

## **Efeitos por contato e ingestão de inseticida químico, bioinseticidas e extrato de *Piper cubeba* em abelhas, em condições de laboratório.**

*Contact and ingestion effects of chemical pesticide, biopesticides and Piper cubeba extract in honeybees under laboratory conditions.*

TRUZI, Caio Cesar<sup>1</sup>; VIEIRA, Natalia Fernanda<sup>1</sup>; NASCIMENTO, Vinícius Ferraz<sup>1</sup>; SOUZA, Joice Mendonça de<sup>1</sup>; DE BORTOLI, Sergio Antonio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FCAV-Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil, [joice.mendonca@unesp.br](mailto:joice.mendonca@unesp.br).

### **RESUMO EXPANDIDO**

#### **Eixo Temático: Contra os Agrotóxicos e Transgênicos**

**Resumo:** O objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade e alterações no comportamento alimentar provocadas por inseticidas químico, biológicos e extrato vegetal em adultos de *Apis mellifera*, sendo utilizados os produtos comerciais Belt<sup>®</sup> (flubendamina), XenTari<sup>®</sup> (*Bacillus thuringiensis aizawai*), CartuchoVIT<sup>®</sup> (vírus - VPN-SfMNPV) e Diplomata<sup>®</sup> (vírus - VPN-HzSNPV), além do extrato hexânico de sementes de *Piper cubeba*. Os produtos não causaram mortalidade significativa por contato, porém por ingestão verificou-se maior mortalidade com XenTari<sup>®</sup>, enquanto os menores percentuais de abelhas mortas ocorreram com Belt<sup>®</sup> e com Diplomata<sup>®</sup>. Foi registrado maior número de visitas *A. mellifera* no alimento contendo Diplomata<sup>®</sup>, bem como o maior número de abelhas ingerindo alimento contendo esse produto, enquanto os menores valores foram obtidos com o extrato de *P. cubeba*.

**Palavras-chave:** toxicidade, atração, polinizador, *apis mellifera*, organismo não-alvo.

### **Introdução**

Os Insetos polinizadores promovem benefícios econômicos pelo aumento no rendimento dos cultivos agrícolas, sendo a abelha, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae), uma das espécies de maior importância (POTTS et al., 2016). Entretanto, a população dessas abelhas tem decaído nos últimos anos, com diversos fatores potencialmente colaborando com essa redução, incluindo o uso abusivo e indiscriminado de inseticidas sintéticos (VAN DER SLUIJS et al., 2013).

Aplicados para controlar espécies-praga, atingem muitos organismos não alvo, como as abelhas, seja por contato ou por ingestão de néctar e pólen contaminados, causando a morte dos insetos e/ou induzindo alterações comportamentais (DESNEUX et al., 2007; COSTA et al., 2014).

O uso de produtos extraídos de plantas para controle de pragas tem se tornado alternativa para o manejo de insetos-praga, podendo-se citar entre eles o extrato hexânico de *Piper cubeba* L., 1753 (Piperales: Piperaceae), com bons resultados no combate a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (COPPING e MENN, 2000; TRUZI et al., 2019), estratégia mais segura ambientalmente e para os seres vivos, incluindo as abelhas.

Estudos com extratos botânicos também levaram a descobertas de novas moléculas inseticidas, como é o caso das diamidas do ácido ftálico, entre elas a



flubendiamida, compostos mais seguros para inimigos naturais e abelhas, as quais foram desenvolvidas a partir da identificação de rianoides presentes na casca de *Ryania speciosa* Vahl, 1796 (Malpighiales: Salicaceae) (BRUGGER et al., 2010; NADAF et al., 2013).

O controle biológico com utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bacillales: Bacillaceae) e de alguns baculovírus (Baculoviridae) tem se destacado no controle de pragas na agricultura, principalmente devido a especificidade e seletividade a diferentes grupos de insetos (JURAT-FUENTES e JACKSON, 2012). No entanto, trabalhos avaliando efeitos desses vírus em abelhas, assim como de formulações comerciais de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis*, ainda são escassos, o mesmo ocorrendo com muitos compostos químicos.

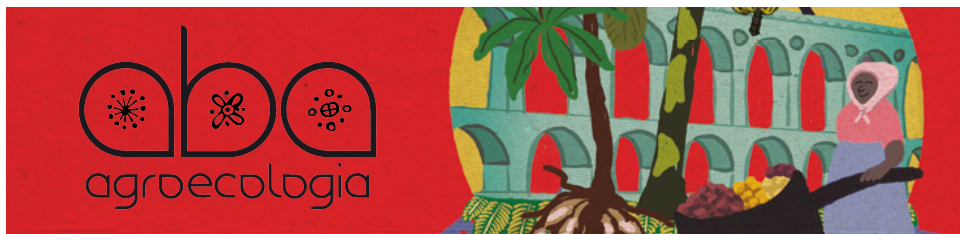
No caso de produtos botânicos, apesar de diversos estudos sobre seu uso no controle de praga, ainda faltam informações sobre a influência em organismos não alvo, como as abelhas (XAVIER et al., 2015). Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade de inseticidas químico e biológicos, bem como do extrato de *P. cubeba*, em adultos de *A. mellifera*.

## Metodologia

Os bioensaios foram realizados utilizando-se abelhas nutrizas com 6 a 12 dias de idade no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI), FCAV-Unesp, Jaboticabal, SP, baseados na metodologia proposta por COSTA et al. (2014). Para tanto, recipientes plásticos de 13,0 cm de largura × 17,5 cm comprimento × 6,0 cm de altura, as abelhas adultas coletadas foram mantidas nesses recipientes forrados internamente com papel toalha e cobertos com tecido tipo “voile”, alimentadas com mel + pólen. Os bioensaios também foram conduzidos nesses recipientes utilizando-se 10 abelhas nutrizas por recipiente e em condições controladas de temperatura ( $27 \pm 1$  °C), umidade relativa ( $60 \pm 10\%$ ) e ausência de luz.

Os produtos utilizados foram: Belt® (Flubendiamida - inseticida químico); XenTari® (bactéria - *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*); CartuchoVIT® (vírus - VPN-SfMNPV) e Diplomata® (vírus - VPN-HzSNPV), além do extrato hexânico de *P. cubeba*, não disponível comercialmente. As doses empregadas foram, respectivamente, de 0,12 g i.a./L, 1,89 g i.a./L, 0,0021 g i.a./L, 0,00695 g i.a./L e 20,0 mL/L, sendo as dos produtos comerciais aquelas recomendadas pelos fabricantes e a do extrato baseada no trabalho de TRUZI et al. (2019). Para o bioensaio de toxicidade por contato, a diluição foi realizada em água deionizada, enquanto para ingestão foi utilizado mel como diluente.

Ação por contato - Os recipientes plásticos foram pulverizados com as diferentes soluções utilizando um pulverizador manual, aplicando-se 0,001 mL/cm<sup>2</sup>, enquanto no controle foi utilizado apenas água deionizada. As abelhas foram alimentadas com mel e pólen embebido em um pedaço de algodão acondicionado no interior de uma tampa plástica (2,0 cm diâmetro × 1,0 cm altura), sendo também colocado no interior do recipiente um pedaço de algodão umedecido com água deionizada (fonte de umidade). A avaliação de mortalidade foi realizada nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 7 e 12 horas e, posteriormente, a cada 24 horas até que a mortalidade na testemunha atingisse 20%, conforme recomendado pela EPA (2012).



Foram observadas 4 repetições por tratamento, sendo cada recipiente plástico considerado uma repetição contendo 10 abelhas adultas.

**Ação por ingestão** - As soluções dos inseticidas diluídos em mel foram embebidas em pedaços de algodão acondicionados no interior de uma tampa plástica (2,0 cm diâmetro × 1,0 cm altura), contendo pólen, e dispostos dentro do recipiente plástico para alimentação das abelhas. No tratamento controle foi utilizado mel puro e pólen. A avaliação da mortalidade foi realizada nos intervalos de 1, 2, 3, 4, 7 e 12 horas sendo, em seguida, também determinada a cada 24 horas após o fornecimento do alimento, até que a mortalidade na testemunha atingisse 20%. Durante as primeiras 4 horas foi avaliado o número de vezes que os insetos visitaram e/ou ingeriram o alimento, sendo conduzidas 4 repetições por tratamento, com cada recipiente contendo 10 insetos.

**Análise estatística** - Os resultados de mortalidade e o número de visitas e de ingestão de alimento por *A. mellifera* nos testes por contato e ingestão não atenderam aos requisitos da análise de variância (ANOVA), sendo, então, as médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls ( $P < 0,05$ ), com as análises realizadas no software SAS (SAS INSTITUTE, 2015).

## Resultados e Discussão

**Ação por contato** – Nenhum dos produtos causou mortalidade significativa nas abelhas nos intervalos de tempo avaliados, com o percentual total de mortalidade após 48 horas variando de 7,5% (*Bt* e *P. cubeba*) a 24,3% (vírus VPN-HzSNPV) (Tabela 1).

**Ação por ingestão** - Durante o primeiro dia de avaliação (1 a 24 horas) não houve diferença significativa entre os produtos. Após 48 horas verificou-se maior mortalidade em *A. mellifera* com a ingestão de *Bt* subsp. *aizawai* (55,0%), com os menores percentuais de mortalidade para flubendiamida (10,0%) e para o baculovírus VPN-SfMNPV (12,5%) (Tabela 2). Nas três primeiras horas foi verificado maior número de visitas de adultos no alimento com VPN-SfMNPV (91,5, 58,5 e 52,5 visitas, respectivamente), sendo que ele também apresentou o maior número total. No geral, o maior número de abelhas ingerindo o alimento foi verificado nos bioinseticidas a base de baculovírus (92,3 e 75,0 para VPN-SfMNPV e VPN-HzSNPV, respectivamente), enquanto o menor valor foi com o extrato hexânico de *P. cubeba* (17,8) (Tabela 3).

Existem variações no efeito dos inseticidas em abelhas nutrizas, sendo os mais importantes observados nos testes por contato com os biológicos (*Bt* e baculovírus) e com o extrato de *P. cubeba*, destacando-se a existência de poucos relatos sobre os efeitos de vírus e de extratos de plantas em abelhas.

A maior mortalidade de abelhas observada neste estudo ocorreu quando os insetos ingeriram alimento contaminado com *Bt* subsp. *aizawai* (XenTari®), existindo alguns trabalhos que relatam efeitos de *Bt* em abelhas, seja no comportamento alimentar ou na sobrevivência (LIBARDONI et al., 2018). D'URSO et al. (2017) observaram que certas concentrações de bioinseticida à base de *Bt* podem afetar o comportamento de abelhas, assim como provocarem alterações morfoestruturais no intestino médio. LIBARDONI et al. (2018) também observaram que, após a ingestão



de *Bt*, ocorreu um desarranjo de leve a moderado nas células epiteliais do intestino médio, o que o que reduziu a longevidade dos adultos de *A. mellifera*.

O maior número de abelhas visitando e ingerindo alimento contendo os bioinseticidas à base de baculovírus foi um resultado interessante e inesperado, sendo devido possivelmente pela composição dos produtos formulados que deve ter algum fator de atração. Um exemplo de alteração comportamental ocorre com os adjuvantes de *Baculovirus heliothis*, que estimulam a alimentação de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) (IGNOFFO et al., 1976), o que também pode ter afetado de maneira positiva as abelhas que passaram a ingerir mais alimento, sem causar algum efeito tóxico.

Riscos de inseticidas botânicos em relação às abelhas já foram reportados, com a observação de redução na sobrevivência e no peso dos insetos, repelência e alterações morfológicas no intestino médio (POTRICH et al., 2020). Com relação aos efeitos do extrato hexânico de *P. cubeba* observados neste estudo, provavelmente estejam relacionados à deterência, uma vez que afetou a ingestão do alimento pelas abelhas.

Os resultados dessa pesquisa alertam para riscos desses produtos, uma vez que podem causar efeitos tóxicos, principalmente no caso de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (XenTari®), bem como provocar alterações no comportamento alimentar das abelhas, como atração para baculovírus e menor ingestão para *P. cubeba*. Estudos que complementam os resultados obtidos, como análise de alterações morfológicas e histológicas, especialmente em glândulas e no intestino, além dos possíveis efeitos nos diferentes estágios de vida das abelhas.

**Tabela 1.** Mortalidade (%) de abelhas *Apis mellifera* por contato dos produtos em cada período após aplicação (PAA).

PAA	Flubendiamida (Belt®)	VPN-SfMNP V	VPN-HzSNPV	<i>Bt aizawai</i>	<i>Piper cubeba</i>	Testemunha
1 h	0,0 ± 0,00 <sup>1</sup>	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	3,1 ± 3,12	0,0 ± 0,00
2 h	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	2,5 ± 2,50	0,0 ± 0,00
3 h	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
4 h	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
7 h	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	7,5 ± 7,50
12 h	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	2,5 ± 2,50
24 h	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	5,0 ± 2,89	0,0 ± 0,00	5,0 ± 2,89	2,5 ± 2,50
48 h	10,6 ± 4,55	12,5 ± 6,29	24,3 ± 2,55	7,5 ± 4,79	7,5 ± 7,50	8,3 ± 5,47

<sup>1</sup>não foram obtidas diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Student Newman Keuls (P > 0,05).



**Tabela 2.** Mortalidade (%) de abelhas *Apis mellifera* por ingestão dos produtos em cada período após aplicação (PAA).

PAA	Flubendiamid a	VPN-SfMNP V	VPN-HzSNPV	<i>Bt aizawai</i>	<i>Piper cubeba</i>	Testemunha
1 h	0,0 ± 0,00 a <sup>1</sup>	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	2,5 ± 2,50 a	2,5 ± 2,50 a	2,5 ± 2,50 a
2 h	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	2,5 ± 2,50 a
3 h	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a
4 h	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	10,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a
7 h	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a
12 h	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	12,5 ± 2,50 a	0,0 ± 0,00 a
24 h	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a
48 h	10,0 ± 7,07 b	12,5 ± 6,29 b	30,6 ± 3,64 b	55,0 ± 10,41 a	16,8 ± 5,86 b	17,5 ± 4,79 b

<sup>1</sup>média ± erro padrão seguidas de mesma letra na linha não diferem pelo teste de Student Newman Keuls (P > 0,05).

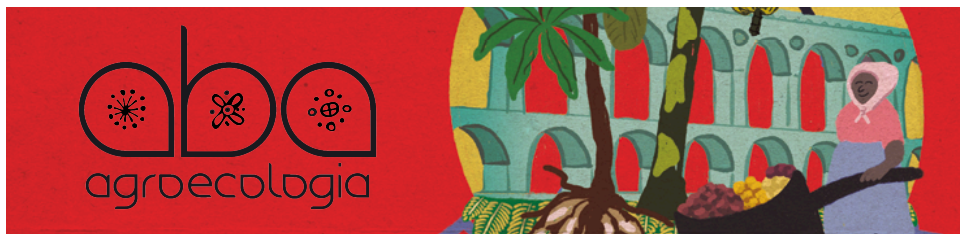
**Tabela 3.** Média do número de visitas e ingestão de alimento com os diferentes produtos por *Apis mellifera*, nos períodos após aplicação (PAA).

Produtos	Visitas				
	1 h	2 h	3 h	4 h	Total
Flubendiamida	49,5 ± 1,44 b <sup>1</sup>	33,5 ± 0,87 b	23,0 ± 1,22 b	10,5 ± 1,85 a	116,5 ± 2,18 b
VPN-SfMNPV	91,5 ± 4,50 a	58,5 ± 4,11 a	52,5 ± 5,76 a	31,5 ± 2,72 a	234,0 ± 16,15 a
VPN-HzSNPV	57,5 ± 0,96 b	37,5 ± 1,19 b	34,3 ± 3,79 ab	30,5 ± 2,72 a	159,8 ± 5,86 b
<i>Bt aizawai</i>	46,3 ± 5,95 b	29,3 ± 5,04 b	33,3 ± 2,32 ab	25,3 ± 4,11 a	134,0 ± 14,10 b
<i>Piper cubeba</i>	42,0 ± 17,09 b	22,3 ± 4,59 b	25,8 ± 9,19 b	17,0 ± 7,56 a	107,0 ± 16,72 b
Testemunha	2,5 ± 2,50 b	25,8 ± 8,64 b	30,8 ± 8,63 ab	17,5 ± 7,35 a	114,8 ± 26,76 b
	Ingestão				
Flubendiamida	24,0 ± 0,41 b	11,3 ± 0,63 a	5,3 ± 1,44 c	2,5 ± 0,29 bc	43,0 ± 0,91 b
VPN-SfMNPV	42,3 ± 1,55 a	11,5 ± 2,50 a	31,0 ± 0,71 a	7,5 ± 1,44 ab	92,3 ± 2,49 a
VPN-HzSNPV	41,0 ± 0,41 a	9,5 ± 2,25 a	15,0 ± 1,22 b	9,5 ± 2,25 a	75,0 ± 5,73 a
<i>Bt aizawai</i>	24,0 ± 1,78 b	7,8 ± 1,44 a	8,0 ± 2,04 bc	5,5 ± 0,29 abc	45,3 ± 2,25 b
<i>Piper cubeba</i>	12,5 ± 6,06 b	2,5 ± 1,55 a	2,3 ± 1,03 c	0,5 ± 0,29 c	17,8 ± 7,04 c
Testemunha	22,3 ± 7,52 b	5,0 ± 3,14 a	9,5 ± 3,93 bc	3,3 ± 1,79 bc	40,0 ± 12,99 b

<sup>1</sup>média ± erro padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Student Newman Keuls (P > 0,05).

## Conclusões

O bioinseticida à base de *Bt* causa efeito na mortalidade *A. mellifera*, sendo que os a base de baculovírus favorecem a atração e a ingestão do alimento, enquanto o extrato hexânico de *P. cubeba* afeta negativamente a ingestão. Os



produtos avaliados não provocam hiperexcitação ou movimentos desordenados nas abelhas.

### Referências bibliográficas

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications, and efficacy. **Pest Management Science** 56:651-676, 2000.

COSTA, E. M.; et al. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honeybee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie**, v. 45, p. 34-44, 2014.

DESNEUX N.; et al. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52 p. 81-106, 2007.

D'URSO V.; et al. Observations on midgut of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apoidea) under controlled acute exposures to a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide. **Apidologie**, v. 48, p. 51-62, 2017.

EPA – Environmental Protection Agency. **Ecological effects test guidelines OCSPP 850.3020**: Honeybee acute contact toxicity test. Washington: OCSPP, 2012. 12 p.

IGNOFFO, C. M.; et al. Gustatory stimulant, sunlight protectant, evaporation retardant: Three characteristics of a microbial insecticidal adjuvante. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, p. 207–210, 1976.

JURAT-FUENTES, J. L.; JACKSON, T. A. Bacterial entomopathogens. In: Kaya H, Vera FE, Kaya HK (Eds.) **Insect Pathology**. London: Academic Press, 2012. p. 268-349.

LIBARDONI, G.; et al. Effect of different *Bacillus thuringiensis* strains on the longevity of Africanized honeybee. **Semina** 39:329-338, 2018.

POTRICH, M.; et al. Are plant extracts safe for honeybees (*Apis mellifera*)? **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1-8, 2020.

POTTS, S. G.; et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, p. 220-229, 2016.

SAS INSTITUTE. SAS/IML® 14.1 User's guide. 2015. Cary: SAS Institute Inc.

TRUZI, C. C.; et al. Extrato hexânico de *Piper cubeba* apresenta atividade inseticida sobre *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera*? In: 16° SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, **Anais...** Londrina, 2019. p. 473.

VAN DER SLUIJS J. P.; et al. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 5, p. 293-305, 2013.