

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA DA SILVA RIBEIRO

**EFEITO RESIDUAL DE FIPRONIL SOBRE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA:
APIDAE) AFRICANIZADA.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

**DOIS VIZNHOS
PARANÁ - BRASIL
2023**

LETICIA DA SILVA RIBEIRO

**EFEITO RESIDUAL DE FIPRONIL SOBRE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA:
APIDAE) AFRICANIZADA.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr^a Michele Potrich.
Coorientador(a): Natalia Ramos Mertz.

**DOIS VIZINHOS
PARANÁ - BRASIL
2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

LETICIA DA SILVA RIBEIRO

**EFEITO RESIDUAL DE FIPRONIL SOBRE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA:
APIDAE) AFRICANIZADA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr^a Michele Potrich.
Coorientador(a): Natalia Ramos Mertz.

Data de aprovação: 21/06/2023.

Michele Potrich

Doutora em Agronomia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Paula Fernandes Montanher

Doutora em Química
Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Cristiane Lurdes Paloschi

Doutora em Engenharia Agrícola
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

**DOIS VIZINHOS
PARANÁ - BRASIL
2023**

Dedico este trabalho a Deus, à minha mãe, à
minha tia e a todos aqueles que oraram e
torceram por mim durante toda a minha
graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por toda força nos momentos de dificuldade, ansiedade e desesperança; por ouvir minhas orações e não me deixar desistir. “Do homem são as preparações do coração, mas do SENHOR a resposta da língua”.

Agradeço profundamente a minha mãe Raquel por toda oração, por todo suporte emocional e por não me deixar desistir; a minha tia Penha por tudo feito desde o meu nascimento; aos meus familiares que sempre torceram por mim e nunca me esqueceram.

Agradeço também a todas as mulheres fortes que apareceram durante a minha jornada. Agradeço com toda minha força a minha orientadora Prof^a Dr^a Michele Potrich pelo acolhimento, ensinamento, desafios lançados e conselhos dados durante toda minha jornada. Agradeço a ela também por todas risadas, momentos de descontração e conversas. Venho também agradecer a Dr^a Natalia Ramos Mertz por todo suporte, conselho e ensinamento durante o período que estive perto dela, além dos momentos em que ela me acalmou. Sou grata por ter dito essas duas mulheres como referência de mulheres cientistas e profissionais competentes.

Agradeço a Gabriela Libardoni, Raiza Abati e Amanda Sampaio por terem estados junto a mim quando iniciei no laboratório e por terem me deixado acompanhar em seus experimentos/trabalhos. Agradeço imensamente a Cristiane Paloschi pelos conselhos, pelas conversas, caronas, risadas e apoio dado durante todo período em que estive ao seu lado.

Agradeço também aos meus amigos e colegas do Laboratório de Controle Biológico da UTFPR – DV Bruna, Andressa, Leonardo, Mariana, Branda e José Carlos por todos os momentos juntos. A UNEPE Apicultura coordenado pela Prof^a Dr^a Fabiana Martins Costa Maia e seus alunos, por todo suporte durante a iniciação científica e o meu TCC.

Agradeço à CAPES e a Fundação Araucária pelas bolsas concedidas durante a minha graduação e que contribuíram diretamente para este trabalho. Agradeço também a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos e a Coordenadoria do curso de Engenharia Florestal por toda estrutura fornecida durante a graduação.

Aos meus amigos Pamela, Rodrigo, Dennis, Rarine e tanto outros, muito obrigado por me aguentarem nos meus momentos de drama, pelas conversas, risadas, momentos de descontração, choro e suporte durante esses anos. Amo vocês!

A todos, MUITO OBRIGADO!

“There is no description, no image in any book that is capable of replacing the sight of real trees, and all of the life to be found around them in a real forest. Something emanates from those trees which speaks to the soul, something no book, no museum is capable of giving”.

(MONTESSORI, MARIA)

RESUMO

RIBEIRO, Leticia da Silva. **EFEITO RESIDUAL DE FIPRONIL SOBRE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA**. 2023. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Bacharelado em Engenharia Florestal, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2023.

Dentre os polinizadores essenciais para a manutenção e conservação da biodiversidade dos ecossistemas, as abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) exercem grande participação. Entretanto, a mortalidade deste inseto vem causando preocupação. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito residual do inseticida fipronil sobre *A. mellifera* africanizada por contato em superfície contaminada. A avaliação do efeito residual do fipronil foi verificada em três bioensaios. No Bioensaio 1, sem ação da fotodegradação, foram pulverizados cerca de 290 microlitros de cinco concentrações (0,75 µg/mL; 1,5 µg/mL; 3 µg/mL; 6 µg/mL e 12 µg/mL) em placas de petri de vidro. No bioensaio 2, com a ação da fotodegradação, foi pulverizado cerca de 290 microlitros da concentração letal média em 48 horas (CL₅₀ 48h) de 5 mg/mL também em placas de petri de vidro. A aplicação da CL₅₀ 48h ocorreu em dois grupos: com e sem fotoperíodo ambos mantidos em condições controladas. Para ambos bioensaios as testemunhas constituíram-se de placas de petri de vidro pulverizadas com água destilada esterilizada. O contato das abelhas com as placas de ambos bioensaios ocorreu por um período de 2 horas. Após este período, as abelhas foram realocadas em gaiolas e transferidas para uma sala climatizada, sendo avaliadas periodicamente, de 1 até 120 horas após o contato. No Bioensaio 3 foi verificada a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) das abelhas após interação com o inseticida fipronil. Para isso, as abelhas foram colocadas em contato com as CL₅₀ 24h e 48h por 4, 24 e 48 horas. Após o período de contato, as abelhas foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C. O segundo grupo de abelhas que ficou em contato com o tratamento com a CL₅₀ 24 e 48 h por 24 e 48 horas também foi congelado após este período de contato. A ação do fipronil no bioensaio 1 e 2, reduziu na sobrevivência de *A. mellifera* quando em contato com superfície contaminada, bem como quando deixada em ambiente sem fotoperíodo (luz). Já no bioensaio 3 foi verificado que o inseticida fipronil não causou alterações bioquímicas na enzima AChE. Desta forma, é recomendado a realização de mais estudos avaliando em maior tempo a atividade enzimática, após as abelhas entrarem em contato com o produto.

Palavras-chave: Abelhas; Inseticida; Sobrevivência; Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

RIBEIRO, Leticia da Silva. **RESIDUAL EFFECT OF FIPRONIL ON AFRICANIZED *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)**. 2023. 47 f. Course Conclusion Paper - Bachelor's Degree in Forest Engineering, Federal Technological University of Paraná. Dois Vizinhos, 2023.

Among the essential pollinators for the maintenance and conservation of biodiversity in ecosystems, the bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) play a major role. However, the mortality of this insect is causing concern. Thus, the objective of this work was to evaluate the residual effect of the insecticide fipronil on *A. mellifera* africanized by contact on a contaminated surface. The evaluation of the residual effect of fipronil was verified in three bioassays. In Bioassay 1, without photodegradation action, about 290 microliters of five concentrations (0.75 µg/mL; 1.5 µg/mL; 3 µg/mL; 6 µg/mL and 12 µg/mL) were sprayed on plates of glass petri. In bioassay 2, with the action of photodegradation, about 290 microliters of the average lethal concentration in 48 hours (LC₅₀ 48h) of 5 mg/mL was also sprayed on glass petri dishes. The application of the 48h CL₅₀ occurred in two groups: with and without photoperiod, both kept under controlled conditions. For both bioassays, the controls consisted of glass petri dishes sprayed with sterilized distilled water. The contact of the bees with the plates of both bioassays occurred for a period of 2 hours. After this period, the bees were relocated in cages and transferred to a climate-controlled room, being evaluated periodically, from 1 to 120 hours after contact. In Bioassay 3, the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) of bees after interaction with the insecticide fipronil was verified. For this, the bees were placed in contact with the CL₅₀ 24h and 48h for 4, 24 and 48 hours. After the contact period, the bees were stored in an ultrafreezer at -80°C. The second group of bees that was in contact with the treatment with CL₅₀ 24 and 48 h for 24 and 48 hours was also frozen after this period of contact. The action of fipronil in bioassays 1 and 2 reduced the survival of *A. mellifera* when in contact with a contaminated surface, as well as when left in an environment without photoperiod (light). In bioassay 3, it was verified that the insecticide fipronil did not cause biochemical alterations in the AChE enzyme. In this way, it is recommended to carry out more studies evaluating the enzymatic activity in a longer time, after the bees come into contact with the product.

Keywords: Bees; Insecticide; Survival; Acetylcholinesterase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier conforme o tempo (horas) para o bioensaio de sobrevivência de *Apis mellifera* após contato com o inseticida Fipronil. T0 – tratamento controle (água); T1 – 0,75 µg mL⁻¹; T2 – 1,5 µg mL⁻¹; T3 – 3 µg mL⁻¹; T4 – 6 µg mL⁻¹, T5 – 12 µg mL⁻¹.....31
- Figura 2.** Gráfico de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Apis mellifera* africanizada após o contato com o inseticida Fipronil submetido a presença de luz por diferentes dias. Sendo T0 = testemunha; T1 = nove dias; T2 = seis dias; T3 = três dias; T4 = zero dia.32
- Figura 3.** Gráfico de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Apis mellifera* africanizada após o contato com o inseticida Fipronil submetido a ausência de luz por diferentes dias. Sendo T0 = testemunha; T1 = nove dias; T2 = seis dias; T3 = três dias; T4 = zero dia.33
- Figura 4.** Gráfico TurkeyHSD (Teste de Tukey da Diferença Honestamente Significativa) da atividade enzimática de AChE em operárias de *Apis mellifera* africanizada após contato com inseticida fipronil.34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Período de desenvolvimento, em dia, da rainha, operárias e zangões de <i>Apis mellifera</i> africanizada.....	19
Tabela 2. Relação idade e atividades realizadas pelas operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada.....	20
Tabela 3. Caracterização dos tratamentos do bioensaio de sobrevivência de operárias de <i>Apis mellifera</i> africanizada após contato com o inseticida Fipronil.....	28
Tabela 4. Orçamento total dos materiais e equipamentos utilizados na elaboração do TCC “Efeito Residual de Fipronil sobre <i>Apis mellifera</i> L. (Hymenoptera: Apidae) Africanizada”.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase (enzima)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B.O.D	Câmara climatizadora
Bioestat	Software de estatística
CCD	Colony Collapse Disorder
Cerflor	Programa Brasileiro de Certificação Florestal
CL	Concentração Letal
CL ₂₄	Concentração Letal média da substância em 24 horas
CL ₄₈	Concentração Letal média da substância em 48 horas
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DL ₅₀	Dose Letal média da substância
FSC®	Forest Stewardship Council
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LabCA	Laboratório Multiusuário Central de Análises
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LMR	Limites Máximos de Resíduos
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PET	Politereftalato de etileno
pH	Potencial hidrogeniônico
PSB	Solução Tampão Fosfato salina
PVC	Policloreto de vinila
SNC	Sistema nervoso central
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
UNEPE	Unidade de Ensino e Pesquisa
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
ACh	Acetilcolina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
UE	União Europeia

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
g	Gramas
US\$	Dólar americano
µL	Microlitros
µg	Micrograma
µg abelha ⁻¹	Micrograma por abelha
µg mL ⁻¹	Micrograma por mililitros
%	Porcentagem
mg/mL	Miligramas por mililitros
mL	Mililitros
kgf/cm	Quilograma força por centímetro
mUA	Mili unidade de absorvância
min	Minutos
mg/L	Miligramas por litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivo Específico.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1.	Abelhas e o Setor Florestal	17
3.2.	Biologia e Organização Social de <i>Apis mellifera</i> L. (Hymenoptera: Apidae) Africanizada.....	18
3.3.	Inseticidas e o Setor Florestal	20
3.4.	Mortalidade das Abelhas	21
3.5.	Caracterização do Fipronil e o efeito sobre abelhas.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1.	Local dos Experimentos	26
4.2.	Obtenção do Produto Fipronil.....	26
4.3.	Obtenção das Abelhas <i>Apis mellifera</i>	26
4.4.	BIOENSAIO 1: Sobrevivência de <i>Apis mellifera</i> após contato com Fipronil 26	
4.5.	BIOENSAIO 2: Ação da fotodegradação do Fipronil sobre a sobrevivência de <i>Apis mellifera</i>	27
4.6.	BIOENSAIO 3: Análises Bioquímicas.....	29
4.7.	Análises Estatísticas.....	30
5	RESULTADOS	31
5.1.	BIOENSAIO 1: Sobrevivência de <i>Apis mellifera</i> após contato com Fipronil 31	
5.2.	BIOENSAIO 2: Ação da fotodegradação do Fipronil sobre a sobrevivência de <i>Apis mellifera</i>	32
5.3.	BIOENSAIO 3: Análises Bioquímicas.....	33
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	ANEXO 46	

1 INTRODUÇÃO

Os insetos polinizadores são considerados seres importantes para a biodiversidade global, pois são responsáveis pela polinização de 90% das espécies vegetais encontradas no ecossistema (SANTOS *et al.*, 2019). Aproximadamente 73% da polinização é realizada por abelhas, enquanto 19 % é feito por moscas, 5% por vespas e besouros, 4% por mariposas e borboletas, enquanto o restante se divide entre os morcegos e as aves (FREITAS; IMPERATRIZ-FONSECA, 2005). A polinização é responsável por aumentar em até 70% a produção de sementes de todas as espécies vegetais (WILSON; CARRIL, 2016).

Dentre as abelhas polinizadoras, a espécie *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) exerce grande participação (OLIVEIRA; TALAMINI; SANTOS, 2016). A intensa relação simbiótica entre as espécies vegetais e as abelhas ao longo da evolução, permitiu a estes dois grupos biológicos a sua sobrevivência em meio as adversidades (DOMINGOS; NÓBREGA; SILVA, 2016). Se por um lado as abelhas possibilitavam as plantas sucesso na reprodução e perpetuação de seus indivíduos, as espécies vegetais disponibilizavam para as abelhas as principais fontes de alimento (pólen, néctar, óleos e outros recursos) essenciais para sua sobrevivência (KLEINERT; GIANNINI, 2012).

As abelhas também têm importância destacada no monitoramento de remanescentes florestais e dos seus serviços ecológicos, sendo extremamente sensíveis a mudanças na composição e estrutura das florestas e/ou fragmentos, bem como na presença de resíduos de inseticidas nas espécies vegetais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; DONKERSLEY, 2019). Logo, o seu emprego como bioindicador ambiental é viável, sendo que as alterações ambientais podem ser refletidas em seu comportamento ou sobrevivência (FAVALESSO; GONÇALVES, 2017; QUIGLEY; AMDAM; HARWOOD, 2019).

Atualmente, em menos de 33,7% do território brasileiro se encontra os remanescentes florestais sem qualquer interferência humana, ou seja, ideal para as abelhas pois não apresentam perda de diversidade nem de nidificação (MAPBIOMAS, 2021). A fragmentação dos habitats naturais, a exploração madeireira, o desmatamento, o avanço dos limites urbanos, o uso intensivo da terra e de agrotóxicos para o controle de doenças e insetos-praga, têm provocado modificações nos ambientes de nidificação das abelhas, contribuindo para o seu desaparecimento

(BARBOSA *et al.*, 2017; CAIRNS *et al.*, 2005). Logo, é notório que a presença de áreas florestais estruturadas para a sobrevivência das abelhas é essencial.

Um exemplo de como estes fatores, principalmente a utilização incorreta e excessiva de agrotóxicos, pode atuar diretamente ou indiretamente na perda de milhares colônias é a CCD “*Colony Collapse Disorder*” ou Desordem do Colapso das Colônias (BOVI, 2013; FREITAS *et al.*, 2017; LU; HUNG; CHENG, 2020; SÁNCHEZ-BAYO *et al.*, 2016; ZALUSKI *et al.*, 2015).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (2023), em 2022, o país aplicou, aproximadamente, 266 mil toneladas de inseticidas, um aumento de 4,289.17 toneladas quando comparado ao ano anterior. No setor florestal, a utilização de inseticidas químicos sintéticos, está mais direcionado ao tratamento de sementes e de solo contra pragas subterrâneas (ROAT *et al.*, 2013). Todavia, a pulverização deste tipo de agrotóxico pode ser mínima ou até mesmo barrada em povoamentos florestais que estejam com algum tipo de certificação ou plano de manejo.

Dentre estes inseticidas destaca-se o princípio ativo fipronil, sendo no setor florestal brasileiro, um dos produtos químicos sintéticos mais utilizados no controle de formigas cortadeiras e cupins, bem como no tratamento de sementes (PENTEADO *et al.*, 2017; ROAT *et al.*, 2013). Podendo ser pulverizado no formato de suspensão concentrada, líquido premido, micro-emulsão e outros, o fipronil atualmente apresenta mais de 78 produtos registrados com este princípio ativo no setor florestal (AGROFIT, 2022).

El Hassani *et al.* (2005) avaliando os efeitos de doses subletais do fipronil sobre as abelhas e seu comportamento, observou que este inseticida provocou alteração na aprendizagem e na memória de *A. mellifera*. Carrillo *et al.*, (2013) e Lunardi; Zaluski; Orsi (2017) estudando também o comportamento de *A. mellifera* quando em contato com os inseticidas fipronil e imidaclopride, verificaram alterações na coordenação motora destas abelhas. Ambos trabalhos evidenciam os prejuízos que este inseticida causa no processo de forrageamento e retorno das abelhas à colmeia.

Desta forma, é essencial a análise da toxicidade de inseticidas como o fipronil a fim de minimizar os impactos sobre este inseto. Isso reitera os princípios e diretrizes que as certificadoras pedem para as empresas florestais em seus plantios, uma vez que a ação indireta dos inseticidas sobre *A. mellifera* já é mais que suficiente para

provocar mudanças que podem levar ao seu desaparecimento e à redução na polinização em diversos cultivos agrícolas e florestais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar efeito residual do inseticida Fipronil sobre *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizada através do contato em superfície contaminada.

2.2 Objetivo Específico

- Verificar a ação residual do inseticida Fipronil, com e sem presença de fotoperíodo, sobre a sobrevivência de abelhas operárias de *A. mellifera* africanizada quando em contato com superfície contaminada.
- Analisar as alterações bioquímicas provocadas pelo inseticida Fipronil na enzima acetilcolinesterase (AChE) em operárias de *A. mellifera* africanizada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Abelhas e o Setor Florestal

A relação existente entre as florestas e as abelhas é algo antigo, oriundo de um processo evolutivo de milhões de anos que se mantem até os dias de hoje (FREITAS *et al.*, 2017). Em florestas tropicais a interação entre esses dois elementos proporciona ao ecossistema a continuidade das espécies e abundância na produção de bens essenciais para o homem (KEVAN; VIANA, 2003; SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES; PINTO, 2007; VANBERGEN *et al.*, 2013).

Desde a descoberta do Brasil, as florestas tem servido como fonte de renda e símbolo de desenvolvimento para diversos grupos, muito em virtude dos seus produtos e benefícios que decorrem dela (DOS SANTOS *et al.*, 2003). Devido a isso, a diminuição de áreas florestais e a necessidade de meios alternativos para a continuidade de determinadas atividades se fez importante.

Assim, plantio de espécies capazes de suprir as demandas madeireiras do setor foi necessário e significativo, a ponto da cadeia produtiva se tornar importante para a economia brasileira. Em 2021, o setor florestal arrecadou, aproximadamente, 224,6 bilhões de reais, com seus mais de 9,93 milhões de hectares plantados com eucalipto (75,8%), pinus (19,4%) e outras espécies (4,8%) (IBÁ, 2022).

No âmbito rural, o emprego de atividades que podem ser associadas as florestas nativas presentes nas pequenas propriedades, é comum. A apicultura, criação e manejo de abelhas *A. mellifera*, é um destes trabalhos que associa serviços ambientais, como a conservação, ao benefício econômico para o produtor (GRAEFF, 2011; GUSMÃO FILHO *et al.*, 2020). A preservação das abelhas, bem como de seus locais de nidificação e de coleta de alimento, mostra a sua importância no cuidado com o equilíbrio ecológico (POSTELARO; AQUINO; FERRAREZI JÚNIOR, 2021).

Por ser uma atividade de total dependência com os fragmentos florestais, os produtos extraídos da apicultura como mel, resina, geleia real e pólen, têm grande importância dentro da cadeia de produtos florestais não-madeireiros (MAROCHI, 2011). Além da diversificação agrícola na propriedade, o emprego da apicultura interliga o lado social (empreendedorismo), econômico (renda extra) e ambiental (preservação) (CAMARGO, 2017; WOLFF, LUIS FERNANDO; SCHNELL E SCHUHIL, 2021).

No ano de 2021, a apicultura brasileira produziu, aproximadamente, 55.828 toneladas de mel, cerca de 854.415 mil reais, com destaque para o estado Rio Grande do Sul, que produziu 9.212 toneladas (17%) e arrecadou cerca de 131.492 mil reais (A.B.E.L.H.A, 2023).

3.2. Biologia e Organização Social de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Africanizada

As abelhas *A. mellifera*, assim como a maior parte dos insetos pertencentes a Classe Insecta, apresenta seu corpo dividido em três regiões: cabeça, tórax e abdôme. Estes três tagmas são revestidos por um tegumento externo do corpo, constituído por uma epiderme e cutícula, denominado exoesqueleto. Ele é constituído pela quitina, substância que fornece ao exoesqueleto proteção contra ataques de patógenos, micro-organismos e doenças, perda de água para o ambiente e garante a sustentação dos músculos (CRUZ-LANDIM, 2009; BACAXIXI *et al.*, 2011).

Na região da cabeça, encontram-se três apêndices sensoriais importantes: os ocelos, os olhos compostos e as antenas, além das peças bucais. Os ocelos são responsáveis pela percepção da intensidade de luz, enquanto os olhos compostos estão ligados as formas e cores e as antenas ao olfato (CRUZ-LANDIM, 2009). Já o aparelho bucal, do tipo lambedor, é encarregado da coleta do néctar e de outros líquidos, de moldar cera, coletar própolis e produzir geleia real (CALLOU, 2021; WIESE, 2005).

O tórax apresenta 3 segmentos, responsáveis por comportar os apêndices locomotores dos insetos: asas e pernas. São dois pares de asas (anterior e posterior) e três pares de pernas, um par em cada um dos segmentos, sendo o último par responsável pela fixação dos grãos de pólen na região chamada corbícula. Já região do abdôme, responsável por acomodar a maiorias dos órgãos, é dividida em sete segmentos, sendo no último segmento encontrado o ferrão, órgão perfurante constituído por lancetas que deslizam para frente e para trás nas rainhas e operárias (WINSTON, 2003; CRUZ-LANDIM, 2009).

As abelhas *A. mellifera* são insetos organizados socialmente, divididas em castas (rainha e operárias e zangões) com funções bem definidas e com o propósito da sobrevivência da colônia (CALLOU, 2021). Enquanto a rainha é responsável pela oviposição e ordem dentro da colônia, os zangões são incumbidos pela fecundação da mesma. Ela realiza o voo nupcial entre o nono e o 12º dia de vida adulta, podendo

chegar a copula com mais de 15 zangões (WIESE, 2005; COUTO; COUTO, 2006). Já as operárias são encarregadas de realizar todas as atividades de manutenção (limpeza, nutrizes, defesa e forrageamento) da colmeia (CAMARGO, 2002).

Geralmente, uma colônia pode conter, aproximadamente, 60 mil abelhas operárias, 400 zangões e 1 rainha. Com um ciclo de vida dividido em 4 fases: ovo, larva, pupa e adulto, as diferentes castas podem variar quanto ao seu tempo de desenvolvimento (Tabela 1) (CRUZ-LANDIM, 2009).

Tabela 1. Período de desenvolvimento, em dia, da rainha, operárias e zangões de *Apis mellifera* africanizada.

Desenvolvimento (dias)				
Casta	Ovo	Larva	Pupa	Total
Rainha	3	5	7	15
Operária	3	6	12	21
Zangão	3	6,5	14,5	24

Fonte: GALLO *et al.*, 2002.

Após seis dias transcorridos da fecundação, a abelha rainha inicia a postura dos ovos diretamente sobre um substrato presente no fundo dos alvéolos de cria. Enquanto no terceiro dia após a postura ocorre o nascimento das larvas, ao sexto dia se inicia o processo da pré-pupa. Com o casulo formado, o desenvolvimento do inseto se inicia e vai até o momento em que o indivíduo adulto esteja formado (CRUZ-LANDIM, 2009; ROSA, 2017).

Os zangões são os únicos indivíduos machos dentro da colmeia. Sua maturação sexual ocorre ao 12º dia de vida, sendo que este não realiza nenhum tipo de trabalho e morre após a fecundação da rainha. Isto ocorre devido a presença de acúleos em seu órgão genital, que ficam presos no órgão genital da rainha, impedindo assim o afastamento do zangão após a cúpula (WIESE, 2005; CRUZ-LANDIM, 2009).

As abelhas operárias são indivíduos femininos, que apresentam órgão reprodutor atrofiado e transformado em ferrão. Responsável pelos cuidados dentro da colônia, a divisão das atividades é de acordo com a idade fisiológica da operária (Tabela 2) (GALLO *et al.*, 2002; ITAGIBA, 1997). Durante toda a sua vida adulta, elas auxiliam na limpeza da colmeia, na criação e alimentação das larvas e na proteção e busca por alimento (néctar, pólen, água e outros) (COUTO; COUTO, 2006).

Tabela 2. Relação idade e atividades realizadas pelas operárias de *Apis mellifera* africanizada.

Atividade	Idade (em dias)	Descrição da Atividade
Limpeza	Recém-nascida ao 5º dia	Limpeza dos alvéolos de cria e das abelhas recém-nascidas.
Nutrizes e cuidadoras	5º ao 10º dia	Cuidado das crias e alimentação das larvas em desenvolvimento.
Construtora	11º ao 20º dia	Construção de favos e pela desidratação do néctar, elaboração do mel e empacotamento do pólen.
Defesa	18º ao 21º dia	Com as glândulas hipofaríngeas e mandibulares desenvolvidas, bem como o acúmulo de veneno, realizam a defesa da colmeia contra saqueadores e outros
Campeira	22º dia a diante	Coleta de pólen, néctar, resinas e água.

Fonte: COUTO; COUTO (2006).

3.3. Inseticidas e o Setor Florestal

A utilização de agrotóxicos no meio agrícola teve seu início após o fim da II Guerra Mundial, através da Revolução verde que trouxe para o campo novas tecnologias para impulsionar a produção de alimentos (BORSOI *et al.*, 2014). Agrotóxicos também conhecidos como produtos fitossanitários ou defensivos agrícolas, são substâncias e/ou compostos de natureza química que tem como principal objetivo prevenir, repelir, inibir ou controlar insetos-pragas, doenças e/ou patógenos que ocorrem em lavouras agrícolas e/ou culturas florestais (CEZIMBRA, 2004; SINDIVEG, 2020).

Eles podem ser classificados como agrícolas (para uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens e florestas plantadas) e não-agrícolas (para uso na proteção de florestas nativas e outros). Podem ser também classificados conforme o seu organismo-alvo em inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, acaricidas, rodenticidas, desfolhantes e fumegantes (EICH, 2015; RIBEIRO; CAMELLO, 2014).

Dentro do setor florestal, a utilização de defensivos agrícolas, como inseticidas, está ligada com as atividades de implantação e manutenção de povoamentos florestais (FARIA, 2009). Porém, essa prática é bastante restrita e limitada, uma vez que para atender os requisitos necessários para a certificação internacional, as empresas florestais precisam praticamente extinguir o uso de

produtos químicos em campo (PEREIRA; CALDEIRA; SOARES, 2016; SILVA et al., 2016).

As principais culturas que apresentam algum agrotóxico registrado para controle de doenças ou insetos-praga como formigas cortadeiras ou cupins, são a Seringueira, Teca, Populus, Acácia-nega, Paricá, Álamo, Pinus e o Eucalipto (PENTEADO *et al.*, 2017; AGROFIT, 2022). A cultura do Eucalipto é a que possui mais produtos registrados, com, aproximadamente, 25 inseticidas químicos formulados, sendo que simultaneamente ao aumento de áreas plantadas, há um aumento na liberação de agrotóxicos (BARROSO *et al.*, 2022; AGROFIT, 2022).

Em 2019, segundo o Relatório Anual do IBÁ (2020), o território brasileiro apresentava, aproximadamente, 6,97 milhões de hectares de florestas plantadas de eucalipto, cerca de 77,4% da área total de florestas cultivadas. Dos 9 milhões de hectares plantados no Brasil, 3,73 milhões de hectares apresentava algum tipo de certificação florestal, seja ela FSC® (Forest Stewardship Council) ou Cerflor (Programa Brasileiro de Certificação Florestal) comuns dentro do setor florestal (IBÁ, 2021).

No ano de 2010, o FSC® colocou em vigor por cinco anos a suspensão do uso dos inseticidas fipronil e sulfluramida, além do imidaclopride, em cultivos florestais que apresentassem seu selo. Essa proibição se fez necessário pois, segundo a certificadora, esses inseticidas estariam sendo prejudiciais para a fauna de cupins e formigas cortadeiras além de outros insetos (EVANGELISTA, 2009; PENTEADO *et al.*, 2017). No entanto, as empresas florestais alegaram impossibilidade do controle de determinadas pragas com produtos alternativos existentes no mercado, uma vez que seu modo de ação é diferente (ANTUNES *et al.*, 2016).

Outro ponto levantado é que qualquer valor acima de 5% de perda durante os plantios devido a insetos-praga, por exemplo, torna-se caro para a empresa, uma vez que o custo com o controle pode chegar a 75% do total disponibilizado (ALVES, 2015). Desta forma, uma derrogação foi concedida às organizações florestais brasileiras, permitindo a utilização novamente do inseticida fipronil em seus plantios florestais (ANTUNES *et al.*, 2016).

3.4. Mortalidade das Abelhas

As constantes aplicações de produtos químicos, como os agrotóxicos, no ambiente em volta das colônias têm afetado as abelhas, mesmo que de forma indireta (GREGORC; ELLIS, 2011). Perda de abelhas adultas, resistência na recolonização

de colmeias vizinhas, além do abandono de colônias inteiras intactas com mel, cria e rainha jovem, foram detectados por agricultores americanos entre os anos de 2006 e 2007 (PETTIS; DELAPLANE, 2010; THOMPSON, 2016)

Este desaparecimento massivo de abelhas das colônias observado pela primeira vez na costa leste dos Estados Unidos, foi considerado posteriormente como uma síndrome, denominada CCD "*Colony Collapse Disorder*" ou Distúrbio do Colapso das Colônias (LIMA; ROCHA, 2012; GUZMAN-NOVOA, 2016).

É de consenso entre pesquisadores, que a CCD ocorre devido a combinação complexa de múltiplos agentes, desde patógenos, parasitas, má nutrição, agrotóxicos e estressores ambientais (perda de habitat, queimadas, mudanças climáticas, etc), que contribuem para o acontecimento da CCD (DAINAT; VANENGELSDORP; NEUMANN, 2012; FRAZIER *et al.*, 2011; SURYANARAYANAN; KLEINMAN, 2013).

No Brasil, o distúrbio do colapso das colônias não é bem documentado, o que compromete a avaliação dos possíveis casos desta síndrome. Isto ocorre devido à falta de registro por parte de órgãos responsáveis, como MAPA e secretarias da agricultura, das colônias dos apiários, meliponários e ambientes naturais (PIRES *et al.*, 2016). O primeiro caso foi em 2008, no Estado de São Paulo, onde foram registradas colônias com alimento, poucas crias, poucas abelhas adultas e a rainha (MESSAGE *et al.*, 2011). Entretanto esta primeira ocasião, os dados apresentados dos patógenos bem como as características observadas pelo produtor, não indicaram que a mortalidade ocorrida ali estava associada a CCD (PIRES *et al.*, 2016).

As modificações na paisagem ao longo dos últimos 60 anos no país pela agricultura e pelo desmatamento, tem provocado grande impacto, seja ele direto ou indireto, na mortalidade das abelhas (BORSOI *et al.*, 2014). Práticas como degradação de áreas de nidificação, fragmentação florestal e redução da abundância e diversidade dos recursos estão conectados a estas mudanças (GOULSON *et al.*, 2015). Além disso, mudanças climáticas, como o aumento das temperaturas e dos regimes de chuva provocadas por processos antrópicos têm alterado a dinâmica da flora e dificultado a termorregulação das colmeias, impedindo que as abelhas realizem as suas atividades corriqueiras e diminuindo o crescimento e sobrevivência das mesmas (MOREIRA; MANSUR; FIGUEIRA-MANSUR, 2012; CUNNINGHAM *et al.*, 2022;). Desta forma, as práticas de desmatamento juntamente com a redução dos remanescentes sobreviventes ao desenvolvimento urbano, têm provocado efeitos nos polinizadores (VIANA *et al.*, 2012).

Os agrotóxicos, em sua essência, têm como função auxiliar no aumento da produção, melhoria da qualidade da cultura e redução de perdas, seja ela agrícola ou florestal (COUTINHO *et al.*, 2005). No setor agrícola, os agrotóxicos podem ser usados para o controle de doenças e pragas, sendo aplicados por pulverização de soluções diluídas ou por suspensão líquida (KISSMANN, 1998). Logo, a exposição das abelhas *A. mellifera*, por exemplo, a esses produtos pode ocorrer de várias formas, desde o contato oral com produtos (como néctar, água e pólen), contaminados durante o forrageamento ou pelo consumo de contaminantes dentro da colmeia ou ainda por contato tópico com o agrotóxico (TOMÉ *et al.*, 2019).

Diferentes concentrações de determinados agrotóxicos podem provocar a morte imediata das abelhas (ALIOUANE *et al.*, 2009), enquanto a exposição em a concentrações não-letais pode comprometer o comportamento, a biologia e aspectos neurais de *A. mellifera* (JOHNSON, 2015).

3.5. Caracterização do Fipronil e o efeito sobre abelhas

O Fipronil é um inseticida sintético sistêmico neurotóxico, nomenclatura oficial da União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC, (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile, pertencente ao grupo químico Pirazol, desenvolvido em 1987 pela Rhône-Poulenc Ag Company, atualmente conhecida como Bayer CropScience (ANVISA, 2021; PROVASE, 2022).

O Fipronil atua diretamente no sistema nervoso central de organismos, apresentando largo espectro de ação e alta eficiência de controle, bem como um mecanismo de ação que pode ser por contato ou ingestão (JACOB, 2012; ROAT *et al.*, 2013). Além de provocar hiperexcitação, ele ocasiona convulsões e paralisias nos insetos o que impossibilita as transmissões de ações potenciais no impulso nervoso, levando-os assim a morte (JOHNSON, 2015; ROSA, 2017).

Em virtude de ser um produto neurotóxico, o inseticida Fipronil apresenta alta afinidade com os canais de cloro, controlado pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) que interrompem o fluxo de íons de cloro dentro da membrana (BOVI, 2013; NOCELLI *et al.*, 2012). Ou seja, quando a molécula do inseticida se liga ao canal de cloro ele bloqueia a ligação que existe entre os canais de cloro com o GABA, provocando inibição sináptica no sistema nervoso central (SNC) do inseto e, conseqüentemente, diminuição de impulsos nervosos estimulados (PEDRO, 2008).

Sua classificação é de categoria de perigo III – moderadamente tóxico – faixa amarela pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária quanto a sua toxicidade aguda (CL₅₀). Já de acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis este inseticida é classificado como potencial de periculosidade ambiental II - muito perigoso ao meio ambiente – dentro da classe de agrotóxicos de uso não-agrícola (IBAMA, 2021; AGROFIT, 2022).

No Brasil, este inseticida pode ser encontrado nos mais diferentes tipos de formulação, desde isca em gel, líquido premido, pó seco, micro-emulsão, isca, isca em pasta, líquidos, suspensão concentrada e isca em grânulos, para as mais diversas culturas agrícolas (batata, milho, algodão, arroz, dentre outros) e florestais (eucalipto, acácia-negra, pinus, teca, seringueira, populus e paricá) (CALLOU, 2021; ANVISA, 2021).

No meio ambiente, o inseticida Fipronil pode formar quatro metabólitos: em fipronil-amida, fipronil-sulfona, sulfeto de fipronil e em fipronil-dessulfenil, sendo este último degradado pela luz solar e extremamente estável e tóxico, mais do que composto original (KILJANEK; NIEWIADOWSKA; POSYNIK, 2016; TINGLE *et al.*, 2003). Devido sua lenta taxa de fotólise, aproximadamente 96 horas para 1,4% do total, o fipronil-dessulfenil é considerado um dos principais resíduos deixados em campo quando aplicado (SINGH *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2021). A meia-vida do Fipronil pode variar de 36 horas na camada superior do solo até 7 meses após sua aplicação o que faz aumentar o risco de exposição deste aos seus organismos-alvo e aos organismos não-alvo, com as abelhas, além de indicar que este pode se deteriorar por condições oxidativas e/ou redutivas (ASTOLFI, 2021; DE TOFFOLI, 2014).

A concentração e/ou dose letal mediana (CL₅₀) para abelhas é de 0,004 mg/abelha. Esse valor indica que o inseticida Fipronil é altamente tóxico para este organismo, uma vez que ele provoca nas abelhas a diminuição dos seus impulsos nervosos, que interfere em suas atividades motoras e de aprendizagem bem como em suas percepções gustativas, sendo estas funções importantes e necessárias para o forrageamento (EL HASSANI *et al.*, 2005; TINGLE *et al.*, 2003).

Estudos realizados por Keshlaf; Basta; Spooner-Hart (2013); Souza (2009); Zaluski (2014) indicaram que o inseticida Fipronil nas concentrações de 0,01 e 0,00035 mg/abelha, 0,0001 mg/abelha e 0,0004 mg/abelha respectivamente, provocaram alterações comportamentais como tremores, convulsão e paralisia nas abelhas *A. mellifera* quando esta ingeriu o produto. Zaluski *et al.* (2015) avaliando

mudanças no comportamento e na coordenação motora de *A. mellifera* após contato com o inseticida fipronil, observou que o mesmo provocou alterações na coordenação, comportamento e metabolismo das abelhas, o que pode atrapalhar em suas atividades e ser um fator associado a outro para a CCD.

Além da agitação e interferência nos processos de aprendizagem e memorização, alterações em enzimas-chave responsáveis por processos de regulação fisiológica, como acetilcolinesterase, carbonilesterase e glubatina S-transferase também foram observados (ROAT *et al.*, 2017).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima para os animais, cuja principal função, dentro do sistema nervoso central (SNC), é realizar a hidrólise do neurotransmissor colinérgico acetilcolina (ACh), responsável pela propagação dos impulsos nervosos (MOTA *et al.*, 2012; AZEVEDO, 2013). A sua inibição, provocada por inseticidas químicos sistêmicos como o Fipronil, por exemplo, pode gerar um acúmulo dos neurotransmissores nas membranas sinápticas do sistema nervoso central, resultando em convulsões, hiperexcitação, paralisia e, conseqüentemente, morte dos insetos (SANT'ANNA, 2009; SILVA, 2012).

Paloschi (2021), avaliando o efeito do Fipronil no mel e em operárias de *A. mellifera*, observou que as amostras de mel provenientes de quatro apiários convencionais presentes dentro da área de estudo, apresentaram contaminação acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) preconizados pela U.E (0,005 µg/mL). A concentração letal média (CL₅₀ em 48 horas) encontrada, cerca de 0,0073 mg/mL, provocou alta mortalidade nas abelhas quando estas entraram em contato com superfície vítrea contaminada. Este valor é muito inferior ao recomendado, por exemplo, pelo produto comercial Nortox 800 WG® (250 µg/mL) no campo.

Logo, é possível observar que além de apresentar letalidade em quantidades mínimas, quando aplicado em campo, o inseticida Fipronil pode apresentar um tempo de permanência nas espécies vegetais prolongado. Este período é também conhecido como efeito residual, tempo em que determinado estressor (agrotóxico) permanece em seu receptor (planta), bem como nos produtos da planta, como solo, ar, alimento e água, controlando uma doença e trazendo assim complicações toxicológicas (CHAM *et al.*, 2020; GASPAROTTO *et al.*, 2023).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local dos Experimentos

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Controle Biológico I e II, na Unidade de Ensino e Pesquisa Apicultura (UNEPE - Apicultura) e no Laboratório Multiusuário Central de Análises (LabCA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos. Os experimentos foram conduzidos a partir das seguintes adaptações metodológicas: Libardoni *et al.* (2021), Baptista *et al.* (2009), Carvalho *et al.* (2009), além de seguir as diretrizes para experimentos de toxicidade em laboratório da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) nº 213 e nº 214 de setembro de 1998 (OECD, 1998a, 1998b).

4.2. Obtenção do Produto Fipronil

O Fipronil utilizado nos bioensaios foi obtido de uma solução padrão (com pureza de 99,9% grau HPLC) da empresa Sigma-Aldrich®. A partir desta foi preparado uma solução estoque, pesando em uma balança analítica (Shimadzu®) cerca de 6,0 mg de Fipronil e dissolvendo o mesmo em um balão volumétrico com capacidade de 10 mL, utilizando o solvente metanol grau HPLC, conseguindo assim uma solução de 600 µg/mL de Fipronil.

4.3. Obtenção das Abelhas *Apis mellifera*

As abelhas, de 24 a 48 horas de vida adulta (pós emergência), de *A. mellifera* africanizada utilizada nos bioensaios foram provenientes de favos com crias operculadas da UNEPE Apicultura. Para estas, foram retirados quadros identificados aos 19 dias, com crias operculadas. Estes quadros foram acondicionados em papel Kraft perfurado e lacrado com fita adesiva até o momento de serem transportados para o Laboratório de Controle Biológico I. Os mesmos foram acomodados em câmara climatizada (tipo B.O.D.) nas condições $30 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas, por aproximadamente 48 horas, com intuito de recriar as condições ambientais existente dentro das colônias e assim obter emergência homogênea das abelhas.

4.4. BIOENSAIO 1: Sobrevivência de *Apis mellifera* após contato com Fipronil

Para o bioensaio por contato das abelhas com o produto, foi realizada a pulverização de 290 µL dos tratamentos na superfície interna das placas de Petri de

vidro (15 cm de diâmetro x 1,5cm de altura) em toda sua superfície, com auxílio de um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão constante (1,2 kgf/cm). Para a secagem das placas, as mesmas foram acomodadas em câmara de fluxo laminar horizontal (Veco[®]), de forma que fosse possível o fluxo de ar entre elas e a evaporação completa da água. Os tratamentos, provenientes da solução estoque, foram compostos por 5 concentrações (T1 - 0,75 µg/mL T2 - 1,5 µg/mL; T3 - 3 µg/mL; T4 - 6 µg/mL; T5 - 12 µg/mL) e um tratamento controle (T0) com água destilada esterilizada.

Quanto ao manuseio das abelhas, as mesmas foram anestesiadas com dióxido de carbono (CO₂) por até 120 segundos a fim de se realizar a transferência delas para as placas. Cada um dos seis tratamentos apresentou 10 placas com grupos de 10 indivíduos, sendo cada placa considerada uma repetição. As abelhas permaneceram em contato com essas placas pulverizadas pelo período de duas horas. Posteriormente a este período, as abelhas foram realocadas em gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) e cobertas com tecido *voil*. Sobre este foram disponibilizados, como fonte de alimento, pasta Cândi (50 g de açúcar de confeitiro + 10 mL de mel) e algodão embebido em água destilada esterilizada.

As gaiolas contendo as abelhas foram levadas a uma sala climatizada (27± 2°C, U.R. 60 ± 10%, fotofase de 10/14 horas C/E) onde a mortalidade das operárias foi contabilizada a um, dois, quatro, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após contato com o inseticida. As abelhas foram consideradas mortas quando as mesmas não reagiram ao toque de uma pinça Bioquip[®].

4.5. BIOENSAIO 2: Ação da fotodegradação do Fipronil sobre a sobrevivência de *Apis mellifera*

A pulverização de 290 µL do inseticida Fipronil foi realizada na concentração letal média (CL₅₀ de 48 horas) de 5 mg/mL, preparada através da solução estoque, na superfície interna das placas de Petri de vidro (15 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) com auxílio de um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão constante (1,2 kgf/cm). Para a secagem das placas, as mesmas foram acomodadas em câmara de fluxo laminar horizontal (Veco[®]), de forma que fosse possível o fluxo de ar entre elas e a evaporação completa da água. Os tratamentos constituíram-se de dois grupos – com e sem fotoperíodo, sendo um mantido em condições de temperatura controlada (26 ± 2°C e UR 60%) e luminosidade ambiental,

com incidência de luz enquanto o outro foi mantido dentro de um recipiente plástico preto (58 cm x 40 cm x 34 cm), que não permitiu a entrada de luz. A testemunha consistiu da pulverização com água destilada esterilizada para ambos grupos.

O primeiro grupo de placas, exposto a luz, foi pulverizado nove, seis e três dias antes da montagem do bioensaio. O mesmo foi realizado para o segundo grupo, sendo estes mantidos sem luz. A pulverização em diferentes datas corresponde ao efeito residual depois de nove dias do produto aplicado, depois de seis dias do produto aplicado, depois de três dias do produto aplicado e depois de zero dias do produto aplicado.

Quanto ao manuseio das abelhas, estas foram anestesiadas com dióxido de carbono (CO₂), por até 120 segundos a fim de se realizar a transferência delas para as placas. Para cada dia de pulverização e tipo de exposição, foram preparadas cinco placas com 10 indivíduos cada (Tabela 3). Ao final, as abelhas permaneceram em contato com essas placas pulverizadas pelo período de duas horas. Posteriormente, as abelhas foram realocadas em gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro), cobertas com tecido *voil*.

Nas gaiolas foram disponibilizados, em uma tampa de garrafa PET, uma solução açucarada (proporção 1:1 de açúcar e água destilada esterilizada) como fonte de alimento. Em seguida as gaiolas contendo as abelhas foram levadas a uma sala climatizada (27± 2°C, U.R. 60 ± 10%) onde a mortalidade das operárias foi contabilizada a dois, quatro, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após contato com o inseticida.

Tabela 3. Caracterização dos tratamentos do bioensaio de sobrevivência de operárias de *Apis mellifera* africanizada após contato com o inseticida Fipronil.

Tratamentos	Luz	Dias	Produto
T0	Presença	9	Água (testemunha)
T0	Ausência	9	Água (testemunha)
T0	Presença	6	Água (testemunha)
T0	Ausência	6	Água (testemunha)
T0	Presença	3	Água (testemunha)
T0	Ausência	3	Água (testemunha)
T0	Presença	0	Água (testemunha)
T0	Ausência	0	Água (testemunha)
T1	Presença	9	Pulverização fipronil
T1	Ausência	9	Pulverização fipronil

T2	Presença	6	Pulverização fipronil
T2	Ausência	6	Pulverização fipronil
T2	Presença	3	Pulverização fipronil
T2	Ausência	3	Pulverização fipronil
T4	Presença	0	Pulverização fipronil
T4	Ausência	0	Pulverização fipronil

Fonte: Autor (2023).

4.6. BIOENSAIO 3: Análises Bioquímicas

Para o bioensaio de análises bioquímicas em abelhas recém-emergidas expostas ao inseticida Fipronil, foi realizado a pulverização de 290 μ L do produto na concentração letal média (em 24 e 48 horas) 5 mg/mL da solução padrão, respectivamente, na superfície interna das placas de Petri de vidro (15 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) com auxílio de um aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Fanem[®] de pressão constante (1,2 kgf/cm). Para a secagem das placas, as mesmas foram acomodadas em câmara de fluxo laminar horizontal (Veco[®]), de forma que fosse possível o fluxo de ar entre elas e a evaporação completa da água. Os tratamentos foram compostos pela CL₂₄ e CL₄₈ horas de Fipronil e por um tratamento pulverizado com água destilada esterilizada.

Quanto as abelhas, as mesmas foram anestesiadas com CO₂ por até 120 segundos a fim de se realizar a transferência delas para as placas. Cada um dos tratamentos apresentou quatro placas com grupos de 15 indivíduos, sendo que a cada três abelhas era considerada uma replicata. Ao final, um grupo permaneceu com as abelhas em contato com as placas pulverizadas pelo período de 4 horas e, em seguida, as abelhas foram congeladas no ultrafreezer vertical LIF640 (Labinfarma Scientific[®]) na temperatura - 80°C.

O outro grupo ficou em contato por apenas 2 horas com as placas e, posteriormente, estas abelhas foram realocadas em gaiolas de PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro), cobertas com tecido *voil*. Em seguida, as gaiolas contendo as abelhas e a alimentação padrão, foram levadas a uma sala climatizada nas mesmas condições descritas no bioensaio 2 (item 4.5), onde ficaram por 24 e 48 horas, respectivamente, após contato com o inseticida.

Após este período, as abelhas foram retiradas das gaiolas e transferidas, novamente, agora para tubos tipo Falcon até serem levadas para o ultrafreezer. As abelhas congeladas, foram fracionadas e a cabeça retirada e homogeneizada, dentro

de um almofariz, em uma Solução Tampão Fosfato salina - PBS (pH 7,5). Após isso, essa solução concentrada foi levada a uma centrifuga refrigerada (Novatecnica®) a -4°C por 20 minutos a 15.000 x g.

O sobrenadante resultante da centrifugação foi ainda ajustado com 1 mg/mL com PSB, conforme metodologia de Zhu *et al.* (2017) e Iturbe-Requena *et al.* (2020) e foi determinada pela técnica de Ellman *et al.* (1961). As leituras dessa nova solução foram realizadas pelo Espectrofluorímetro digital Vitor® Nivo. A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi medida pelo método de *Iturbe-Requena et al.* (2020).

4.7. Análises Estatísticas

Para a análise dos bioensaios 1 e 2, com Fipronil por contato com placas de Petri de vidro, foi realizado a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier a fim de verificar a persistência da ação de contato do produto sintético sobre as abelhas recém-emergidas de *A. mellifera*, enquanto para o teste de comparação entre os tratamentos foi empregado o teste de log-rank. A análise integral dos dados foi feita através do pacote de sobrevivência (THERNEAU, 2015) do software R (R core Team, 2019).

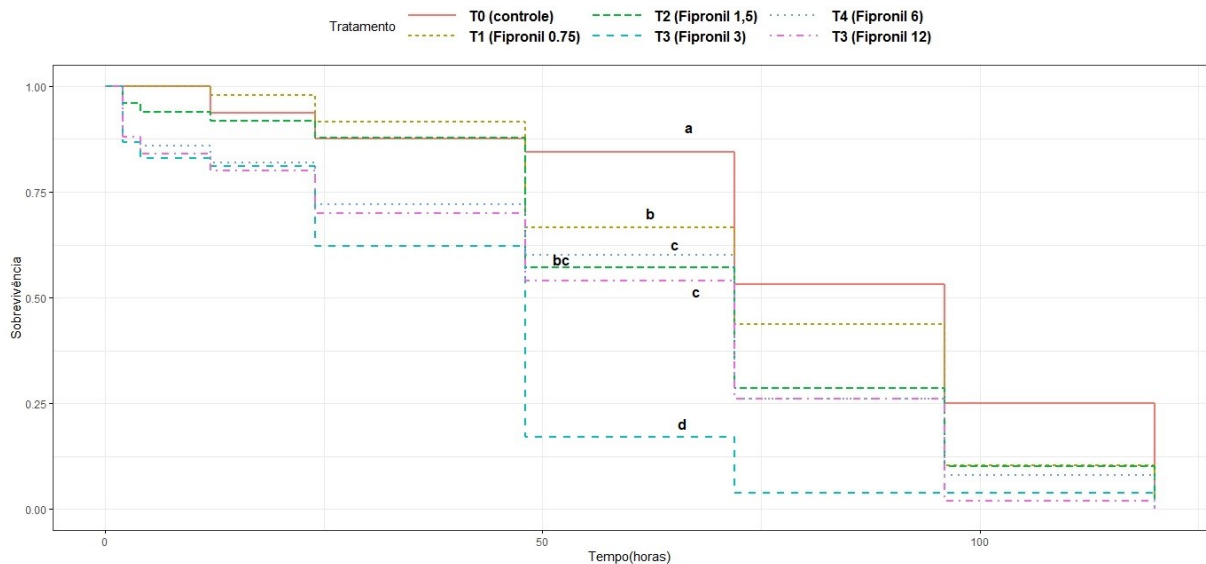
Já para o bioensaio 3, sobre as análises bioquímicas das abelhas expostas ao Fipronil, foi realizado uma análise de variância (ANOVA) para comparação dos resultados, enquanto para o teste de comparação entre as médias foi empregado o pacote Emmeans. As médias foram comparadas pelo teste de Turkey, com 5% de significância, no programa R.

5 RESULTADOS

5.1. BIOENSAIO 1: Sobrevivência de *Apis mellifera* após contato com Fipronil

O efeito residual ocasionado pela pulverização do inseticida fipronil sobre as operárias de *A. mellifera*, provocou maior redução na sobrevivência de operárias no tratamento T3, concentração de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (18%), quando comparada às demais concentrações no mesmo período de 50 horas (Figura 1). Este valor se diferenciou do apresentado pelo tratamento controle (água), qual apresentou, no mesmo período, aproximadamente 82% de abelhas vivas.

Figura 1. Gráfico de sobrevivência de Kaplan-Meier conforme o tempo (horas) para o bioensaio de sobrevivência de *Apis mellifera* após contato com o inseticida Fipronil. T0 – tratamento controle (água); T1 – $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$; T2 – $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; T3 – $3 \mu\text{g mL}^{-1}$; T4 – $6 \mu\text{g mL}^{-1}$, T5 – $12 \mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: Autor (2023).

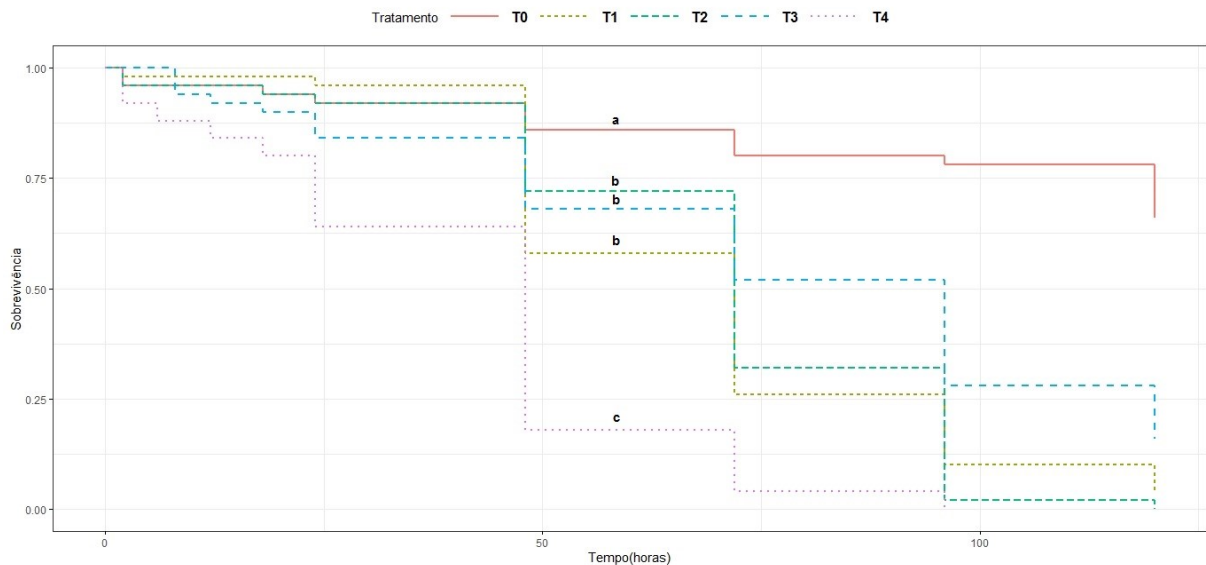
A concentração de $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (54%), tratamento T5, foi a segunda concentração que causou maior redução na sobrevivência de operárias de *A. mellifera* africanizada, seguindo das concentrações de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (56%), tratamento T2, $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (60%), tratamento T4 e $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ (70%), tratamento T1, respectivamente, indicando assim que a concentração $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (18%) teve uma ação mais rápida e letal no mesmo período, de 50 horas.

5.2. BIOENSAIO 2: Ação da fotodegradação do Fipronil sobre a sobrevivência de *Apis mellifera*

Quanto a fotodegradação tratamento T4, de contato com placa no tempo zero, causou maior redução na sobrevivência de operárias de *A. mellifera* quando comparada com o resíduo do inseticida submetido a diferentes dias de fotodegradação (com presença de luz). Esta redução ocorreu, principalmente após 50 horas de contato das abelhas com as placas.

A sobrevivência das abelhas foi de, aproximadamente, 18% no tratamento “zero dia” (T4), 56% no tratamento de nove dias de fotodegradação (T1), 68% no tratamento de seis dias de fotodegradação (T2) e de 72% no tratamento com três dias de fotodegradação (T3) (figura 2). Enquanto a testemunha (T0) 75% das abelhas vivas neste período. Desta forma observa-se que o produto fotodegradado foi menos letal que o produto recentemente pulverizado.

Figura 2. Gráfico de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Apis mellifera* africanizada após o contato com o inseticida Fipronil submetido a presença de luz por diferentes dias. Sendo T0 = testemunha; T1 = nove dias; T2 = seis dias; T3 = três dias; T4 = zero dia.

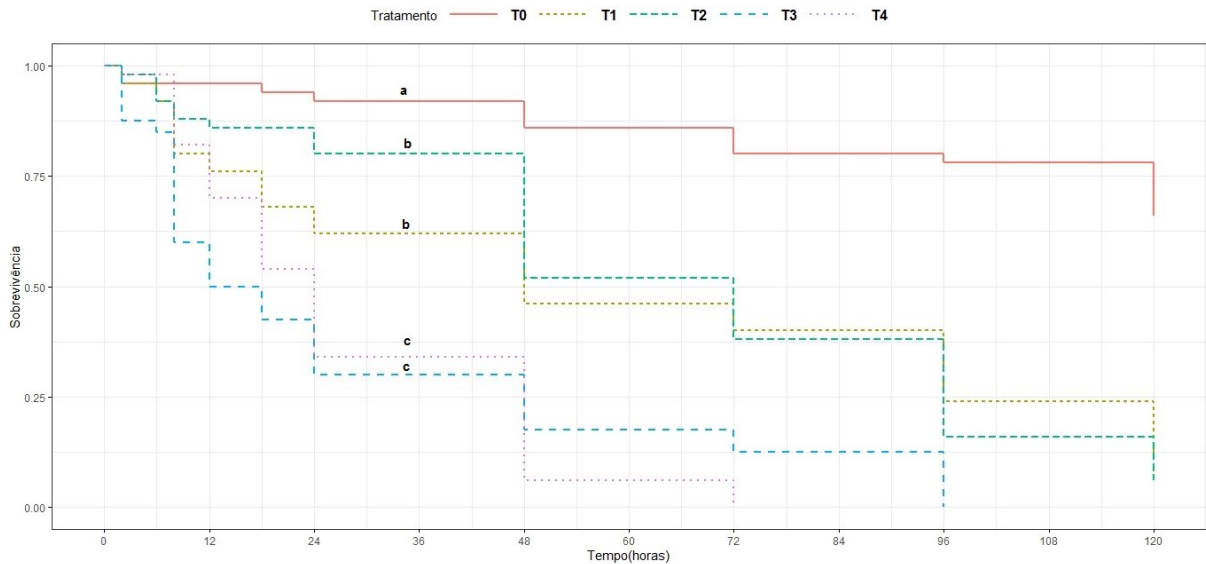


Nota: As mesmas letras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). **Fonte:** Autor (2023).

O inseticida Fipronil, pulverizado em placas de petri protegidas da exposição da luz (sem fotodegradação) e, posteriormente disposta para contato com as operárias de *A. mellifera*, provocou redução na sobrevivência destas abelhas. O tratamento “zero dia” (T4) apresentou apenas 6% de abelhas vivas, 50 horas após o contato inicial. Nas placas com tratamento de três dias (T3), apenas 31% das abelhas estavam vivas neste período, nas placas com o tratamento de nove dias (T1) 48% das

abelhas estavam vivas, e no tratamento de seis dias (T2), 52% das abelhas estavam vivas. Já nas placas em que as abelhas entraram em contato com a testemunha (T0), foi constatado 75% de sobrevivência neste mesmo período (figura 3).

Figura 3. Gráfico de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Apis mellifera* africanizada após o contato com o inseticida Fipronil submetido a ausência de luz por diferentes dias. Sendo T0 = testemunha; T1 = nove dias; T2 = seis dias; T3 = três dias; T4 = zero dia.

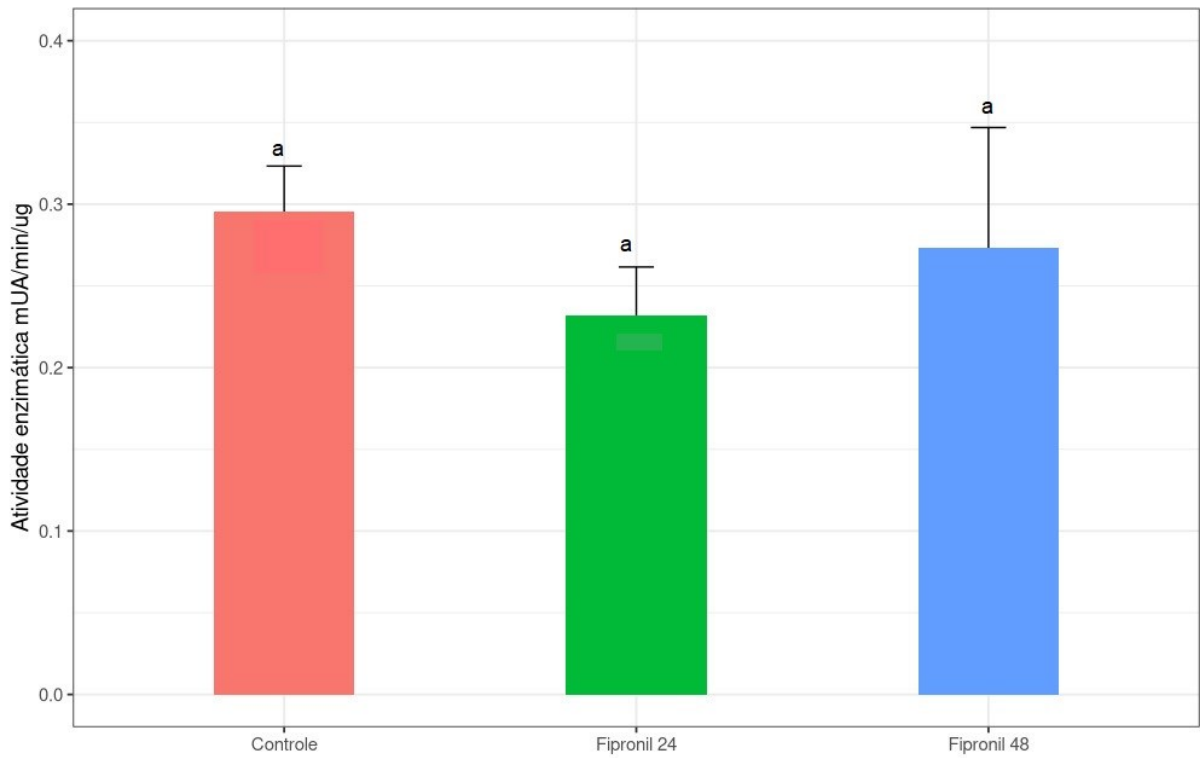


Nota: As mesmas letras indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). **Fonte:** Autor (2023).

5.3. BIOENSAIO 3: Análises Bioquímicas

Pode-se observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos CL₂₄ e CL₄₈ horas do inseticida Fipronil na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) bem como em relação a ausência deste produto (testemunha), em operárias de *A. mellifera*. Em um período de 48 horas, a média da atividade enzimática do Fipronil na CL₄₈ se encontrava em 0,273 mUA/min/ μ g enquanto a média da atividade enzimática do Fipronil na CL₂₄ se encontrava 0,232 mUA/min/ μ g (Figura 4).

Figura 4. Gráfico TurkeyHSD (Teste de Tukey da Diferença Honestamente Significativa) da atividade enzimática de AChE em operárias de *Apis mellifera* africanizada após contato com inseticida fipronil.



Nota: Letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). **Fonte:** Autor (2023).

6 DISCUSSÃO

Enquanto realizam o forrageamento, as abelhas *A. mellifera* estão em constante exposição e contato a diferentes tipos de partículas e/ou substâncias tóxicas suspensas no ar ou presentes no néctar, pólen e água (LU; HUNG; CHENG, 2020; WOLFF; REIS; SANTOS, 2008). A partir dos bioensaios realizados no presente trabalho, é notório o efeito rápido e letal que o inseticida químico fipronil tem sobre as abelhas quando encontrado em superfícies, como no pólen, néctar, água e outros.

No bioensaio 1, a concentração de 3 µg mL⁻¹, em 50 horas, foi extremamente letal e causou redução da sobrevivência das operárias de *A. mellifera*, deixando somente 18% delas vivas neste período. Isto pode ter ocorrido devido ao fipronil ter impedido os canais de cloro se abrirem e realizarem a despolarização da membrana pós-sináptica, provocando assim uma hiperexcitação do sistema nervoso central das abelhas (EL HASSANI *et al.*, 2005; PEDRO, 2008).

Carrillo *et al.* (2013), trabalhando com abelhas expostas a doses de fipronil por contato e ingestão, observaram que a concentração de 0,1 e 0,01 µg abelha⁻¹ era suficiente para causar prejuízos comportamentais e fisiológicos em *A. mellifera*. Já Roat *et al.*, (2013) observaram que o inseticida fipronil na dose subletal de 0,01 µg mL⁻¹ é perigoso para as atividades neurais das abelhas, mesmo em baixas concentrações.

Keshaf; Basta; Spooner-Hart (2013) avaliando a toxicidade do inseticida fipronil sobre *A. mellifera*, constatou que o contato via tópico do produto com as abelhas na dose letal (LD₅₀) de 1,9 µg abelha⁻¹ provoca redução da sobrevivência de operárias. ZALUSKI *et al.*, (2015) verificou que o fipronil quando administrado por contato, nas doses entre 0,007 e 0,224 µg, foi mais tóxico do que quando ingerido pelas abelhas.

Logo, é evidente que até a menor concentração utilizada no bioensaio 1, de 0,75 µg mL⁻¹, provocou redução na sobrevivência das abelhas, tendo somente como diferencial o tempo e potência da degradação do princípio ativo. O fipronil apresenta rápida degradação no ambiente, aproximadamente 36 horas (meia vida), e diferentes metabólitos ao final do processo: fipronil-amida, fipronil-sulfona, sulfeto de fipronil e o fipronil-dessulfinil (ASTOLFI, 2021; KILJANEK; NIEWIADOWSKA; POSYNIK, 2016; PROVASE, 2022).

O tratamento T4, sem presença de luz e “zero dia” de contato provocou maior redução na sobrevivência de operárias de *A. mellifera* em 50 horas. Apenas 6% das abelhas estavam vivas enquanto, no mesmo período, o tratamento T4, com presença de luz e “zero dia” de contato, apresentava apenas 18% de abelhas vivas.

O principal produto resultante da degradação do fipronil pela luz solar ou UV, (fotólise) é o fipronil-dessulfinil, considerado um dos metabólitos mais nocivos deste processo (GUNASEKARA *et al.*, 2007). Porém, no presente trabalho este metabólito não foi mais tóxico do que o próprio princípio ativo do Fipronil, sem a presença de luz pois não foi produzido.

Estudos observando a degradação e a toxicidade dos metabólitos produzidos pelo Fipronil demonstraram que o fipronil-dessulfinil além de ser o mais resistente no ambiente, apresenta lenta taxa de fotólise. Também foi verificado que, em 60 horas de fotodegradação, 50% do fipronil-dessulfinil foi degradado pela luz UV enquanto em 96 horas de exposição de luz é suficiente para que somente 1,4% do mesmo seja convertido em outro metabólito e que somente 31% do total fotodegradado é formado por fipronil-dessulfinil (SINGH *et al.*, 2021).

A oxidação causada pelo estresse da não existência de luz durante o processo pode ter mantido a ação do princípio ativo do Fipronil, provocando maior redução na sobrevivência das abelhas em 50 horas do que o fipronil-dessulfinil na presença de luz (SIMON-DELSO *et al.*, 2015). Zhou *et al.*, (2021) verificando a biodegradação do fipronil, observou que a presença de 1% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante o processo de degradação do fipronil pela luz, acelera a formação do fipronil-dessulfinil entre 0,87-4,51 hora.

Desta forma, é importante entender que a polinização, o processo de forrageamento das abelhas mesmo sendo fundamental para o ecossistema como um todo, submete as abelhas, de forma direta ou indireta, aos mais diferentes estressores, que podem contribuir para efeitos positivos ou não a sua sobrevivência, comportamento, imunidade ou reprodução (HILL; WEBSTER, 1995; DICKEL *et al.*, 2018;).

O Fipronil, nos tratamentos em CL₂₄ e CL₄₈ horas, não provocou nenhuma alteração significativa na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em operárias de *A. mellifera*. Devido ser um inseticida antagonista, que bloqueia os receptores do neurotransmissor GABA e provoca alteração na despolarização do neurônio pós-sináptico, o Fipronil, impede que AChE hidrolise o neurotransmissor acetilcolina (ACh)

e o neurônio colinérgico retorne ao estado de repouso (SANT'ANNA, 2009; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). Roat *et al.*, (2017) avaliando a exposição de abelhas ao inseticida fipronil, observou que o mesmo não provocou alterações nas atividades teciduais da AChE em *A. mellifera*, devido a acetilcolinesterase, na dose 0,01 µg/abelha, não hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (AChE). O mesmo foi observado no presente trabalho.

Assim, mesmo exibindo uma diminuição e depois retomada na velocidade de degradação da enzima AChE entre os períodos de 24 e 48 horas, é possível considerar que a concentração utilizada não apresentou alteração e se manteve potencial de reduzir a sobrevivência de operárias de *A. mellifera*. Chicas-Mosier *et al.*, (2022) estudando o efeito da AChE em abelhas expostas a tricloreto de alumínio, observou que a maioria das concentrações testadas não apresentaram alterações na atividade enzimática, apresentando somente um pico na atividade na concentração mais alta, de 300 mg/L.

Desta forma, uma recuperação por parte das abelhas *A. mellifera* em 48 horas é possível, indicando que um pico na velocidade da degradação da AChE em 24 horas ocorreu, porém não foi suficiente para diminuir a ação do produto. Carvalho *et al.*, (2013) avaliando as respostas enzimáticas em abelhas expostas a Deltametrina, Fipronil e Spinosad, verificou que o Fipronil foi o mais tóxico com uma DL₅₀ de 5,83 ng/abelha, e mesmo assim, as abelhas não apresentaram modificação nas atividades teciduais da AChE quando expostas a este produto.

Logo, é evidente que a utilização deste produto em plantios florestais deve seguir protocolos, princípios e diretrizes, quando autorizado por órgãos certificadores, uma vez que sua ação letal foi comprovada por este trabalho e tanto outros. Portanto, recomenda-se que mais estudos avaliando o efeito residual deste inseticida sobre organismos não-alvo, além da influência do fotoperíodo em mais concentrações e a degradação da enzima AChE, devam ser realizados.

7 CONCLUSÃO

O inseticida Fipronil apresentou efeito residual e provocou redução na sobrevivência de operárias de *A. mellifera* africanizada, quando em contato com superfície contaminada, bem como quando deixado em um ambiente sem fotoperíodo. Também foi observado que o inseticida fipronil não provocou alterações na atividade enzimática da enzima AChE, na concentração de 5 mg/mL para a CL₂₄ e CL₄₈ horas.

REFERÊNCIAS

- A.B.E.L.H.A. **Atlas da Apicultura no Brasil**. v-1.3 (2021-2023). Disponível em:<<https://abelha.org.br/atlas-da-apicultura-no-brasil/>>. Acesso em 17, Abril. 2023.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Regulação de produtos e serviços: agrotóxicos – F43 Fipronil**. Disponível em:<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/f/4351json-file-1/view>>. Acesso em: 17, abril. 2022.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (2022)**. Disponível em:<https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 17, Abril. 2022.
- ALIOUANE, A. Y. et al. Titre : SUBCHRONIC EXPOSURE OF HONEYBEES TO SUBLETHAL DOSES OF PESTICIDES : EFFECTS ON BEHAVIOR thiamethoxam is below 0 . 1 ng / bee . **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 31062, 2009.
- ALVES, P. G. L. **Certificação florestal do Forest Stewardship Council (FSC) e o manejo integrado de pragas florestais em empreendimentos certificados**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2015.
- ANTUNES, L. R. et al. **Derrogação para uso de Fipronil em florestas certificadas FSC® no Brasil** Documentos Técnicos IPEF, 2016.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.
- ASTOLFI, A. **TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* L. CAMPEIRAS EXPOSTAS À DOSE AMBIENTALMENTE RELEVANTE DO FIPRONIL**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2021.
- AZEVEDO, D. S. **UTILIZAÇÃO DO TESTE DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE APLICADO NO ESTUDO DA DEGRADAÇÃO ABIÓTICA DOS AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS**. [s.l.] Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.
- BACAXIXI, P. et al. A IMPORTÂNCIA DA APICULTURA NO BRASIL. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE AGRONOMIA**, n. 20, p. 1–6, 2011.
- BARBOSA, D. B. et al. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 694–703, 2017.
- BARROSO, G. M. et al. Expansion of Planted Forests: The Risk of Pesticides Mixtures. **Forests**, v. 13, n. 1, 2022.
- BORSOI, A. et al. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 86–100, 2014.
- BOVI, T. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.** [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, 2013.

CAIRNS, C. E. et al. Bee Populations, Forest Disturbance, and Africanization in Mexico1. **Biotropica**, v. 37, n. 4, p. 686–692, dez. 2005.

CALLOU, S. M. DE S. **REVISÃO SOBRE TOXICIDADE DE INSETICIDAS A ABELHA *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)**. [s.l.] Universidade Federal de Campina Grande, 2021.

CARRILLO, M. P. et al. Influência dos agroquímicos fipronil e imidaclopride no aprendizado de abelhas *Apis mellifera* L. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 35, n. 4, p. 431–434, 2013.

CARVALHO, S. M. et al. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 2117–2124, set. 2013.

CEZIMBRA, C. . Uso de agrotóxicos ou produtos fitossanitários. 2004.

CHAM ET AL. **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/2020-12-10-Mamual_ARA_Abelhas_2ed-Ibama.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2023.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: Mecanismo De Ação, Degradação E Toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65–72, 2005.

CUNNINGHAM, M. M. et al. Honey bees as biomonitors of environmental contaminants, pathogens, and climate change. **Ecological Indicators**, v. 134, p. 108457, 2022.

DAINAT, B.; VANENGELSDORP, D.; NEUMANN, P. Colony collapse disorder in Europe. **Environmental Microbiology Reports**, v. 4, n. 1, p. 123–125, 2012.

DE OLIVEIRA, M. A. et al. Bioindicadores ambientais: Insetos como um instrumento desta avaliação. **Revista Ceres**, v. 61, p. 800–807, 2014.

DICKEL, F. et al. Increased survival of honeybees in the laboratory after simultaneous exposure to low doses of pesticides and bacteria. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0191256, 31 jan. 2018.

DOMINGOS, A. T. DE S.; NÓBREGA, M. M. DA; SILVA, R. A. DA. Biologia das abelhas *Apis Mellifera*: Uma revisão bibliográfica. **ACTA Apícola Brasilica**, v. 4, n. 2, p. 08–12, 31 dez. 2016.

DONKERSLEY, P. Trees for bees. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 270–271, n. October 2018, p. 79–83, 2019.

DOS SANTOS, A. J. et al. Produtos Não Madeireiros: Conceituação, Classificação, Valoração E Mercados. **Floresta**, v. 33, n. 2, p. 215–224, 2003.

EICH, A. P. P. **HISTÓRICO DE USO E AÇÃO DE AGROQUÍMICOS SOBRE ABELHAS DA ESPÉCIE *Apis melífera***. [s.l.] Universidade Federal do Pampa, 2015.

EL HASSANI, A. K. 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.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of

acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.

EVANGELISTA, A. L. **Impacto Do Fipronil Sobre a Comunidade De Cupins (Insecta : Isoptera) Em Áreas Cultivadas Com.** [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2009.

FARIA, Á. B. DE C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais A review of some insecticide groups used in forest pest integrated management. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais V.**, v. 5, n. 2, p. 345–358, 2009.

FAVALESSO, M. M.; GONÇALVES, R. B. ABELHAS E VESPA S (HYMENOPTERA) COMO INDICADORAS ECOLÓGICAS EM UMA ÁREA DE RESTAURAÇÃO FLORESTAL. **Oecologia Australis**, v. 21, n. 04, p. 396–406, dez. 2017.

FRAZIER, J. et al. Pesticides and their involvement in colony collapse disorder. **American Bee Journal**, v. 151, p. 779–781, 2011.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A importância econômica da polinização. **Mensagem Doce**, v. 80, p. 44–46, 2005.

FREITAS, P. V. D. X. DE et al. Declínio populacional das abelhas polinizadoras: Revisão. **Pubvet**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2017.

GASPAROTTO ET AL. **Glossário de Fitopatologia**. 4. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2023.

GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

GRAEFF, I. **A Apicultura Como Instrumento De Educação Ambiental No Contexto Social , Econômico E Ambiental**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

GREGORC, A.; ELLIS, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 2, p. 200–207, 2011.

GUNASEKARA, A. S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189–199, 2007.

GUSMÃO FILHO, J. D. et al. **CONHECIMENTO DAS TÉCNICAS DE MANEJO E IMPORTÂNCIA DAS ABELHAS PARA POLINIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE ALIMENTOS**. Anais da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia. **Anais...**2020.

HILL, D. B.; WEBSTER, T. C. Apiculture and forestry (bees and trees). **Agroforestry Systems**, v. 29, n. 3, p. 313–320, 1995.

IBÁ. Relatório Anual. **Indústria Brasileira de Árvores**, p. 96, 2022.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. Polinizadores e Polinização - um Tema Global. In: **Edusp**. [s.l: s.n.]. p. 484.

ITURBE-REQUENA, S. L. et al. Acute oral and contact toxicity of new ethyl-carbamates on the mortality and acetylcholinesterase activity of honey bee (*Apis mellifera*). **Chemosphere**, v. 242, 2020.

- JACOB, C. R. D. O. **Efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2012.
- JOHNSON, R. M. Honey bee toxicology. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 415–434, 2015.
- KESHLAF, M.; BASTA, A.; SPOONER-HART, R. Assessment of toxicity of Fipronil and its residues to Honey Bees. **Mellifera**, v. 13, n. 26, p. 30–38, 2013.
- KEVAN, P. G.; VIANA, B. F. The global decline of pollination services. **Biodiversity**, v. 4, n. 4, p. 3–8, 2003.
- KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; POSYNIK, A. Pesticide poisoning of honeybees: A review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. **Journal of Apicultural Science**, v. 60, n. 2, p. 5–24, 2016.
- KISSMANN, K. G. **Adjuvantes para caldas de produtos fitossanitários - Kissmann.pdfTecnologia e segurança na aplicação de agrotóxicos**, 1998.
- KLEINERT, A. D. M. P.; GIANNINI, T. C. Generalist bee species on Brazilian bee-plant interaction networks. **Psyche (London)**, v. 2012, 2012.
- LIBARDONI, G. et al. Possible interference of *Bacillus thuringiensis* in the survival and behavior of Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.
- LIMA, M. C.; ROCHA, S. DE A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. Brasília: Ibama: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis., 2012.
- LU, C.; HUNG, Y. T.; CHENG, Q. A Review of Sub-lethal Neonicotinoid Insecticides Exposure and Effects on Pollinators. **Current Pollution Reports**, v. 6, n. 2, p. 137–151, 2020.
- LUNARDI, J. S.; ZALUSKI, R.; ORSI, R. O. Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides Fipronil and imidacloprid in Africanized Honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 64, n. 1, p. 50–56, 2017.
- MAROCHI, M. R. **Influência do uso da terra na produção apícola**. [s.l.] Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2011.
- MESSAGE, D. et al. Colapso de colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 9, n. 3, p. 59–59, 2011.
- MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, p. 1–23, 2012.
- MOTA, W. M. et al. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 4, p. 624–628, 2012.
- OECD. **Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test**. [s.l.] OECD, 1998a.
- OECD. **Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test**. [s.l.] OECD, 1998b.

OLIVEIRA, F. A.; TALAMINI, V.; SANTOS, W. O. IMPORTÂNCIA DA POLINIZAÇÃO NO ECOSSISTEMA AGRÍCOLA. In: SILVA, F. O.; REIS, S. T. (Eds.). **Anais dos Encotros sobre os Benefícios das abelhas na agricultura**. Nossa Senhora da Glória - SE: [s.n.]. p. 29–36.

PALOSCHI, C. L. **PRESENÇA DE IMIDACLOPRID E FIPRONIL NO MEL E O EFEITO EM OPERÁRIAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA**. 2021. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste Do Paraná, Cascavel. Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola

PEDRO, J. **DETECÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE, DO INSETICIDA FIPRONIL NO ORGANISMO TESTE *Allium cepa***. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, 2008.

PENTEADO, S. DO R. C. et al. Plantações florestais comerciais e o uso de agrotóxicos em relação a alguns produtos da agricultura. In: **Plantações florestais: geração de benefícios com baixo impacto ambiental**. Brasília, DF: Embrapa Florestas, 2017. p. 79–84.

PEREIRA, E. S.; CALDEIRA, Z. V.; SOARES, M. A. Manejo integrado de pragas na eucaliptocultura: inseticidas e parasitoides são compatíveis? **Revista Agri-Environmental Sciences**, v. 2, n. 2, p. 13, 2016.

PETTIS, J. S.; DELAPLANE, K. S. Coordinated responses to honey bee decline in the USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 256–263, 2010.

PIRES, C. S. S. et al. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: Are there cases of CCD? **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422–442, 2016.

POSTELARO, E. R.; AQUINO, M. D. H.; FERRAREZI JÚNIOR, E. Apicultura Familiar. **Revista Interface Tecnológica**, v. 18, n. 1, p. 298–307, 2021.

PROVASE, M. **ANÁLISE GENOTÓXICA DO FIPRONIL® NO CÉREBRO DE ABELHAS DA ESPÉCIE *Bombus atratus* (HYMENOPTERA, BOMBINI)**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, 2022.

QUIGLEY, T. P.; AMDAM, G. V.; HARWOOD, G. H. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. **Current Opinion in Insect Science**, v. 35, p. 132–137, 2019.

RIBEIRO, B. A. L.; CAMELLO, T. C. F. REFLEXÕES SOBRE O USO DE AGROTÓXICOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS. **Revista Sustinere**, v. 2, n. 2, 16 dez. 2014.

ROAT, T. C. et al. Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of africanized honeybees. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 456–466, 2013.

ROAT, T. C. et al. Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1652–1660, 2017.

ROSA, S. L. **Uma avaliação dos efeitos advindos de inseticidas organossintéticos sobre abelhas *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) no Brasil [Revisão da Literatura]**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

- SÁNCHEZ-BAYO, F. et al. Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. **Environment International**, v. 89–90, p. 7–11, 2016.
- SANT'ANNA, F. B. Main mechanisms of insecticide resistance on insects. **Pubvet**, v. 3, n. 2, p. unpaginated, 2009.
- SANTOS, T. A. S. et al. Diversidade De Abelhas (Hymenoptera , Atlântica No Sudeste Do Brasil Bee Diversity (Hymenoptera , Apoidae) in an Atlantic Forest Fragment in Southeast Brazil. **Nbc**, v. 9, n. 18, p. 95–107, 2019.
- SILVA, E. et al. Does fipronil application on roots affect the structure of termite communities in eucalypt plantations? **Forest Ecology and Management**, v. 377, p. 55–60, 2016.
- SILVA, K. C. C. **Caracterização da Acetilcolinesterase cerebral de tucunaré, Cichla ocellaris (BLO H & SCHNEIDER, 1801): efeito de íons e pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- SIMON-DELSO, N. et al. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 2015.
- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **Mercado de Defensivos Agrícolas no Brasil (2022)**. Disponível em:< <https://sindiveg.org.br/mercado-total/>>. Acesso em: 29, junho. 2023.
- SINGH, N. S. et al. A comprehensive review of environmental fate and degradation of fipronil and its toxic metabolites. **Environmental Research**, v. 199, n. May, p. 111316, ago. 2021.
- SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. DO S. DE C. As Abelhas Como Agentes Polinizadores (The Bees Agents Pollinizer's). **Redvet**, v. VII, n. 3, p. 1–7, 2007.
- SOUZA, T. F. DE. Efeitos das doses subletais de fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais. **Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas**, v. 9, p. 49, 2009.
- SURYANARAYANAN, S.; KLEINMAN, D. L. Be(e)coming experts: The controversy over insecticides in the honey bee colony collapse disorder. **Social Studies of Science**, v. 43, n. 2, p. 215–240, 2013.
- TINGLE, C. C. D. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 176, p. 1–66, 2003.
- VANBERGEN, A. J. et al. Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 11, n. 5, p. 251–259, 2013.
- WILSON, J.; CARRIL, O. M. **The bees in your backyard: a guide to North America's bees**. [s.l.] Princeton University Press, 2016.

WOLFF, LUIS FERNANDO; SCHNELL E SCHUHIL, G. Eucaliptos e abelhas. In: OLIVEIRA, EDILSON BATISTA; JUNIOR, J. E. P. (Ed.). . **O eucalipto e a Embrapa : quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento**. Brasília, DF: Embrapa Florestas, 2021. p. 1160.

WOLFF, L. F.; REIS, V. D. A.; SANTOS, R. S. S. **Abelhas melíferas: bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica** Embrapa Pelotas, RS Embrapa Clima Temperado, , 2008. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPACT-2009-09/11875/1/documento_244.pdf>

ZALUSKI, R. **Efeito do inseticida fipronil em abelhas africanizadas e na expressão de gene relacionado ao sistema imunológico**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2014.

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. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 5, p. 1062–1069, 2015.

ZHOU, Z. et al. Biodegradation of fipronil: current state of mechanisms of biodegradation and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 20, p. 7695–7708, 29 out. 2021.

ZHU, Y. C. et al. Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–19, 2017.

ANEXO

Tabela 4. Orçamento total dos materiais e equipamentos utilizados na elaboração do TCC “Efeito Residual de Fipronil sobre *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Africanizada”.

Item	Quantidade	Valor Total (R\$)	Fonte
Açúcar	1	R\$ 31,48	Lojas Americanas
Aerógrafo Pneumatic Sagyma®	1	R\$ 199,34	Tudo sobre produtos
Alimentador	1	R\$ 27,00	Cia da Abelha
Almofariz de porcelana e pistilo (180 ml)	1	R\$ 40,00	Glasslab
Autoclave vertical	1	R\$ 40.000,00	Prismalab
Balança analítica (Shimadzu®)	1	R\$ 9.256,00	Forlab Express
Balão de vidro 25 ml	1	R\$ 27,93	Cienlab
Balão de vidro 50 ml	1	R\$ 29,57	Cienlab
Béquer 50 ml	1	R\$ 9,98	Cienlab
Bomba Fanem®	1	R\$ 12.000,00	Solab
Botas	1	R\$ 60,00	Os Juan
Caixa de luvas de látex	1	R\$ 55,00	Americanas
Caixa organizadora preta	1	R\$ 64,70	Kalunga
Câmara de fluxo laminar horizontal	1	R\$ 8.000,00	Veco®
Câmaras climatizadas	1	R\$ 6.500,00	Solab
Cavalete/suporte de colmeia	1	R\$ 51,90	Cia da Abelha
Centrifuga	1	R\$ 35.000,00	Novatecnica®
Colmeias Langstroth	1	R\$ 169,90	Cia da Abelha
Dióxido de carbono	1	R\$ 200,00	
Eppendorf	1	R\$ 144,86	Prime Cirúrgica
Espátula	1	R\$ 22,00	Glasslab
Fipronil	1	R\$ 1.300,00	
Fita crepe	1	R\$ 5,00	Magazine Luiza
Formão de apicultor	1	R\$ 69,90	Cia da Abelha
Fumigador	1	R\$ 327,87	Apícola
Gaiolas de PVC	1	R\$ 10,00	
Lâminas de cera alveolada	1	R\$ 76,50	Apícola
Luvas	1	R\$ 53,00	Os Juan
Macacões com mascara	1	R\$ 260,00	Os Juan
Melgueira	1	R\$ 81,90	Cia da Abelha
Micropipeta 1000 - 100 µL	1	R\$ 433,58	Forlab Express
Papel Alumínio	1	R\$ 2,94	Magazine Luiza
Papel Kraft (rolo)	1	R\$ 130,00	
Pinça	1	R\$ 80,00	Bioquip®
Placas de Petri de vidro	1	R\$ 17,00	Loja Netlab
Ponteiras 1000 - 100 µL	1	R\$ 163,16	Lojas Laborglas
Proveta 1000 ml	1	R\$ 118,30	Cienlab
Ração apícula	1	R\$ 348,00	Cia da Abelha
Reagente Bradford	1	R\$ 447,68	Prolab
Sacos de autoclave	1	R\$ 5,00	Cirúrgica estilo
Tecido voil	1	R\$ 6,00	
Telas excludora de rainha	1	R\$ 44,90	Cia da Abelha
Ultrafreezer (Labinfarma Scientific®).	1	R\$ 55.000,00	Labinfarma Scientific
Vitor® Nivo	1	R\$ 200.000,00	Nivo
TOTAL		R\$ 370.870,39	

Fonte: Autor (2023).