

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

IVENS VINÍCIUS DE MATOS

**BIOENSAIO DE TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO (N-
(PHOSPHONOMETHYL)GLYCINE) PARA ABELHA NATIVA SEM FERRÃO**
Melipona quadrifasciata quadrifasciata (Lepelletier 1836) (Meliponinae, Apidae)

CAMPO MOURÃO

2020

IVENS VINÍCIUS DE MATOS

**BIOENSAIO DE TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO (N-
(PHOSPHONOMETHYL)GLYCINE) PARA ABELHA NATIVA SEM FERRÃO**
Melipona quadrifasciata quadrifasciata (Lepeletier 1836) (Meliponinae, Apidae)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC 2), do curso de Engenharia Ambiental, do Departamento Acadêmico de Ambiental (DAAMB), do Câmpus Campo Mourão, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito parcial para obtenção de título de bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof. Dr. Débora Cristina Souza

CAMPO MOURÃO

2020



Ministério da Educação
**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ**
Câmpus Campo Mourão
Coordenação de Engenharia Ambiental – COEAM



**TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
INTITULADO**

**BIOENSAIO DE TOXICIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO (N-
(PHOSPHONOMETHYL)GLYCINE) PARA ABELHA NATIVA SEM FERRÃO
Melipona quadrifasciata quadrifasciata (Lepeletier 1836) (Meliponinae,
Apidae).**

DO DISCENTE

Ivens Vinícius de Matos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no dia 01 de dezembro de 2020 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Campo Mourão. O acadêmico foi arguido pela Comissão Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a comissão considerou o trabalho aprovado.

Avaliador 1 - Prof. Dr. Paulo Agenor Alves

Avaliador 2 - Prof. Dra. Raquel de Oliveira Bueno

Orientadora - Prof. Dr^a. Débora Cristina Souza

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, meus pais, **Solange Panato** e **Bernardo Luis Semedo de Matos**, pelo incentivo e, acima de tudo, pelo amor incondicional e conselhos durante toda minha vida, sem vocês nada seria possível. Quero sempre encher de orgulho e dar o meu melhor. A vocês meu amor eterno e gratidão! Vocês são meu exemplo.

As minhas irmãs **Heloisa Panato Rocateli** e **Juliane de Matos**, pela verdadeira amizade, por todo amor e companheirismo e momentos bons. Desejo a vocês, todo sucesso do mundo.

Ao meu sobrinho **Raul de Matos Godoy**, que me desperta os sentimentos mais puros e mesmo sem muito saber disso, e por existir, me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradeço imensamente à minha orientadora e amiga **Prof. Dra. Débora Cristina Souza** pelo acolhimento, sabedoria e orientação nesse trabalho. E em especial a minha amiga e **Prof. Dra. Elizabete Satsuki Sekine** por todos os ensinamentos, orientações, conselhos e paciência. Vocês são meu exemplo de profissionalismo.

Aos membros da comissão examinadora **Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno** e **Prof. Dra. Raquel de Oliveira Bueno**, pela disponibilidade para a leitura deste trabalho, bem como pelas relevantes sugestões.

Aos amigos e companheiros de graduação, pela amizade, companheirismo, atenção, ajuda e é claro por todas as nossas confraternizações.

A **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, UTFPR, campus Campo Mourão pela oportunidade de estudar em um curso de excelência. A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram nos acontecimentos desta pesquisa e contribuíram para conclusão desse curso.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Entrada do ninho de <i>Melipona quadrifasciata quadrifasciata</i> (Mandaçaia), no meliponário residencial na cidade de Campo Mourão, Paraná.	15
Figura 2: Mapa de localização do Meliponário Residencial no município de Campo Mourão-PR.	17
Figura 3: Abelha operária de <i>M. quadrifasciata</i> se alimentando com a solução 50% sacarose e 27,93 ug de glifosato	21
Figura 4: Coleta da abelha sem ferrão <i>M. quadrifasciata</i> para realização dos testes de Dose média letal (DL50) e atividade de locomoção no meliponário residencial na cidade de Campo Mourão, Paraná..	19
Figura 5: Caixa utilizada para teste de atividade de locomoção. L= lâmpada fluorescente; T= tela de nylon; R= raias; E= entrada.....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
3.1	OBJETIVO GERAL	12
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4	REVISÃO DE LITERATURA	13
4.1	Herbicida Glifosato [N-(fosfonometil) glicina].....	13
4.2	Abelha (Apidae, Meliponinae).....	14
4.3	Melipona quadrifasciata quadrifasciata(Lepeletier 1836) (Mandaçaia)	14
5	MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1	Local do Experimento	17
5.2	Amostragem de abelhas.....	18
5.3	Teste de dose média letal (DL ₅₀) via oral	18
5.4	Teste de atividade de locomoção	20
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
	REFERÊNCIAS	27

RESUMO

MATOS, I. V. **Bioensaio de toxicidade do herbicida Glifosato (n-(phosphonomethyl)glycine) para abelha nativa sem ferrão *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (lepeletier 1836) (Meliponinae, apidae).** 2020, 27p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado Engenharia Ambiental) – Coordenação de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão – PR.

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo herbicidas, inseticidas, fungicidas e acaricidas os mais utilizados na agricultura. A extensa área de plantio no Brasil proporcionou que o país fosse o maior consumidor de agrotóxicos no mundo. Neste contexto, objetiva-se verificar a Dose Letal (DL₅₀) do herbicida Glifosato em abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* e seu efeito sobre a atividade de locomoção. As abelhas operárias foram capturadas com gaiola de madeira colocada na saída da caixa ninho de um meliponário. Para o teste DL₅₀ foi feita uma repetição, utilizando 27,93 µg/abelha por ingestão oral ao herbicida Glifosato diluído em solução de sacarose 50%. Outra solução não contendo o herbicida foi feita para testar o grupo controle. No teste de DL₅₀ não houve mortalidade após o período de 24h horas nos dois grupos. Observou-se maior agitação nas abelhas do grupo contaminado comparado ao grupo controle. O teste de atividade de locomoção não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos, embora tenha-se observado que as abelhas que ingeriram o herbicida foram mais estimuladas pela luz e se locomoveram mais rápido na pista. Dessa maneira, conclui-se que o herbicida avaliado nessa pesquisa pode ser considerado tóxico na concentração utilizada.

Palavras-chave: Abelhas; Agrotóxicos; Atividade de Locomoção; Dose Letal.

ABSTRACT

MATOS, I. V. **Bioassay toxicity of the herbicide Glyphosate (n-phosphonomethyl) glycine) to native stingless bee *Melípona quadrifasciata quadrifasciata* (lepeletier 1836) (Meliponinae, apidae).** 2020, 27p. Completion of course work (Bachelor's degree of Environmental Engineering) Environmental Engineering Coordination, Federal University of Technology – Paraná, Campus Campo Mourão – PR.

Due to the extensive planting area, Brazil has become the world's largest consumer of pesticides, with herbicides, insecticides, fungicides and acaricides being the most used in agriculture. The objective of this study was to verify the Lethal Dose (LD50) of the herbicide Glyphosate in worker bees of *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and its effect on locomotion activity. Worker bees were captured with a wooden cage placed at the exit of a meliponary's nest box. In the DL50 test, 27.93 µg / bee was used by oral ingestion of the herbicide Glyphosate diluted in 50% sucrose solution. Another solution without the herbicide was used to test the control group. In this test, there was no mortality after the 24-hour period in both groups. Greater agitation was observed in the bees in the contaminated group compared to the control group. The locomotion activity test showed no significant differences between the two groups, although it was confirmed that the bees that ingested the herbicide were more stimulated by light and moved faster on the track. Thus, it is concluded that the herbicide evaluated in this research was considered toxic in the concentration used.

Keywords: Bees; Pesticides; Locomotor Activity; Lethal Dose.

1 INTRODUÇÃO

O serviço ecológico realizado pelas abelhas é essencial para a manutenção da diversidade vegetal e da flora nativa, e indiretamente, da fauna que dela se beneficia. Dessa forma uma maior oferta de sítios de nidificação para as abelhas sem ferrão, contribui diretamente para a conservação da fauna e da flora, que, em conjunto com outros seres vivos, mantêm o nosso planeta em equilíbrio (SILVA, PAZ, 2012).

Todas as vezes que ações humanas levam à simplificação biológica, como a supressão vegetal ou operações da agricultura como a aplicação de pesticidas ou aração, serviços ecológicos são perdidos e os custos econômicos e ambientais são enormes (Altieri, 1994; Andow, 1991).

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo herbicidas, inseticidas, fungicidas e acaricidas os mais utilizados na agricultura (JARDIM; ANDRADE, 2009). A extensa área de plantio no Brasil proporcionou que o país fosse o maior consumidor de agrotóxicos no mundo. (PIGNATI *et al.*, 2017).

Um dos fatores que ameaçam a abundância, a diversidade, a saúde dos polinizadores e, conseqüentemente, a provisão do serviço de polinização – além do uso da terra, da poluição, da invasão por espécies exóticas e das mudanças climáticas – é o uso de agrotóxicos. A agricultura brasileira é atualmente baseada no uso intensivo desses insumos (PIRES, SOARES, 2018).

O néctar coletado é transportado na vesícula melífera do inseto, processado pelas abelhas antes de se tornar mel e ser armazenado nos favos (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014), ou seja, a exposição das abelhas aos agrotóxicos ocorre por meio de contato direto, durante a coleta no campo ou na colônia por meio dos recursos armazenados, ou pela ingestão do néctar, mel e pólen com contaminantes. Todo esse processo leva a contaminação dos produtos apícolas e perturbações ou morte da colônia (FREITAS; PINHEIRO, 2012).

Segundo Malaspina (1979), os inseticidas podem afetar as abelhas por três vias principais de intoxicação: por contato, ingestão ou fumigação, e seus efeitos variam de acordo com as doses e concentrações utilizadas, tempo de exposição, dentre outras características.

Para a avaliação dos efeitos dos agrotóxicos em abelhas é verificando os efeitos dos inseticidas sobre o comportamento das abelhas e a análise da atividade locomotora. Autores tem utilizado a habilidade destes insetos de se orientarem à uma fonte luminosa, para avaliar os efeitos dos inseticidas sobre a locomoção e também para examinar o tempo que as abelhas levam para se deslocar em um determinado percurso (LAMBIN et al., 2001, EL HASSANI et al., 2008, ALIOUANE et al., 2009).

Para Imperatriz-Fonseca (2012) verificar o potencial de risco da exposição das abelhas aos defensivos agrícolas, compreender como esses organismos reagem às intoxicações com doses subletais pode nos ajudar a identificar os primeiros sintomas do processo de intoxicação e propor medidas mitigatórias, diminuindo o impacto sobre as abelhas e o ambiente.

Uma forma de avaliar a toxicidade de determinadas substâncias às abelhas é por meio da determinação da dose letal média capaz de exterminar 50% de uma população, a DL50 (PEREIRA, 2010). Protocolos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, OECD (1998) apresentam métodos oficiais de condução desses testes, nos quais agrotóxicos podem ser aplicados de forma tópica ou oral e a mortalidade registrada após 24 ou 48 horas após início da contaminação (PEREIRA, 2010).

Do ponto de vista biológico, a criação de abelhas também é importante porque os insetos, ao coletarem o néctar de flor em flor, promovem a polinização assegurando a perpetuação de milhares de plantas nativas e das exóticas cultivadas para alimentação humana (ABSY et al. 1977).

A meliponicultura deve ser compreendida como atividade vital em nossa sociedade, não apenas para a produção de mel e outros subprodutos, mas também para a manutenção da vida vegetal nos trópicos por meio da polinização de plantas nativas e manutenção da diversidade fenotípica deste importante ecossistema (AIDAR, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento da toxicidade de inseticidas às abelhas *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* é de extrema importância para nortear diretrizes de controle em seu uso, aliadas à preocupação de preservação ambiental. A presente pesquisa teve por objetivos realização do bioensaio para avaliar a toxicidade por exposição oral do herbicida Glifosato para a abelha nativa sem ferrão *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia), e verificar a ocorrência de alterações de atividade de locomoção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realização do bioensaio para avaliar a toxicidade aguda letal (DL_{50}), por exposição oral do herbicida Glifosato para a abelha nativa sem ferrão *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confeção das gaiolas de captura e a pista de atividade de locomoção necessária para a realização do bioensaio.
- Testar os efeitos do herbicida Glifosato em observação e sobre a pista de atividade de locomoção.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Herbicida Glifosato [N-(fosfonometil) glicina]

A molécula do glifosato [N-(fosfonometil) glicina], foi sintetizada pela primeira vez por Henri Martin em uma pequena indústria farmacêutica suíça (CILAG) no ano de 1950. Como aplicações farmacêuticas não foram identificadas, a molécula foi vendida para outras empresas e amostras foram testadas para possíveis usos finais. Atribui-se ao químico americano John E. Franz, da empresa Monsanto, o primeiro a sintetizar e testar o glifosato em 1970, que logo foi patenteado para o uso como herbicida (DUKE, 2008).

O Glifosato pertence ao grupo G da classe dos herbicidas, é um herbicida não seletivo, de ação pós-emergente apresentado como concentrado solúvel. Devido às suas propriedades sistêmicas, permite o controle total de plantas daninhas monocotiledôneas e dicotiledôneas que são atingidas pela ação do herbicida na parte aérea e raízes (GLIFOSATO NORTOX SL, 2020).

O glifosato é o herbicida mais vendido do mundo. No Brasil, no período de 2009 a 2017, o glifosato e seus sais ficaram em 1º lugar no ranking dos ingredientes ativos (de agrotóxicos) mais vendidos. O consumo nos anos de 2014 e 2015 foi superior ao dos demais anos, com cerca de 194.939,60 mil toneladas. As vendas nos anos de 2016 e 2017 foram, respectivamente, de 185.602,22 e 173.150,75 mil toneladas. Se comparado com o 2º colocado no ranking de vendas, o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), que no período de 2014 a 2015 registrou a média de venda de 48.750 mil toneladas, o glifosato registra o consumo três vezes maior (IBAMA, 2019).

Os órgãos federais brasileiros responsáveis pelo registro de agrotóxicos (patenteados ou genéricos) são o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). Estes, por meio de Resoluções e Portarias, normatizam diversas situações relacionadas a critérios e exigências para avaliação e classificação toxicológica, lista de componentes, pré e pós-registros, reavaliações, licenciamento, controle, fiscalização e monitoramento de serviços, produtos e comércio (TEIXEIRA, 2019).

A Política Nacional de Resíduos Sólidos, instituída pela Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, determinou aos fabricantes, importadores, distribuidores e comerciantes a obrigatoriedade de estruturar e implementar sistemas de logística reversa, mediante retorno dos produtos após o uso pelo consumidor, de forma independente do serviço público de limpeza urbana e de manejo dos resíduos sólidos, os agrotóxicos, seus resíduos e embalagens.

4.2 Abelha (Apidae, Meliponinae)

As abelhas indígenas (Meliponinae) são abelhas, ditas da terra, em comparação com as que nos vieram e que ainda nos vêm da Europa e da África. Devemos chamá-las, de preferência, abelhas sem ferrão, posto que possuam ferrão, mas tão atrofiado que é, praticamente, como se não existisse. Um outro caráter que distingue bem nossas abelhas das exóticas é que as nossas têm olhos nus e as outras os têm pilosos (SANTOS, 1985).

Em todo mundo existem mais de 300 espécies identificadas. Essas cerca de 100 correm risco de extinção devido aos desmatamentos, à poluição do ambiente, e ao uso indiscriminado de agrotóxicos. A criação de abelhas sem ferrão é uma atividade que faz bem para qualquer idade, seja como lazer, satisfação de plantas nativas ou cultivadas, conservação da natureza, desenvolvimento tecnológico, ou ampliação do conhecimento científico (PALUMBO, 2015).

4.3 *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Lepeletier 1836) (Mandaçaia)

Recebe o nome de mandaçaia, também a subespécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep., cujas faixas abdominais são largamente interrompidas. *Melipona quadrifasciata* típica ocorre do Sul de São Paulo até o Rio Grande do Sul, enquanto *M. anthidioides* é a forma comum no estado de Minas, Rio de Janeiro, Sul de Goiás e Norte de São Paulo. No Nordeste existe a *Melipona mandaçaia* Smith, semelhante à *M. quadrifasciata*, porém menor e mais brilhante (SANTOS, 1985).

As características para identificar a mandaçaia são sua coloração predominante preta, no abdômen com 3 a 5 faixas amarelas contínuas transversais ao eixo do corpo, e operárias de 8,6 mm de tamanho. Seu local de nidificação é em

ocos de árvores, entre 1 a 10 metros acima da base dos troncos. A entrada do ninho localizada no centro de estrias convergentes de barro, por onde passa apenas uma abelha de cada vez (Figura 1). Possui potencial na meliponicultura com produção de mel e polinização (WITTER, S.; BLOCHTEIN, B, 2009). Seu nome comum, em tupi guaraní significa “Vigia-Bonito” (BALLIVIÁN, 2008).

Figura 1: Entrada do ninho de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia), no meliponário residencial na cidade de Campo Mourão, Paraná.



Fonte: Fonte: Aatoria própria (2020).

A Mandaçaia ocorre ao longo da costa leste brasileira, que vai desde o Rio Grande do Sul até a Paraíba (MOURE, 1950). Estudos indicam que a Mandaçaia tem preferência por regiões com altitude acima de 600 metros. O que pode justificar o fato de ser encontrada em regiões de clima frio ao sul do país, como nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (KERR 1951; MOURE, 1975).

Em 2018 o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) em conjunto com o Ministério do meio ambiente (M.M.A) publicou um documento classificando com base em diversos critérios, os quais recebem diferentes pontuações e, ao final, indica quais espécies devem ser consideradas prioritárias para avaliação. No

documento “Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos” a abelha social nativa sem ferrão *M.quadrifasciata* foi quinta colocada (Tabela 1) das espécies sociais, como prioritária para análise de risco de agrotóxico.

Tabela 1: Espécies de abelhas sociais e solitárias prioritárias para análise de risco de agrotóxicos, 2018.

Espécies sociais	Pontuação final
<i>Trigonaspinipes</i>	28
<i>Tetragoniscaangustula</i>	24
<i>Nannotrigonatestaceicornis</i>	22
<i>Meliponascutellaris</i>	21
<i>Melipona quadrifasciata</i>	20

Fonte: IBAMA, 2018.

A abelha em estudo é nativa do Estado do Paraná, isso foi levado em conta na escolha para o presente trabalho, já que é de grande importância estudos para que seja possível entender melhor seu comportamento na sua própria região. Segundo os documentos Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region (MOURE; URBAN e MELO, 2007), para Câmara Técnica de Meliponicultura do Estado do Paraná (CT-PR) a abelha Mandaçaia MQQ é classificada como “comercial” e recebe a recomendação de manejo para produção de mel e outros produtos, divisão e venda de colônias.

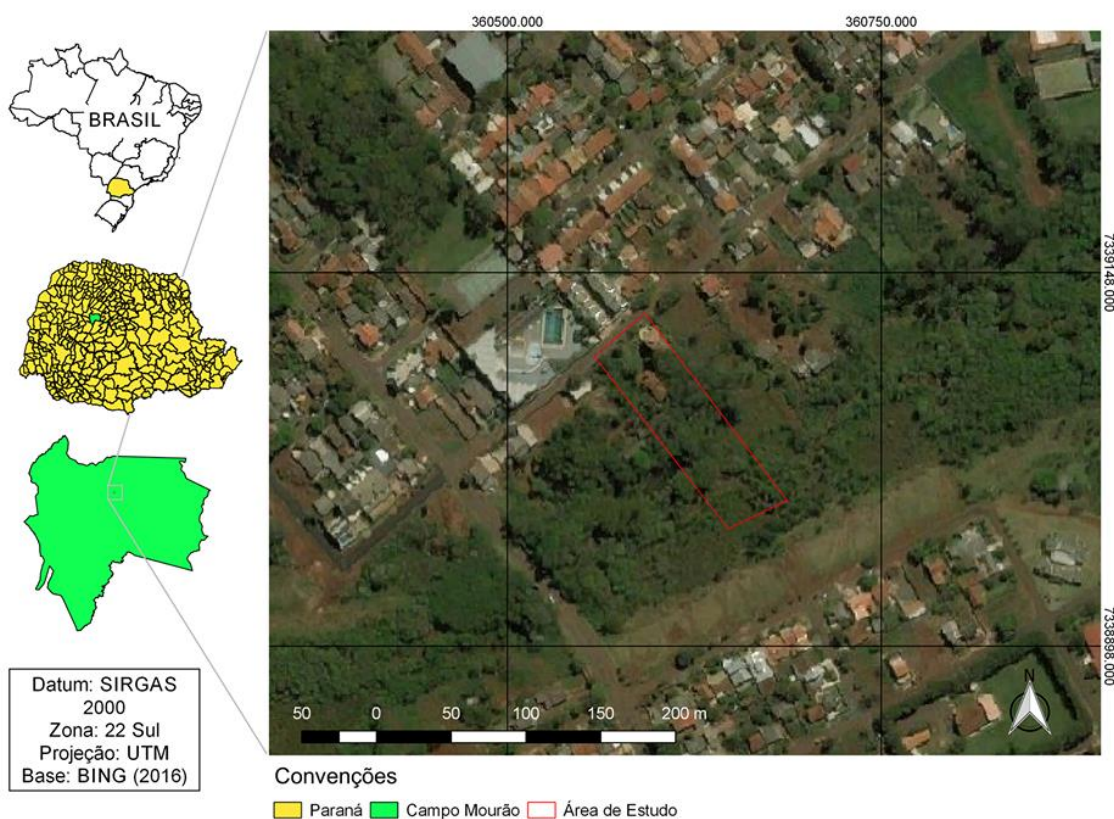
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local do Experimento

O trabalho foi realizado na cidade de Campo Mourão no estado do Paraná, Brasil, região com área de produção agrícola, com uso de agrotóxicos.

Campo Mourão se encontra entre as Latitudes: 23° 57' 10" e 24° 18' 6" sul e Longitudes 52° 32' 39" e 52° 11' 8" oeste, está situado sobre as bacias do Ivaí e Piquiri e seus principais rios são o Rio Mourão e Rio do Campo. Segundo a Köppen e Geiger a classificação do clima é Cfa. Campo Mourão tem uma temperatura média de 19.9 °C. Tem uma pluviosidade média anual de 1570 mm. O estudo foi realizado em um meliponário residencial composto de 15 caixas de abelhas nativas sem ferrão pertencentes a seis espécies diferentes. As caixas de abelhas estão distribuídas em um local de mata nativa, com área de aproximadamente 4.220 m² (Figura 2). Para este estudo foi escolhido um ninho de mandaçaia pertencente a este meliponário.

Figura 2: Mapa de localização do Meliponário Residencial no município de Campo Mourão–PR.



Fonte: Fonte: Autoria própria (2020).

5.2 Amostragem de abelhas

Abelhas Operárias da colônia de *M. quadrifasciata*, foram capturadas no dia 24 de outubro de 2020, no período da manhã (entre 6 e 7 horas). As abelhas foram coletadas por meio de uma armadilha instalada na saída do ninho, com a qual foram coletadas 10 abelhas, divididas em duas gaiolas, contendo 5 abelhas cada.

As gaiolas de madeira foram instaladas na frente do tubo de entrada do ninho até as 5 abelhas tivessem entrado em cada gaiola, logo após as gaiolas com as abelhas foram colocadas em uma caixa térmica e levadas em aproximadamente 25 minutos e para o Laboratório de Ecologia na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Campo Mourão. No laboratório, as abelhas foram mantidas a 25-26 ° C em regime de luz natural.

5.3 Teste de dose média letal (DL₅₀) via oral

A metodologia aplicada para avaliar a toxicidade oral aguda para o herbicida Glifosato sobre a abelha sem ferrão *M. quadrifasciata*, teve base nas metodologia adaptadas da OECD / OCDE – Diretrizes da OCDE para Teste de Produtos Químicos, Abelhas, teste de toxicidade oral aguda, para as abelhas *Apis mellifera* (OECD/OCDE, 213,1998).

Para a realização do teste dose média letal (DL₅₀) via oral do herbicida glifosato para abelhas operárias de *M. quadrifasciata* foram utilizadas a formulação comercial do herbicida Glifosato obtida pela empresa Biocarb, Curitiba, Paraná. Com base da formulação indicada no rótulo. Para a aplicação do teste DL₅₀ via oral do herbicida glifosato para operarias *M. quadrifasciata* foi estabelecida a concentração indicada do herbicida diluída em solução de sacarose (Água + mel). As abelhas do tratamento receberam a solução de sacarose contaminada, de forma que a único contato com o alimento foi através do alimentador, além do grupo controle que recebeu apenas a solução de sacarose.

No laboratório, as abelhas foram isoladas e privadas de alimentos por uma hora na própria gaiola de madeira. Depois de uma hora colocou-se o alimentador (Figura 3), tubo de eppendorf de 2,0mL furado na base, por onde as abelhas tiveram contato com o alimentador durante 24 horas contendo a dose de 27,93 µg/abelha de glifosato do herbicida testado.

Figura 3: Abelha operária de *M. quadrifasciata* se alimentando com a solução 50% sacarose e 27,93 ug de glifosato.



Fonte: Fonte: Aatoria própria (2020).

Para avaliar a quantidade de alimento consumido por abelha por dia, o tudo de eppendorf com a quantidade de 2.0 ml foi pesado em balança analítica MARTE AY220, e, após o experimento foi pesado novamente. Esse método permitiu observar e calcular o consumo da solução pelas abelhas medindo o volume e massa restante após a exposição oral ao herbicida.

5.4 Teste de atividade de locomoção

O teste de atividade de locomoção foi realizado de acordo com Zaluski et al. (2015), que se baseia na observação do deslocamento da abelha ao longo de uma arena graduada.

Esse teste é usado para avaliar o efeito de doses subletais de herbicidas na velocidade das abelhas, podendo fornecer informações sobre mudanças de comportamento dos insetos expostos.

Passadas 24 horas da exposição oral ao herbicida Glifosato as abelhas foram colocadas individualmente na entrada de cada raia, abelhas dos dois grupos, totalizando cinco abelhas liberadas a cada teste. A luz foi ligada 10 segundos antes de liberar as abelhas. O teste foi gravado em vídeo com uma SONY Cyber-shot DSC H50 e com auxílio de Software VideoPad. Este teste visa avaliar o tempo que cada abelha leva para percorrer o percurso de 50 cm. Após 10 minutos a filmagem foi interrompida independente da locomoção das abelhas. As abelhas que não se locomoveram nesse período foram dadas como nula a sua locomoção.

Os dados dos dois testes foram analisados por teste T-student ao nível de 5% de significância, para duas amostras pareadas que consiste na avaliação da diferença entre as amostras dos grupos, utilizando o Software BioEstat 5.3 (BIOESTAT, 2020).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A captura das abelhas foi realizada no horário de início de movimentação, quando estas saem do ninho para iniciar a coleta de pólen e néctar. Para isto confeccionou-se uma armadilha de captura.

A armadilha era composta de tubo plástico com 10 cm de comprimento e diâmetro de 1,8 mm conectado na entrada da colônia e em gaiola de madeira (9 x 9 x 3 cm), com a parte superior em tela transparente plástica furada, permitindo a ventilação e a base forrada com papel filtro, de modo que a abelha ao sair ficasse presa (Figura 4).

Figura 4: Coleta da abelha sem ferrão *M. quadrifasciata* para realização dos testes de Dose média letal (DL₅₀) e atividade de locomoção no meliponário residencial na cidade de Campo Mourão, Paraná.



Fonte: Fonte: Autoria própria (2020).

Para testar o efeito do glifosato sobre o comportamento das abelhas utilizou-se uma arena de madeira. Esta arena permite verificar se o contaminante altera o comportamento da abelha para letargia ou alvoroço.

A caixa possuía dimensões de 60cm x 1m x 4cm, contendo 7 raias (5cm x 50cm x 4cm) graduadas, com tampa de vidro na parte frontal para permitir a visualização do deslocamento de cada abelha. Na parte inferior 7 entradas (1.8 mm) individuais, uma para cada raia, onde foram colocadas as abelhas. Uma chapa na parte inferior da caixa garantiu que o acesso das abelhas às divisões ocorresse ao mesmo tempo. Na parte superior da caixa localiza-se uma lâmpada fluorescente para estimular as abelhas a fazer o percurso. Uma tela de nylon foi colocada após a distância de 50 cm, para evitar a chegada da abelha até a lâmpada. A caixa foi fixada verticalmente (Figura 5), Abelhas tendem a ir em direção à luz, contra a força da gravidade (fototaxia passiva) (LAMBIN et al., 2001; EL HASSNI et al.,2005).

Figura 5: Caixa utilizada para teste de atividade de locomoção. L= lâmpada fluorescente; T= tela de nylon; R= raias; E= entrada.



Fonte: Autoria própria (2020).

Após a construções dos materiais realizou-se um ensaio com *M. quadrisfasciata* e o herbicida glifosato, com base nos dados comerciais para abelhas informados pelo fabricante para o DL₅₀.

Durante o desenvolvimento do teste DL₅₀ não houve mortalidade durante no período de 24h, nem na solução de sacarose contaminada nem na solução controle. O que permite dizer que a dose comercial indicada para *Apis mellifera* pode ser considerada a mesma para *M. quadrifasciata*.

A avaliação da toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas levando em conta, especialmente, os efeitos subletais contribui para melhor entendimento do declínio dos polinizadores, favorecendo a adoção de estratégias que reduzam essa contaminação (HOOVEN et al., 2013).

No entanto observou-se durante o teste maior agitação nas abelhas do grupo contaminado comparado ao grupo controle. Dados da literatura mostram que algumas espécies de abelha, incluindo as abelhas nativas do Brasil, podem apresentar maior sensibilidade a algumas classes de pesticidas quando comparadas à sensibilidade de *A. mellifera* (ARENA e SGOLASTRA,2014).

FREITAS; PINHEIRO, (2010) colocam que em estudos de campo observam-se alterações nos níveis de orientação das abelhas operárias, limpeza do corpo, tremores, efeitos retardados, comportamento agressivo, níveis de atividade à entrada da colmeia, número de indivíduos, entre outros, além de sobrevivência ao longo do inverno ou seca.

Confirmando que a alteração de comportamento está associada ao consumo do herbicida, verifica-se na quantidade consumida da solução pelos dois grupos (Tabela 2), tal consumo não diferenciou entre eles.

Tabela 2: Consumo após 24 horas de exposição oral a dose de herbicida glifosato em abelha sem ferrão *M. quadrifasciata*.

	Eppendorf	Eppendorf com solução de sacarose	Frasco controle após 24h	Frasco contaminado após 24h
Peso/g	0,9	3,18g	2,401g	2,455g
	28g			
Medida/ml	0	2,0 ml	1,4 ml	1,4ml

Fonte: Aatoria própria, 2020.

Como não houve diferença no consumo entre o xarope de mel e o contaminado por glifosato, isto sugere que não há efeitos repelentes ou anti-alimentares do herbicida para as abelhas. Isso pode causar repetição na exposição das abelhas e acúmulo de recursos contaminados pelos herbicidas nas colmeias (PAREJA et al., 2011).

Após a exposição oral ao herbicida glifosato no período de 24 horas estas abelhas participaram do teste de atividade de locomoção. Nem todas as abelhas se locomoveram e as que mais responderam ao estímulo luminoso foram as do grupo contaminado pelo herbicida (Tabela 3).

Tabela 3: Tempo gasto pelas abelhas *M. quadrifasciata* para percorrer 50 cm, 24 horas após exposição por ingestão à DL₅₀) do herbicida glifosato.

	Abelha/raia	Distância/ cm	Tempo/s
Controle	1	50	80.164
	2	50	55.756
	3	0	0
	4	0	0
	5	0	0
Contaminado	1	0	0
	2	50	21.213
	3	50	53.223
	4	0	0
	5	50	18.817

Fonte: Autoria própria, 2020.

Comparando a velocidade média dos dois grupos de abelhas o tempo do grupo controle foi maior (27.184 segundos) do que do grupo contaminado (18.65 segundos), no teste T não houve diferença significativa entre os dois grupos, ((t)= 0.6477, (p) = 0.5525). Algumas abelhas não conseguiram iniciar o percurso, não completando a pista de teste com a distância de 50 cm, tanto no grupo controle como no contaminado. Como o número de dados foi pequeno, sugere-se um estudo com maior riqueza de dados. Embora não tenha sido significativo o mesmo comportamento foi encontrado em outro estudo semelhante.

Em estudo com *Apis mellifera* observou-se que o tempo de voo de abelhas tratadas oralmente com dose sub-letal de inseticida, durante orientação em um labirinto, foi significativamente maior quando comprado com as do grupo controle (DECOURTYE et al. 2009)

No trabalho de LUNARDI (2018) os resultados indicaram alta toxicidade dos herbicidas glifosato para as abelhas *Apis mellifera* africanizadas. As abelhas sofreram redução da atividade motora após a exposição por ingestão.

Alterações em uma ou mais funções das abelhas podem afetar seu forrageamento e comprometer sua sobrevivência (ALIOUANE et al., 2009).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa maneira, conclui-se que o herbicida avaliado nessa pesquisa foi considerado tóxico na concentração utilizada às abelhas operárias de *M. quadrifasciata*, por apresentarem valores de mortalidade zero para o teste de DL₅₀ definida de 27,93 µg/abelha, que coloca a DL₅₀ desta espécie igual ao de *Apis mellifera*. No entanto, houve alterações comportamentais durante os testes de ingestão oral.

O teste de atividade de locomoção não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos, embora tenha-se confirmado que as abelhas que ingeriram o herbicida foram mais estimuladas pela luz e se locomoveram mais rápido na pista.

Espera-se que esse trabalho possa contribuir com a avaliação dos impactos da utilização de herbicidas às abelhas *M. quadrifasciata*. No entanto, mais estudos devem ser realizados com maior número de amostras.

REFERÊNCIAS

- ABSY, M.L & KERR, W.E. **Algumas plantas visitadas para obtenção de pólen por operárias de melípona seminigramerrillae em Manaus.** Acta. Amaz., 1977, 7 (3)309-315,.
- AIDAR, D. S.; **A MANDAÇAIA**, 2ª edição revisada e ampliada; Editora FUNPE, 2005 pagina 16.
- ALTIERI, M. A. **Biodiversity and pest management in agroecosystems.** New York: Haworth Press, 1994.
- ALIOUANE, Y., EL HASSANI, A.K., GARY, V., ARMENGAUD, C., LAMBIN, M. and GAUTHIER, M., 2009. **Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior.** Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, vol. 28, no. 1, pp. 113-122.
- ALIOUANE, Y. et al. **Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior.** Environ. Toxicol. Chem., v. 28, n. 1, p. 113- 122, 2009.
- ANDOW, D. A. **Vegetation al diversity andarthropod population response.** Annual Review of Entomology, Palo Alto, CA, v. 36, p. 561-586, 1991.
- ARENA, M.; SGOLASTRA, F. **A meta-analysis comparing the sensitivity to pesticides.** Ecotoxicology. 23: 324-334, 2014.
- BALLIVIÁM, J. M. P. P. (Org.). **Abelhas Nativas sem Ferrão.** São Leopoldo: Oikos, 129p., 2008.
- BIOESTAT 5.3. **BioEstat:** Software de estatística para a área de ciências biológicas. Tefé: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2020. Disponível em: <<https://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/>>. Acesso em: 27/10/2020.
- BRASIL. Constituição (2010). Lei nº N° 12.305, de 02 de agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos (Pnrs).** 1. ed. Brasília : Presidência da República, .. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm . Acesso em: 07 ago. 2020.
- DECOURTYE, A. et al. **Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (Apis mellifera L.) to orientate in a complex maze.** Julius Kunh Archives, v. 423, p. 75-83, 2009
- DUKE, Stephen O. POWLES, B. **Mini-reviewGlyphosate: a once-ina-centuryherbicide.** PestManagmentScience SCI v. 64: 319-325, 2008. DOI: 10.1002/ps. 1518.
- EL HASSANI, A. K., DACHER, M., GARY, M., LAMBIN, M., GAUTHIER, M. and ARMENGAUD, C., 2008. **Effects of sublethal doses ofacetamidridandthiame thoxamon the behavior of the honey bee (Apismellifera).**Archivesof Environmental ContaminationandToxicology, vol. 54, no. 4, pp. 653-661.
- EL HASSANI, A.K. et al. Effectsofsublethal doses offipronilon the behaviorof the honey bee (Apismellifera) **Pharmacology, Biochemistryandbehavior**, v. 82, n. 1, p. 30-39, 2005.
- FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. **Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecosistemas brasileiros.** Oecol. Aust., v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010.
- GLIFOSATO NORTOX SL. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA sob nº 7316, Registro MAPA Nº 04811; Local: Araongas - PR. Bula herbicida. Disponível em: <https://www.nortox.com.br/wp-content/uploads/2020/02/Glifosato-Nortox-SL-Bula-VER-07-30.01.2020.pdf>. Acesso em: 04 out. 2020.
- HOOVEN, L.; SAGILI, R.; JOHANSEN, E. **How to reduce bee poisoning from pesticides.** Oregon: Oregon State University, Extension Service, 2013. Disponível em: . Acesso em: 18 set. 2017.

IBAMA. Instituto Nacional do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/legislacao/agrotoxicos> . Acesso em: 05.04.2019.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A. **Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global** – Um enfoque às maçãs. Quím. Nova, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

KERR, W.E. **Estudos sobre a genética de populações de himenópteros em geral e dos apíneos sociais em particular**. Ann. Esc. Sup. Agric. L. Queiroz 8: 219-354, 1951.

LAMBIN, M.; ARMENGAUD, C.; RAYMOND, S. and GAUTHIER, M., 2001. **Imidacloprid-Induced Facilitation of the Proboscis Extension Reflex Habituation in the Honeybee**. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, vol. 48, pp.129-134.

LAMBIN, M. et al. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honey bee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 48, p. 129-134, 2001.

LUNARDI, J. S. **Efeito de doses letais e subletais de herbicidas sobre a mortalidade e alterações comportamentais de Apis mellifera L.** Botucatu – São Paulo, 2018.

MALASPINA, O. **Estudo Genético da Resistência ao DDT e Relação com outros caracteres em Apis Mellifera (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação (Mestrado) – Zoologia de invertebrados, Universidade Estadual Paulista (Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 1979.

MOURE, J.S; URBAN, D; MELO, G.A.R. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007, 1058 p.

MOURE, J. S.; KERR, W. E. **Sugestões para modificação da sistemática do gênero Melipona (Himen.Apoidea)**. Dusenya, v.1, p. 105-129, 1950.

MOURE J.S. **Notas sobre as espécies de Melipona descritas por Lepetelier em 1836 (Hymenoptera, Apidae)**. Rev. Bras. Biol. 3: 15–17. 1975.

PALUMBO, H. N. **Nossa brasileirinhas: As abelhas nativas**/.Hermes Neri Palumbo. Curitiba, 2015, Pagina 11.

PAREJA, L. et al. **Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay**. Int. J. Environ. Res. Public Health, v. 8, n. 10, p. 3844-3858, 2011.

PEREIRA, A. M. **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. 2010. 125 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

PIGNATI, Wanderlei Antonio et al (org.). **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde**. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csc/v22n10/1413-8123-csc-22-10-3281.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2020.

PINHEIRO, M. et al. **Polinização por abelhas**. In: RECH, A. R. et al. (Org.). Biologia da polinização. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. cap. 9, p. 205.

PIRES, Carmen Sílvia Soares. **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos** / Carmen Sílvia Soares Pires, Karoline Ribeiro de Sá Torezani. – Brasília: Ibama; 2018. 84 p. ; 21 x 29,7 cm

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. **Pesticide residues and bees: a risk assessment**. PLoS One, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0094482

SANTOS, Eurico; **Os Insetos**, 2º edição Coleção zoologia brasileira Vol. 10, Editora Itatiaia Limitada Belo horizonte 1985; Pagina 130, 159.

SILVA, W.P.; PAZ, J.R. **Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica.** *Natureza online*, v. 10, n. 3, p 146-152. 2012.

TEIXEIRA. D.E et al; NAPOLITANO H.B;.. R.L et al ,**Legislação e Normatização para o Glifosato no Brasil**, *Revista Processos Químicos* Jan / Jun de 2019

OCDE/OCDE, Teste 213, **Diretrizes Da Ocde Para O Teste De Produtos Químicos, Abelhas, teste de toxicidade oral aguda.** Disponível em:<<https://doi.org/10.1787/9789264070165-en>>, páginas, 8, 1998.

VERA LUCIA IMPERATRIZ-FONSECA Et al. **Polinizadores no Brasil: Contribuição e perspectiva para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**, São Paulo: Editora da Univerisade de São Paulo, 2012 488 p 28cm.

VIDEOPAD video editor free; NCH Software disponível: Microsoft Store, 2018.

ZALUSKI, R. et al. **Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses.** *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 34, p. 1062-1069, 2015

WITTER, S.; BLOCHTEIN, B. **Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul.** 1 ed. Porto Alegre, 2009, Página 54 e 55.