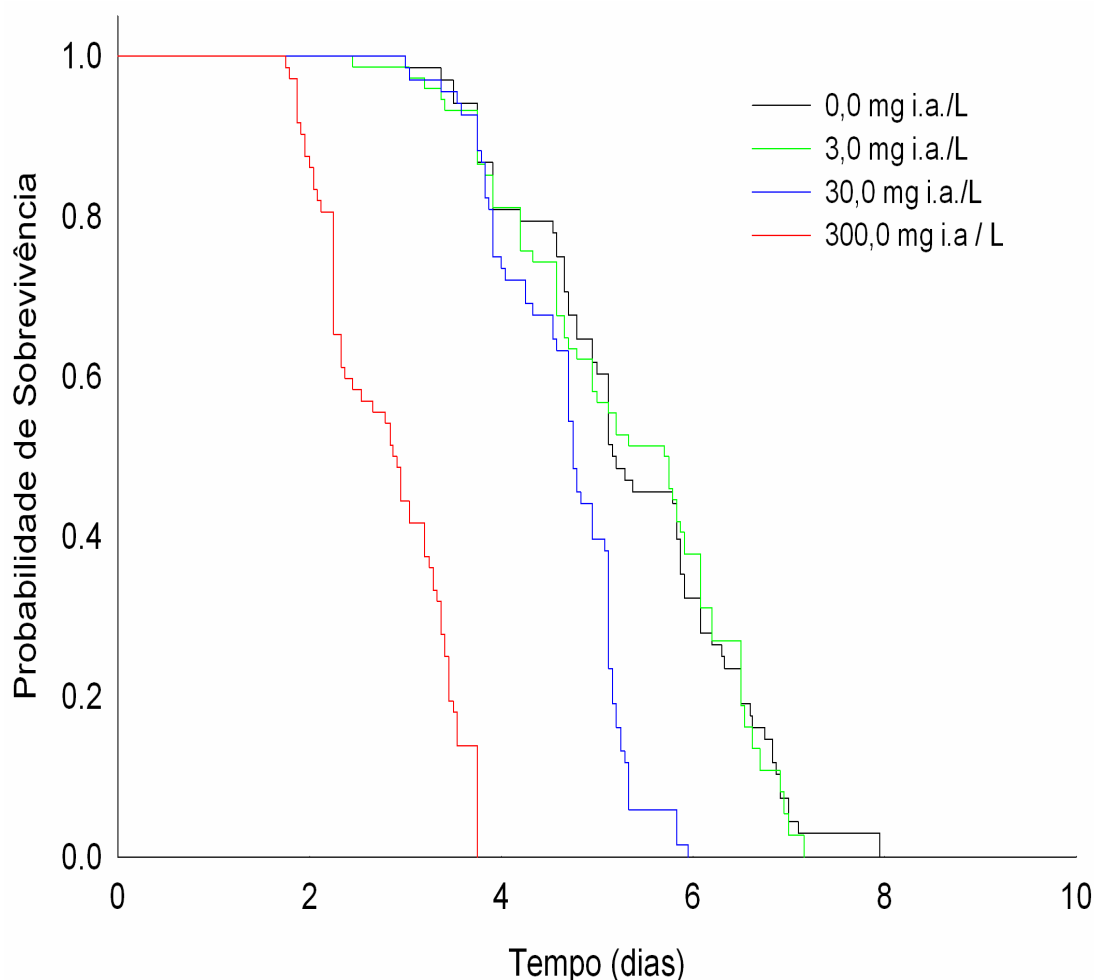
## **6 Resultados**

### **6.1 Taxa de Sobrevivência**

A análise de sobrevivência para abelhas operárias forrageiras de *A. mellifera* africanizada expostas ao inseticida Azamax<sup>®</sup> mostrou diferença significativa entre os tratamentos (Log-rank test,  $\chi^2 = 356,388$ ; g.l. = 3;  $p < 0,001$ ).

Os tratamentos controle e com 3,0 mg de i.a/L não apresentaram diferenças significativa entre si, o que não ocorreu para os demais tratamentos (Fig. 5; Tabela 1).

As doses maiores de Azamax<sup>®</sup> afetaram significativamente a sobrevivência para abelhas operárias forrageiras de *A. mellifera* africanizada (Log-rank test,  $\chi^2 = 356,388$ ; g.l. = 3;  $p < 0,001$ ).



**Fig. 5** – Taxa de Sobrevivência estimada por Kaplan-Meier de forrageiras de *A. mellifera* africanizada alimentadas com dietas com diferentes concentrações de Azamax<sup>®</sup>.

Tratamento	Tempos Letais (TL <sub>50</sub> )		
	TL <sub>50</sub> (dias)	Intervalo de Confiança (95%)	
		Inferior	Superior
Controle	5,2	4,62	5,78
1/10 dose de campo	5,7	5,00	6,40
Dose de Campo	4,7	4,5	5,0
10x dose de campo	3,0	2,6	3,2

**Tabela 1** – Tempos letais das abelhas operárias forrageiras *A. mellifera* Africanizas submetidas a diferentes concentração de Azamax<sup>®</sup>.

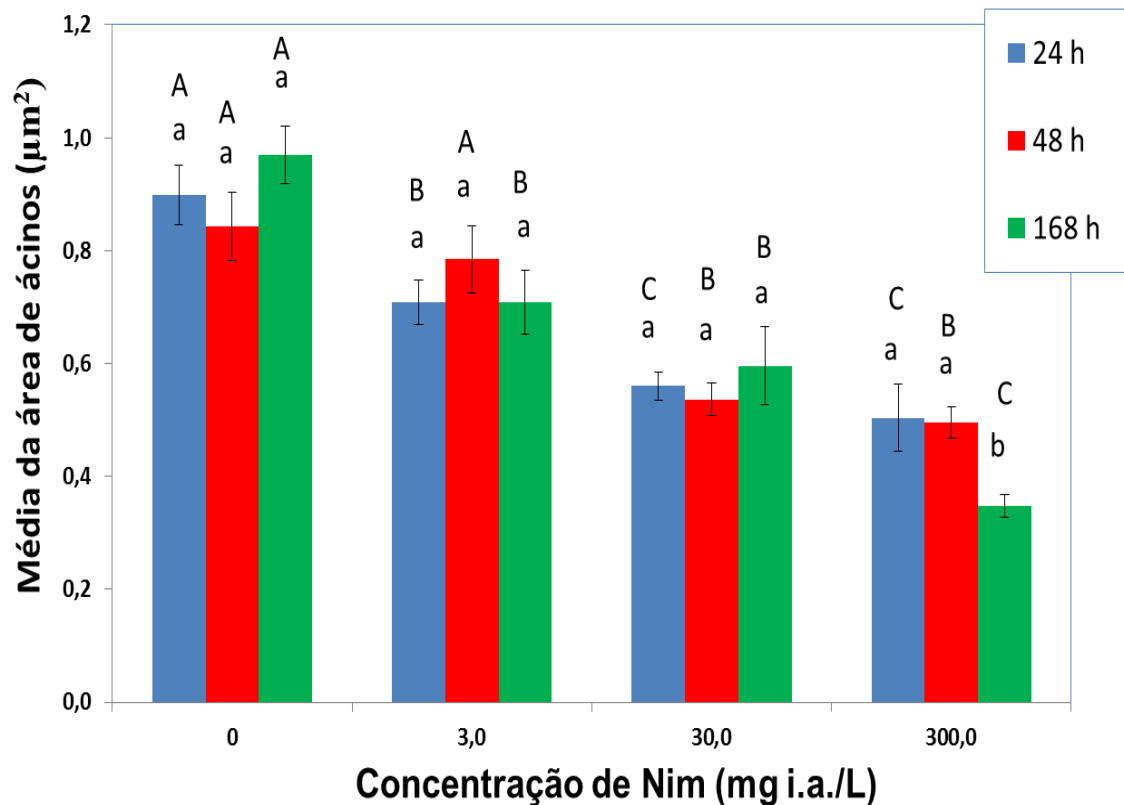
## 6.2 Morfologia das Glândulas Hipofaringeanas

Segundo a análise de variância houve diferenças estatisticamente significativas nas áreas dos ácinos das glândulas hipofaringeanas das operárias quando submetidas às diferentes concentrações e nos diferentes tempos de exposição ao inseticida Azamax<sup>®</sup> (Fig. 6; Tabela 2). A medida que a concentração do produto aumentou da dieta, a área dos ácinos das glândulas foi menor, quando comparado ao tratamento controle (Fig. 7).

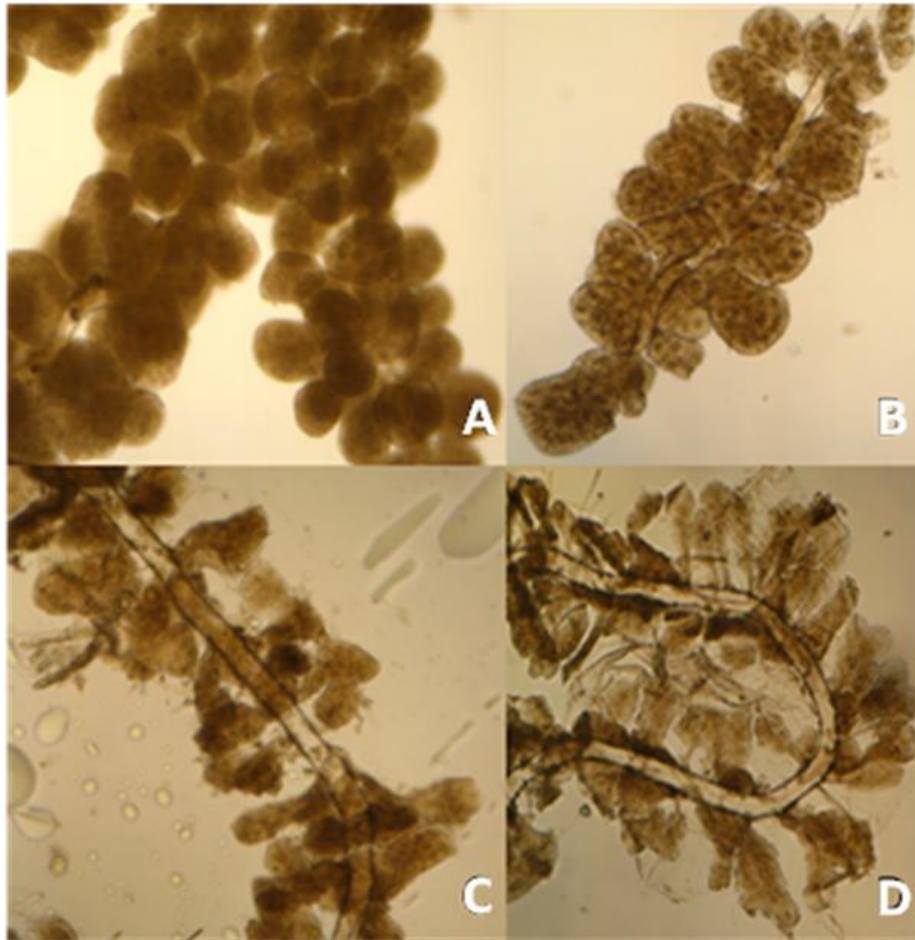
Efeito	Graus de Liberdade	F Value	Pr > F
Concentração	3	304,17	<0,0001
Tempo	2	16,96	<0,0001
Dose x Tempo	6	9,2	<0,0001

**Tabela 2** – Análise de variância das áreas dos ácidos das glândulas hipofaríngeas de *A. mellifera* africanizadas.

Pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey entre médias houve diferenças significativas : Concentração ( $p < 0,0001$ ); Tempo ( $p > 0,0001$ ); Dose x Tempo ( $p < 0,0001$ ).



**Fig. 6** – Área média dos ácidos de glândulas hipofaríngeas de operárias de *A. mellifera* submetidas aos diferentes tratamentos. Letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro do tratamento; letras maiúsculas iguais não diferem entre si entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**Fig. 7** – Ácinos de *A. mellifera* africanizadas expostas a diferentes concentrações do inseticida Azamax<sup>®</sup>. A) Controle – Sem Azamax<sup>®</sup>; B) 1/10 de concentração de campo (3 mg i.a./L); C) Concentração de campo (30 mg i.a./L) e D) 10x a concentração de campo (300 mg i.a./L). Aumento de 100x.

### 6.3 Caminhamento

As características comportamentais avaliadas nas operárias dos tratamentos para as arenas apresentaram diferenças significativas (ANOVA e teste F,  $\alpha=5\%$ ) para idade das operárias em relação à distância percorrida ( $F=3,58$ ,  $p<0,0001$ ), velocidade média ( $F=3,58$ ,  $p<=0,0001$ ), tempo ( $F=1,40$ ,  $p<0,1723$ ) e número de paradas ( $F=1,64$ ,  $p<0,0885$ ). Quando submetidas à análise de variância multivariada one-way MANOVA e PROC GLM com MANOVA Statement diferiram significativamente para idade das operárias (dfnum/den = 4/249; Roy's Greatest Root = 0,104996;  $F=6,54$ ;  $p < 0,0001$ ), e não significativo para tratamento ( $F=3,95$ ,  $p = 0,0040$ ) e para a interação idade x tratamento ( $F=2,31$ ,  $p = 0,0343$ ).

Os resultados referentes ao tempo médio em movimento foi 726,96 s, enquanto a velocidade média de caminhamento foi de 1,88 cm/s, a distância média percorrida foi de 679199,67 cm e o número médio de paradas na arena foi de

16709,07 s. A análise de correlação mostrou uma correlação positiva entre distância percorrida com a velocidade média de caminhada ( $r=0,999$ ,  $p<0,0001$ ), número de parada e o tempo ( $r=0,939$ ,  $p<0,0001$ ), no entanto apresentou correlação negativa entre o tempo e distância ( $r=-0,4914$ ,  $p<0,0001$ ), entre o tempo e a velocidade ( $r=-0,4913$ ,  $p<0,0001$ ), distância e número de paradas ( $r=-0,06139$ ,  $p<0,0001$ ), número de parada e velocidade ( $r=-0,06137$ ,  $p<0,0001$ ) na arena. Assim, apenas distância percorrida foi considerada nas análises subsequentes, cuja tendência e diferenças são representativas dos demais parâmetros avaliados nestes bioensaios.

#### 6.4 PER – *Proboscis Extension Reflex*

Abelhas recém-nascidas até a idade de 24 e 48h não responderam a soluções de sacarose com concentrações inferiores a 1%. Verificou-se a melhora na resposta a concentrações de sacarose maiores que 3% (Fig. 8; Fig. 9).

A porcentagem de resposta ao PER por tratamento foi baixa, não apresentando diferença estatística pelo teste Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks e teste *postroc* de médias Dunn ( $H = 6,925$  com 7 graus de liberdade,  $P = 0,437$ ).

Não houve diferenças estatísticas na resposta com a extensão da probóscide para diferentes concentrações de sacarose entre as abelhas experimentais submetidas aos tratamentos controle e com Azamax<sup>®</sup>.

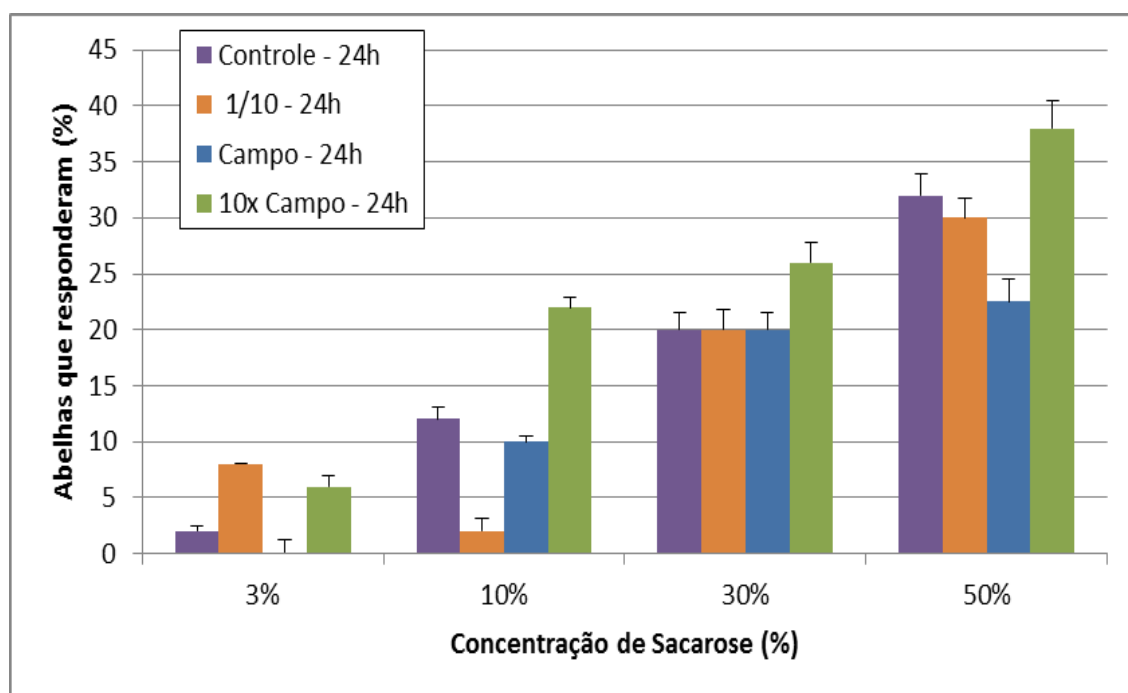
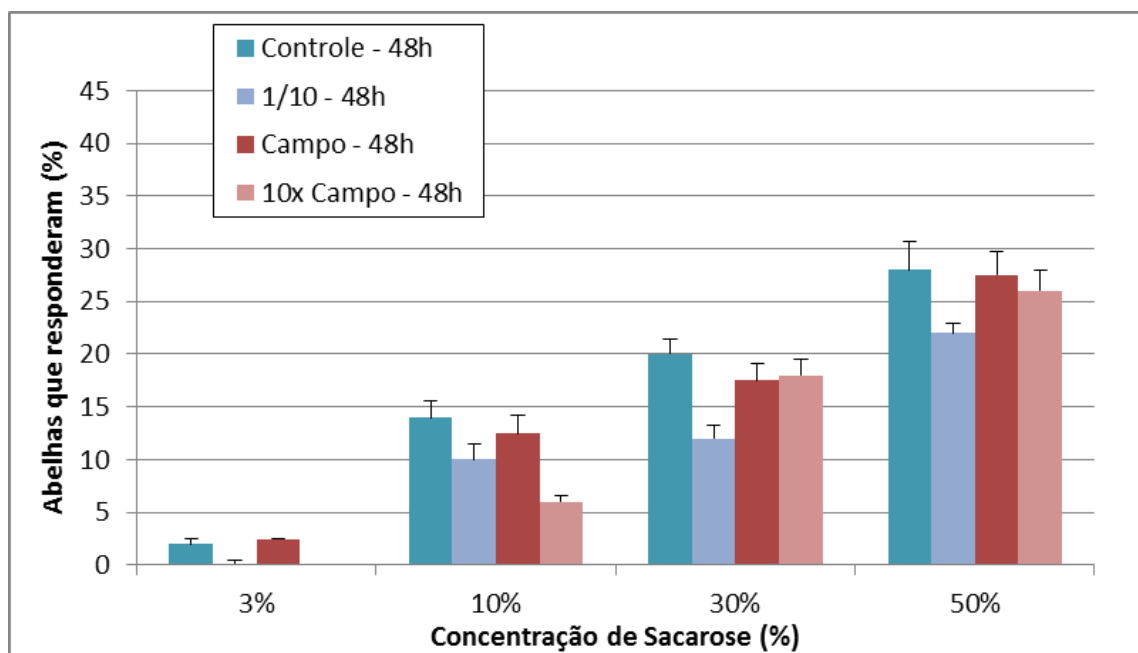


Fig. 8 – PER das abelhas expostas ao diferentes tratamentos de Azamax<sup>®</sup> em 24 horas. Barras representam a porcentagem de resposta e desvio padrão.





**Fig. 9** – PER das abelhas expostas aos diferentes tratamentos de Azamax<sup>®</sup> em 48 horas. Barras representam a porcentagem de resposta e desvio padrão.

## 7 Discussão

Apesar de a Legislação Brasileira ser completa, rígida e baseada nos protocolos atuais usados mundialmente, é importante lembrar que adequações visando o cenário brasileiro em relação aos organismos não alvos usados nos protocolos, como por exemplo, as abelhas, são importantes para melhor avaliar o uso de agrotóxicos na agricultura do país.

A falta de representatividade dos efeitos dos agrotóxicos em outros polinizadores, além da *Apis mellifera*, pode ser considerada como um dos aspectos negativos da aplicação dos protocolos internacionais no Brasil.

De outro modo, alternativas como a introdução da avaliação de efeitos de doses subletais que afetam a mortalidade e a morfologia das glândulas hipofaríngeas de abelhas eussociais foram indicadas no presente trabalho.

Além disso, os protocolos atualmente utilizados para polinizadores utilizam somente indivíduos adultos, uma única espécie, apenas parâmetros de doses agudas e muitas vezes são exclusivamente realizados em laboratórios. Desse modo não refletem a real situação de campo e, por conseguinte, a condição de vida dos insetos sociais como as abelhas, em que alterações em alguma fase da vida ou comportamento podem trazer graves consequências para a colônia.

Thompson (2003) salienta a importância dos testes realizados em laboratório capazes de fornecer uma base para a avaliação do desempenho dos agrotóxicos com quociente de risco  $> 50$  em condições de campo e semicampo, isto é, condições controladas em ambientes fechados que mais se aproxima de condições de campo (Raak-van den Berg *et al.*, 2012). Assim um grande número desses produtos, mesmo sendo utilizados em baixos níveis de aplicação ou concentração, acabam resultando em efeitos letais ou subletais comportamentais em campo. Raak-van den Berg *et al.* (2012) ainda enfatizam que as normas EPA e EPPO são importantes protocolos para fornecer suporte dentro dos quais os dados podem ser coletados e analisados.

Conforme mostrado no presente trabalho, a sobrevivência de forrageiras de *A. mellifera* africanizada foi afetada pela ingestão de dietas contendo diferentes concentrações do produto Azamax<sup>®</sup>. As abelhas que ingeriram a dieta com concentrações maiores, 300 mg i.a/L (10x a dose de campo indicada pelo fabricante) morreram mais rápido em relação ao controle. E mesmo as abelhas que ingeriram a dieta com a concentração indicada pelo fabricante, morreram mais cedo, o que nos leva a crer que a capacidade das abelhas forrageiras alcançarem a colmeia com o alimento contaminado é muito grande, expondo os indivíduos que estão dentro da colônia, supostamente protegidos dessas contaminações, o que corrobora com a afirmação de Jay (1986), de que a contaminação de abelhas por agrotóxicos geralmente ocorre quando a abelha coleta pólen e néctar, podendo atingir uma colônia em diferentes extensões.

Ao analisar as áreas das glândulas hipofaringeanas em abelhas jovens com sete dias de idade, verifica-se que as mesmas foram altamente afetadas pelas concentrações do produto na dose de campo e 10x essa dose, o qual interferiu na ativação dos ácidos, que por sua vez impediria esses indivíduos de executar a função de nutrir as larvas e a rainha dentro da colônia. O Azamax<sup>®</sup> por ser um composto fagoinibitório em razão do efeito repelente da Azadiractina em *A. mellifera* via dieta, já descrito por Neumam *et al.* (1994), impediu que as abelhas se alimentassem de forma apropriada para que as glândulas hipofaringeanas se ativassem.

O efeito de dietas proteicas sobre a área dos ácidos das glândulas hipofaringeanas estão diretamente relacionados (Al-Ghamdi *et al.* 2010, Pinto *et al.*, 2012).

Shenk *et al.*, (2001) atestaram que a aplicações em campo do nim resultaram em reduzida emergência de adultos, maior mortalidade e má formação nas asas de abelhas recém-emergidas. Melathoupolos *et al* (2000a) mostraram que aplicações de azadiractina em intervalos de seis dias em campo, apresentou uma área de cria severamente reduzida e grande mortalidade de rainhas nas colônias.

Dessa forma, mesmo produtos considerados de origem vegetal (naturais ou botânicos), com um grande apelo orgânico aos produtores, deveriam ser reavaliados não somente considerando um parâmetro como uma dose letal aguda para abelhas, mas também exposições a médio/longo prazo, que podem apresentar resultados tão ou mais importantes quanto à letalidade.

Segundo o IBAMA (2012), recentemente quatro ingredientes ativos: Imidacloprido, Tiametoxam, Clotianidina e Fipronil associados a efeitos nocivos às abelhas serão reavaliados, tendo ainda como medida preventiva a proibição provisória de aplicação por aviões em qualquer tipo de cultura.

Estudos recentes indicaram que o uso destas substâncias é prejudicial para insetos polinizadores, em especial para as abelhas, podendo causar a morte ou alterações na fisiologia e o comportamento destes insetos. Tomé *et al.* (2012) ao estudarem abelhas da espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* (abelhas sem ferrão) expostas ao inseticida imidacloprido durante a fase larval, mostraram que as abelhas apresentaram problemas tanto na sobrevivência quanto ao se usarem doses subletais do inseticida. Os mesmos autores verificaram ainda que as abelhas que sobreviveram até a fase adulta apresentaram alterações neuromorfológicas e/ou comportamentais. O uso de inseticidas que contem esses ingredientes ativos por meio de aplicação aérea tem sido associado à morte de abelhas em diferentes regiões do país, o que motivou a proibição.

No presente trabalho, testando-se o Azamax<sup>®</sup>, um produto de origem vegetal e considerado de baixa toxicidade, as análises de caminhamento e extensão de probóscide, não apresentaram efeitos significativos para *A. mellifera* africanizada, uma vez que o seu modo de ação está associado à ação fagoinibitória e alteração da muda em fase larval. Entretanto, as análises de mortalidade e morfologia das glândulas hipofaríngeas demonstraram que tal produto, em doses subletais pode afetar significativamente esses parâmetros.

Dessa forma, é importante observar que mesmo produtos considerados de baixa toxicidade podem exercer algum efeito adverso em *A. mellifera*

africanizada. A utilização de protocolos que apresentem novas alternativas de avaliação toxicológica, como doses subletais, comportamento, morfologia e fisiologia, os quais podem ser úteis para a prevenção de futuros acidentes ambientais envolvendo a contaminação de polinizadores e organismos não-alvo.

Abelhas com sete dias de idade estão aptas a serem nutridoras, alimentando as larvas em desenvolvimento dentro da colmeia com geleia real. Em outra parte da vida as abelhas se tornam forrageiras, passam a sair com mais frequência das colmeias e apresentam uma taxa de mortalidade maior, as quais precisam ser repostas por outras operárias saudáveis que receberam a geleia real durante o desenvolvimento, provida por abelhas nutridoras. Portanto, qualquer perturbação que altere essa divisão de trabalho em uma colmeia pode acarretar drásticos efeitos em relação à sobrevivência de uma colônia (Freitas & Pinheiro, 2010).

O próximo passo na adequação da Legislação Brasileira frente aos pleitos de registro de produtos agrotóxicos no Brasil deverá ser a ampliação do cenário da Avaliação do Perigo para a Avaliação do Risco ambiental desses produtos. A aplicação de protocolos de estudo com o uso de doses subletais nos organismos testados irá corroborar para uma visão ampliada de exposição de abelhas aos agrotóxicos em resíduos de pólen, néctar e outras possíveis rotas. A verificação da interferência dos agrotóxicos no comportamento, fisiologia e morfologia das abelhas adultas e crias em desenvolvimento, tanto no nível individual quanto colônial, mensurando os efeitos e os riscos desses produtos em insetos não alvos, especialmente em abelhas *Apis mellifera* africanizada e abelhas nativas (não-*Apis*) no meio ambiente.

## 8 Conclusão

- Estudos de efeitos de diversos tipos (classes) de agrotóxicos no comportamento, morfologia e fisiologia para insetos sociais e outros polinizadores, são de extrema importância para a manutenção desses insetos no meio ambiente.
- Medidas para a redução de efeitos danosos às abelhas, como a localização dos apiários, programas educacionais, cuidados com o fluxo de alimentos contaminados dentro das colônias, tratamento das colônias intoxicadas, remoção de plantas daninhas em florescimento, orientação quanto ao uso correto dos agrotóxicos,

principalmente em proximidades de colônias de abelhas, entre outros, devem ser amplamente divulgados.

- Necessidade de ampliação da avaliação/reavaliação de produtos agrotóxicos para um patamar além da avaliação do perigo para a avaliação do risco, englobando maiores números de parâmetros que representam melhor o cenário ambiental a ser estudado.

- Incentivo à criação de abelhas da espécie *Apis mellifera* africanizadas, para a apicultura, hoje considerada uma importante atividade agropecuária no Brasil, com a produção de mel, pólen, cera, própolis e geleia real; bem como à criação de abelhas das tribos Meliponini (conhecidas como abelhas sem ferrão).

- Os protocolos internacionais atualmente utilizados para avaliação de agrotóxicos para o parâmetro abelha necessitam ser revisados e complementados para se atingir uma maior abrangência quanto às espécies utilizadas, diferentes tipos de avaliação de parâmetros comportamentais e morfofisiológicos, os quais são de extrema importância para colônias de abelhas.

- Os protocolos devem avaliar não só os efeitos de doses letais, mas também os efeitos de doses subletais nesses polinizadores.

## 9 Referências Bibliográficas

AL-GHAMDI, A.A.; AL-KHAIBARI, A.M.; OMAR, M.O. Consumption rate of some proteinic diets affecting hypopharyngeal glands development in honeybee workers. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18. 73-77. 2011.

AGROFIT – Sistema de Informação sobre Agrotóxicos. <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em 22/01/2012.

ALVES, J.E. Toxicidade do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.: Meliaceae) para *Apis mellifera* e sua importância apícola na caatinga e mata litorânea cearense. Tese de Doutorado. Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Doutorado Integrado UFC-UFPB-UFRPE. Universidade Federal do Ceará. 129 p. 2010.

AMENT, S.A.; WANG, Y.; ROBINSON, G.E. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *WIREs Systems Biology and Medicine*. v.2. 566-576. 2010.

BORTOLOTTI, L.; MONTANARI, R.; MARCELINO, J.; MEDRZYCHI, P.; MAINI, S.; PORRINI, C. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of the honey bees. *Bulletin of Insectology*, 56: 63-67, 2003.

BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, Senado, 1998.

BRASIL. Lei 7802, de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. *Diário Oficial da União*, 12 de julho de 1989.

BRASIL. Ibama. Portaria Normativa nº 84. Estabelece os procedimentos e exigências para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental de agrotóxicos, seus componentes e afins, 15 de outubro de 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretriz nº 1. Diretriz e exigências referentes à autorização de registro, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins, 09 de dezembro de 1991.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278–294, 2010.

BUCHMANN, S.L.; NABHAN, G.P. *The Forgotten Pollinators*. Covelho, CA and Washington, D.C.: Island Press, 292 p. 1996.

BURLEW, D. A. The Effects of Pesticide-Contaminated Pollen on Larval Development of the Honey Bee, *Apis mellifera*. (Master of Environmental Study Degree). Evergreen State College, 130 p. 2010.

CARSON, R. *Primavera Silenciosa*. Gaia Editora. Primeira Edição. 1962.

CORRÊA, A.S. Resistência fisiológica e comportamental de populações de *Sitophilus zeamais* à permetrina, esfenvalerato e esfenvalerato + fenitrotiona. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Viçosa - MG. 54 p. 2009.

CRISTINO, A.S. Aspectos reprodutivos envolvidos no processo de africanização das abelhas *Apis mellifera* no Brasil.. Dissertação (Mestrado em Medicina). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto - SP. 99 p. 2003.

CRUZ-LANDIM, C. *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo: Ed UNESP, 416 p. 2009.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R.L.M. Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa. Editora e Tipografia Costa. Rio Claro, SP, 48p. 2000.

DA SILVA, N.R. Aspectos do perfil e do conhecimento de apicultores sobre manejo e sanidade da abelha africanizada em regiões de apicultura de Santa

Catarina. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC. 115 p. 2004.

DE JONG, D. Desaparecimento de abelhas; pesticidas agrícolas afetam insetos, safras e saúde humana. *Scientific American Brasil*, v. 84, 48-49. 2009.

DEL SARTO, M.C.L. Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Tese (Doutorado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Viçosa - MG. 63 p. 2009.

DESNEUX, N.D.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52: 81–106, 2007.

EPA (Draft 1996). Honey bee acute contact toxicity. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.3020. USEPA. 1996

EPAMIG – EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. CIOCIOLA JÚNIOR, A.I. Nim: alternativa no controle de pragas e doenças. *Boletim Técnico*, 67. 24 p. 2002.

EPPO. Guideline on test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, v. 22, 203-216. 1992.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2004. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. Pp. 19-25. *In*: B.M. Freitas & J.O.B. Portela (eds.). Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 285p.



FELTON, J.C.; OOMEN, P.A.; STEVENSON, J.H. Toxicity and Hazard of pesticides to honeybees: Harmonization of test methods. *Bee World*, 67: 114–124, 1986.

FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics*, 10:645-657. 2009.

FREITAS, B.M. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Economic value of Brazilian cash crops and estimates of their pollination constrains. In: Food and Agriculture Organization (FAO) report 02, Agreement. Economic Value of pollination and pollinators. São Paulo: Food and Agriculture Organization (FAO)- Fundação da Universidade de São Paulo (FUSUP). PP. 1-4. 64 p. 2004.

FREITAS, B.M.; PINHEIRO, J.N. Polinizadores e pesticidas: princípios de manejo para os agroecossistemas brasileiros. Brasília: MMA. 112 p. 2012.

FREITAS, B.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. A importância econômica da polinização. *Mensagem Doce*, São Paulo, n.80, 44-46. 2005.

FREITAS, B.M.; PINHEIRO, J.N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis*, 14: 282-298. 2010.

GATEHOUSE, H.S.; GATEHOUSE, L.N.; MALONE, L.A. S.; HODGES, E.; TREGIDGA; TODD, J. Amylase activity in honey bee hypopharyngeal glands reduced by RNA interference. *Journal of Apicultural Research* 43: 9-13. 2004.

GIL, M.; De MARCO, R.J. Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. *The Journal of Experimental Biology* 208. 671-680. 2005.

GOULD, J.L. Ethological and comparative aspects of honey bee learning. *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives*. 19-50. 1993.

GONÇALVES, L.S. Africanização das abelhas nas Américas, impactos e perspectivas de aproveitamento do material genético. *Naturalia*, Edição Especial em Homenagem aos 70 anos do Dr. Warwick Estevam Kerr. 126–134. 1992.

GONÇALVES, L.S.; STORT, A.C. A africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. II. In: BARRAVIERA (Ed.). *Venenos Animais: Uma visão integrada*. Rio de Janeiro, RJ: EPUC, Editora de Publicações Científicas Ltda. 49–63. 1994.

GRÜNEWALD, B. Differential expression of voltage-sensitive K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in neurons of the honeybee olfactory pathway. *The Journal of Experimental Biology*. 206. 117-129. 2003.

GUEDES, R.N.C; LIMA, J.O.G.; SANTOS, J.P.; CRUZ, C.D. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*. v.31, issue 2, 145-150. 1995.

HALM, M.P.; RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; TASÉI, J.N.; RAULTS, S. New risk assessment approach for systemic insecticides: The case of the honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environmental Science Technology*, v. 40. 2448-2454. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Sinopse do Censo Demográfico 2010*. 261p. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). *Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins/DIQUA CGASQ* – Brasília: Ibama. 180 p. 2009.

JONHSON, B.R. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 64: 305-316. 2010.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473:478–483. 2011.

KERR, W.E; CARVALHO G.A.; NASCIMENTO, V.A. *Abelha urucu: biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte: Littera Maciel, 144 p. 1996.

KERR, W. E. The history of the introduction of African bees to Brazil. *South African Bee Journal*, v. 2, n. 39. 3–5. 1967.

LONDRES, F. *Agrotóxicos no Brasil um guia para ação em defesa da vida*. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 190 p. 2011.

LU, C.; WARCHOL, K.M.; CALLAHAN, R.A. In situ replication of honey bee colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology* 65 (1): 99-106. 2012.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E.C.M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v. 23, 303-309. 2006.

MALASPINA, O.; SOUZA, T.F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. In: *Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Apicultura e III de Meliponicultura*. Belo Horizonte, MG, Brasil. CD-Rom. 2008.

MALASPINA, O.; SOUZA, T.F; ZACARIN, E.C.M; CRUZ, A.S; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. 41-48. In: *Anais do VIII Encontro sobre Abelhas*. Ribeirão Preto, SP, Brasil. 763 p. 2008.

MAMOOD, A.N; WALLER, G.D. Recovery of learning responses by honeybees following sublethal exposure to permethrin. *Physiological Entomology*, v. 15. p. 55 – 60. 1990.

MELLO, M.H.S.H.; SILVA, E.A.; NATAL, D. *Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas* Africanized bees in a

metropolitan area of Brazil: shelters and climatic influences. *Revista de Saúde Pública*; 37 (2): 237-41. 2003.

MENZEL, R. Learning in honeybees in an ecological and behavioral context. *Experimental Behavioral Ecology*. 55-74. 1985.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA) - Secretaria de Biodiversidade e Florestas. *Bibliografia Brasileira de Polinização e Polinizadores*. Brasília – DF. 250 p, 2006.

MORAES, S.S.; BAUTISTA, A.R.L.; VIANA, B.F. Avaliação da toxicidade aguda (DL50 e CL50) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) Hymenoptera: (Apidae): via de contato. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29: 31-37. 2000.

MORAGAS, W.M; SCHNEIDER, M.O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. *Caminhos de Geografia* 3(10) 26-40. 2003.

NEVES, B.P.; OLIVEIRA, I.P. Cultivo e utilização do nim indiano (*Azadirachta indica*) no contexto de uma agricultura auto sustentável. *Anais do III Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais (III COBRADAN)*. Belém – PA. 120-129. 2006.

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

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

OEPP/EPPO. Revised draft of EPPO Guidelines PP 1/170(3): Guidelines for efficacy evaluation of plant protection products: side-effects on honeybees, 2000-09.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS – ONU Brasil. A ONU e a população mundial. <<http://www.onu.org.br/a-onu-em-acao/a-onu-em-acao/a-onu-e-a-populacao-mundial/>>. Acesso em 10/05/2012.

PAREJA, L.; COLAZZO, M.; PÉREZ-PARADA, A.; NIELL,S.; CARRASCO-LETELIER, L.; BESIL, N.; CESIO, M. V.; HEIZEN, H. Detection of Pesticides in Active and Depopulated Beehives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8 3844-3858. 2011.

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

PERNAL, S.F.; CURRIE, R.W. Pollen quality of fresh an 1-year-old single pollen diets for workers honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31. 387-409. 2000.

PHAM-DELÈGUE, M.; DECOURTYE, A.; KAISER, L.; DEVILLERS, J. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, 33 425 – 432. 2002.

PINHEIRO, J.N.; FREITAS, B.M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis*, v. 14, 266-281. 2010.

PINTO, M.R.; MIGUEL, W. Intoxicação de *Apis mellifera* por organofosforado na região do Vale do Itajaí – SC. In: Anais do Conbravet 2008. <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1080-2.pdf>>. Acesso em 15/05/2012.

PINTO, F.A.; De FERNANDES, R.O.; PODEROSO, J.C.M.; SANTANA, W.C.; MESSAGE, D. Nutritional and temporal effects on hypopharyngeal glands of africanized honeybees (Hymenoptera – Apidae). *Sociobiology*. 59, 2. 2012.

RAAK-VAN DEN BERG, C.L.; DE LANGE, H.J.; VAN LENTEREN, J.C. Intraguild predation behaviour of ladybirds in semi-field experiments explains invasion success of *Harmonia axyridis*. PLoS ONE. 2012.

RIBEIRO, R. O princípio da precaução e a avaliação de risco no Decreto 4.074/2002. Dissertação (Mestranda, Política e Gestão Ambiental). Centro de Desenvolvimento Sustentável. Universidade de Brasília. Brasília – DF, 115 p. 2005.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Review of Entomology. 35:271-97. 1990.

SEEHUUS, S.; NORBERG, K.; KREKLING T.; FONDRK K.; AMDAM, G.V. Immunogold localization of vitellogenin in the ovaries, hypopharyngeal glands and head fat bodies of honeybee workers, *Apis mellifera*. Journal of Insect Science, 7:52-60. 2007.

SPADOTTO, C.A; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDREA, M.M. Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 29 p. 2004.

SOLOMON, K.R.; STEPHENSON, G.R.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Praguicidas e o Meio Ambiente. Edição em português, São Paulo – SP. ILSI Brasil International Life Science Institute do Brasil. 473 p, 2010.

STOCKSTAD, E. The case of the empty hives. Sciences, v. 316. 970-972. 2007<sup>a</sup>.

STORT, A.C.; GONÇALVES, L.S. A africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. In: BARRAVIERA (Ed.). Venenos Animais: Uma visão integrada. Primeira Edição. Rio de Janeiro, RJ: EPUC, Editora de Publicações Científicas Ltda. 33–47. 1994.

STORT, A.C.; GONÇALVES, L.S. A abelha africanizada e a situação atual da apicultura no Brasil. *Ciência e Cultura*, v. 1, n. 31, 32–43. 1979.

TAUTZ, J. O fenômeno das abelhas. Tradução: Gerson Roberto Neumann. Porto Alegre. Artmed, 288p. 2010.

TOMÉ, H.V.V.; MARTINS, G.F.; LIMA, M.A.P.; CAMPOS, L.A.O.; GUEDES, R.N.C. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE* 7(6): e38406. 2012.

TOMYTA, R.Y. Legislação de agrotóxicos e sua contribuição para a proteção da qualidade do meio ambiente. *Biológico*, São Paulo, v. 67, n. 1/2, 1-10. 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL AGENCY (US-EPA). Ecological Effects Tests Guidelines. OPPTS 850.3020. Honey Bee Acute Contact Toxicity. 1996.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Colony Collapse Disorder Progress Report. CCD Steering Comitee. 2010.

VAN ENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SEAGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* 4(8): e6481, 2009.

WARE, G.W.; WHITEACRE, D. The Pesticide Book. 2004. 6th ed. MeisterPro Information Resources. 488 . p. 1978. <<http://www.pesticidebook.com/>>. Acesso em 17/12/2010.

WILLIAMS. G.R.; TARPY, D.R.; VANENGELSDORP, D.; CHAUZAT, MARIE-PIERRE; COX-FOSTER, D.L.; DELAPLANE, K.S.; NEUMANN, P.; PETTIS, J.S.; ROGERS, R.E.L.; SHUTLER, D. Colony Collapse Disorder in context. *Bioessays* 32: 845–846. Insights & Perspectives, WILEY Periodicals, Inc. 2010.

WILLIAMS, I.H. The dependences of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Zoology Reviews*. 6, 229–257. 1994.

WHITFIELD, C.J.; BEHURA, S.K.; BERLOCHER, S.H.; CLARCK, A.G.; JONHSTON, S.J.; SHEPPARD, W.S.; SMITH, D.R.; SUAREZ, A.V.; WEAVER, D.; TSUTSUI, N.D. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, v.314, 642-645. 2006.