

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

GUSTAVO KENJI IWASAKA

Análise do efeito subletal de produtos comerciais de Abamectina e Difenoconazol em abelhas da espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) com o auxílio do software de vídeo rastreamento SACAM

São Carlos  
2020



GUSTAVO KENJI IWASAKA

Análise do efeito subletal de produtos comerciais de Abamectina e Difenoconazol em abelhas da espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) com o auxílio do software de vídeo rastreamento SACAM

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Ambiental, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Janete Brigante

São Carlos  
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da  
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

I97a Iwasaka, Gustavo Kenji  
Análise do efeito subletal de produtos comerciais  
de Abamectina e Difenconazol em abelhas da espécie  
*Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) com o auxílio do  
software de vídeo rastreamento SACAM / Gustavo Kenji  
Iwasaka; orientadora Janete Brigante. São Carlos, 2020.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, 2020.

1. Abelhas nativas. 2. Efeitos de toxicidade. 3.  
Abelha - comportamento. 4. Vídeo Rastreamento. 5.  
Agrotóxicos. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

# FOLHA DE JULGAMENTO

---

Candidato(a): **Gustavo Kenji Iwasaka**

Data da Defesa: 25/11/2020

Comissão Julgadora:

Resultado:

**Janete Brigante (Orientador(a))**

APROVADO

**Eny Maria Vieira**

APROVADO

**Lúcio André de Castro Jorge**

APROVADO

**Prof. Dr. Marcelo Zaiat**

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação



*Dedico este trabalho ao meu pai, Sergio.  
Pela vida, pelo amor e pelos muitos ensinamentos.*





## **Agradecimentos**

Agradeço imensamente à minha família, que demonstra amor com apoio e cuidado. Agradeço pelo trabalho e sacrifício que me proporcionaram poder me dedicar aos estudos, viver de maneira maravilhosa e as infinitas oportunidades de crescer.

À minha mãe Lidia e minha irmã Fernanda pelo suporte durante toda esta caminhada, e que mesmo morando distante, sempre estiveram presentes em tudo que fazia.

À Dr<sup>a</sup> Janete Brigante por toda a dedicação em me orientar da melhor maneira possível, mesmo nos momentos menos oportunos. Ao aprendizado e ao amor às abelhas que me mostrou e seguirão para sempre comigo.

À Prof.<sup>a</sup> Eny Maria Vieira (e seus alunos) pela confiança ao abrir seu laboratório, viabilizar esta pesquisa e mostrar sempre como melhorá-la.

À todos os meus amigos de São Carlos: Amb 014, Operação Natal, Banana, Banheiras e Inúteis que compartilharam comigo a vida na melhor cidade do Brasil. Crescemos, mudamos, aprendemos e nos divertimos muito juntos. Agradeço em especial meu amigo e veterano Colina, que está presente desde meu primeiro dia de faculdade dividindo alegrias, tristezas, pensamentos e receitas.

Finalmente, agradeço à República Feudo, pelas amizades que superam diferenças e nos mostram os diferentes conceitos de família. As pessoas com as quais vivi alguns dos melhores e mais memoráveis momentos da vida.



## RESUMO

IWASAKA, G. K. **Análise do efeito subletal de produtos comerciais de Abamectina e Difenconazol em abelhas da espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) com o auxílio do software de vídeo rastreamento SACAM.** 2020. 84 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Curso Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Evidências apontam para o declínio do número de abelhas em todo o mundo, resultado de fatores antropogênicos como o uso de agrotóxicos. Neste estudo utilizou-se o SACAM, software de vídeo rastreamento para o uso com insetos praga, de modo a avaliar os efeitos subletais, em especial à locomoção como resposta fototrópica, pela exposição tópica em abelhas aos produtos comerciais de Abamectina e Difenconazol, Kraft 36 EC e Score 250 EC respectivamente. Foram utilizadas, individualmente, concentrações baseadas na  $DL_{50}$  dos agrotóxicos, frações de 10% da  $DL_{50}$  e doses baseadas em recomendações de aplicação em campo, bem como a mistura de ambos os agrotóxicos. Observou-se mortalidade precoce em praticamente todas as amostras e também alterações no padrão de resposta ao início do teste, com redução de 7 a 54,16% no número de abelhas que reagiram à presença de luz dentre as amostras contaminadas. As amostras contaminadas com o Kraft, Score e a mistura destes apresentaram alteração estatística relevante quanto à Velocidade Angular Média, e a análise das médias de Tortuosidade, Velocidade, Distância Percorrida e Velocidade Angular sugere alterações nos padrões de comportamento como hiperatividade, sendo este mais comum em doses aplicadas maiores e letargia, efeito oposto observado em algumas doses de menor concentração. Por fim, validou-se o software utilizado com a proposição de melhorias organizacionais e estruturais para replicação do teste e obtenção de resultados mais consistentes.

Palavras Chave: Abelhas nativas. Efeitos de toxicidade. Abelha - comportamento. Vídeo rastreamento. Agrotóxicos.



## ABSTRACT

IWASAKA, G. K. **Análise do efeito subletal de produtos comerciais de Abamectina e Difenconazol em abelhas da espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) com o auxílio do software de vídeo rastreamento SACAM.** 2020. 84 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Curso Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Evidences indicate the bee population declining all over the world as a result of anthropogenic factors such as pesticides use. In this study a video tracking software used to monitor pests called SACAM was used to evaluate sublethal effects as phototropic motion responses caused by topic exposure to the commercial products of Abamectin and Difenconazole known as Kraft 36 EC and SCORE 250 EC. Concentrations based on pesticides LD<sub>50</sub>, 10% LD<sub>50</sub> fractions, field application based doses and both pesticides mixtures were used. Early mortality was observed in most samples as well as pattern alteration to test start with a decline from 7 to 54.16% of bees that reacted to the presence of light among the contaminated samples. Kraft, Score and the mixtures contaminated samples had statistically relevant alterations to Angular Speed. The analysis of the averages Tortuosity, Speed, Distance and Angular Speed suggests behavioral pattern alterations such as hyperactivity and even the opposite effect: lethargy. Hyperactivity was commonly found on samples contaminated with higher doses and lethargy among the smaller concentrations samples. Finally the software was validated and organizational and structural changes were suggested as a manner to improve test replication and achieve more consistent results.

Keywords: Native bees. Toxicity effects. Bee - behaviour. Video tracking. Pesticides.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Uso médio de agrotóxicos por área de lavoura de 2010 a 2017 no Brasil.....	29
<b>Figura 2.</b> Fórmula Estrutural da Abamectina.....	32
<b>Figura 3.</b> Fórmula estrutural do Difenconazol.....	33
<b>Figura 4.</b> Divisões para cada concentração de agrotóxico. ....	37
<b>Figura 5.</b> Caixa contendo colônia de <i>Melipona scutellaris</i> .....	38
<b>Figura 6.</b> Coleta de abelhas com gaiola e extensor plástico.....	39
<b>Figura 7.</b> Gaiolas mantidas na incubadora sob ambiente controlado.....	39
<b>Figura 8.</b> Abelhas anestesiadas sob observação.....	40
<b>Figura 9.</b> Tempo necessário para retorno da anestesia.....	41
<b>Figura 10.</b> Estrutura de raia utilizada por Pereira (2010).....	46
<b>Figura 11.</b> Raia em posição preparada para o teste.....	47
<b>Figura 12.</b> Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com KRAFT 36 EC segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D). ....	56
<b>Figura 13.</b> Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com SCORE 250 EC segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).....	59
<b>Figura 14.</b> Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com misturas de KRAFT 36 EC e SCORE 250 EC em comparação com o controle, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).....	62
<b>Figura 15.</b> Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com a Mistura 1 em comparação com as amostra de KRAFT e SCORE isoladas, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D). ....	64
<b>Figura 16.</b> Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com a Mistura 2 em comparação com as amostra de KRAFT e SCORE isoladas, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).....	66
<b>Figura 17.</b> Exemplo de rotas “confusas” registrada pelo <i>software</i> . Nota-se que por interferência de reflexos, por exemplo, em alguns momentos a trajetória dos objetos, identificados por cores diferentes, se confunde. ....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade.....	28
<b>Tabela 2.</b> Tempo registrado de anestesia completa (até que o indivíduo apresentasse movimentação coordenada como andar e voo) .....	41
<b>Tabela 3.</b> Valores de DL <sub>50</sub> , por contato, para <i>Melipona scutellaris</i> em µg i.a. /µL seus intervalos de confiança de 95% .....	42
<b>Tabela 4.</b> Concentrações utilizadas em teste, derivadas da DL <sub>50</sub> tópica dos ingredientes ativos.....	43
<b>Tabela 5.</b> Culturas e dose recomendada para estimar uma concentração de campo.....	43
<b>Tabela 6.</b> Culturas e dose recomendada para estimar uma concentração de campo.....	44
<b>Tabela 7.</b> Resumo das concentrações utilizadas no experimento.....	45
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros utilizados no software SACAM.....	48
<b>Tabela 9.</b> Mortalidade observada no intervalo de tempo entre a exposição aos agrotóxicos e o registro dos efeitos sobre a mobilidade.....	50
<b>Tabela 10.</b> Reação das abelhas ao início do teste e realização do percurso, por concentração de exposição.....	52



## SUMÁRIO

1 Introdução .....	19
2 Objetivos.....	21
2.1 Objetivos Específicos.....	21
3 Revisão Bibliográfica.....	22
3.1 Polinização por abelhas.....	22
3.2 Importância dos agentes polinizadores.....	23
3.3 Abelhas Sociais Nativas do Brasil.....	24
3.3.1 A espécie <i>Melipona scutellaris</i> (Latreille, 1811) .....	25
3.4 Ameaças às Abelhas Nativas.....	26
3.5 Agrotóxicos.....	28
3.5.1 Efeito sobre Polinizadores.....	30
3.5.2 Abamectina.....	31
3.5.3 Difenconazol.....	33
3.6 Fototropismo.....	34
3.7 Métodos de Avaliação de Efeitos Subletais em Abelhas.....	35
4 Método.....	37
4.1 Desenvolvimento Experimental.....	37
4.2 Organismo Teste.....	38
4.3 Teste de Anestesia.....	40
4.4 Contaminação.....	42
4.5 Raia e Teste de Locomoção .....	45
4.6 Vídeo Rastreamento.....	47
4.7 Análise Estatística.....	48
5 Resultados e Discussão.....	49

5.1 Mortalidade pós contaminação.....	49
5.2 Resposta ao início do teste e imobilização.....	51
5.3 Teste de Locomoção.....	53
5.3.1 Contaminação por KRAFT 36 EC.....	54
5.3.2 Contaminação por SCORE 250 EC.....	58
5.3.3 Misturas.....	61
5.4 SACAM.....	68
6. Conclusão.....	70
Referências .....	72
Apêndice.....	82

## 1. Introdução

O Brasil, um país de imensa biodiversidade apresenta uma grande riqueza de abelhas nativas sem ferrão, com destaque para a tribo Meliponini, que é um grupo de abelhas eussociais de grande importância (KERR et al., 1996), uma vez que seu trabalho de polinização auxilia na renovação das florestas tropicais como também para a melhoria da produção de muitas culturas agrícolas. Outra espécie bastante difundida no país é a exótica *Apis mellifera*, introduzida no século XIX para a produção de cera (KERR et al., 2011).

Estudos apontam que cerca de 35% da produção agrícola mundial seja dependente de agentes polinizadores, como as abelhas (KLEIN et al., 2006), porcentagem que pode até aumentar ao se considerar apenas as lavouras destinadas para o consumo humano, segundo a FAO (2020). Para plantas agrícolas de grande importância econômica e social a ausência de polinizadores como abelhas pode significar a ausência de reprodução ou frutificações pequenas e insuficientes (BRADBEAR, 2009; KLEIN et al., 2006).

Deste modo, a importância da preservação e manutenção dos agentes polinizadores não está somente relacionada à preservação da biodiversidade, como também está intrinsecamente relacionada à economia e segurança alimentar da espécie humana.

No caso das abelhas sem ferrão, sua manutenção está associada à polinização de 40 a 90% de toda flora nativa, dependendo do ecossistema em questão, incluindo espécies alimentícias e de interesse econômico (KERR et al., 1996).

Colocando em risco seu importante serviço ambiental, evidências apontam para o declínio das populações de abelhas no mundo todo, em especial as selvagens, fenômeno atribuído majoritariamente aos fatores antropogênicos (BROWN; PAXTON, 2009). No Brasil, segundo Kerr et al. (2001), as principais causas atribuídas à diminuição das populações de abelhas nativas estão relacionadas à supressão e fragmentação de habitats, a exploração das abelhas, comercial ou não, e ao uso de agrotóxicos.

A contaminação por agrotóxicos está relacionada à diminuição expressiva da população de abelhas e ao desaparecimento de colônias inteiras (VANENGELSDORP et al., 2009). Aplicação de maneira incorreta, concentrações acima das

recomendadas, persistência ambiental e acúmulo nos tecidos plantares e cadeia alimentar ameaçam a manutenção destes polinizadores (ALMEIDA et al., 1985; GOMES et al., 2020; CARVALHO, 2017).

O presente estudo objetiva a espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) conhecida popularmente como “uruçu” ou “uruçu-nordestina”. Considerada uma espécie de tamanho grande (NOGUEIRA-NETO, 1997) e corpo robusto (VIANA, 2020), é originária das matas úmidas e subúmidas do nordeste brasileiro (ALVES et al., 2012) e sua capacidade tanto como produtora de mel, como polinizadora de espécies nativas e exóticas faz com que esta possua grande importância econômica e ambiental (KERR et al., 1996).

O estudo tem como foco avaliar o impacto da exposição a doses subletais de um inseticida (Abamectina) e um fungicida (Difenoconazol), ambos de uso agrícola sobre a capacidade locomotora da espécie. A Abamectina é um químico da família das Avermectinas de efeito acaricida, inseticida e nematicida amplamente utilizada na agricultura (ANVISA, 2020a). Seu mecanismo de funcionamento consiste na atuação sobre o neurotransmissor inibitório GABA (ácido gama amino butírico) e sobre os canais de cloro dos receptores glutamato (GluCl) (BAI; OGBOURNE, 2016). O Difenoconazol é um fungicida da família dos triazóis de elevada importância ambiental pela sua baixa degradabilidade (LEWIS et al., 2016) e longa permanência em solos e corpos hídricos (WANG et al., 2011; BROMILOW et al., 1999) e apesar de ser considerado tóxico para mamíferos e organismos aquáticos, apresenta risco considerado baixo às abelhas melíferas (LEWIS et al., 2016).

Dada a grande relevância ambiental e agrícola da espécie *Melipona scutellaris* e o amplo uso na agricultura dos agrotóxicos citados, tem-se em questão a necessidade do estudo da interação entre eles e o quanto esta interação pode afetar na mobilidade e capacidade de orientação após exposição. Para registrar o comportamento das abelhas após a exposição foi utilizado o software SACAM, que como ferramenta de vídeo rastreamento pode ser utilizada no estudo do comportamento animal permitindo exatidão e flexibilidade de análises. Tal recurso não possui efeito sobre a movimentação e nem o comportamento animal (AKAKA; HOUCK, 1980) e são independentes do discernimento do pesquisador, apresentando reprodutibilidade nas análises (NOLDUS et al., 2001). Destaca-se que a ferramenta utilizada, de desenvolvimento da Embrapa, ainda não foi validada com testes em abelhas, sendo tal validação também um objetivo do estudo.

## 2. Objetivos

No presente trabalho, buscou-se avaliar a ação dos efeitos subletais dos produtos comerciais dos agrotóxicos Abamectina e Difenoconazol a partir da aplicação tópica em campeiras da espécie *Melipona scutellaris*.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Montar, testar e adaptar um sistema denominado de Raia para uso acoplado ao registro de imagens;
- Realizar o estudo investigativo e de potencialidades dos recursos do software SACAM: exigências físicas, ópticas, recursos estatísticos e resultados gerados;
- Aplicar teste de toxicidade tópica utilizando os produtos comerciais Kraft, Score e a mistura, em abelhas adultas de *M. scutellaris*;
- Aplicar a metodologia integrando Raia, Imagens, Abelhas e SACAM para avaliar efeito na capacidade locomotora das abelhas.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Polinização por abelhas

O processo de polinização, quer seja abiótica ou biótica, desempenha um papel vital na perpetuação das plantas. Por meio da polinização, sementes são geradas e a perpetuação da espécie pode ser garantida (BARFIELD, 2010).

A polinização pode ser compreendida como a transferência do pólen, presente nas anteras, para o estigma. Existem espécies que apresentam autofecundação, mas na sua ausência, agentes externos devem realizar o deslocamento dos grãos de pólen. Para algumas plantas a polinização pode acontecer com a utilização exclusiva de algum agente externo, enquanto outras utilizam-se de uma combinação destes (BRADBPEAR, 2009).

Os agentes externos podem ser naturais, como o vento, como também uma imensa variedade de agentes bióticos. Dentre os agentes polinizadores animais conhecidos estão mamíferos, aves e insetos, com destaque para as mais de vinte mil espécies de abelhas selvagens (FAO<sup>1</sup>, 2020).

Angiospermas, que tipicamente reproduzem-se de maneira sexuada (BARFIELD, 2010), são amplamente beneficiadas pela polinização por abelhas, fato explicado pela grande diversidade morfológica ou comportamental do grupo de insetos. Enquanto evolutivamente abelhas e angiospermas estão intimamente conectadas, características morfológicas como cor, presença de aroma e néctar, formato e acessibilidade ao pólen das flores resultaram, em alguns casos, na realização da polinização exclusividade das abelhas (PINHEIRO et al., 2014).

Conhecidas como entomófilas as plantas polinizadas por insetos e melitófilas, as que são polinizadas por abelhas (PINHEIRO et al., 2014) tendem a possuir certas características específicas como a floração diurna, aroma mais suave em comparação às com floração e polinização noturna, tubos de néctar não maiores que 2cm, áreas de pouso para abelhas e coloração variada, como azul, amarela e branca, mas raramente vermelha (BRADBPEAR, 2009).

Nestes casos, a eficiência das abelhas se dá pelo grande número, físico e capacidade de forragear uma espécie por vez (BRADBPEAR, 2009).

A polinização pode ser ainda mais dependente da atuação das abelhas. Angiospermas com anteras poricidas ou envolvidas em disposição a deixar apenas

um pequeno orifício petalar de acesso, necessitam de um polinizador fisicamente adaptado à ação (HOLSTEIN; GOTTSCHLING, 2018). A ação conhecida como “Buzz-Pollination” ou Polinização por Vibração, capaz de polinizar tais angiospermas, consiste no movimento vibratório produzido pelo relaxamento e contração dos músculos indiretos de voo e conseqüentemente o movimento torácico e é realizado exclusivamente por abelhas fêmeas (NADIA; MACHADO, 2005).

### **3.2 Importância dos agentes polinizadores**

Em ambientes naturais a participação animal é de vital importância para que ocorra a polinização de certas espécies. Ambientes fechados pela densidade vegetal como florestas tropicais onde o sombreamento impede muitas vezes que ocorra floração no solo, falta de ventos para carregar o pólen, distâncias muito grandes ou florações muito rápidas, como as das florestas temperadas europeias, impedem que o processo ocorra na ausência de agentes bióticos (BRADBEAR, 2009).

Com relação à produção agrícola os polinizadores são essenciais à produção de muitos dos frutos, vegetais, castanhas e óleos que garantem variedade e micronutrientes à alimentação (FAO<sup>1</sup>, 2020) e são conseqüentemente vitais para a qualidade de nutrição humana (BRUNET, 2019).

Ainda que aproximadamente, em volume, 60% da produção agrícola mundial não depende da polinização animal, como no caso de grãos e cereais, 35% da produção agrícola é diretamente dependente da polinização animal (KLEIN et al., 2006). Dados da FAO<sup>1</sup> mostram que aproximadamente 75% das lavouras de frutas e sementes para consumo humano sejam dependentes da ação de agentes polinizadores (FAO<sup>1</sup>, 2020). Além disso, interferem positivamente também na produção de carne e laticínios sendo as abelhas os principais polinizadores da alfalfa, um dos maiores componente para a alimentação de gado e frango no hemisfério Norte (BRUNET, 2019).

Para determinados cultivos de grande valor comercial e importância social como castanha-do-brasil, baunilha, cacau, melancia, melão, macadâmia, kiwi e maracujá, a ação dos polinizadores é essencial para que ocorra a reprodução (KLEIN et al., 2006). Para variedades como morango e maçã, que requerem um determinado número de grãos de pólen para que ocorra a fertilização completa, um número

insuficiente de visitas de abelhas resulta em um desenvolvimento insuficiente de sementes e também frutificações menores (BRADBPEAR, 2009)

Em termos econômicos diversas abordagens diferentes de pesquisas sugerem diferentes, porém igualmente significativos impactos econômicos dos polinizadores sendo as abelhas os mais importantes polinizadores de monoculturas no mundo todo (WATANABE, 1994).

Seguindo uma abordagem bioeconômica, que integra a relação de dependência com polinizadores sobre as 100 variedades classificadas mundialmente como alimentos, o valor econômico da polinização na produção é estimado entre 235 a 577 bilhões de dólares anualmente (FAO<sup>3</sup>, 2016).

Dados mais antigos, dos EUA, de 1994, já avaliavam a participação dos polinizadores em 10 bilhões de dólares anuais em safras como amêndoa, maçã e alfafa (WATANABE, 1994). Pesquisas anteriores, de 1992, estimaram os ganhos sociais anuais relacionados à produção agrícola atribuídos às abelhas entre 1,6 e 5,7 bilhões de dólares nos EUA (SOUTHWICK; SOUTHWICK, 1992).

Um estudo americano realizado no estado de Nova Jersey em 2005, com produtores de melancia, onde o valor anual da produção chega a, aproximadamente, 7,64 milhões de dólares por ano, atribui aproximadamente 4,74 milhões de dólares por ano à polinização realizada por abelhas nativas, em considerável declínio na região. O mesmo estudo também avaliou um custo de aproximadamente 210 mil dólares anuais apenas com o aluguel de abelhas melíferas para a substituição das espécies nativas quanto à seus serviços ambientais (WINFREE et al., 2011).

Nem todos os ganhos humanos da ação das abelhas e demais polinizadores podem ser quantificados ainda. A segurança alimentar futura do planeta é extremamente dependente da manutenção dos ecossistemas e da agricultura sustentável (UN, 2015) e a indústria farmacêutica, altamente dependente da biodiversidade, fonte de compostos muitos dos quais ainda não conhecidos, podem ser profunda e negativamente afetadas pelo declínio da ação destes agentes (BRUNET, 2019).

### **3.3 Abelhas Sociais Nativas do Brasil**

Enquanto existem inúmeras evidências da ameaça e declínio das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) por parte do uso de pesticidas, parasitas e síndromes, as



abelhas nativas do Brasil sofrem com as constantes ameaças à integridade de seus ecossistemas, com o avanço das cidades e a agricultura.

O grupo de abelhas nativas eussociais do Brasil é representado pela Tribo Meliponini, popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão. São responsáveis por até 90% do sucesso reprodutivo de árvores nativas de fecundação cruzada e de 40% a 90% da polinização de toda flora nativa, dependendo do ecossistema (KERR et al., 1996).

Além da ausência de ferrão, pelo fato de este ser atrofiado, diferem das outras abelhas também pela presença de ninhos feitos em árvores, em fendas, ou pendurados em galhos, não constituem células reais e a entrada dos ninhos está quase sempre coberta com alguma estrutura, de terra ou geoprópolis (NOGUEIRA-NETO, 1997). No território brasileiro, tem-se o conhecimento de mais de 400 abelhas sem ferrão eussociais de diferentes hábitos de nidificação, tamanho de ninhos, cores, formas e tamanhos (SANTOS, 2010).

Dentro da subfamília *Meliponinae* existem, dentre 52 gêneros, 300 espécies espalhadas pelas regiões Tropicais do hemisfério Sul, estando aproximadamente 100 dessas espécies ameaçadas de extinção dada a destruição de habitats. No continente americano, estão distribuídas do Rio Grande do Sul ao México (KERR et al., 1996).

Sua organização social, em colônias de número populacional variável, dependendo da espécie (NOGUEIRA-NETO, 1970), é dividida em castas, sendo a rainha responsável pela coesão da colônia e postura de ovos, os machos responsáveis pela cópula da rainha e as operárias ou obreiras responsáveis pelas outras funções necessárias tais como limpeza, alimentação da rainha, proteção da colônia, coleta de recursos externos e construção das estruturas internas e externas (VENTURIERI, 2008).

### **3.3.1 A espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811)**

O manejo da espécie conhecida popularmente como “uruçu”, “uruçu-verdadeira” ou “uruçu-nordestina” remonta a antes da chegada dos colonizadores portugueses no Brasil, sendo praticada por diversas tribos indígenas. Seus produtos como o mel apresentam o maior interesse econômico para a meliponicultura, bem como sua capacidade de coletar pólen e realizar polinização, de grande importância ambiental (KERR et al., 1996).

Segundo Viana (2020), a morfologia das operárias consiste em comprimento de 10 a 12 milímetros, um corpo robusto, vértice marrom-amarelado com pelos abundantes de cor amarelo-ruivos e clipeo levemente convexo. A cabeça, abdômen e o tórax são escuros, sendo este último coberto com pelos densos amarelo-dourado.

O nome popular “uruçu” é também atribuído à diversas outras espécies de abelhas da fauna brasileira (NOGUEIRA-NETO, 1970), comumente associadas às espécies de tamanho grande (NOGUEIRA-NETO, 1997), e por este motivo, algumas informações relacionadas à sua distribuição podem se apresentar equivocadas, ocorrendo naturalmente na região Nordeste do Brasil (ALVES et al., 2012).

Estudos mostram a relação entre a ocorrência natural desta espécie com a vegetação de florestas úmidas e subúmidas e também com a presença de árvores com grandes vazios e fendas, característica que propicia sua ocorrência mesmo em áreas de transição (ALVES et al., 2012). A umidade relativa também se mostra um importante fator à atividade de voo, sendo intensificada nos períodos com maior umidade relativa (SILVA et al., 2011).

### **3.4 Ameaças às Abelhas Nativas**

Em contrapartida à sua imensa importância econômica e ecológica, o declínio das populações de abelhas, em especial às selvagens, se mantém em crescente e ritmo acelerado e está diretamente relacionado à fatores antropogênicos (BROWN; PAXTON, 2009) e majoritariamente ligada a fatores econômicos (BARBOSA et al., 2017).

Além disso, a falta de informação acerca de sua importância somada à baixa produção de mel, que para muitos ainda é o único valor econômico das abelhas, em comparação com a *Apis mellifera* faz com que poucos se interessem pela conservação e manejo racional das abelhas sem-ferrão (LOPES et al., 2005).

Em nível global, fatores como perda, destruição e fragmentação de habitats, doenças, inserção ou invasão de espécies exóticas e mudanças climáticas são atribuídos como os principais contribuintes para a diminuição das populações de abelhas e biodiversidade em geral, bem como a interação entre todos estes fatores (BROWN; PAXTON, 2009). A revisão de dados históricos gerados na Inglaterra e EUA mostraram também a correlação entre a diminuição de espécies de abelhas nativas

com a inserção e utilização de agrotóxicos e a implantação de grandes áreas de monocultura em ambos os países (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019).

Segundo Kerr et al. (2001) a diminuição populacional das abelhas nativas do Brasil pode ser atribuída aos seguintes fatores:

- Desmatamentos e exploração de madeira - Relacionam-se com a diminuição expressiva de espaços para nidificação de cerca de 300 espécies e também com a oferta de alimento;
- Queimadas - Diretamente relacionada com o desmatamento e destruição direta de colônias. Dá-se atenção especial à rainha, que ao não conseguir voar, acaba por impossibilitar a colônia de se deslocar e evitar a ameaça;
- Exploração do mel - Com intuito comercial ou não, a procura pelo mel e técnicas incorretas utilizadas acabam culminando na destruição de colônias inteiras;
- Fragmentação de habitats - A diminuição das áreas de mata e de colônias em determinado espaço se desdobram na diminuição da variabilidade genética, necessária para manutenção a longo prazo das populações;
- Uso de agrotóxicos - O uso de agrotóxicos afeta diretamente o tamanho das populações de abelhas nas áreas aplicadas e próximas.

### 3.5 Agrotóxicos

A Lei Federal n.º 7.802 de 1989 (BRASIL, 1989) apresenta como definição de agrotóxico:

Os produtos e os 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 de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; Substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento;

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto a seu princípio ativo ou especificidade e a praga de destinação tais como Inseticidas, Larvicidas, Herbicidas, Fungicidas, entre outros (ALMEIDA et al., 1985).

A classificação quanto à sua toxicidade para humanos baseia-se na Dose Média Letal (DL50), por via oral para ratos (BARRIGOSI, 2020), variando entre as Classes 1 a 5, sendo 1 considerada “Produto Extremamente Tóxico” e a 5 “Produto Improvável de Causar Dano Agudo” (ASCOM/ANVISA, 2019), como representado na tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação dos agrotóxicos quanto à toxicidade.

<b>Classe</b>	<b>Classificação</b>
1	Produto Extremamente Tóxico
2	Produto Altamente Tóxico
3	Produto Moderadamente Tóxico
4	Produto Pouco Tóxico
5	Produto Improvável de Causar Dano Agudo

Fonte: ASCOM/ANVISA (2019).

Dentro do contexto de modelo de produção vigente e o aumento da população mundial, assim como a consequente demanda por alimentos, os agrotóxicos proporcionaram um aumento da produção mundial e da produtividade das lavouras (CARVALHO, 2017).

Mesmo com dados comumente associados à conflitos de interesse e subnotificações, o Brasil ainda consta entre os principais consumidores mundiais de agrotóxicos. No setor, a expansão do mercado brasileiro das últimas décadas figurou em aproximadamente 190%, em comparação com os 93% da média mundial (RIGOTTO et al., 2014).

Segundo dados da FAO<sup>2</sup>, entre os anos de 2010 e 2017 o uso total de agrotóxicos no Brasil foi de aproximadamente 360 mil toneladas. Os mesmos dados, no mesmo período de tempo, revelam uma média nacional anual de 5,81 kg de agrotóxicos por hectare (Figura 1). No mesmo período a média mundial não superou os 2,68 kg/hectare (FAO<sup>2</sup>, 2020).

**Figura 1.** Uso médio de agrotóxicos por área de lavoura de 2010 a 2017 no Brasil.



Fonte: FAO<sup>2</sup> (2020)

Outras bases de dados tais como o Ibama, revelam dados ainda maiores. Boletins anuais demonstram quantidades em torno de 500 mil toneladas anuais de agrotóxicos comercializados, chegando a 549.280,44 toneladas no ano de 2018 (IBAMA, 2018).

O uso de pesticidas químicos, no geral, não se concentra apenas em áreas rurais e ao uso agrícola. Seu uso em áreas urbanas se concentra no controle de pragas como mosquitos e outros vetores de doenças bem como em seu uso doméstico como jardins e gramados. Essa configuração caracteriza-se pelo uso de

doses maiores que o recomendado, de maneiras muitas vezes não intencionais (MEFTAUL et al., 2020).

Agrotóxicos são sinônimo de uma importante preocupação com saúde pública visto a elevada quantidade de pessoas envolvidas e expostas desde sua fabricação, aplicação no campo, aplicação urbana e todas as suas áreas adjacentes. Somam-se ao problema todos os consumidores de alimentos contaminados com seus resíduos (RIGOTTO et al., 2014).

A questão à saúde pública se torna mais complexa ao aprofundar a temática. Trabalhadores envolvidos na aplicação encontram-se comumente mal protegidos, sem os equipamentos necessários e sem a instrução necessária para aplicação correta (ALMEIDA et al., 1985) e diferentes métodos de aplicação, como o aéreo, podem atingir facilmente áreas não desejadas (PAN et al., 2019).

Esses químicos, no geral, possuem a capacidade de impregnar e persistir nos tecidos das plantas, podem infiltrar os solos e atingir corpos hídricos contaminando-os e são passíveis de bioacumulação na cadeia alimentar (GOMES et al., 2020). Posteriores à aplicação, alguns agrotóxicos podem ainda sofrer transformações químicas ou serem metabolizados por microrganismos, por exemplo, aumentando sua toxicidade ou sua persistência no ambiente (CARVALHO, 2017). Tais capacidade podem aumentar o alcance destes em relação a outros ecossistemas e também exercer efeito tóxico sobre diversas espécies não desejadas (CARVALHO, 2017).

### **3.5.1 Efeito sobre Polinizadores**

Uma vez aplicados e inseridos no ambiente, os agrotóxicos podem afetar as abelhas e outros agentes polinizadores de diversos modos, podendo ocasionar em sua mortalidade direta ou indireta.

A ação dos agrotóxicos associada a técnicas de monocultura pode diminuir consideravelmente, dependendo da espécie botânica, a abundância de néctar e pólen e também a oferta de locais de reprodução e nidificação. A distribuição de pólen e a diminuição de tipos polínicos associados à menos espécies afetam em nível local e regional a população de polinizadores (PINHEIRO; FREITAS, 2010; OSBORNE et al., 1991).

Segundo PINHEIRO e FREITAS (2010) a principal causa direta de mortalidade de abelhas (efeito agudo) se dá pelo contato, oral ou tópico, durante o forrageamento

de plantas contaminadas pela aplicação de determinados pesticidas. Outros fatores como a presença das abelhas na hora da aplicação, concentrações utilizadas, métodos de aplicação e a presença de agentes naturais como chuva e vento podem agir como agravantes para expor as abelhas à contaminantes (PORRINI ET AL., 2003).

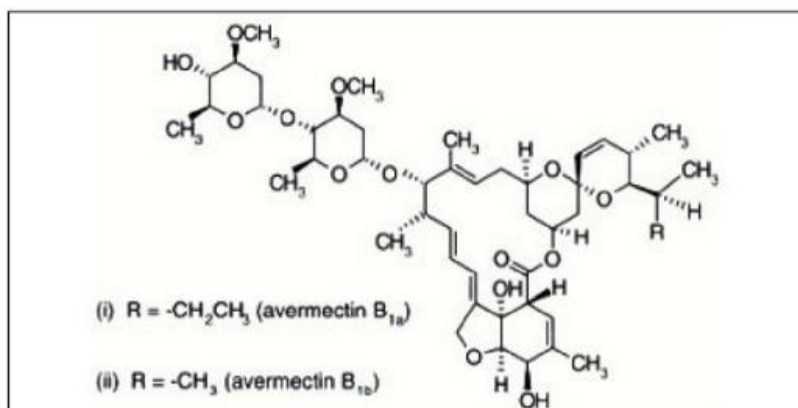
A constante busca por água, néctar e pólen para a manutenção da colônia e a grande área coberta na atividade de forrageamento faz com que estes insetos não-alvo entrem em contato, quando não com doses letais, com doses subletais que podem afetar o desenvolvimento e saúde de toda colônia. Resíduos de pesticidas foram encontrados em amostras de pólen coletadas por abelhas e outros subprodutos recolhidos nas colmeias (OLIVEIRA et al., 2016; ŠKERL et al., 2009) revelando a exposição não só da campeira como também possivelmente da colônia toda e seu impacto negativo ao desenvolvimento da mesma (ŠKERL et al., 2009), estando ligado às principais causas do desaparecimento de colônias inteiras, fenômeno conhecido como *Colony Collapse Disorder* (CCD) (VANENGELSDORP et al., 2009).

Efeitos comportamentais causados pela exposição subletal à diversos agrotóxicos corroboram com as hipóteses do enfraquecimento dos indivíduos e consequentemente das colônias inteiras. O registro de diversas variações comportamentais compreende entre muitos outros efeitos, em abelhas *Apis* e também em abelhas nativas do Brasil, a diminuição do forrageamento, diminuição da frequência de remoção de rejeitos, diminuição na postura de ovos (WU-SMART; SPIVAK, 2016; ALIOUANE et al., 2009), alteração na velocidade média de locomoção (PEREIRA, 2010), confusão, déficits motores (JACOB et al., 2019), letargia, dificuldades motoras, paralisia, superexcitação (MORAIS et al., 2018) e dificuldade nas ações de comunicação social e defesa de colônias (BOFF et al., 2018).

### **3.5.2 Abamectina**

A Abamectina é um acaricida, inseticida e nematicida de uso agrícola (ANVISA<sup>1</sup>, 2020), sendo um dos principais e mais populares compostos químicos da família das Avermectinas (BAI; OGBOURNE, 2016).

As Avermectinas foram primeiro obtidas a partir da fermentação do *Streptomyces avermitilis*, de uma amostra de solo coletada próxima ao Golfo de Kawano no Japão (GERENUTTI; SPINOSA, 1997).

**Figura 2.** Fórmula Estrutural da Abamectina.

Fonte: ANVISA<sup>1</sup> (2020).

Pode ser empregado em diversas culturas, muitas delas de grande importância para a produção brasileira. Segundo a ANVISA<sup>1</sup> (2020) é indicada no emprego às culturas de:

[...] algodão, amendoim, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, cebola, citros, coco, cravo, crisântemo, ervilha, feijão, feijão-vagem, figo, maçã, mamão, manga, melancia, melão, morango, pepino, pêra, pêssego, pimentão, rosa, soja, tomate e uva [...] alho, [...] cenoura, milho.

Sua aplicação pode ser foliar, no solo, bulbilhos e sulcos e no emprego ao tratamento de sementes (ANVISA<sup>1</sup>, 2020).

A Abamectina, como as Avermectinas, é classificada como uma neurotoxina, atuando sobre o neurotransmissor inibitório GABA (ácido gama amino butírico) e sobre os canais de cloro dos receptores glutamato (GluCl) (BAI; OGBOURNE, 2016).

O bloqueio do neurotransmissor GABA reduz a inibição neural levando a hiperexcitação do sistema nervoso central, causando tremores, hiperatividade e hiperexcitabilidade, enquanto o efeito sobre os receptores GluCl faz com que este aumente sua permeabilidade para os íons cloreto, resultando em um bloqueio entre os sinais neurais e musculares (BLOOMQUIST, 2003).

As consequências aos invertebrados expostos são movimentos não-coordenados, paralisia, inanição e morte (BAI; OGBOURNE, 2016).

Segundo Wislocki et al. (1989) estudos demonstraram a toxicidade aguda da Abamectina para abelhas *Apis mellifera* com valores de CL<sub>50</sub> para 24h e 48h de 0,0017

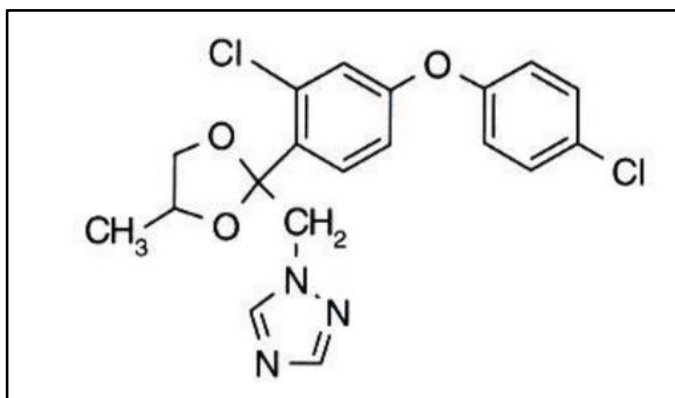


e 0,002 µg/abelha respectivamente, e DL<sub>50</sub> de 0,009 µg/abelha. Tal risco elevado à espécie não-alvo levou a European Food Safety Authority a recomendar sua aplicação quando as lavouras não estivessem em época de floração (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016).

### 3.5.3 Difenoconazol

O Difenoconazol é um fungicida de uso agrícola, pertencente ao grupo químico dos Triazóis cuja fórmula química bruta é C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (ANVISA<sup>2</sup>, 2020), representada na figura 3.

**Figura 3.** Fórmula estrutural do Difenoconazol.



Fonte: ANVISA<sup>2</sup> (2020)

Os triazóis, cujo modo de ação consiste na inibição da biossíntese dos esteróis, são amplamente utilizados na agricultura e caracterizados por sua longa permanência no solo (BROMILOW et al., 1999).

São classificados como quimicamente e fotoquimicamente estáveis e de baixa biodegradabilidade (LEWIS et al., 2016) e, portanto, facilmente transportados ao solo e aos corpos hídricos (LEWIS et al., 2016; WANG et al., 2011).

Segundo a ANVISA<sup>2</sup> (2020), é empregado na aplicação foliar ou no tratamento de sementes das seguintes culturas:

[...] abacate, abóbora, abobrinha, álamo, alface, algodão, alho, ameixa, amendoim, antúrio, arroz, alstroeméria, aveia, azaleia, banana, batata, begônia, berinjela, beterraba, boca de leão, café, caju, caqui, cebola, cenoura, cevada, citros, coco, couve-flor, cravo, cravínea, crisântemo, ervilha, eucalipto, feijão, figo, gerânio, gérbera, girassol, goiaba, kalanchoe, lisianthus, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, morango, nectarina, pepino, pêssego, pimentão, rosa, soja, tomate, trigo, uva e violeta.

Segundo ANVISA<sup>2</sup> (2020) é classificado como classe 1 quanto à toxicidade. Possui “risco moderado a alto” em mamíferos e “risco moderado a alto” à organismos aquáticos como peixes, invertebrados e algas. Com relação a abelhas, seu risco é considerado “baixo”, sendo a  $DL_{50}$  oral menor que  $177\mu\text{g}/\text{abelha}$  e  $DL_{50}$  de contato menor que  $100\mu\text{g}/\text{abelha}$  (LEWIS et al., 2016).

### 3.6 Fototropismo

Fototropismo pode ser definido como a mudança de orientação, positiva ao aproximar ou negativa ao distanciar, determinada por fatores externos, no caso, a luz. No caso das plantas, o fototropismo é utilizado de modo a otimizar a absorção de luz solar e é predominantemente influenciado pela luz de cor azul (TAIZ et al., 2015).

Experimentos já mostraram que este fenômeno também ocorre com abelhas. Submetidas à um ambiente escuro e depois à um foco de iluminação, as abelhas testadas seguiram positivamente a direção da luz, voando ou caminhando (WOLF; ZERRAHN-WOLF, 1934).

Outros experimentos e observações conduzidas mostraram uma reação de grande intensidade causada pela luz em abelhas, mesmo estas em condições debilitadas ou ambientes não favoráveis, como frio intenso ou alta umidade e também nas condições de abelhas sozinhas ou como enxame (MINNICH, 1920).

A fototropia pode ser utilizada como forma de localização e estudos citam determinados comportamentos e movimentações, como danças, de abelhas melíferas utilizados para comunicar a presença de alimentos, por exemplo, de acordo com variações da rotação da Terra e posição do Sol (PIERCE; CHENEY, 2013).

Neste estudo, o fototropismo foi utilizado de modo a guiar as abelhas dentro de um ambiente confinado.

### **3.7 Métodos de Avaliação de Efeitos Subletais em Abelhas**

Dentro do campo da ecotoxicologia, existem diferentes técnicas aplicadas para avaliação do comportamento cognitivo das abelhas, com a detecção de alterações nestes comportamentos provocadas pela exposição subletal à pesticidas agrícolas. Esta análise pode ser realizada nos âmbitos individuais, sendo comuns as alterações nos padrões de locomoção e resposta à estímulos e no âmbito social, com mudanças no comportamento em relação à outros indivíduos, vitais para o funcionamento das colônias (PHAM-DELEGUE et al., 2002).

As técnicas de registro podem ser ou não computadorizadas. Por exemplo, um estudo realizado por Boff et al. (2018) sobre o comportamento de antenação e trofolaxia, foi realizada com base na observação e contagem manual das interações. Wu-Smart e Spivak (2016) utilizaram contagem e observação de modo a avaliar o comportamento de higiene e forrageamento de colônias inteiras, após contaminação com pesticidas, correlacionando os resultados com diferentes concentrações e tamanhos de colônias.

De maneira semelhante, Pereira (2010) utilizou-se de análises não computadorizadas de gravações de abelhas para estimar a velocidade de locomoção das abelhas contaminadas. Análises não computadorizadas também foram utilizadas por Eeraerts et al., (2020) os quais objetivaram a observação dos padrões de forrageamento de abelhas na natureza, por meio da ação das abelhas de rotação da movimentação e cronometragem.

Ainda que os métodos não computacionais apresentem baixo investimento, fácil aplicação e em alguns casos sejam a única possibilidade de detectar certos comportamentos, nota-se, no entanto, que utilizam poucos parâmetros de análise, sendo que os mesmos são, de certo modo, dependentes dos observadores e seu

discernimento, e a replicação de tais experimentos não é de todo garantida (NOLDUS et al., 2001).

O uso de técnicas de registro por automação para estudar o comportamento cognitivo de muitos animais evoluiu rapidamente a partir de detectores simples usados por Clarke, Smith e Justesen (1985) ou mesmo os aparelhos de ultrassom utilizados por Akaka e Houck (1980) ou o sistema de radar Doppler e micro-ondas usado por Martin e Unwin (1980), para sistemas cada vez mais complexos em capacidade de detecção.

Dentro do universo das técnicas computacionais estão os programas de *Video-Tracking* ou rastreamento de vídeo utilizados nos estudos de comportamento animal. Atualmente, a técnica de rastreamento por vídeo tem sido muito utilizada para medir o comportamento ou os deslocamentos de animais em laboratório.

Programas de rastreamento por vídeo foram introduzidos na década de 90 e têm sido aprimorados para oferecer cada vez mais as vantagens dentre as técnicas computadorizadas, como a flexibilidade, precisão e exatidão, reprodutibilidade (NOLDUS et al., 2001), além de ser possível ampliar os parâmetros de análise, sem impor restrições de movimento ou afetar o comportamento normal dos objetos em estudo (AKAKA; HOUCK, 1980).

A utilização de programas de *Video-Tracking* possibilitou Hassani et al. (2005) e Teeters et al. (2012) o uso de múltiplos parâmetros de análise, a padronização da obtenção de dados e o tratamento de um grande volume de informações. Hassani et al. (2005) utilizaram-se das análises por vídeo para acompanhar o deslocamento das abelhas em intervalos de 5 segundo, enquanto Teeters et al. (2012) do monitoramento por vídeo durante 26 horas seguidas para monitorar as distâncias percorridas, o tempo gasto com alimentação e o número de interações sociais de um grupo de 32 abelhas. Teeters et al. (2012) utilizaram-se do software pago EthoVisionXT desenvolvido pela companhia neerlandesa Noldus (NOLDUS, 2020).

O presente estudo visa a utilização do software SACAM, de análise de imagens, desenvolvido pela Embrapa Instrumentação Agropecuária em parceria com a Embrapa Recursos Genéticos inicialmente para o uso com insetos praga, cujo objetivo é a adaptabilidade a diferentes tipos de teste e também o baixo custo, sendo disponibilizado gratuitamente pela desenvolvedora (RIBEIRO DA SILVA; JORGE, 2010; CAETANO et al., 2006).

## 4. Método

### 4.1 Desenvolvimento Experimental

Todo o desenvolvimento experimental do projeto foi realizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudo Ambientais da Escola de Engenharia de São Carlos EESC-USP bem como no Instituto de Química de São Carlos IQSC-USP.

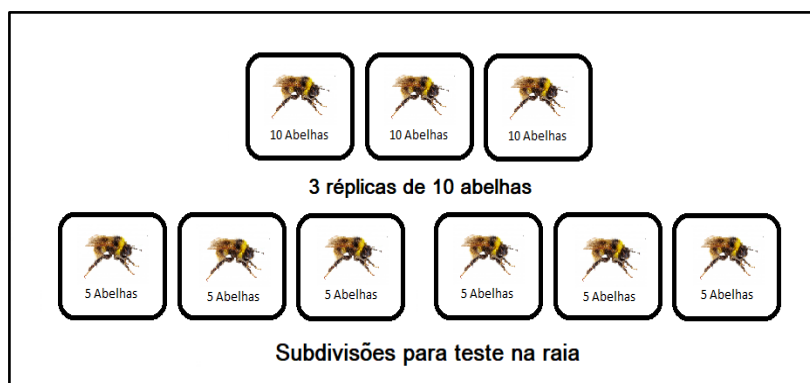
Para a realização do teste final, no qual as abelhas foram submetidas à contaminação e ao trajeto em uma estrutura denominada raia, realizaram-se pré testes de modo a definir padrões e modificações necessárias à raia já construída.

Inicialmente foi realizado um teste de anestesia com gelo, que não obteve resultados satisfatórios e posteriormente com CO<sub>2</sub>, padronizado pelas diretrizes para teste em abelhas *Apis mellifera* pela OECD. Definido o CO<sub>2</sub> como agente anestesiante, realizou-se um outro teste de modo a definir os menores tempos e volumes do gás necessários para o manuseio das abelhas.

Realizaram-se também testes utilizando a Raia e o *software* SACAM de modo a definir os parâmetros de análise e filmagem a serem utilizados além do manuseio adequado da estrutura para que o teste fosse bem sucedido.

Dada as dimensões da raia preexistente, que não comporta amostras inteiras de 10 abelhas, decidiu-se por realizar o teste final em grupos de 5 abelhas, como representado na Figura 4.

**Figura 4.** Divisões para cada concentração de agrotóxico.



Fonte: Autor

Assim, de cada uma das 3 amostras de 10 abelhas, padronizadas para este tipo de teste, subdividiu-se as abelhas em gaiolas de 5 indivíduos, totalizando 6

gaiolas para cada uma das soluções de agrotóxicos utilizadas. As amostras Controle foram definidas como 5 amostras de 10 abelhas, totalizando 10 gaiolas contendo 5 indivíduos.

Os testes em raia foram realizados em 2 dias devido à duração prolongada destes.

## 4.2 Organismo Teste

Para a realização do experimento foram utilizadas abelhas urucu-nordestina *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811), provenientes do Meliponário Experimental, no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais EESC USP, localizado no município de Itirapina, estado de São Paulo (22,166812°S, 47,9020744°W).

Todos os organismos utilizados foram abelhas adultas, campeiras e de colônias saudáveis, em caixas próprias, como representado na Figura 5. Por colônia saudável entende-se a ausência aparente de parasitas, presença da atividade de forrageamento e atividades naturais, presença de potes preenchidos com pólen e mel e rainha em postura.

**Figura 5.** Caixa contendo colônia de *Melipona scutellaris*.



Fonte: Autor

As coletas foram realizadas no período da manhã do dia anterior ao teste, acompanhando a atividade de forrageamento natural, na saída das colônias, utilizando gaiolas de teste plásticas acopladas à extensores plásticos (Figura 6). Para a coleta dos organismos não houve nenhum tipo de interferência ou estímulo para que

as abelhas saíssem da colmeia, garantindo que os testes fossem realizados apenas com campeiras adultas e saudáveis.

**Figura 6.** Coleta de abelhas com gaiola e extensor plástico.



Fonte: Autor

As abelhas foram mantidas em gaiolas plásticas de 250ml, ventiladas e com livre acesso a alimentação por meio de tubos Eppendorf contendo algodão embebido em solução sacarose/água (50%). A alimentação foi mantida todo período *ad libitum*, de modo a prolongar o bem-estar dos organismos para a realização dos testes.

Após a coleta, as gaiolas plásticas foram mantidas em incubadora a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade controlada de 50 a 60% até a aplicação do contaminante e o teste de locomoção, como representado pela Figura 7.

**Figura 7.** Gaiolas mantidas na incubadora sob ambiente controlado.



Fonte: Autor

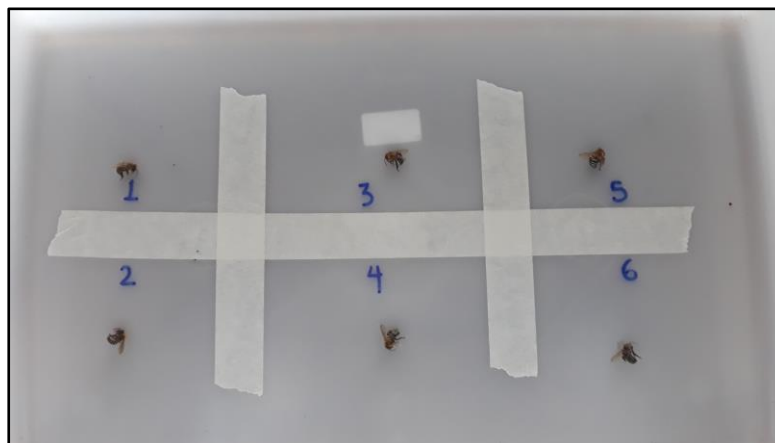
### 4.3 Teste de Anestesia

Seguindo protocolo da OECD para testes com *Apis Mellifera* a anestesia para manejo das abelhas deve ser realizada com dióxido de carbono ou nitrogênio e sua quantidade e período de exposição devem ser minimizados (OECD, 1998).

A escolha do CO<sub>2</sub> se deu pela facilidade em obtenção, já disponível no laboratório, e para a minimização da quantidade e exposição, foram realizados testes preliminares de modo a definir o menor tempo possível com efetiva anestesia (Figura 8).

Para a padronização da anestesia, definiu-se a vazão do cilindro de CO<sub>2</sub> como aproximadamente 0,5 L/min, o tempo de injeção na gaiola-teste de 4 segundos e o tempo de dispersão do CO<sub>2</sub>, com gaiola fechada, de 5 segundos.

**Figura 8.** Abelhas anestesiadas sob observação.



Fonte: Autor

Os resultados obtidos no teste preliminar de anestesia, com os padrões utilizados, são apresentados na tabela 2 e no gráfico do Tempo Necessário para Retorno da Anestesia por Número de Amostras, na Figura 9.



**Tabela 2.** Tempo registrado de anestesia completa (até que o indivíduo apresentasse movimentação coordenada como andar e voo).

Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7
2min22s	6min02s	3min52s	5min01s	5min25s	58s	2min52s
21s	5min28s	1min54s	6min10s	4min58s	1min30s	3min32s
3min10s	6min	3min36s	2min56s	4min52s	3min03s	3min40s
2min13s	5min06s	3min33s	3min53s	5min11s	4min32s	3min54s
2min50s	2min40s	2min32s	6min12s	4min20s	6min13s	4min03s
2min26s	55s	3min40s	5min55s	5min55s	6min17s	4min04s

Fonte: Autor

Constatou-se no teste preliminar uma certa mortalidade ou elevada letargia ao aumentar os parâmetros de teste: vazão, tempo de injeção e dispersão.

**Figura 9.** Tempo necessário para retorno da anestesia



Fonte: Autor

Para a condução do resto do experimento, definiu-se um tempo de 7 minutos para que as abelhas retornassem do estado de anestesia.

#### 4.4 Contaminação

Os agrotóxicos escolhidos para a condução deste teste foram a Abamectina e o Difenconazol.

Para o teste optou-se pelo uso da formulação comercial de ambos, de modo a aproximar as condições reais de campo. Assim, utilizou-se o Kraft® 36 EC, 36g Abamectina/L), marca pertencente à Cheminova Brasil Ltda e o Score® 250 EC, 250g Difenconazol/L e 23,6% (p/p) Difenconazol, marca pertencente à Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, ambos de uso agrícola.

Tanto o Kraft® 36 EC como o Score® 250 EC são classificados como classe 1 toxicológica (extremamente tóxico) e classe 2 quanto ao potencial de periculosidade ambiental (produto muito perigoso ao meio ambiente) (SYNGENTA GLOBAL, 2020; CHEMINOVA, 2020).

A contaminação tópica foi escolhida para garantir a dose aplicada em cada abelha, algo mais difícil de ser rastreado em testes de contaminação oral.

Todas as concentrações utilizadas foram definidas de modo a contaminar cada uma das abelhas com 1 µL de solução e seguindo o protocolo da OECD para testes agudo em abelhas (OECD, 1998), todas as soluções foram preparadas com um “wetting agent”, o Triton X-100, na concentração de 0,1% (v/v) em solução com água.

A base tomada para a determinação das concentrações utilizadas foi o estudo realizado por Brigante, J. (Dados ainda não publicados) que determinou valores de DL<sub>50</sub>, para as vias de exposição oral e tópica dos ingredientes ativos Abamectina e Difenconazol para a espécie *Melipona scutellaris* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores de DL<sub>50</sub>, por contato, para *Melipona scutellaris* em µg i.a. /µL seus intervalos de confiança de 95%.

Pesticida	Duração da Exposição		
	24h	48h	72h
Abamectina	0,079 (0,071 – 0,089)	0,049 (0,045 - 0,055)	Não Possível
Difenconazol	67 (35 - 98)	9,6 (8,2 – 11)	9,2 (7,9 – 10)

Fonte: Brigante, J. (Dados ainda não publicados)

De modo a observar apenas os efeitos subletais de ambos os produtos e diminuir os efeitos de mortalidade utilizou-se também uma diluição em 10% das doses subletais apresentadas ( $DL_{50}$ ) no período de 48h (Tabela 4).

**Tabela 4.** Concentrações utilizadas em teste, derivadas da  $DL_{50}$  tópica dos ingredientes ativos.

Agrotóxico	Concentração $\mu\text{g i.a.}/\mu\text{L}$
Abamectina	0,0049 (~0,005)
Difenoconazol	0,96 (~1)

Fonte: Autor

Adicionou-se também uma concentração, para cada produto, baseada nas doses aplicadas em campo do produto comercial, simulando uma concentração semelhante e mais próxima a real. As doses resultantes foram baseadas em diferentes culturas, todas de relevante interesse à espécie e correspondência geográfica, para cada um dos agrotóxicos (Tabelas 5 e 6).

**Tabela 5.** Culturas e dose recomendada para estimar uma concentração de campo.

Kraft 36 EC	Cultura	Dose recomendada em mistura para 100L de água
	Citrus	12,5mL
	Maçã	45mL
	Mamão	40mL
	Tomate	35mL

Fonte: Cheminova (2020).

Para a determinação da dose de campo do Kraft 36 EC utilizou-se a média aritmética das doses recomendadas para as culturas selecionadas (Tabela 5), e o desvio padrão desta.

$$\text{Possível dose de campo} = 33,125 \pm 12,42 \text{ mL/100L}$$

A dose escolhida foi a maior dose dentro do intervalo, sendo 45,55 mL/100L de água ou **0,0164 µg i.a./µL** em solução.

**Tabela 6.** Culturas e dose recomendada para estimar uma concentração de campo.

Score 250 EC	Cultura	Dose recomendada em mistura para 100L de água
	Café	35mL / 100L água
	Citrus	20mL / 100L água
	Maçã	14 mL /100L água
	Mamão, Pêssego e Pimentão	30mL / 100L água
	Manga, Tomate	50mL/ 100L água
	Rosa	60mL/ 100L água

Fonte: Syngenta Global (2020).

Para a determinação da dose de campo do Score 250 EC utilizou-se a média aritmética das doses recomendadas para as culturas selecionadas (Tabela 6), e o desvio padrão desta.

$$\text{Possível dose de campo} = \mathbf{34,83 \pm 16,025 \text{ mL/100L}}$$

A dose escolhida foi a maior dose dentro do intervalo, sendo 50,86 mL/100L de água ou **0,127 µg i.a./µL** em solução.

Por fim, adicionou-se também duas concentrações de mistura de modo a observar a possível interação entre os produtos. Para a determinação destas doses a  $DL_{50}/10$  do SCORE 250 EC foi mantida, adicionando a  $DL_{50}$  do Kraft 36 EC e a média de campo determinada em cada uma das misturas.

**Tabela 7.** Resumo das concentrações utilizadas no experimento.

	Produto Utilizado	Descrição da Concentração	Concentração µg i.a./µL
<b>Tópico</b>	<b>KRAFT 36 EC</b>	DL <sub>50</sub>	0,05
		DL <sub>50</sub> /10	0,005
		Média Campo	0,0164
	<b>SCORE 250 EC</b>	DL <sub>50</sub>	9,6
		DL <sub>50</sub> /10	0,96 (~1)
		Média Campo	0,127
	<b>Mistura</b>	DL <sub>50</sub> /10 SCORE + DL <sub>50</sub> KRAFT	1 µg Score /µL + 0,05 µg Kraft/µL
		DL <sub>50</sub> /10 SCORE + Média Campo KRAFT	1 µg Score /µL + 0,0164 µg Kraft/µL

Fonte: Autor

Contaminou-se as abelhas na região do tórax após anestesia por CO<sub>2</sub> na própria gaiola, por aproximadamente 8 segundos.

De modo a viabilizar a contaminação, optou-se por utilizar uma gota de 4 µL, com maior espalhamento e melhor vazão da pipeta. Deste modo, no dia determinado para a aplicação, todas as soluções foram diluídas em 25%, preservando as doses iniciais pretendidas.

#### 4.5 Raia e Teste de Locomoção

A estrutura do teste de locomoção das abelhas foi baseada na utilizada por Pereira (2010) com abelhas *Apis mellifera*.

**Figura 10.** Estrutura de raia utilizada por Pereira (2010).



Fonte: Pereira (2010).

A estrutura consiste em uma caixa com tampo de vidro, dividida verticalmente em 8 raia de largura de aproximadamente 5 centímetros, comprimento de 50 centímetros e altura de 4 centímetros. O começo de cada raia contém um vão no qual cada uma das abelhas fica alojada individualmente, bem como uma contenção para que todas possam ser liberadas no mesmo instante. Ao final da raia situa-se uma grade, também para contenção, e uma lâmpada fluorescente de 59cm de comprimento, responsável pela atração fototrópica.

Utilizou-se uma lâmpada fluorescente de 10W, da marca Luxor, com tonalidade fria “luz do dia”, de 6400K.

Algumas alterações foram realizadas para o teste como a mudança do fundo para branco, aumentando o contraste das abelhas com a raia, a contenção para liberação simultânea e também o deslocamento da lâmpada para mais próxima do final do percurso.

O tampo de vidro permite a visibilidade da câmera utilizada pelo *software* SACAM, situada a 70 cm da raia. Assim, de modo a diminuir a interferência nas leituras causada pelos reflexos no vidro bem como outras fontes de luminosidade, o experimento foi realizado em ambiente controlado escuro, onde predominava a luminosidade proveniente da lâmpada.

Posicionou-se as abelhas uma a uma na raia e após o tempo pré determinado de retorno da anestesia, todas foram liberadas simultaneamente para análise do *software*, durante 1 minuto.

**Figura 11.** Raia em posição preparada para o teste.



Fonte: Autor.

#### **4.6 Vídeo Rastreamento**

Utilizou-se o software SACAM (software para análises de comportamento de insetos) desenvolvido e disponibilizado gratuitamente pela Embrapa Instrumentação Agropecuária e em parceria com a Embrapa Recursos Genéticos com o objetivo de auxiliar no monitoramento de animais em movimento, inicialmente de insetos praga (RIBEIRO DA SILVA; JORGE, 2010).

O software utiliza-se de imagens sobrepostas a uma área pré-determinada de modo a analisar padrões de movimentação e algoritmos de detecção automática com diferentes sensibilidades, gerando importantes marcadores para análise, dentre eles velocidade linear e angular, tempo de permanência em cada área de estudo, distância percorrida e tortuosidade, permitindo seu uso para objetos de estudo de diferentes tamanhos e padrões de comportamento.

A baixa exigência quanto aos requisitos mínimos de hardware e a interface simples propiciam sua ampla utilização em diferentes estudos.

Utilizou-se para este experimento uma câmera USB da marca Logitech, modelo c270, resolução 720p, foco fixo e FoV 60°.

Os parâmetros utilizados no SACAM são descritos na tabela 8 e foram obtidos empiricamente de modo a obter os melhores resultados compatíveis com a câmera, computador e raia disponíveis.

**Tabela 8.** Parâmetros utilizados no software SACAM

Resolução	640x480
Sensibilidade de Detecção	94,1%
Tamanho mínimo do retângulo	1x1
Tamanho do pixel	> 0,9 cm
Tempo de análise	60 s

Fonte: Autor

#### 4.7 Análise Estatística

A avaliação dos dados gerados pelo SACAM foi realizada a partir do teste Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos, com significância de 5% (ALKASSAB; KIRCHNER, 2018). Em caso de valor  $p$  significativo, utilizou-se o teste de Dunn para identificar entre quais amostras encontrava-se a diferença estatisticamente significativa (LOURENÇO, 2012).

Todos os testes foram realizados em Microsoft Excel 2019 com o apoio do pacote de análises estatísticas RealStats 2020, disponível gratuitamente em <http://www.real-statistics.com>.



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Mortalidade pós contaminação

No período que compreendeu o intervalo entre a contaminação tópica das abelhas em laboratório e a colocação das abelhas na raia foram observadas as relações de mortalidade em cada um dos grupos. Dos 27 indivíduos encontrados mortos em suas gaiolas 12 estavam entre as abelhas contaminadas apenas com KRAFT, 9 estavam entre as abelhas contaminadas com SCORE e 4 entre as abelhas contaminadas com a mistura entre ambos.

Foi possível observar também que relevante parte dos indivíduos encontrados mortos foram encontrados nas maiores doses:  $DL_{50}$  e Média Campo do KRAFT,  $DL_{50}$  do SCORE e a mistura da  $DL_{50}/10$  do SCORE com a  $DL_{50}$  do KRAFT.

Os resultados obtidos de mortalidade encontram-se descritos na tabela 9.

**Tabela 9.** Mortalidade observada no intervalo de tempo entre a exposição aos agrotóxicos e o registro dos efeitos sobre a mobilidade.

Produto Utilizado	Descrição	Dose ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Número de Abelhas Mortas	Abelhas mortas em relação ao tamanho da amostra (%)
<b>KRAFT 36 EC</b>	Controle limpo	-	1	1,9
	Controle (Água + Triton)	-	0	0
	DL <sub>50</sub>	0,05	5	14,7
	DL <sub>50</sub> /10	0,005	1	3,03
	Média Campo	0,0164	7	20,58
<b>SCORE 250 EC</b>	Controle (Água + Triton)	-	0	0
	DL <sub>50</sub>	9,6	7	23,33
	DL <sub>50</sub> /10	1	2	6,45
	Média Campo	0,127	0	0
<b>Mistura</b>	DL <sub>50</sub> /10 SCORE + DL <sub>50</sub> KRAFT	1 $\mu\text{g}$ Score + 0,05 $\mu\text{g}$ Kraft	3	9,37
	DL <sub>50</sub> /10 SCORE + Média Campo KRAFT	1 $\mu\text{g}$ Score + 0,0164 $\mu\text{g}$ Kraft	1	3,125

Fonte: Autor

Por meio da aplicação de doses subletais, esperava-se uma mortalidade muito mais reduzida em comparação com a encontrada, levando em consideração que as doses tais como DL<sub>50</sub> são calculadas para períodos de exposição de 48 horas e não entre 3 e 6 horas, como apresentado no experimento.

Com relação ao KRAFT a mortalidade não apresentou efeito linear, sendo a mortalidade apresentada pela “Média Campo” e pela “DL<sub>50</sub>” muito próximas, não correspondendo com a diferença de quase 300% entre as doses, ainda assim quando

observadas as Misturas, o aumento na dose presente de KRAFT elevou a mortalidade de maneira proporcional.

A amostra contaminada com SCORE, por outro lado, apresentou linearidade com relação à mortalidade, indicando que a exposição ao fungicida pode ter ligação direta com a mortalidade apresentada, bem como a dose de cada amostra, mesmo em período de exposição muito menor, como já apresentado.

## **5.2 Resposta ao início do teste e imobilização**

A primeira alteração observada na realização dos testes de locomoção se deu pelo fato de que certa porcentagem de abelhas não conseguiu iniciar o percurso da raia, permanecendo no local inicial de disparo, não respondendo ao efeito da luz, ou seja, não apresentando fototropismo positivo.

Todas as amostras contaminadas com KRAFT, SCORE e a mistura destes apresentaram imobilização, ou seja, alteração quanto a porcentagem de abelhas que não iniciaram o percurso, tendo o aumento da concentração do contaminante refletido diretamente nesse parâmetro.

Os dados obtidos com relação a imobilização foram reunidos na Tabela 10.

**Tabela 10.** Reação das abelhas ao início do teste e realização do percurso, por concentração de exposição.

Produto Utilizado	Descrição	Dose ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Abelhas que iniciaram o percurso (%)
<b>KRAFT 36 EC</b>	Controle limpo	-	94,12
	Controle (Água + Triton)	-	67,24
	DL <sub>50</sub>	0,05	45,84
	DL <sub>50</sub> /10	0,005	83,87
	Média Campo	0,0164	85,19
<b>SCORE 250 EC</b>	Controle (Água + Triton)	-	86
	DL <sub>50</sub>	9,6	78,26
	DL <sub>50</sub> /10	1	79,31
	Média Campo	0,127	93,34
<b>Mistura</b>	DL <sub>50</sub> /10 SCORE + DL <sub>50</sub> KRAFT	1 $\mu\text{g}$ Score + 0,05 $\mu\text{g}$ Kraft	75,86
	DL <sub>50</sub> /10 SCORE + Média Campo KRAFT	1 $\mu\text{g}$ Score + 0,0164 $\mu\text{g}$ Kraft	80,64

Fonte: Autor

Os controles descritos como “Água + Triton” representam a primeira sequência de testes realizada em cada dia e o aumento do número de abelhas que não iniciaram o percurso pode estar associado à estressores como movimentação e transporte da caixa com as gaiolas, bem como o menor intervalo, dentre todos os testes, entre a exposição e o teste de locomoção na raia. Neste momento é importante ressaltar que por motivos práticos não foi possível manter exato o intervalo entre contaminação e teste de locomoção na raia em todas as amostras, com a diferença variando entre 3 a 6 horas.

Em comparação ao “Controle limpo” em que nada foi aplicado às abelhas, todas as concentrações seguintes, incluindo as mais baixas, apresentaram uma diminuição da porcentagem de abelhas que efetivamente passaram pela raia, sendo que, quanto maior a concentração, menor a porcentagem de abelhas analisadas.

A lógica também se mantém com relação ao aumento das doses: quanto maior a concentração de agrotóxico utilizada, maior foi a porcentagem de abelhas que se mantiveram imóveis na área delimitada e não iniciaram o teste.

Entre si, as misturas seguiram o mesmo padrão. Apesar disso, quando comparadas às amostras apenas da diluição do KRAFT e do SCORE, apresentaram valores semelhantes.

Avaliando este parâmetro, a reação mais expressiva apresentada foi a da concentração de 0,05 µg i.a./µL de KRAFT (caracterizada como DL<sub>50</sub>), sendo a dose DL<sub>50</sub> do SCORE, apesar da diminuição de abelhas que iniciaram o percurso em quase 22%, nem tão sensível como os quase 55% apresentados pelo KRAFT.

Em teste semelhante, com uso de raia e influência de forte luminosidade, porém utilizando-se do inseticida Fipronil, Lourenço (2012) obteve também uma diminuição considerável do número de abelhas que não iniciaram o percurso, caracterizando tal imobilidade como efeito subletal sobre a capacidade locomotora e de orientação da abelha.

### **5.3 Teste de Locomoção**

Os seguintes parâmetros gerados pelo *software* SACAM foram utilizados para a análise dos efeitos na locomoção das abelhas: Velocidade, Distância Percorrida, Velocidade Angular e Tortuosidade.

Os parâmetros avaliados buscam refletir possíveis alterações no comportamento natural e mobilidade das abelhas bem como em sua orientação e espacialidade.

O parâmetro da tortuosidade, por exemplo, segundo Benhamou (2004), está diretamente ligado à eficiência do mecanismo de orientação, sendo seu caminho ideal o mais próximo de uma linha reta. Benhamou (2004) ainda liga tal parâmetro com atividades como navegação e procura de alimento. A tortuosidade como indicador da eficiência de localização está contida em uma escala de 0 a 1, sendo 1 o caminho ideal, a linha reta. O *software* SACAM gera dados de tortuosidade instantânea para

cada *frame* capturado, baseado no conjunto de frames anteriores, e também a média por objeto.

A velocidade angular, segundo Zeil et al. (1996), está intimamente ligada ao posicionamento da visão de abelhas e vespas, atuando na definição e manutenção de um ponto objetivo em seus campos focais direito e esquerdo e, portanto, ligado ao controle de voo e espacialidade.

A velocidade de voo também se mostra não só como um indicador de agitação das abelhas como também um indicador da eficiência do voo e forrageamento. Estudos indicam a correlação entre o aumento da eficiência de forrageamento com a diminuição da velocidade de voo, constatando-se que em um ambiente controlado, as abelhas possuem a capacidade de sacrificar a velocidade de modo a aumentar a eficácia de suas viagens (CHITTKA et al., 2003; SPAETHE et al., 2006).

Por fim, o parâmetro da Distância Percorrida em tempo determinado, no caso um minuto, foi utilizado de modo a observar não só a habilidade das abelhas em percorrer toda a estrutura como também se realizariam o caminho mais de uma vez, evidenciando possivelmente a capacidade locomotora, agitação e otimização do caminho realizado.

### 5.3.1 Contaminação por KRAFT 36 EC

A análise estatística dos dados gerados pelas amostras contaminadas com KRAFT pelo teste de Kruskal-Wallis não apontou diferença estatística significativa para os parâmetros de Velocidade Média ( $H = 5,057$ ,  $df = 4$  e  $p = 0,281$ ), Distância Percorrida ( $H = 4,54$ ,  $df = 4$  e  $p = 0,338$ ) e Tortuosidade ( $H = 6,585$ ,  $df = 4$  e  $p = 0,159$ ).

O parâmetro Velocidade Angular Média ( $H = 12,956$ ,  $df = 4$  e  $p = 0,0115$ ), sendo  $p < 0,05$ , apresentou diferença significativa. Foi possível constatar diferença entre as comparações “Controle (Água + Triton) e Controle Limpo” e entre o “Controle (Água + Triton) e Média Campo ( $0,0164 \mu\text{g i.a.}$ )”. Além disso, houve diferença significativa entre as amostras “DL<sub>50</sub> ( $0,05 \mu\text{g i.a.}$ ) e DL<sub>50</sub>/10 ( $0,005 \mu\text{g i.a.}$ )” e entre as amostras “DL<sub>50</sub>/10 ( $0,005 \mu\text{g i.a.}$ ) e Média Campo ( $0,0164 \mu\text{g i.a.}$ )”

O teste realizado com a contaminação com o pesticida KRAFT 36 EC foi também o teste em que se realizou a diferenciação entre um controle limpo, onde foi aplicada apenas a anestesia padrão com CO<sub>2</sub>, e um controle contaminado com

solução de água e Triton, seguindo as especificações dadas para seu uso como “*wetting agent*”.

Avaliando os dois testes controle, observou-se uma diferença percentual em todos os parâmetros analisados com exceção da tortuosidade e pelo teste de Kruskal-Wallis, diferença significativa quanto à Velocidade Angular Média.

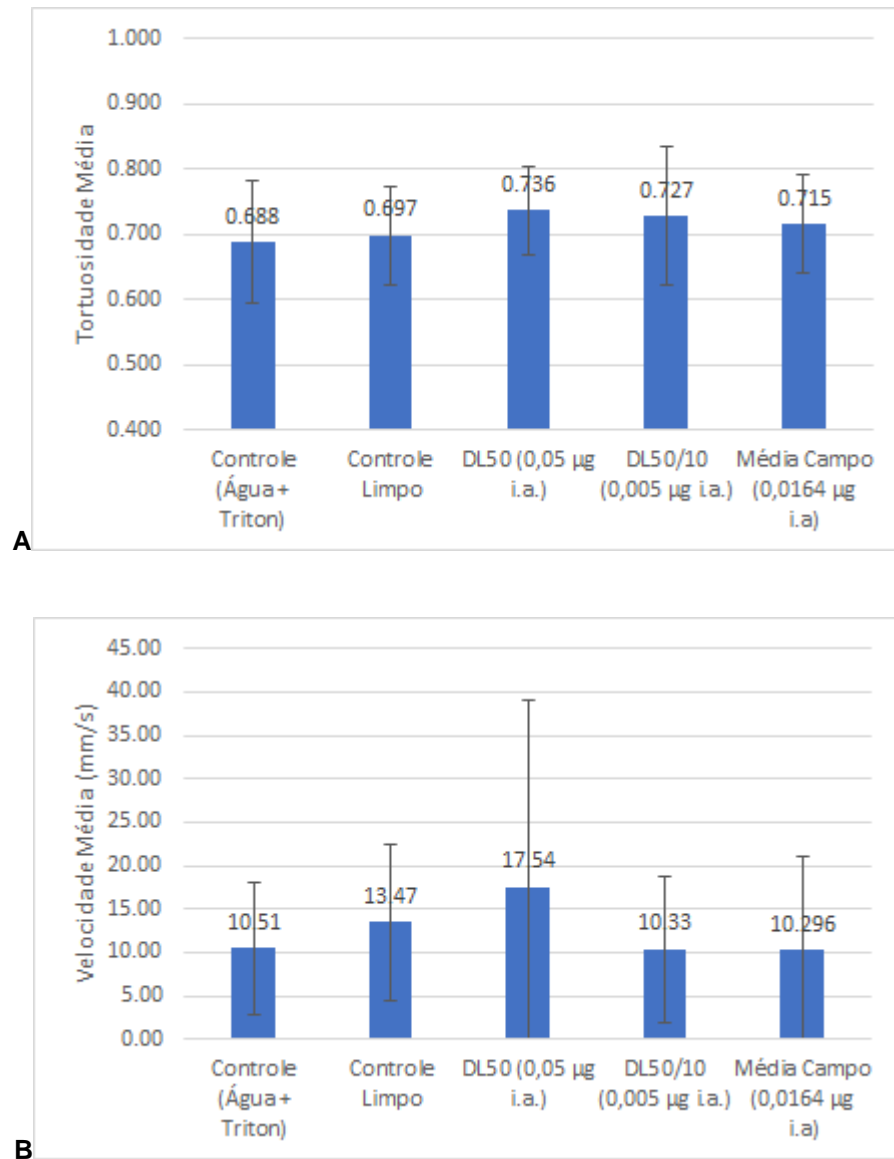
Neste caso, a Distância Média Percorrida e a Velocidade Média foram maiores no controle limpo, 28,21% e 18,4% respectivamente, enquanto em comparação, a Velocidade Angular Média foi aproximadamente 95% maior no controle com Triton. Tais dados podem sugerir uma diminuição de mobilidade ou maior desorientação na amostra tratada com a água e Triton.

Hassani et al. (2005) observou diferenças entre os resultados obtidos entre a aplicação oral e a aplicação tópica em abelhas *Apis mellifera* com fipronil, que em diferentes concentrações não apresentou alterações nas habilidade de locomoção das abelhas testadas, e sugere que a aplicação tópica por si só já provoca resultados como a diminuição na mobilidade das abelhas.

Em consideração aos resultados apresentados pelas diferenças dos controles, utilizou-se como controle comparativo em todos os testes seguintes apenas a amostra em que houve aplicação tópica, ou seja, o “Controle (Água + Triton)”.

Para as análises de diferença média dos parâmetros analisados, observou-se os dados representados nas Figuras 12(A), 12(B), 12(C) e 12(D).

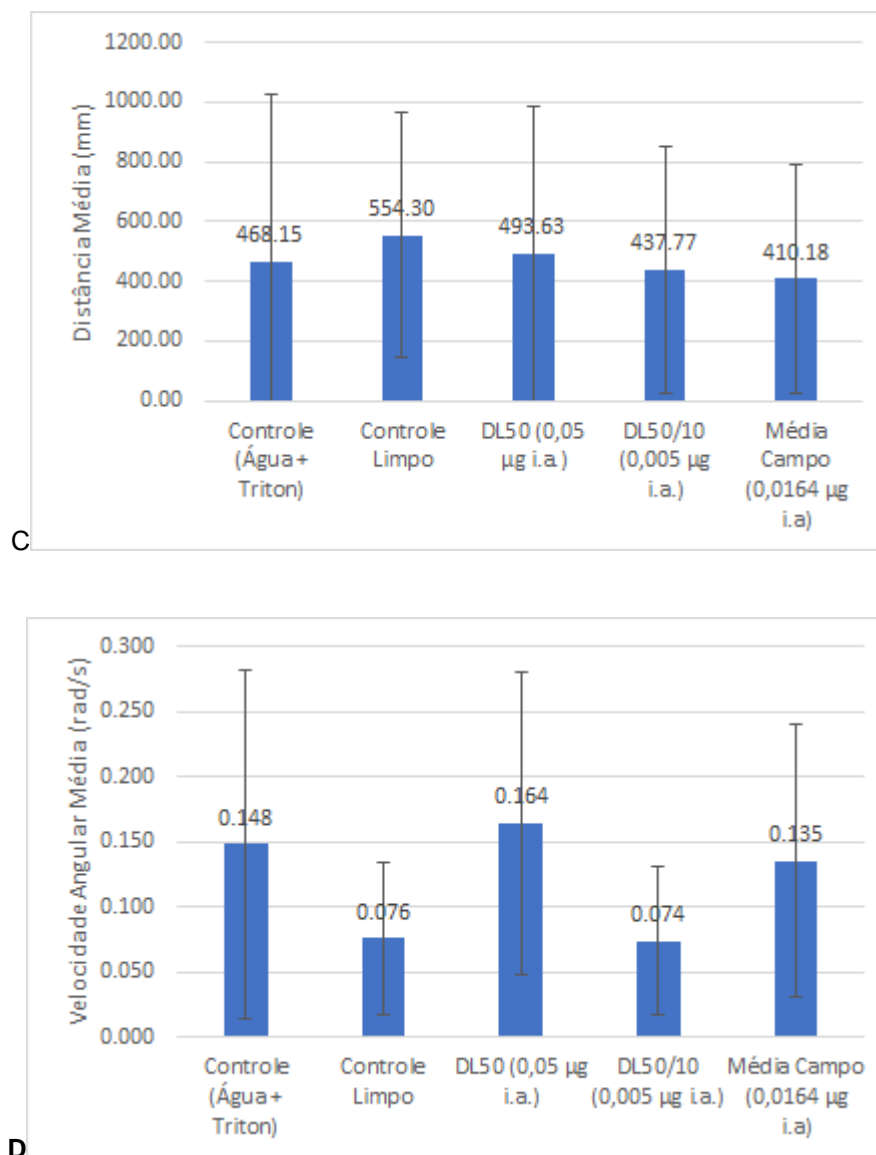
**Figura 12.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com KRAFT 36 EC segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor



**Figura 12.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com KRAFT 36 EC segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor

A análise dos dados médios em comparação apenas com o Controle (água + Triton) mostra que os maiores parâmetros alcançados estão nas amostras contaminadas com a maior concentração do agrotóxico em questão. Em comparação com o controle, a diferença entre a dose DL<sub>50</sub> (0,05 µg i.a.) foi de quase 67% com relação à Velocidade Média das amostras, de 5,44% com relação à Distância

percorrida Média e de aproximadamente 11% com relação à Velocidade Angular Média.

Comparando apenas as amostras contaminadas com o agrotóxico, a diferença entre as amostras de maior e de menor concentração foram de 69,7% para Velocidade Média, 12,7% para Distância Média e 122% para Velocidade Angular Média.

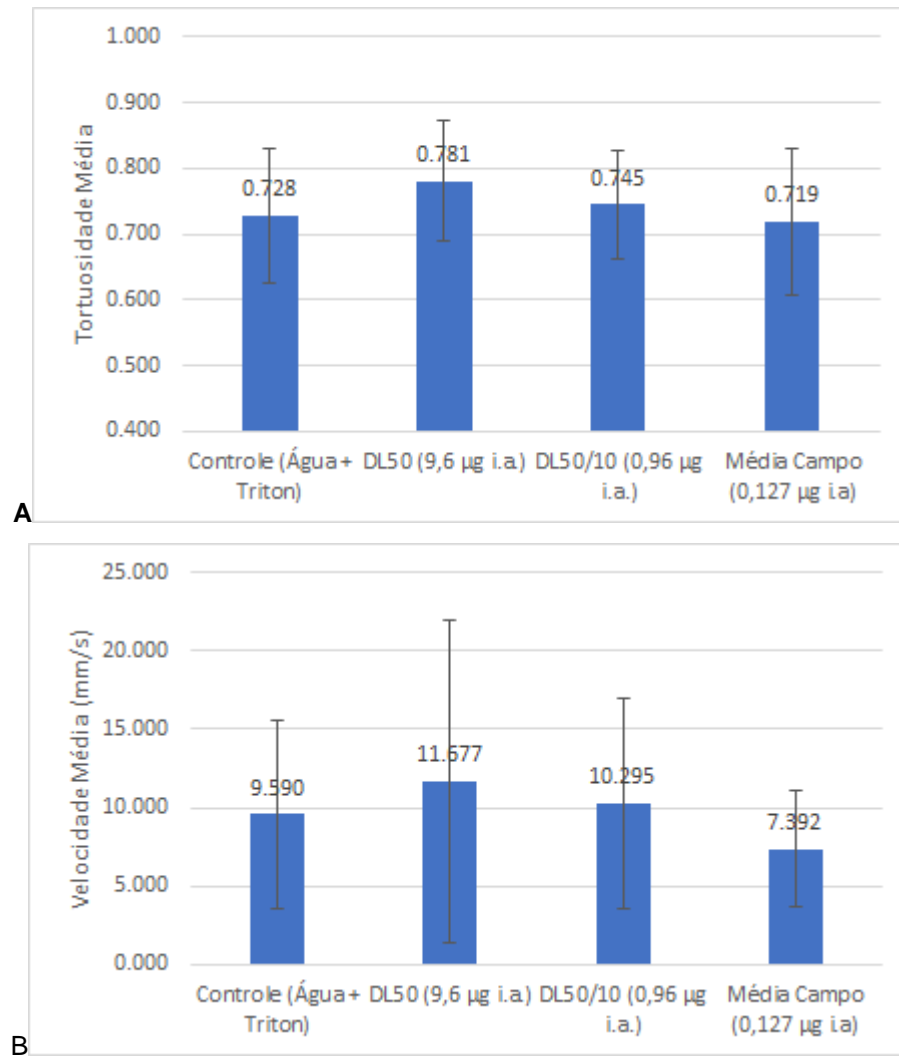
Ainda, é possível sugerir mudanças significativas nos padrões de locomoção causados pela presença do pesticida KRAFT, mudanças estas que estão relacionadas com as doses utilizadas. Hassani et al. (2005), em um estudo com Fipronil, de mecanismo de ação semelhante à Abamectina, de ação sobre o neurotransmissor inibitório GABA e sobre os canais de cloro dos receptores glutamato (GluCl) (BAI; OGBOURNE, 2016), sugere que efeitos não lineares de resposta à doses utilizadas, como ocorrido no experimento, podem ser um indicativo de ação nos diferentes receptores, com afinidades diferentes de acordo com a concentração utilizada ou então da ação de diferentes metabólitos do químico.

### **5.3.2 Contaminação por SCORE 250 EC**

A análise de todos os parâmetros pelo método de Kruskal-Wallis revelou uma diferença estatística não significativa entre os valores de Tortuosidade ( $H = 5,976$ ,  $df = 3$  e  $p = 0,113$ ), Velocidade Média ( $H = 2,481$ ,  $df = 3$  e  $p = 0,478$ ) e Distância Percorrida ( $H = 1,907$ ,  $df = 3$  e  $p = 0,592$ ).

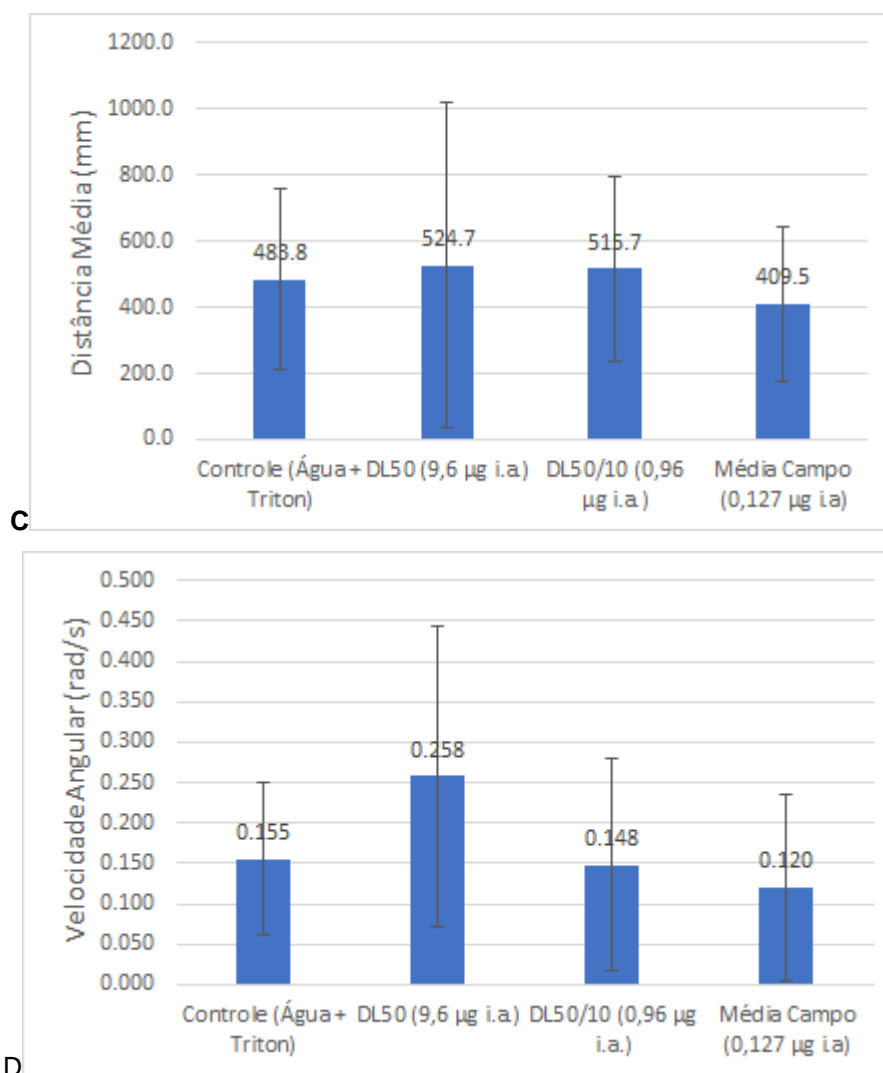
Apenas os valores da Velocidade Angular apresentaram relevância estatística ( $H = 10,324$ ,  $df = 3$  e  $p = 0,016$ ), no caso, quando comparadas as doses “DL<sub>50</sub> (9,6 µg i.a.) e DL<sub>50</sub>/10 (0,96 µg i.a.)” e entre “DL<sub>50</sub> (9,6 µg i.a.) e Média Campo (0,127 µg i.a.)”.

**Figura 13.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com SCORE 250 EC segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor

**Figura 13.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com SCORE 250 EC segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D)



Fonte: Autor

Observando as médias obtidas pelos dados gerados é possível observar um aumento de todos os parâmetros com o aumento da concentração do contaminante utilizado, ainda assim, a menor concentração, “Média Campo (0,127 µg i.a)”, apresentou resultados semelhantes ou inferiores nos parâmetros analisados em comparação com o controle.

Assim como no teste com o KRAFT, em comparação com as demais concentrações e controle, a amostra com as maiores alterações foi a de maior concentração, DL<sub>50</sub> (9,6 µg i.a.). Embora a tortuosidade não tenha apresentado diferenças muito significativas, na amostra a variação foi de aproximadamente 66%

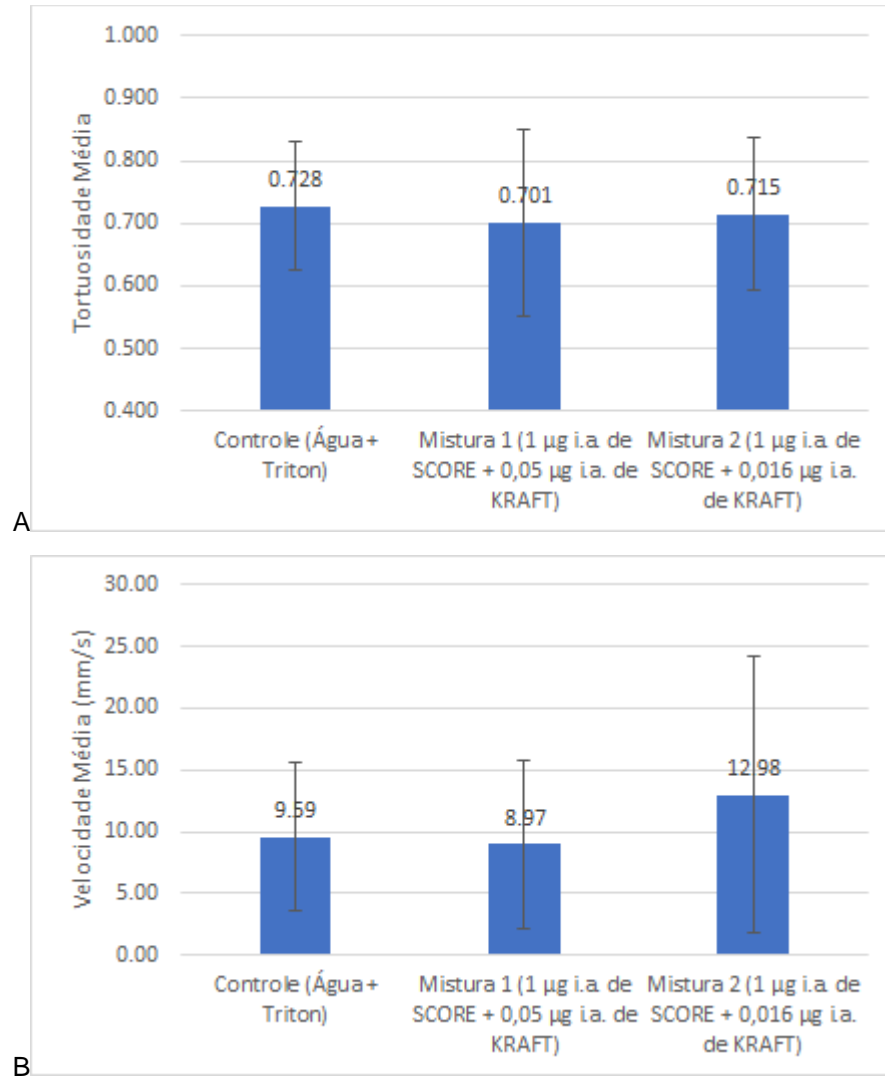
em comparação com a Velocidade Angular Média do controle e 21% em relação à Velocidade Média do controle. Os mesmos parâmetros em comparação com a amostra de menor concentração mostram diferenças ainda maiores, de 115% e 58% para Velocidade Angular Média e Velocidade Média, respectivamente.

As diferenças obtidas podem sugerir que o fungicida SCORE 250 EC em doses subletais pode causar alterações nos padrões de comportamento em abelhas *Melipona scutellaris*, alterações como aumento da agitação e alterações de localização e espacialidade, e também que doses mais baixas podem surtir pouco ou nenhum efeito na capacidade de locomoção das abelhas bem como podem ter efeito contrário às doses maiores, causando por exemplo, letargia às abelhas.

### 5.3.3 Misturas

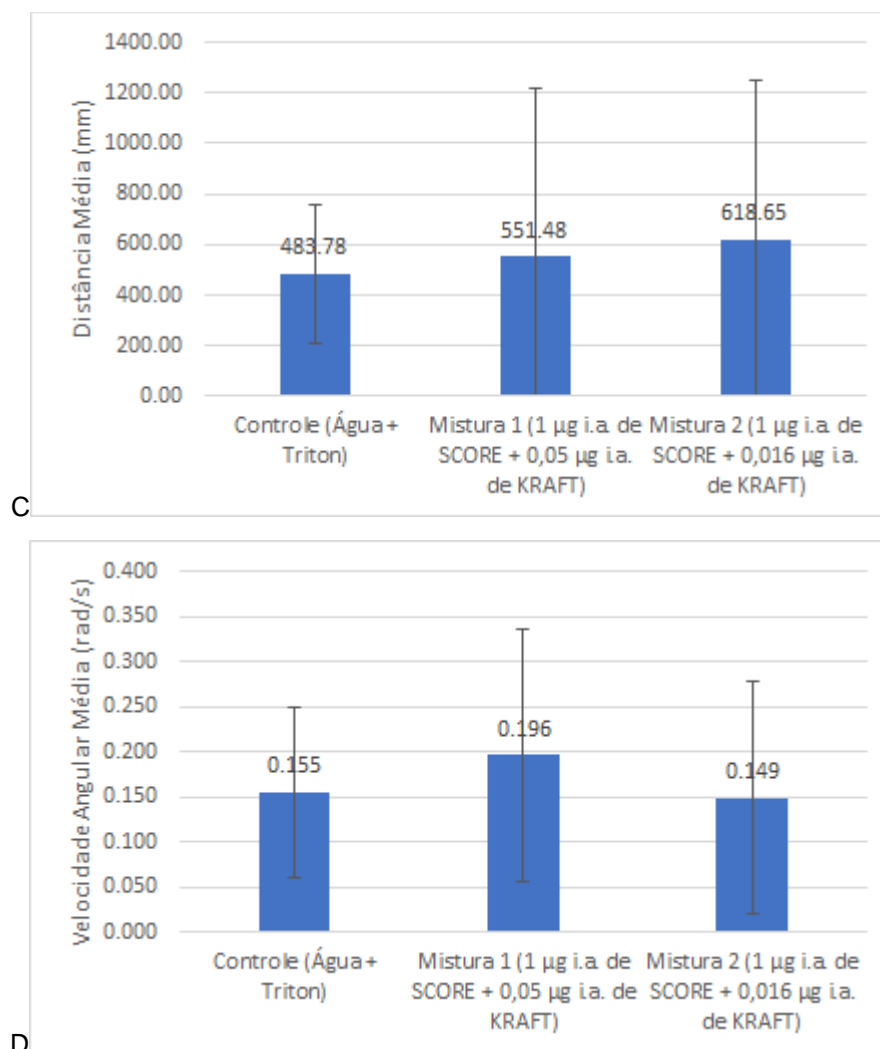
A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis realizada com as amostras de Mistura em comparação com o controle e as concentrações que compõem a mistura mostram que não houve diferença significativa com relação aos parâmetros de Tortuosidade ( $H = 0,585$ ,  $df = 5$  e  $p = 0,988$ ), Velocidade Média ( $H = 2,334$ ,  $df = 5$  e  $p = 0,801$ ) e Distância Percorrida ( $H = 2,805$ ,  $df = 5$  e  $p = 0,729$ ). O único parâmetro com diferença estatisticamente significativa foi a Velocidade Angular ( $H = 21,057$ ,  $df = 5$  e  $p = 0,00079$ ). Seguido pelo teste de Dunn, a diferença significativa foi encontrada entre a “Mistura 2 e a dose Média Campo ( $0,0164 \mu\text{g i.a}$ ) de KRAFT”, indicando que neste caso, o acréscimo de  $1 \mu\text{g i.a.}$  de SCORE pode ter contribuído para tal diferença.

**Figura 14.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com misturas de KRAFT 36 EC e SCORE 250 EC em comparação com o controle, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor

**Figura 14.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com misturas de KRAFT 36 EC e SCORE 250 EC em comparação com o controle, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor

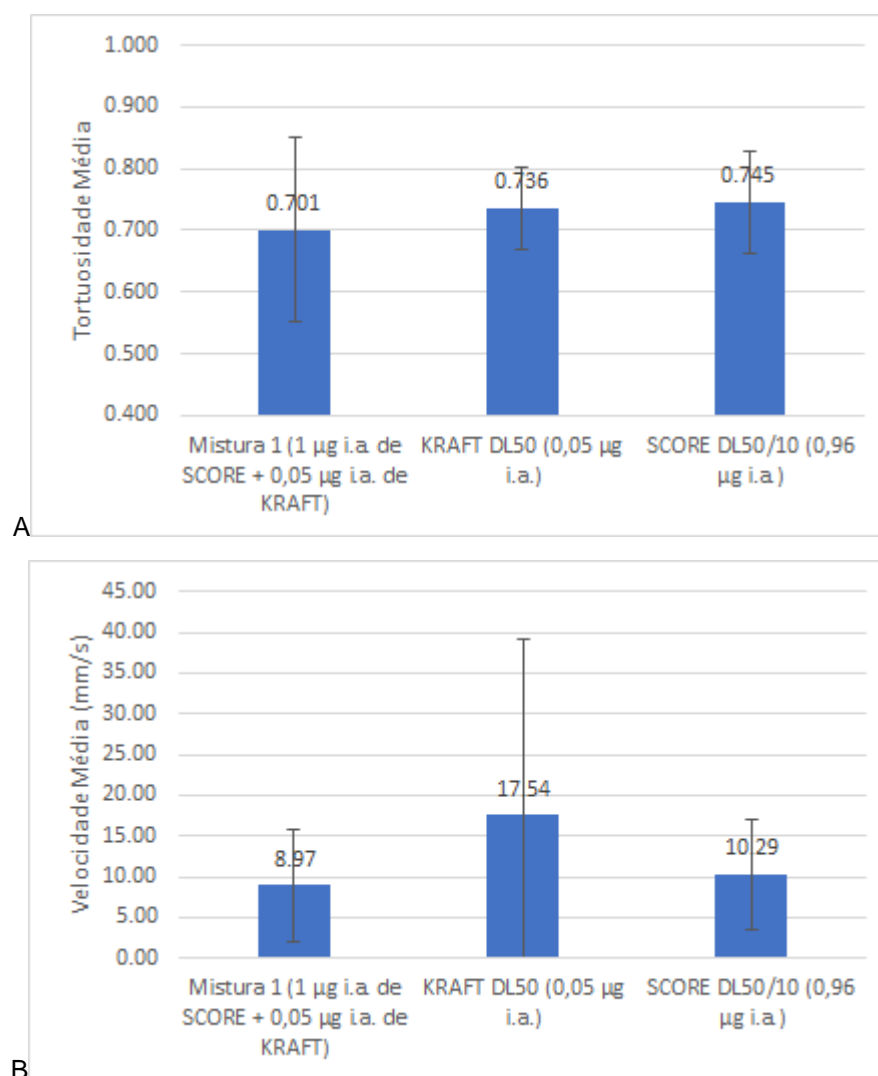
A análise das diferenças médias entre os parâmetros utilizados mostrou que em comparação ao controle, a Mistura 1 (1 µg i.a. de SCORE + 0,05 µg i.a. de KRAFT) apresentou uma diminuição de 3,65% em relação à Tortuosidade Média, uma diminuição de 6,44% em relação à Velocidade Média, um aumento de 14% em relação à Distância Percorrida Média e um aumento de 26,5% em relação à Velocidade Angular.

A comparação entre o controle com a amostra contaminada com a Mistura 2 (1 µg i.a. de SCORE + 0,016 µg i.a. de KRAFT) mostrou, em relação ao controle uma diminuição de 1,7% em relação à Tortuosidade Média, um aumento de 35,3% em

relação à Velocidade Média, uma diminuição de 4,2% em relação à Velocidade Angular Média e um aumento de 27,9% em relação à Distância Percorrida Média.

Assim, ambas as amostras se mostraram ligeiramente mais tortuosas (sendo 1 o caminho reto) e ambas apresentaram acréscimos consideráveis em relação à Distância Média Percorrida pelas amostras.

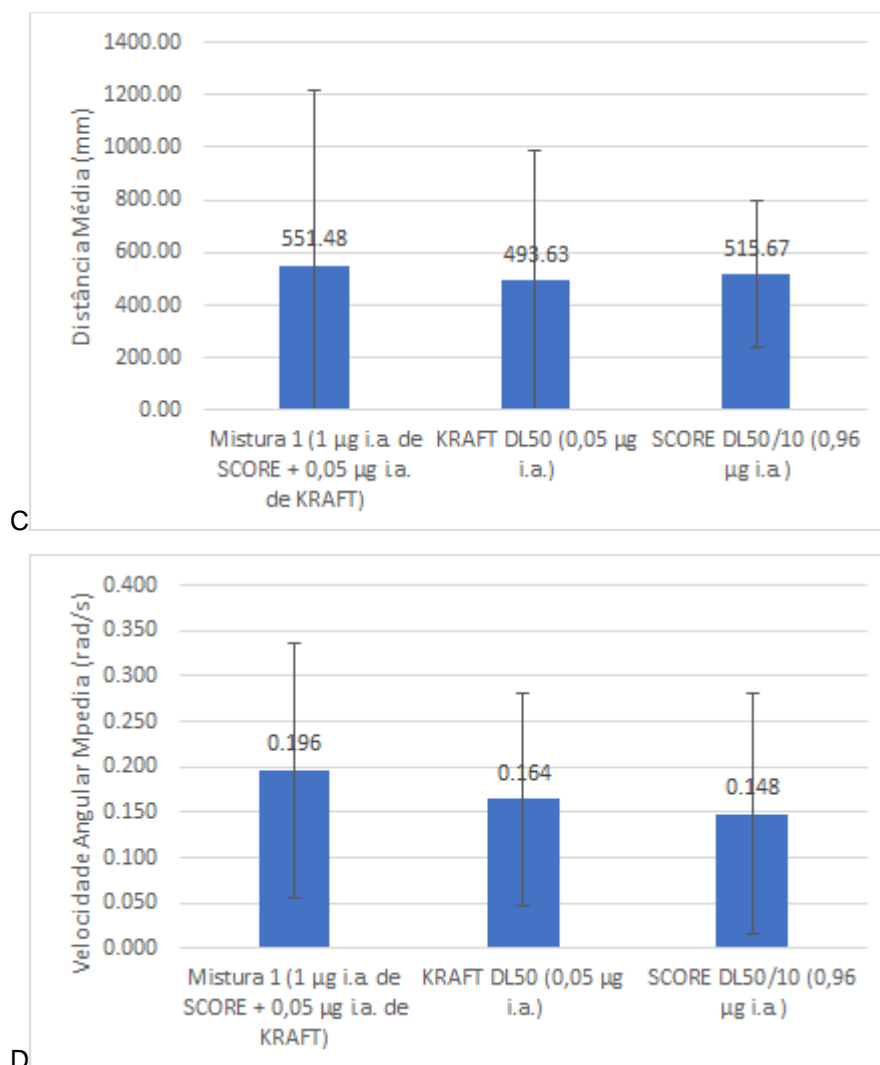
**Figura 15.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com a Mistura 1 em comparação com as amostra de KRAFT e SCORE isoladas, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor



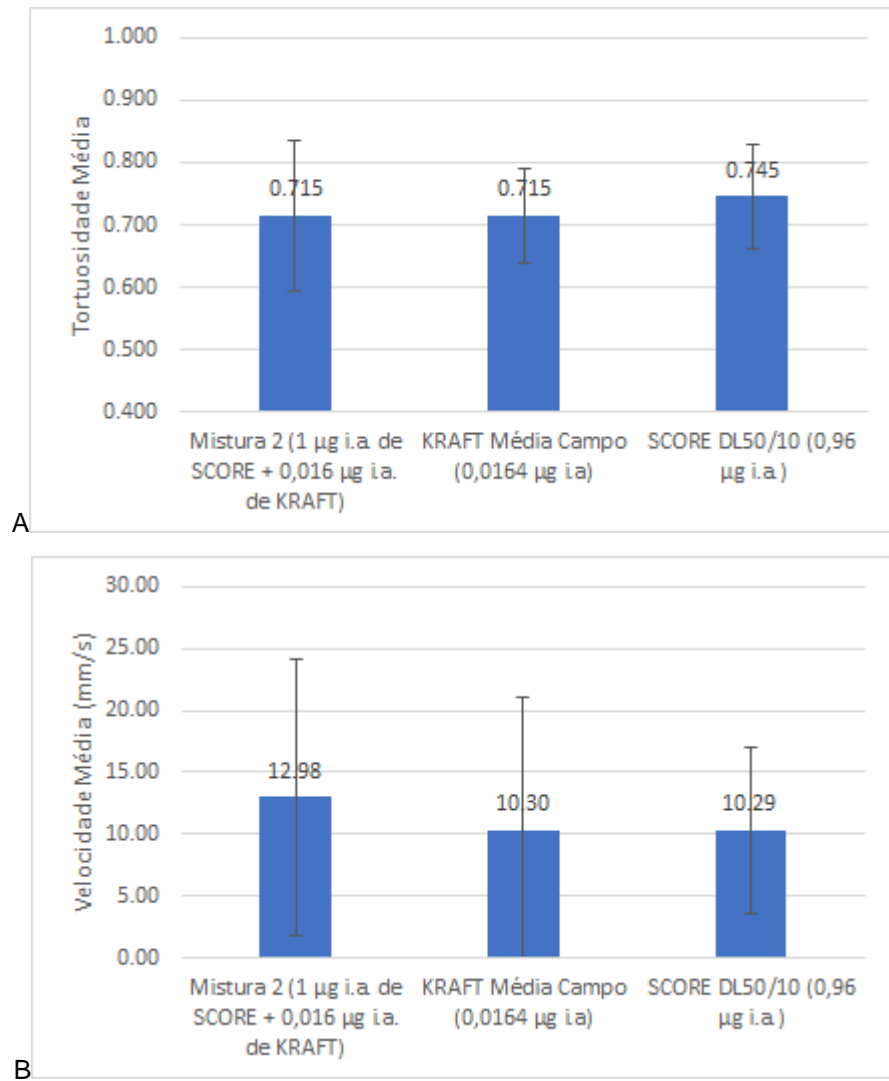
**Figura 15.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com a Mistura 1 em comparação com as amostras de KRAFT e SCORE isoladas, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor

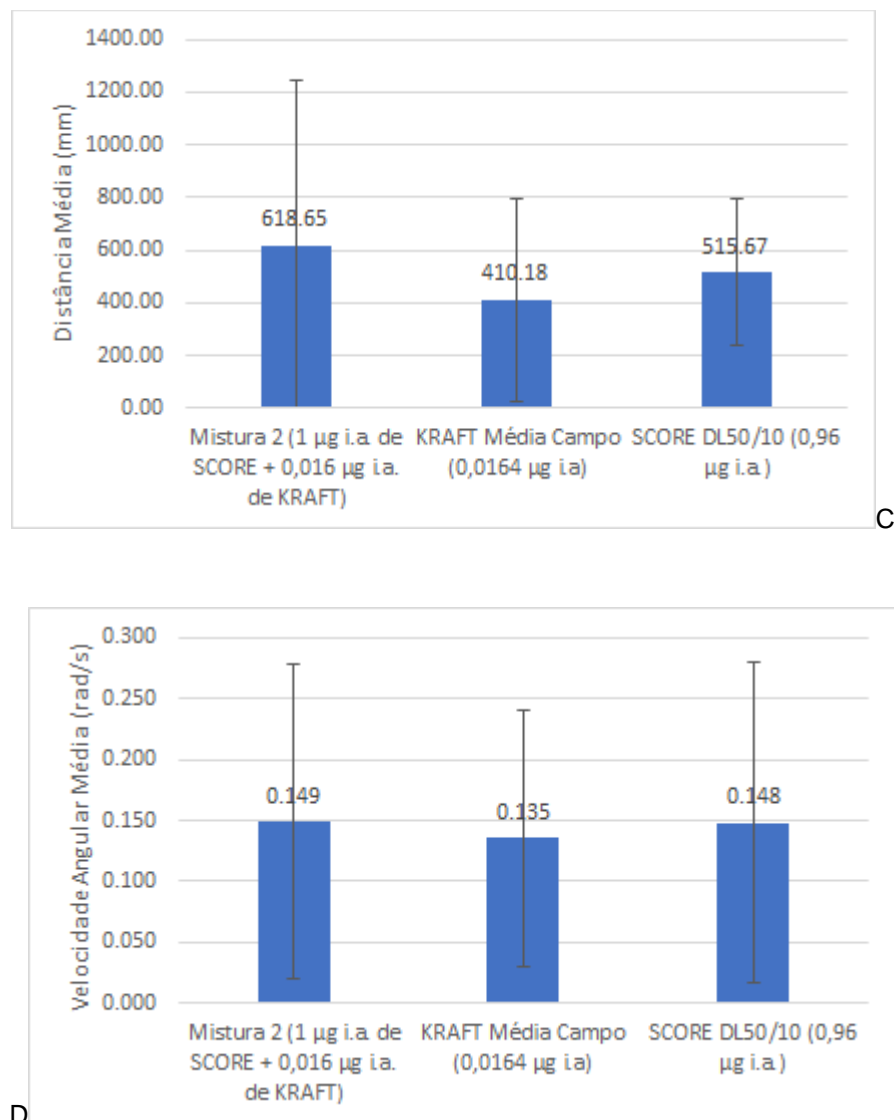
Comparando as médias das misturas com as amostras em que contaminou-se apenas com um tipo de agrotóxico foi possível observar que a amostra Mistura 1 apresentou o comportamento mais tortuoso, a menor Velocidade Média, a maior Distância Percorrida Média e a maior Velocidade Angular Média em relação às amostras contaminadas com os componentes separados da mistura nas mesmas concentrações.

**Figura 16.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com a Mistura 2 em comparação com as amostra de KRAFT e SCORE isoladas, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor

**Figura 16.** Resultados apresentados pelas amostras contaminadas com a Mistura 2 em comparação com as amostras de KRAFT e SCORE isoladas, segundo os parâmetros de Tortuosidade Média (A), Velocidade Média (mm/s) (B), Distância Média (mm) (C) e Velocidade Angular Média (rad/s) (D).



Fonte: Autor

Da Mistura 2, que mantém a mesma concentração de SCORE da Mistura 1, porém com a dose de campo referente ao KRAFT, esperava-se um efeito semelhante à Mistura 1 porém com menor intensidade devido à diminuição do KRAFT.

Em comparação com as amostras contaminadas pelos componentes separados das misturas foi possível observar que a Mistura 2 apresentou, quanto à tortuosidade, um valor equivalente ao observado na amostra contaminada apenas com o KRAFT e mais tortuoso que a contaminada apenas pelo SCORE, apresentou a maior Velocidade Média e a maior Distância Percorrida Média dentre os três valores

e também a maior Velocidade Angular Média, valor equivalente à apresentada pela amostra contaminada unicamente com SCORE.

Analisando os resultados obtidos pelas misturas é possível observar que, ainda que de maneira não linear e previsível, as amostras contaminadas com as Misturas apresentaram alterações consideráveis em comparação com o controle, mas principalmente em comparação com os componentes individuais dessas soluções. É possível sugerir que os agrotóxicos estudados KRAFT e SCORE possam atuar de maneira conjunta causando efeitos subletais ao comportamento da *Melipona scutellaris*.

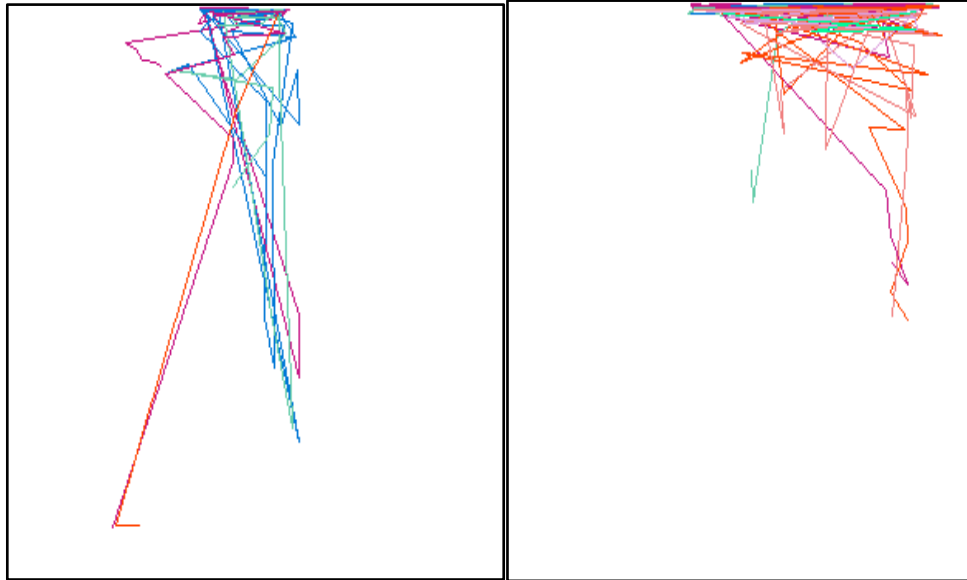
#### 5.4 SACAM

O software SACAM mostrou-se uma opção viável, sem custos, gerando dados complexos para análise e possível de ser utilizado na realização de testes semelhantes. Porém, fatores tais como a sensibilidade de detecção da câmera, a própria qualidade de imagem da câmera utilizada, bem como o nível de controle sobre o ambiente utilizado geraram muitos dados atribuídos a objetos duplicados, não existentes e indesejados, tais como sombras e reflexos na raia.

Tratando-se de um software que atua por meio de um “algoritmo de diferenças entre quadros sucessivos de vídeo, calculando-se o valor do tom de cinza médio numa janela de tamanho proporcional ao tamanho do inseto” tal mecanismo pode estar sujeito a falhas causadas pela planificação de um objeto 3D, variações de luminosidade e ruído de imagem e também da forma nem sempre constante do objeto, como abelhas que possuem corpo articulado, asas e patas, que se deslocam sem que o corpo necessariamente se desloque também (JORGE, 2011).

Foi possível observar também dificuldade na configuração utilizada como um todo, incluindo configurações dentro do software e hardware disponível, para identificar os objetos em velocidade muito elevadas ou quando as abelhas mudavam sucessivamente de posição, sendo filmadas de lado ao invés de filmadas pela parte de trás ou vice versa.

**Figura 17.** Exemplo de rotas “confusas” registrada pelo *software*. Nota-se que por interferência de reflexos, por exemplo, em alguns momentos a trajetória dos objetos, identificados por cores diferentes, se confunde.



Fonte: Autor

Tais interferências fazem com que a análise dos dados obtidos necessite de uma filtragem de modo a eliminar todos esses objetos não existentes, bem como os momentos em que as trajetórias se confundem, prejudicando muitas vezes a qualidade e exatidão dos dados obtidos e a reprodutibilidade do teste.

## 6. Conclusão

A junção de testes de toxicidade subletal com testes de mobilidade controlados, aliados à tecnologia de vídeo rastreamento possibilitou a geração de uma grande quantidade de dados e possíveis análises comportamentais.

A Raia, estrutura construída para os testes, apresentou boa usabilidade com abelhas do porte da *Melipona scutellaris*. Antes mesmo da utilização do *software* de detecção por imagem, a estrutura propiciou visualização sobre a diminuição à resposta ao início do teste, com abelhas mantendo-se imóveis e sem reação à luz, e que junto ao aumento da mortalidade pós-contaminação, revelaram possíveis efeitos negativos da ação de ambos os agrotóxicos testados.

Os dados gerados pelo SACAM, dentre todos os parâmetros utilizados, mostraram diferenças estatísticas relevantes apenas quanto à Velocidade Angular das amostras, parâmetro este ligado com a espacialidade e o posicionamento de visão das abelhas, e principalmente entre as amostras de diferentes concentrações e não em comparação com o controle, como esperado.

Mesmo sem diferenças estatísticas relevantes nos outros parâmetros, a análise dos dados médios possibilitou a observação de diferenças expressivas entre as amostras. A amostra contaminada com KRAFT em 0,05 µg i.a./ abelha apresentou uma Velocidade Média 67% superior à observada no controle e percorreu, em média, uma Distância 5,44% maior. A amostra contaminada com SCORE a 9,6 µg i.a./abelha apresentou um aumento de 66% na Velocidade Angular Média, em comparação com o controle e 21% superior com relação à Velocidade Média.

Apesar de grandes, as diferenças entre Controle e as maiores concentrações aplicadas, chamou atenção também, em alguns parâmetros, as diferenças ainda maiores entre as amostras contaminadas com as maiores e as menores concentrações, mostrando que existe a possibilidade de doses diferentes apresentarem efeitos subletais opostos.

Assim, é possível indicar a existência de efeitos subletais às abelhas *Melipona scutellaris* causados pelos agrotóxicos em estudo, inclusive com a ação conjunta deles em mistura. Na natureza, as diferenças apontadas pelos testes podem ser determinantes para a realização de atividades cotidianas, porém de vital importância para a espécie, como localização espacial e a capacidade de forragear.

Com relação ao *software* utilizado e sua validação, acredita-se que a ferramenta foi validada para este tipo de teste e os resultados apresentados mostraram-se eficientes para a análise, porém mudanças ainda podem ser feitas na estrutura do teste para que a qualidade dos dados apresentados pelo *software* aumente ainda mais, seja com a melhor adaptação do ambiente ou até de equipamento com melhor capacidade de processamento e resolução.

Sugere-se ainda que para resultados mais precisos e conclusivos, dentro da melhora da metodologia, que se aumente o número de amostras e concentrações utilizadas bem como a atenuação de fatores que neste caso foram inevitáveis, como o transporte das abelhas após a contaminação para um local diferente, a realização dos testes em dias separados devido à sua longa duração, respeitando também alterações comportamentais das abelhas ao longo de um dia, e também a influência das alterações de estresse e temperatura, na escala anual, como mudanças de estações, ou diária, como a variação ao longo de 24 horas.

## Referências

AKAKA, W. Hinano; HOUCK, Becky A.. The use of an ultrasonic monitor for recording locomotor activity. **Behavior Research Methods & Instrumentation**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 514-516, set. 1980. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.3758/bf03201825>.

ALIOUANE, Yassine et al. SUBCHRONIC EXPOSURE OF HONEYBEES TO SUBLETHAL DOSES OF PESTICIDES: EFFECTS ON BEHAVIOR. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.113-122, 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1897/08-110.1>.

ALKASSAB, Abdulrahim T.; KIRCHNER, Wolfgang H. Assessment of acute sublethal effects of clothianidin on motor function of honeybee workers using video-tracking analysis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 200-205, 2018.

ALMEIDA, Waldemar de; FIÚZA, José; MAGALHÃES, Cláudio Marques; JUNGER, Celso Merola. Agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 220-249, jun. 1985. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x1985000200008>.

ALVES, Rogério M.O.; CARVALHO, Carlos A.I.; SOUZA, Bruno A.; SANTOS, Wyratan S.. Areas of natural occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera Apidae) in the state of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 84, n. 3, p. 679-688, set. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0001-37652012000300010>.

ANVISA<sup>1</sup>. **Abamectina**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/A18%2B%2BAbamectina.pdf/77bf0354-9d40-40a2-bc14-4c6159385604>. Acesso em: 02 maio 2020.

ANVISA<sup>2</sup>. **Difenoconazol**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D36%2B-%2BDifenoconazol.pdf/fce161cd-d3d4-41b2-b4ff-53438306cf4d>. Acesso em: 02 maio 2020.

ASCOM/ANVISA. **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos**: Marco regulatório. 2019. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos-)



/219201/pop\_up?\_101\_INSTANCE\_FXrpx9%20qY7FbU\_viewMode=print&\_101\_INSTANCE\_FXrpx9qY7FbU\_languageld=en\_US. Acesso em: 1 maio 2020.

BAI, Shahla Hosseini; OGBOURNE, Steven. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. **Chemosphere**, [s.l.], v. 154, p. 204-214, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.113>.

BARBOSA, D. B.; CRUPINSKI, E. F.; SILVEIRA, R. N.; LIMBERGER, D. C. H. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 694-703, 30 dez. 2017.

BARFIELD, Ashley; BERGSTROM, John C.; FERREIRA, Susana. **An economic valuation of pollination services in Georgia**. 2012.

BARRIGOSI, José Alexandre Freitas. **Uso de Agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>. Acesso em: 1 maio 2020.

BENHAMOU, Simon. How to reliably estimate the tortuosity of an animal's path:: straightness, sinuosity, or fractal dimension?. **Journal of theoretical biology**, v. 229, n. 2, p. 209-220, 2004.

BLOOMQUIST, Jeffrey R.. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 54, n. 4, p. 145-156, 18 nov. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.10112>.

BOFF, Samuel; FRIEDEL, Anna; MUSSURY, Rosilda Mara; LENIS, Patricia Roseti; RAIZER, Josué. Changes in social behavior are induced by pesticide ingestion in a Neotropical stingless bee. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 164, p.548-553, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.061>.

BRADBEAR, Nicola. **Bees and their role in forest livelihoods : a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products**. Roma: Fao, 2009.

BRASIL. **Lei no 7.802, de 11 julho de 1989**. Disponível em:<[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.html](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.html)>. Acesso em: 29 mar. 2020.

BROMILOW, Richard H; A EVANS, Avis; NICHOLLS, Peter H. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. laboratory incubations. : 1. Laboratory incubations. **Pesticide Science**, [s.l.], v. 55, n. 12, p. 1129-1134, dez. 1999. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9063\(199912\)55:123.0.co;2-u](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9063(199912)55:123.0.co;2-u).

BROWN, Mark J.f.; PAXTON, Robert J.. The conservation of bees: a global perspective. **Apidologie**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.410-416, 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2009019>.

BRUNET, Johanne. **Pollinator Decline: Implications for Food Security & Environment**. 2019. Disponível em: <https://www.scientia.global/pollinator-decline-implications-for-food-security-environment/>. Acesso em: 3 mar. 2020.

CAETANO, L. D.; LAUMANN, R. A.; MORAES, M. C. B.; JORGE, L. A. C.; PALHARES, L. A.; BORGES, **SACAM: software para análises de comportamento de insetos**, ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 11., 2006, Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 154.

CARVALHO, Fernando P.. Pesticides, environment, and food safety. **Food And Energy Security**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 48-60, maio 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fes3.108>.

CHEMINOVA. **Kraft 36 EC: Bula**, 2020, São Paulo

CHITTKA, Lars; DYER, Adrian G.; BOCK, Fiola; DORNHAUS, Anna. Bees trade off foraging speed for accuracy. **Nature**, [s.l.], v. 424, n. 6947, p. 388-388, jul. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/424388a>.

CLARKE, Rex L.; SMITH, Robert F.; JUSTESEN, Don R.. An infrared device for detecting locomotor activity. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, [s.l.], v. 17, n. 5, p. 519-525, set. 1985. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.3758/bf03207645>.

EERAERTS, Maxime; SMAGGHE, Guy; MEEUS, Ivan. Bumble bee abundance and richness improves honey bee pollination behaviour in sweet cherry. **Basic And Applied Ecology**, [s.l.], v. 43, p. 27-33, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2019.11.004>.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance abamectin.** *Efsa Journal*, v. 14, n. 5, p. 1-24, maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4491>.

FAO<sup>1</sup>. **FAO's Global Action on Pollination Services for Sustainable Agriculture:** Tiny miracle workers. Disponível em: <http://www.fao.org/pollination/background/bees-and-other-pollinators/en/>. Acesso em: 3 fev. 2020.

FAO<sup>2</sup>. **FAOSTAT:** Pesticides Indicators. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>. Acesso em: 29 abr. 2020.

FAO<sup>3</sup> **Pollinators vital to our food supply under threat.** Disponível em: <http://www.fao.org/news/story/en/item/384726/icode/>. Acesso em: 02 out. 2020.

GALLAI, Nicola; SALLES, Jean-michel; SETTELE, Josef; VAISSIÈRE, Bernard E.. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, [s.l.], v. 68, n. 3, p. 810-821, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>.

GERENUTTI, Marli; SPINOSA, Helenice de Souza. Avermectinas: revisão do uso e da ação sobre o SNC. **Biotemas**, Florianópolis, v. 10, n. 2, p. 7-27, jan. 1997. ISSN 2175-7925. Disponível em: <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/22121>>. Acesso em: 01 maio 2020. doi:<https://doi.org/10.5007/%x>.

GOMES, Hiago de O.; MENEZES, Jorge Marcell C.; COSTA, José Galberto M. da; COUTINHO, Henrique Douglas M.; TEIXEIRA, Raimundo Nonato P.; NASCIMENTO, Ronaldo F. do. A socio-environmental perspective on pesticide use and food production. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 197, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110627>.

HASSANI, Abdessalam Kacimi et al. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 1, p. 30-39, 2005.

HOLSTEIN, Norbert; GOTTSCHLING, Marc. Flowers of *Halgania* (Ehretiaceae, Boraginales) are set up for being buzzed and the role of intertwining anther trichomes. **Flora**, [s.l.], v. 240, p. 7-15, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2017.12.005>.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2018. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 29 abr. 2020.

JACOB, Cynthia Renata de Oliveira; ZANARDI, Odimar Zanuzo; MALAQUIAS, José Bruno; SILVA, Carina Aparecida Souza; YAMAMOTO, Pedro Takao. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera Apidae). **Chemosphere**, [s.l.], v. 224, p.65-70, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.105>.

JORGE, Lúcio André de Castro. **Metodologia de fusão de vídeos e sons para monitoração de comportamento de insetos**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha urucu—biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte. **Fundação Acangaú**. 143p, 1996.

KERR, Warwick Estevam et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, v. 6, n. 12, p. 20-41, 2010.

KLEIN, Alexandra-maria; VAISSIÈRE, Bernard e; CANE, James H; STEFFAN-DEWENTER, Ingolf; A CUNNINGHAM, Saul; KREMEN, Claire; TSCHARNTKE, Teja. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 274, n. 1608, p. 303-313, 27 out. 2006. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.

LEWIS, Kathleen A. et al. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 22, n. 4, p. 1050-1064, 2016.

LOPES, Marcio; FERREIRA, João Batista; SANTOS, G. dos. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, n. 4, p. 1-3, 2005.

LOURENÇO, Clara Tavares. **Determinação da toxicidade tópica e oral do inseticida fipronil e efeitos de suas doses subletais no comportamento de abelhas sem ferrão**

**Melipona scutellaris (Latreille, 1811).** 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agricultura e Ambiente, Ufscar, Araras, 2012.

MARTIN, P. H.; UNWIN, D. M.. A microwave doppler radar activity monitor. **Behavior Research Methods & Instrumentation**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 517-520, set. 1980. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.3758/bf03201826>.

MEFTAUL, Islam Md; VENKATESWARLU, Kadiyala; DHARMARAJAN, Rajarathnam; ANNAMALAI, Prasath; MEGHARAJ, Mallavarapu. Pesticides in the urban environment: a potential threat that knocks at the door. : A potential threat that knocks at the door. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 711, p. 134612-134627, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134612>.

MINNICH, Dwight E.. **The relation of phototropism to swarming in the honey bee Apis Mellifera L. The Journal Physiology.** Cambridge, p. 1-10. abr. 1920.

MORAIS, Cássio Resende et al. Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). **Chemosphere**, v. 206, p. 632-642, 2018.

NADIA, Tarcila de Lima; MACHADO, Isabel Cristina. Polinização por vibração e sistema reprodutivo de duas espécies de Sauvagesia L. (Ochnaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 255-265, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-84042005000200006>.

NOGUEIRA-NETO, P. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**, São Paulo, SP: Chácaras e quintais, 1970, 365 p.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997, 445 p.

NOLDUS, Lucas P. J. J.; SPINK, Andrew J.; TEGELENBOSCH, Ruud A. J.. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. : A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 398-414, ago. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.3758/bf03195394>.

NOLDUS (org.). **About Noldus**. Disponível em: <https://www.noldus.com/about-noldus>. Acesso em: 21 maio 2020.

OECD. **Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test**: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: Oecd Publishing, Paris, 1998. 2 v.

OLIVEIRA, Renata Cabrera de; QUEIROZ, Sonia Claudia do Nascimento; LUZ, Cynthia Fernandes Pinto da; PORTO, Rafael Silveira; RATH, Susanne. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. **Chemosphere**, [s.l.], v. 163, p. 525-534, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.022>.

OSBORNE, Juliet L; WILLIAMS, Ingrid H; A CORBET, Sarah. Bees, Pollination and Habitat Change in the European Community. **Bee World**, [s.l.], v. 72, n. 3, p. 99-116, jan. 1991. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772x.1991.11099088>.

PAN, Xing-lu; DONG, Feng-shou; WU, Xiao-hu; XU, Jun; LIU, Xin-gang; ZHENG, Yong-quan. Progress of the discovery, application, and control technologies of chemical pesticides in China. **Journal Of Integrative Agriculture**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 840-853, abr. 2019. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119\(18\)61929-x](http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119(18)61929-x).

PEREIRA, Andriago Monroe. **EFEITOS DE INSETICIDAS NA SOBREVIVÊNCIA E NO COMPORTAMENTO DE ABELHAS**. 2010. 125 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Zoologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PHAM-DELEGUE, Minh-ha; DECOURTYE, Axel; KAISER, Laure; DEVILLERS, James. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, [s.l.], v. 33, n. 5, p. 425-432, set. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2002033>.

PIERCE, W. David; CHENEY, Carl D. **Behavior analysis and learning**. Psychology Press, 2013.

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, n.1, p.266-281, 2010. <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.16>.

PINHEIRO, Mardiore et al. Polinização por abelhas. In: RECH, André Rodrigo et al. **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. Cap. 9. p. 205-234.

PORRINI, Claudio et al. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. **Apiacta**, v. 38, n. 1, p. 63-70, 2003.

RIBEIRO DA SILVA, Agostinho e JORGE, Lucio. **AFSoft, GeoFielder e Sacam Desenvolvimento e aplicação de tecnologias**, 2010

RIGOTTO, Raquel Maria; VASCONCELOS, Dayse Paixão e; ROCHA, Mayara Melo. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 30, n. 7, p. 1360-1362, jul. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311xpe020714>.  
SÁNCHEZ-BAYO, Francisco; WYCKHUYS, Kris A.g.. Worldwide decline of the entomofauna: a review of its drivers. : A review of its drivers. **Biological Conservation**, [s.l.], v. 232, p. 8-27, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>.

SANTOS, Aline B. **Abelhas nativas: polinizadores em declínio**. Natureza Online, São Cristóvão, v. 3, n. 8, p.103-106, 2010.

SILVA, Marília; RAMALHO, Mauro; ROSA, Jaqueline F. Por que *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) forrageia sob alta umidade relativa do ar? **Iheringia. Série Zoologia**, [s.l.], v. 101, n. 1-2, p. 131-137, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0073-47212011000100019>.

ŠKERL, Maja Ivana Smodiš; BOLTA, Špela Velikonja; ČESNIK, Helena Baša; GREGORC, Aleš. Residues of Pesticides in Honeybee (*Apis mellifera carnica*) Bee Bread and in Pollen Loads from Treated Apple Orchards. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 374-377, 12 maio 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-009-9762-0>.

SOUTHWICK, Edward E.; SOUTHWICK, Lawrence. Estimating the Economic Value of Honey Bees (Hymenoptera: apidae) as agricultural pollinators in the United States. : Apidae) as Agricultural Pollinators in the United States. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 85, n. 3, p. 621-633, 1 jun. 1992. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jee/85.3.621>.

SPAETHE, J.; CHITTKA, L.; SKORUPSKI, P. Visual search and decision making in bees: time, speed and accuracy. **International Journal of Comparative Psychology**, 2006.

SYNGENTA GLOBAL. **Score250EC**. Disponível em: <https://tinyurl.com/y8yam5pp>. Acesso em: 13 maio 2020.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. e MURPHY, A., 2015. **Plant Physiology**. 2ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

UN (org.). **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**. 2015. Disponível em: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>. Acesso em: 05 fev. 2020.

VANENGELSDORP, Dennis et al. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. : A Descriptive Study. **Plos One**, [s.l.], v. 4, n. 8, p. 1-41, 3 ago. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.

VENTURIERI, Giorgio Cristino. **Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. 2. ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 60 p.

VIANA, B.F. **Exemplos regionais de animais: Melipona scutellaris**. Projeto Qualibio. Disponível em: <<http://www.qualibio.ufba.br/063.html>>. Acesso em: 5 mai. 2020.

WANG, Chun; WU, Qihua; WU, Chunxia; WANG, Zhi. Application of dispersion–solidification liquid–liquid microextraction for the determination of triazole fungicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 185, n. 1, p. 71-76, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.124>.

WATANABE, M. E.. Pollination Worries Rise As Honey Bees Decline. **Science**, [s.l.], v. 265, n. 5176, p. 1170-1170, 26 ago. 1994. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.265.5176.1170>.

WINFREE, Rachael; GROSS, Brian J.; KREMEN, Claire. Valuing pollination services to agriculture. **Ecological Economics**, [s.l.], v. 71, p. 80-88, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolecon.2011.08.001>.



WISLOCKI, P. G.; GROSSO, L. S.; DYBAS, R. A.. Environmental Aspects of Abamectin Use in Crop Protection. **Ivermectin And Abamectin**, [s.l.], p. 182-200, 1989. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-3626-9\\_13](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-3626-9_13).

WOLF, Ernst; ZERRAHN-WOLF, Gertrud. **THE EFFECT OF LIGHT INTENSITY, AREA, AND FLICKER FREQUENCY ON THE VISUAL REACTIONS OF THE HONEY BEE**. The Journal Of General Physiology. Cambridge, p. 853-863. dez. 1934.

WU-SMART, Judy; SPIVAK, Marla. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep32108>.

ZEIL, Jochen; KELBER, Almut; VOSS, Rüdiger. Structure and function of learning flights in ground-nesting bees and wasps. **Journal of Experimental Biology**, v. 199, n. 1, p. 245-252, 1996.

## Apêndice

### Resultados obtidos pelo SACAM no teste com KRAFT 36 EC

	Controle (Água + Triton)	Controle Limpo	DL50 (0,05 µg i.a.)	DL50/10 (0,005 µg i.a.)	Média Campo (0,0164 µg i.a)
Tortuosidade Média	0.68752922	0.69749096	0.73626555	0.72738466	0.71473443
Desv. Padrão da Amostra	0.09436405	0.0740414	0.06703117	0.10579516	0.07542484
Velocidade Média (mm/s)	10.50554821	13.46981827	17.53870798	10.33319384	10.29570321
Desv. Padrão da Amostra	7.64822771	8.93292495	21.50906327	8.47544182	10.70291132
Distância Média (mm)	468.148718	554.3044546	493.6345455	437.7706364	410.1815652
Desv. Padrão da Amostra	559.7756294	408.7176173	494.7609067	414.0579475	383.9830735
Velocidade Angular Média (rad/s)	0.14812162	0.07579339	0.16417508	0.07391262	0.1351871
Desv. Padrão da Amostra	0.13396018	0.05786691	0.11663736	0.05718602	0.10447206

Fonte: Autor

## Resultados obtidos pelo SACAM no teste com SCORE 250 EC

Teste SCORE 250 EC	Controle (Água + Triton)	DL50 (9,6 µg i.a.)	DL50/10 (0,96 µg i.a.)	Média Campo (0,127 µg i.a)
Tortuosidade Média	0.7275320	0.7806897	0.7451378	0.7185951
Desv. Padrão da Amostra	0.1018500	0.0912374	0.0826904	0.1120146
Velocidade Média (mm/s)	9.5899962	11.6767139	10.2949624	7.3920043
Desv. Padrão da Amostra	6.0080456	10.3256472	6.7304232	3.7302673
Distância Média (mm)	483.7817955	524.6676111	515.6656190	409.5055357
Desv. Padrão da Amostra	274.8472122	491.7172897	279.6921449	234.9960147
Velocidade Angular Média (rad/s)	0.1553191	0.2579069	0.1483085	0.1199071
Desv. Padrão da Amostra	0.0938252	0.1859217	0.1318056	0.1150292

Fonte: Autor

## Resultados obtidos pelo SACAM no teste com misturas entre KRAFT 36 EC e SCORE 250 EC

TESTE MISTURAS	Mistura 1 (1 µg i.a. de SCORE + 0,05 µg i.a. de KRAFT)	Mistura 2 (1 µg i.a. de SCORE + 0,016 µg i.a. de KRAFT)
Tortuosidade Média	0.7009727	0.7150191
Desv. Padrão da Amostra	0.1494622	0.1206599
Velocidade Média (mm/s)	8.9721759	12.9759707
Desv. Padrão da Amostra	6.8724124	11.1629693
Distância Média (mm)	551.4771200	618.6521538
Desv. Padrão da Amostra	667.4225418	628.9606106
Velocidade Angular Média (rad/s)	0.1964900	0.1488198
Desv. Padrão da Amostra	0.1399581	0.1284937

Fonte: Autor

