



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Impacte da aplicação do inseticida EPIK na abelha do mel *Apis mellifera* L. a médio e a longo prazo

Relatório de Estágio Profissionalizante

Mestrado em Gestão Ambiental

Diana Sofia Oliveira Duarte

Aluno nº 21427003

2018



INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA

Impacte da aplicação do inseticida EPIK na abelha do mel *Apis mellifera* L. a médio e a longo prazo

Relatório de Estágio

Mestrado em Gestão Ambiental

Entidade de Acolhimento:

LOUSAMEL - Cooperativa Agrícola dos Apicultores da Lousã e Concelhos Limítrofes Crl

Orientadora externa:

Eng.^a Ana Paula Sançana

Orientadora interna:

Prof.^a Teresa Vasconcelos

Diana Sofia Oliveira Duarte

Aluno nº 21427003

2018

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me ajudaram no decorrer deste projeto final.

Quero agradecer, do fundo do coração, à Professora Teresa Vasconcelos e à Engenheira Ana Paula Sançana, pela amizade, carinho, confiança e por me terem ensinado e orientado imenso na elaboração deste relatório.

Ao Presidente da Cooperativa Lousamel, António Carvalho, por me ter aceitado nesta instituição, pela amizade e por todo o apoio e aprendizagem.

À Engenheira Neusa Nazaré, Engenheira Sandra Santos, Engenheira Isabel Herder, Sandrine, Engenheira Filomena Gomes e ao Doutor Pedro Bravo por terem estado sempre disponíveis a ajudar ao longo deste percurso.

Ao Doutor André Halak pela amizade e a enorme ajuda prestada durante o estágio.

À minha família, especialmente, aos meus pais, irmão, namorado e Frig, que me apoiaram sempre nesta fase importante da minha vida e do meu percurso académico.

Aos meus amigos mais próximos, com quem partilhei momentos e histórias do tempo de estágio, agradeço o apoio, compreensão e dedicação.

Resumo

A abelha do mel, *Apis mellifera L.*, é um inseto ecologicamente e economicamente importante. Assegura a polinização de diversas plantas cooperando para a manutenção da biodiversidade do ecossistema. O seu valor económico não depende somente dos seus produtos diretos mas também da ativa polinização que exerce nas culturas. A *A. mellifera*, destaca-se como o polinizador economicamente mais valioso para as culturas em todo o mundo, e é cada vez mais sujeita aos produtos químicos utilizados em agricultura e florestas para controlar fungos, pragas e plantas daninhas, de modo, a assegurar a produtividade (Pereira, 2010).

Cada vez mais se tem a noção do desaparecimento das abelhas. Este desaparecimento não depende de um único fator mas sim de vários, como por exemplo, condições climáticas desfavoráveis, problemas nutricionais, utilização de inseticidas como os neonicotinóides, presença de doenças de parasitas e predação. As abelhas podem entrar em contacto com os tais agentes químicos devido às suas atividade de colheita de água, néctar e pólen (Pereira, 2010; Oldroyd, 2007).

As florestas nacionais ocupam cerca de 35 % do território nacional, sendo que presentemente a espécie dominante é o eucalipto. Esta cultura encontra-se em expansão, visto ser muito importante para economia do país, mas tem associadas alguns problemas, nomeadamente o *Gonipterus platensis Marelli* conhecido como gorgulho do eucalipto. Para poder controlar e minimizar os danos provocados pelo gorgulho do eucalipto, são utilizados diversos tipos de tratamento como físico, cultural, biológico e químico. O tratamento químico homologado escolhido, para esta cultura é o Epik, um acetamiprida, do grupo dos neonicotinóides (ICNF, 2013; Paiva, 2016).

O presente relatório tem como principal objetivo avaliar o impacte da aplicação do inseticida Epik por contacto e ingestão da dose recomendada na mortalidade direta e de longo termo das abelhas, com o intuito de minimizar o desaparecimento das abelhas.

Realizaram-se ensaios para avaliar o efeito da absorção do inseticida por contacto e ingestão, na dose recomendada para a cultura, na mortalidade de abelhas e determinou-se a dose letal. Foram avaliadas as alterações causadas pela aplicação deste inseticida na

expressão genética das abelhas, representativas da mortalidade a longo prazo, utilizando o perfil eletroforético das proteínas.

Os resultados obtidos mostraram que a mortalidade nas abelhas é superior quando a aplicação de inseticida é feita por contacto. Foi possível determinar a dose letal do inseticida para as abelhas; 0,41 mg/mL para aplicação em contacto, 1mg/mL para aplicação em ingestão e verificou-se que a expressão genética das abelhas era alterada, pela ausência de proteínas na zona que contém o inseticida.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, *Gonipterus platensis*, *Eucalyptus globulus*, Neonicotinóides, Epik SG, Aplicação por contacto, Aplicação por ingestão, Mortalidade de abelhas

Abstract

The honeybee *Apis mellifera* L. is an ecologically and economically important insect. It ensures the pollination of several plants, conserving the ecosystem's biodiversity. Its economic value depends not only on its direct products, but also on its active pollination in crops. *A. mellifera* stands out as the economically most valuable pollinator for crops worldwide, and yet, is increasingly subject to chemicals used in agriculture and forests to control fungi, pests and weeds to ensure productivity (Pereira, 2010).

More and more people are aware of the bees' disappearance. This disappearance does not depend on a single factor but on several, such as unfavorable climatic conditions, nutritional problems, use of insecticides such as neonicotinoids, the presence of diseases and parasites and predation. Bees may be exposed to these chemical agents through harvesting water, nectar or pollen (Pereira, 2010; Oldroyd, 2007).

National forests occupy 35% of the national territory, being the dominant species, eucalyptus. This culture is expanding, once since it is very important for the country's economy, but it comes with some problems, namely the *Gonipterus platensis* Marelli, also known as eucalyptus weevil. To control and minimize the damage caused by the eucalyptus weevil, various types of treatment are used, such as physical, cultural, biological and chemical. The chemically chosen treatment for this disease is Epik, an acetamiprid, from the neonicotinoids group (ICNF, 2013; Paiva, 2016).

The aim of this report is to test the effect of the application of the Epik insecticide on contact and intake, of the recommended dose, in the bees' direct and long-term mortality, in order to minimize the disappearance of bees.

Tests were conducted to evaluate the effect of insecticide absorption on contact and intake, at the recommended dose for the culture, in the bees' mortality, being then determined the lethal dose. The changes caused by this insecticide application in the bees' gene expression were evaluated using the proteins electrophoretic profile, representative of the long-term mortality.

The results showed that the bees' mortality is higher when the insecticide application is made by contact. It was possible to determine the insecticide lethal dose for the bees; 0.41 mg / mL by contact, 1mg / mL by ingestion and it was found that the bees' gene expression is altered by the absence of proteins in the insecticide-containing zone.

Key Words: *Apis mellifera*, *Gonipterus platensis*, *Eucalyptus globulus*, **Neonicotinóides**, Epik SG, Application by contact, Application by intake, Bees decay.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
Abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	12
1.1. Enquadramento Geral.....	12
1.2. Abelha.....	16
1.2.1. Importância das abelhas para a polinização.....	16
1.2.2. Colónia.....	18
1.2.3. Morfologia e anatomia das abelhas.....	21
1.2.4. Produtos das abelhas.....	30
1.2.5. Declínio das abelhas.....	34
1.3. Eucalipto.....	38
1.4. Pesticidas.....	41
1.4.1. Epik SG.....	45
1.5. Objetivos.....	46
2. Material e Métodos.....	47
2.1. Caracterização do local de estudo.....	47
2.2. Obtenção de material biológico.....	49
2.2.1. Teste de contacto.....	49
2.2.2. Testes de ingestão.....	51
2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	53
3. Resultados e Discussão.....	56
3.1. Teste de contacto vs Teste de ingestão.....	56
3.1.1. Dose recomendada.....	56
3.1.2. Dose letal - contacto.....	60
3.1.3. Dose Letal – ingestão.....	62
3.2. Gel em poliacrilamida.....	63
3.2.1. Dose recomendada - contacto.....	63
3.2.2. Dose recomendada - ingestão.....	64
3.2.3. Dose letal.....	66
4. Conclusões.....	68

5. Bibliografia.....	70
6. Webgrafia	75
Anexos.....	76

Índice de Figuras

Figura 1 - Abelha coberta com pólen (Projeto avalia a importância da polinização para a agricultura, 2017).....	17
Figura 2 - As diferentes castas das abelhas, rainha, operária e zangão (Cantinho da Ciência, 2017).....	18
Figura 3 - Corpo da abelha (Apisantos, 2017).....	21
Figura 4 - Sistema digestivo da abelha (Slidshare, 2017).	24
Figura 5- Mel Serra da Lousã (Lousamel, 2017).....	31
Figura 6 – Gorgulho do eucalipto (<i>Gonipterus platensis</i>) (ICNF, 2014).	39
Figura 7 - Frasco de Epik SG.	45
Figura 8 - Estrutura química da acetamiprida (Akeju, 2014).	45
Figura 9 - Caixa de Petri preparadas.	49
Figura 10 - Colocação das abelhas na caixa de Petri.....	50
Figura 11 - Caixas de Petri prontas para a estufa	50
Figura 12 - Frascos do alimentador com xarope e inseticida.	51
Figura 13 - Gaiola com abelhas e frasco alimentador (xarope e inseticida).	52
Figura 14 - Estufa com os testes de contaminação e de ingestão.	52
Figura 15 - Retirar a amostra do frasco para carregar os poços	54
Figura 16 - Retirada do gel do suporte. Imersão e lavagem com a solução colorantes de proteínas.	55
Figura 17 - Descoloração das proteínas.....	55
Figura 18 - Mortalidade verificada para a dose recomendada em 24 e 48 horas no teste de contacto, com os respetivos erros padrões. As letras a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P=0,000282$, $\text{start } t = -4,8$, (t crítico $=1,76131$).	56
Figura 19 - Mortalidade verificada para a dose recomendada em 24 e 48 horas no teste de ingestão, com os respetivos erros padrões. As letras a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P = 1,545 \cdot 10^{-5}$, $\text{start } t = -6,44$ e t crítico $=2,1448$	57
Figura 20 - Comparação da mortalidade verificada para a dose recomendada em 24 horas entre os testes de contacto e ingestão, com os respetivos erros padrões. A letra a mostra que não há diferenças estatísticas observadas. $P = 0,000281$, $\text{start } t = -4,80$ e t crítico $=2,1448$	58
Figura 21 - Comparação da mortalidade verificada para a dose recomendada em 48 horas entre os testes de contacto e ingestão, com os respetivos erros padrões. As a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P = -1,55 \cdot 10^{-5}$, $\text{start } t = -6,44$ e t crítico $=2,1448$	59
Figura 22 - Mortalidade média das abelhas por aplicação de várias doses de Epik por contacto, com os respetivos erros padrões. a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P= 1,363 \cdot 10^{-17}$, $F= 25,55$. A equação de regressão $y=1,0454x+1,2186$. 60	
Figura 23 - Mortalidade média das abelhas por aplicação de várias doses de Epik por ingestão, com os respetivos erros padrões. a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P= 6,816 \cdot 10^{-64}$, $F= 88,39$. A equação de regressão $y=0,8366x+1,2645$. 62	
Figura 24 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de contacto com a dose recomendada e o controlo, primeira repetição.....	63

Figura 25 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de contacto com a dose recomendada e o controlo, segunda repetição.	63
Figura 26 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de ingestão com a dose recomendada e o controlo, primeira repetição.	64
Figura 27 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de ingestão com a dose recomendada e o controlo, segunda repetição.	65
Figura 28 – Perfil eletroforético das proteínas para o teste de contacto com a dose letal e o controlo, primeira repetição.	66
Figura 29 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de contacto com a dose letal e o controlo, segunda repetição.	66
Figura 30 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de ingestão com a dose letal e o controlo, primeira repetição.	67
Figura 31 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de ingestão com a dose letal e o controlo, segunda repetição.	67

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Tipo de pesticida e o seu organismo alvo (Duro, 2013).....	42
Tabela 2 - Composição dos géis utilizados para a análise SDS-PAGE.....	53
Tabela 3 - Composição dos tampões necessários para a análise SDS-PAGE.....	54

Abreviaturas

A.- Apis

A.C.- Antes de Cristo

ABPV – Vírus da Paralisia Aguda

CL 50 - Concentração Letal

CO₂ – Dióxido de Carbono

DCC – Distúrbio do Colapso das Colónias

DL 50 – Dose Letal

DWV - Vírus das Asas Deformadas

F.A.O. – Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação)

ha – Hectare

IFAP – Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

KBV - Vírus Kashmir

1. Introdução

1.1. Enquadramento Geral

As abelhas surgiram há 30 milhões de anos atrás, em coevolução com as Angiospérmicas. Ao longo do desenvolvimento da vida na Terra existiam insetos, muito semelhantes às vespas atuais, cuja dieta alimentar se baseava na ingestão de néctar das flores como principal fonte de energia, e caçavam pequenos animais como fonte de proteína. Com a sua evolução, muitas dessas vespas substituíram a proteína animal pela proteína vegetal (pólen) surgindo, assim, as primeiras abelhas (Bovi, 2013; Pirani, 1993; Tautz, 2010).

Nos dias de hoje muito se conhece sobre a morfologia e o comportamento das abelhas. Estes insectos pertencem à ordem *Hymenoptera* que é a terceira maior em número de espécies da classe *Insecta*, da qual fazem parte formigas, vespas e abelhas. A classe *Insecta* apresenta duas subordens e vinte superfamílias. Na superfamília *Apoidea* encontram-se oito famílias, e 20.000 espécies diferentes repartidas por vários géneros. Dentro do género *Apis* existem sete espécies diferentes: a abelha do mel *Apis mellifera* Linnaeus; a *A. florea*; a *A. andreniforme*; a *A. dorsata*; a *A. cerana*; a *A. laboriosa* e a *A. koschevnikov* (Couto, 2006; Nocelli, 2017).

A *Apis florea* e a *A. andreniforme*, conhecidas também por “abelhas-anãs” (com cerca de 7mm de comprimento) da Ásia, são eficientes polinizadoras. Constroem ninhos com um único favo, ao ar livre mas rodeadas de vegetação densa. A *A. dorsata* são abelhas gigantes do Sul da Ásia e da Indonésia (possuem entre 17 a 19 mm de comprimento), constroem num só favo, podendo armazenar até 10 kg de mel e possuem grande capacidade de defesa. A *A. cerana* pode ser encontrada na China, Coreia, Irã, Índia, Japão e Tailândia, apesar da variação no tamanho e comportamento são muito semelhantes à *A. mellifera*. e à *A. laboriosa* ou gigante, que habitam o Himalaia (acima de 2000 m de altitude) (Couto, 2006).

Inicialmente alguns autores defendiam que o género *Apis* era originário da Ásia. Contudo, em 2006 Whitfield *et al* afirmam que teve origem no continente africano e daí sofreu uma expansão para fora através de uma via oriental e ocidental. A espécie *A.*

mellifera teve origem na África e, em seguida, em pelo menos dois eventos diferentes e anteriores à chegada do *Homo sapiens*, migraram para Ásia e Europa. Com a criação das abelhas pelo homem surgiram diferentes subespécies por meio de hibridação intraespecífica, especialmente em regiões como o Continente Americano, onde a *A. mellifera* não era nativa. A *A. mellifera* é constituída por pelo menos 20 subespécies, entre elas as mais conhecidas são a *A. mellifera ligustica* Spinola, a *A. mellifera carnica* Pollmann, a *A. mellifera mellifera* Linnaeus, a *A. mellifera caucasica* Pollmann, e a *A. mellifera iberiensis* Engel. (Bovi, 2013; Parker *et al.*, 2010).

A interação existente entre as abelhas da espécie *A. mellifera* e os seres humanos é muito antiga. As gravuras encontradas em cavernas datadas de 7000 anos A.C., mostram o homem a colher mel de ninhos silvestres. A colheita era feita de modo extremista, sem qualquer cuidado com a fragilidade dos ninhos causando danos aos enxames. Com o passar dos anos, e devido à procura por mel, as abelhas foram sendo criadas pelo homem, e gradualmente, foram sendo inseridas tecnologias nessa atividade. Quando o Homem aprendeu a explorar as colônias em anos sucessivos, poupando-lhes uma parte dos favos dando origem à apicultura (Carvalho, 1995; Crane, 1999).

Existem atualmente em Portugal cerca de 11 mil apicultores registados, correspondendo a um universo de, aproximadamente, 33 mil apiários e 626 mil colmeias. Pela análise da distribuição regional verifica-se que existe uma forte dispersão da atividade apícola pelo território nacional, o Norte é a região onde se situa um maior número de apicultores. Existem sete Organizações de Produtores reconhecidas, entre as quais se salienta a LOUSAMEL. A espécie predominante de abelhas no nosso país, que faz parte da península ibérica, é a *A. mellifera iberiensis* (PAN, 2016).

Do ponto de vista ecológico as abelhas são muito importantes, pois asseguram a polinização de diversas flores contribuindo para a manutenção da biodiversidade. A polinização também é de elevada importância para a economia agrícola mundial. Os produtos obtidos por meio da apicultura são o mel, pólen, própolis, geleia real, cera, o veneno, a comercialização de enxames e de rainhas e a polinização, podendo serem muito rentáveis para o apicultor (Bovi, 2013; Pereira, 2010).

Nos últimos dez anos, foram vários os países que reportaram uma queda acentuada no número de colónias de abelhas melíferas. As causas apontadas para esse desaparecimento são diversas; não são encontradas abelhas mortas, mas ainda não há resultados conclusivos. Acredita-se que não existe um único fator que atue nesta síndrome, mas sim um conjunto de fatores abióticos e bióticos entre os quais se destacam condições climáticas desfavoráveis, problemas nutricionais, utilização de inseticidas como os neonicotinóides, presença de doenças, de parasitas e predação, (Pereira, 2010; Oldroyd, 2007).

Apesar de apenas algumas obreiras saírem da colmeia, toda a colónia está exposta aos inseticidas, pois alimentam-se de néctar e pólen que podem estar contaminados. Esses produtos podem apresentar um efeito letal ou subletal, que é dificilmente detectável. Podem influenciar tanto a nível fisiológico, quanto no comportamento das abelhas comprometendo assim, toda a estrutura social da colónia (Pereira, 2010; Pham-Delègue *et al.*, 2002).

A ocupação dos campos por monoculturas favorece o aparecimento de pragas e doenças, o que torna a agricultura moderna cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos cuja função é de proteger as culturas agrícolas das doenças, pragas e ervas daninhas. Esses produtos podem entrar na cadeia solo-água-planta, apresentando uma perigosa fonte direta e indireta de contaminação para as abelhas e outros seres vivos. A atividade apicultura dependente das plantas cultivadas ou da mata local como fonte de néctar e pólen, leva a que as abelhas fiquem expostas aos poluentes que são originados no ambiente em que vivem, causando intoxicação e contaminação dos seus produtos (Bovi, 2013; Pereira, 2010).

Em Portugal a ocupação do uso do solo apresenta algumas áreas como matos e pastagens, agricultura, águas interiores, urbano e impróprios, sendo que o que apresenta maior área é a floresta (35%). Dentro das florestas temos diferentes grupos de espécies o pinheiro manso, azinheira, pinheiro bravo, sobreiro e eucaliptos. A espécie dominante é o eucalipto (812 mil ha), que se encontra em expansão. O eucalipto tem diversas pragas e doenças associadas, entre as quais se destaca o gorgulho (*Gonipterus platensis* Marelli) e que causa grandes perdas de produtividade nos povoamentos afetados (ICNF, 2013).

O eucalipto assume um papel relevante na atividade económica portuguesa pela importância da área ocupada, da elevada rentabilidade da sua cultura e também pelo significado macroeconómico da produção a que dá origem, constituindo a matéria-prima de um dos principais sectores industriais da economia do país, a indústria de pasta para papel, com participação proeminente na balança comercial externa (Alves, 2007; Paiva, 2016).

Para o controlo do gorgulho do eucalipto existem diversas práticas, sendo que a mais acessível e eficaz a curto prazo é o controlo químico. Contudo, com o aumento da legislação referente a pesticidas, que tem sido agravado pela recente crise mundial das populações de insectos polinizadores, o uso da maioria dos produtos foi proibido em florestas e plantações certificadas. Desde 2010, os únicos inseticidas autorizados são - Calipso (thiacloprid, BAYER) e Epik (acetamiprid, SIPCAM). Ambos os produtos, pertencem à classe química dos cloronicotinóides e têm como substâncias ativas, respectivamente, o acetamiprida e o tiaclopride que são quimicamente diferentes, mas idênticos no seu mecanismo tóxico (ICNF, 2015; Sarmiento, 2015; Paiva, 2016).

Recentes estudos salientam o efeito dos neonicotinóides na mortalidade a longo termo das abelhas e diversos autores sugerem que a recente mortalidade verificada nas abelhas se deve à utilização desses produtos, como por exemplo o estudo da Vasconcelos, 2014.

1.2. Abelha

1.2.1. Importância das abelhas para a polinização

As abelhas, na procura de alimento (pólen e néctar), de flor em flor promovem a reprodução cruzada dos vegetais, aumentando o vigor das espécies, melhorando a produção de frutos e sementes e possibilitando novas combinações hereditárias. A polinização trata-se de um processo fundamental para a perpetuação das mais variadas espécies vegetais. Neste sentido, a presença de polinizadores é essencial para o sucesso da reprodução das plantas em qualquer ecossistema, incluindo os agrícolas. Sabe-se que 75% das espécies vegetais existentes são dependentes de agentes polinizadores (vento, água, pássaros, morcegos, homens e insectos), no entanto, as abelhas são consideradas os principais polinizadores. Estes são os responsáveis por realizar a reprodução cruzada de 73% de todas as espécies vegetais cultivadas no mundo (Bovi, 2013; Couto *et al.*, 2006; Chambó *et al.*, 2010).

Das principais espécies cultivadas pelo homem, 73% apresentam dependência pela polinização animal. Algumas dessas culturas são o melão (*Cucumis melo*) e a maçã (*Mallus comunis*) que, na ausência de polinizadores, se tornam improdutivas. No entanto, existem culturas que não são dependentes da polinização promovida por insectos, ou seja, são auto-férteis como por exemplo, o pepino (*Cucumis sativu*) (Bovi, 2013; Pereira, 2010).

A polinização das culturas comerciais feitas por abelhas *Apis mellifera* apresenta alguns benefícios aos frutos e resulta em valores importantes para a economia agrícola mundial. Em 2005, o valor económico global da polinização por insectos gerou cerca de 153 bilhões de euros (9,5% do valor total da produção agrícola mundial). Com base na FAO (Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas) sabe-se que o valor anual das culturas globais diretamente afetadas por polinizadores varia entre 253 bilhões de dólares e 577 bilhões dólares (FAO, 2017; Potts *et al.*, 2010).

Gallai *et al* (2009) afirma que têm sido utilizadas duas formas principais para avaliar o valor monetário dos polinizadores. A primeira consiste em avaliar simplesmente o valor total das culturas pelos insectos polinizadores, sendo esta abordagem utilizada à escala mundial. A segunda abordagem relaciona a dependência das culturas aos

polinizadores, permitindo calcular a perda de produção, no caso de desaparecimento completo dos polinizadores. O valor económico dado ao serviço de polinização corresponde ao valor da perda da cultura.

As plantações não dependentes da polinização por animais apresentam a maior fonte de calorías da dieta humana. Nos últimos 46 anos, a área total cultivada mundialmente tem crescido, no entanto, a proporção de terras dedicadas à produção de culturas não dependentes de polinizadores tem diminuído consideravelmente quando comparada às culturas dependentes de polinizadores. Esta mudança é movida pelo facto de culturas dependentes de polinizadores terem um maior valor de mercado do que as não dependentes. A agricultura dependente de polinizadores tem crescido cerca de 62% entres os anos 1961 e 2006, mais que o crescimento global de manejo das abelhas melíferas, o que poderá limitar a produção agrícola no futuro (Gallai *et al*, 2009; Klein *et al*, 2007; Pereira, 2010).



Figura 1 - Abelha coberta com pólen (Projeto avalia a importância da polinização para a agricultura, 2017).

1.2.2. Colónia

As abelhas *A. mellifera* convivem numa sociedade onde os seus elementos dividem tarefas, podendo observar-se uma interação íntima entre eles, sendo esta mantida por mecanismos de comunicação e por meio de substâncias químicas (feromona), danças e sons (Couto *et al.*, 2006).

A vida na colónia decorre, durante a maior parte do tempo, no interior de abrigos oferecidos pelo Homem (colmeias) ou pela Natureza. Numa colmeia, cada colónia possui uma rainha, obreiras que podem chegar às 100.000 e uma média de 400 zangãos. A colónia encontra-se representada por populações que atingem, no período produtivo, cerca de 50.000 indivíduos, número que em condições favoráveis podem ultrapassar 100.000 (Couto *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 1995).

De modo a atingir populações tão numerosas, a sociedade que cada colónia constitui tem que resolver alguns problemas, tais como, espaço, alimentação, higiene, climatização e defesa. A resolução destes problemas é conseguida principalmente pela atividade das obreiras, na sequência de processos de comunicação adequados à satisfação das necessidades de cada momento (Carvalho *et al.*, 1995).

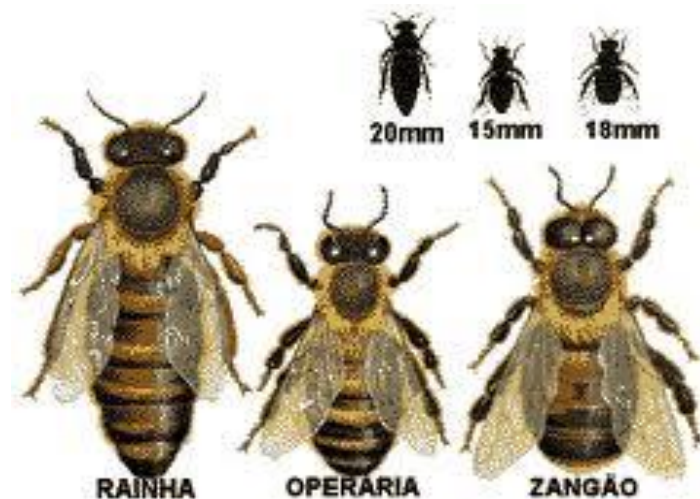


Figura 2 - As diferentes castas das abelhas, rainha, operária e zangão (Cantinho da Ciência, 2017).

❖ Rainha

A rainha nasce numa célula especial chamada de alvéolo real, e é alimentada exclusivamente com geleia real pelas obreiras. Apresenta um ciclo de desenvolvimento de 15 dias, 3 dias de ovo, 5 dias de larva, 7 dias de pupa e depois nasce. Entre o terceiro e quinto dia, a rainha sai da colmeia no seu voo nupcial para acasalar com o zangão, podendo acasalar várias vezes durante um único voo (em média com 17 zangãos). O voo pode demorar entre 10 a 15 minutos, sendo este um momento crítico para a colónia pois a rainha pode morrer, tornando a colmeia zanganeira (Jean –Prost, 2010; Carvalho *et al.*, 1995).

Depois de fecundada, a rainha volta para a colmeia e passado alguns dias começa a postura de ovos, acontecimento que irá ocupar de forma dominante durante a maior parte da sua vida. Na realização da postura, a rainha percorre os favos (acompanhada pelas obreiras que as auxiliam, recebendo também os seus estímulos de natureza glandular), e procura células vazias, previamente preparadas pelas obreiras, onde, em cada uma põe no fundo um único ovo. Dependendo da forma das células podem nascer rainhas, obreiras e/ou zangãos (Carvalho *et al.*, 1995).

Em relação às células das obreiras, a rainha põe ovos fecundados, onde ocorre a fecundação, que é a junção do gâmeta feminino (óvulo) com o gâmeta masculino (espermatozóide). Nas células dos zangãos, a rainha põe ovos não fecundados, estes desenvolvem-se por partenogénese (Jean –Prost, 2010).

Para além, da postura de ovos diária (1500 a 2000), a rainha têm outras funções na colónia, nomeadamente, a manutenção da ordem social e a inibição do funcionamento do aparelho reprodutor das obreiras, impedindo-as de fazer postura de ovos não fecundados.

❖ Obreiras

As obreiras representam a maior parcela da colmeia, demorando 20 dias para nascerem, sendo que, 3 dias são ovo, 5 larva e 12 são pupa. O que as diferencia de

serem rainhas ou obreiras é a alimentação, que no caso das obreiras é de uma mistura de geleia real, mel e pólen (Couto *et al.*, 2006).

As obreiras começam logo a executar tarefas após o seu nascimento, que estão relacionadas com o desenvolvimento glandular, a idade das obreiras e a necessidade da colmeia. Esta sequência temporal do desempenho de atividades não é rígida e pode ser totalmente alterada, no coletivo ou no individual, dependendo dos acontecimentos mais ou menos perturbadores que surjam e afetam o dia-a-dia da vida na colónia, o que demonstra uma extraordinária capacidade de adaptação das obreiras (Couto *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 1995).

Nos primeiros dias após a emergência (até ao quinto dia), as obreiras cuidam da limpeza dos alvéolos de criação e ajudam na limpeza das abelhas recém-nascidas. Do quinto ao décimo dia as obreiras demonstram grande desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, produtoras de geleia real. Nesta idade, elas cuidam das crias e alimentam as larvas em desenvolvimento, sendo chamadas de abelhas nutrizes. Durante o décimo primeiro e vigésimo dia, as glândulas cerígenas localizadas no abdómen apresentam o seu máximo de desenvolvimento, estimulando as abelhas para produzirem cera. Nessa idade, recebem e desidratam o néctar trazido pelas campeiras (são as obreiras que realizam atividades externas à colónia, como por exemplo, colher néctar), originando o mel e, armazenam o pólen. Se faltarem alvéolos para o depósito de pólen e mel, elas constroem favos. As obreiras entre o décimo oitavo e o vigésimo primeiro dia, realizam a defesa da colmeia, estimuladas pela acumulação de veneno no reservatório de veneno. Além disso, ocupam-se da ventilação da colmeia mantendo a temperatura interna entre os 34 e 35° C. A partir do vigésimo segundo dia e até à sua morte, as abelhas têm como principal atividade fora da colmeia, coletar pólen, néctar, água e resinas. Estas são chamadas de campeiras (Couto *et al.*, 2006).

❖ Zangãos

Os zangãos apresentam um ciclo de desenvolvimento de 24 dias, 3 dias de ovo, seis dias e meio de larva e 14 dias e meio de pupa. Estes nascem de ovos não fecundados, partenogénese, sendo que 100% do material genético da mãe passa para o filho (Couto *et al.*, 2006).

A única função clara da utilidade dos zangãos na vida da colônia consiste na participação que estes têm na fecundação da rainha. Estes depois de doze a treze dias, após a emersão como indivíduos adultos, tornam-se maduros sexualmente, iniciando os voos nupciais. Os zangãos que conseguem fecundar a rainha ficam desde logo destinados a morrer, uma vez que a parte terminal do respetivo aparelho sexual fica retida na estrutura genital feminina destacando-se do resto por uma zona de fratura de maior fragilidade (Carvalho *et al.*, 1995; Couto *et al.*, 2006).

1.2.3. Morfologia e anatomia das abelhas

O corpo das abelhas é constituído por três partes principais: cabeça, tórax e abdómen. Estas regiões são envolvidas por uma substância rígida e impermeável, designada de quitina, que constitui o exosqueleto (esqueleto da abelha). O exosqueleto tem como funções a proteção contra predadores, contra a perda de água e, possibilitar uma livre movimentação. Na figura 1 pode-se observar a anatomia das abelhas, onde estão identificadas as diferentes partes do seu corpo (Couto *et al.*, 2006).

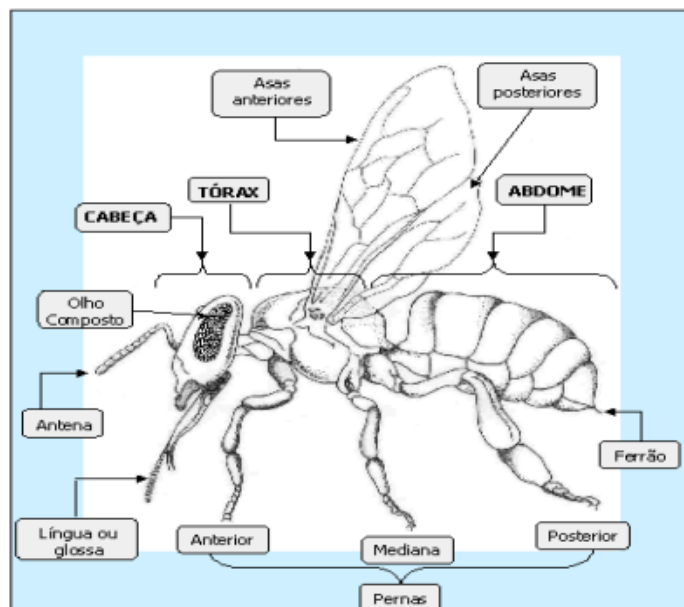


Figura 3 - Corpo da abelha (Apisantos, 2017).

❖ Cabeça

Na cabeça localizam-se os olhos, antenas, pelos e aparelho bucal. O aparelho bucal e as glândulas associadas possuem funções de manipulação, ingestão do néctar e pólen e digestão parcial do alimento. Os olhos compostos, os ocelos, os pelos sensoriais e as antenas são estruturas sensoriais. No entanto, existem outros tipos de estruturas sensoriais, com grandes variações funcionais e morfológicas, nomeadamente, a humidade, sensibilidade a odores, temperatura, paladar e CO₂ (Couto *et al.*, 2006).

As abelhas têm dois olhos compostos, em posição lateral e são formados por omatídeos (a rainha possui entre 3000 e 4000, as obreiras entre 4000 a 6900 e os zangãos de 7000 a 8600 omatídeos). Nas rainhas e nas obreiras, os olhos compostos têm aspeto reniforme bem separados um do outro no lado superior da cabeça, enquanto nos zangãos os olhos são mais globosos. Estes têm função foto-receptiva, focam, concentram, percebem a luz, as cores e os movimentos à sua volta. Também conseguem distinguir algumas cores, por ordem decrescente de sensibilidade; ultravioleta, azul-violeta, azul, verde, amarelo e laranja, não sendo capazes de distinguir o vermelho. Os três ocelos, arranjados em forma triangular estão situados na região frontal mediana da cabeça e detectam intensidade luminosa. Os pelos sensoriais presentes nas junções das facetas, têm função de receberem o fluxo de ar e de proteger contra água e poeiras. As abelhas possuem duas antenas, localizadas na zona frontal mediana da cabeça, que possuem sensibilidade auditiva e olfativa, conseguindo a direção de odor específico. O número de cavidades olfativas das antenas das rainhas é de 1600, das obreiras de 3000 e dos zangãos de 30000 (Carvalho *et al.*, 1995; Couto *et al.*, 2006).

O aparelho bucal é constituído por 2 mandíbulas e probóscide. As mandíbulas manipulam e cortam a cera, pólen e própolis, e, são também, responsáveis pela alimentação das crias, limpeza, remoção de abelhas mortas, defesa e dissolução de cera. A probóscide é formada pelas maxilas e pela língua, esta é longa (5,3 a 7,2mm), e revestida por muitos pêlos. É utilizada na colheita e ingestão de líquidos, na colheita de pólen, na troca de alimentos, na desidratação do néctar, na evaporação da água, no controlo da temperatura do ninho e dispersão das feromonas da rainha (Couto *et al.*, 2006; Jean-Prost, 2010).

❖ Tórax

O tórax é constituído por dois pares de asas e três pares de pernas, divididos por segmentos chamados de coxa, trocânter, fêmur, tarso, tíbia e pré-tarso. As asas são membranas transparentes percorridas com nervos rígidos e ocos, estão ligadas entre si por ganchos denominados de hâmulos. Estes possibilitam a movimentação conjunta dos dois pares de asas durante o voo (velocidade média de 24km/h). As asas são usadas também na comunicação, sendo que, os sons produzidos pelo bater das asas podem indicar, por exemplo, a distância entre a colmeia e o alimento (Couto *et al.*, 2006; Jean-Prost, 2010).

Os três pares de pernas das abelhas servem para transportar pólen e resinas, manipular cera e própolis, limpeza das antenas e na movimentação. O primeiro par de pernas, ajuda na limpeza das antenas, a tíbia do segundo par, tem um espinho que desprende o pólen. O último par de pernas, é o mais especializado, são usadas para o transporte de pólen e cera pelas corbículas. Elas possuem uma concavidade, rodeada com pelos, que contém uma cerda central que ajuda a reter as cargas de pólen ou resinas (Couto *et al.*, 2006; Jean-Prost, 2010).

❖ Abdómen

O abdómen é formado por segmentos, ligados por membranas, sete na rainha e nas obreiras e, oito nos zangãos. No interior do abdómen, estão a maioria dos órgãos responsáveis pelo funcionamento do corpo, onde se encontra também o ferrão, no caso das fêmeas, utilizado para defesa. O aparelho do ferrão é uma estrutura composta por músculo e quitina que serve para introdução do ferrão e injeção do veneno. É constituído por um estilete que no seu interior sustenta duas farpas. Durante a ferroadada o esforço da abelha para voar faz com que rompa a musculatura que sustenta o ferrão, deixando o saco de veneno, o que provoca a morte da abelha (Couto *et al.*, 2006; Jean-Prost, 2010).

❖ Sistemas

As abelhas têm sistemas que atuam no seu organismo, nomeadamente o sistema digestivo, circulatório, respiratório, nervoso, glandular e o sistema reprodutor.

❖ Sistema digestivo

No sistema digestivo, a maior parte do canal alimentar localiza-se no abdómen, que se liga à boca por meio de um tubo longo chamado esófago, presente na cabeça e no tórax. No abdómen, o esófago dilata originando o papo, onde existe uma válvula denominada de pró-ventrículo, que antecede o ventrículo (estômago funcional), o intestino delgado e o reto. O papo das abelhas detém uma grande capacidade de expansão, sendo este o responsável pelo transporte de néctar, água e auxílio na formação de mel. Quando o papo está cheio ocupa quase toda a cavidade abdominal (Couto *et al.*, 2006).

O pró-ventrículo regula a passagem do alimento e da água para o ventrículo, e é o local onde ocorre a maior parte da digestão e absorção do alimento. Os restos dos alimentos, como as células mortas e as cascas do pólen, atravessam o intestino até chegarem ao reto, onde são excretados. O reto também se pode expandir, seja nos primeiros dias de vida das obreiras ou no inverno, quando estas não saem da colmeia, acumulando os restos alimentares por vários dias, uma vez que as abelhas saudáveis não defecam dentro da colmeia (Couto *et al.*, 2006).

Como se pode observar na Figura 4, os tubos de Malpighi fazem parte do sistema digestivo. São órgãos excretores, que possuem a função de absorver os restos de líquidos nitrogenados do sangue, transferindo-os para o intestino para serem excretados (Couto *et al.*, 2006).



Figura 4 - Sistema digestivo da abelha (Slidshare, 2017).

❖ Sistema circulatório

O sistema circulatório das abelhas é constituído por hemolinfa (sangue) que, ao contrário dos animais de sangue quente, é frio, incolor e não se limita a tubos como nos vertebrados. A circulação realiza-se mediante um coração, com forma alongada, localizado no dorso da abelha. Uma onda de contração que percorre o coração empurra o sangue até a cabeça e de volta para a cavidade corporal. O sistema é ajudado pelo diafragma ventral e dorsal, um vaso chamado de aorta e dois vasos pequenos que percorrem as válvulas, antenas e músculos (Couto *et al.*, 2006).

As funções do sistema circulatório são transportar alimentos do ventrículo para as células do corpo, conduzir os restos alimentares para os órgãos excretores, lubrificar os órgãos responsáveis pelo movimento do corpo e defesa contra patogénicos, por meio das células sanguíneas que atacam os organismos invasores (Couto *et al.*, 2006,).

❖ Sistema respiratório

Na figura 3, está representado o sistema respiratório das abelhas, onde o oxigénio é transportado por um sistema de tubos, as traqueias. O ar entra nas traqueias por orifícios localizados no abdómen e tórax, designados por espiráculos ou estigmas. A troca dos gases oxigénio e dióxido de carbono ocorre por difusão simples (Couto *et al.*, 2006).

É através de movimentos respiratórios, produzidos pelos músculos do abdómen, que ocorre a movimentação do ar no interior do corpo. Quando existe excesso de atividade, é nos sacos aéreos que se dá a troca dos gases (Couto *et al.*, 2006).

❖ Sistema nervoso

O sistema nervoso consiste num cérebro com sete gânglios ou centros nervosos com várias junções através do corpo, que controla algumas regiões das musculaturas. As extremidades dos nervos receptores ou sensoriais recebem informações sobre as modificações ocorridas no meio ambiente e são transmitidas por meio de impulsos elétricos, coordenando as atividades das abelhas (Couto *et al.*, 2006).

❖ Sistema glandular

O sistema glandular das abelhas é muito complexo, pois abrange todo o corpo da abelha, e está intimamente relacionado com um grande número de atividades e comportamentos. Na cabeça encontram-se as glândulas hipofaríngeas, as mandibulares e as salivares. No tórax observam-se as glândulas de cheiro, cera e as associadas ao ferrão (Couto *et al.*, 2006).

As funções dessas glândulas podem ser agrupadas em produção de cera, defesa, comunicação e processamento de alimentos. Estas funções são coordenadas, na maioria, por substâncias químicas voláteis. Deve-se ter em consideração as substâncias químicas produzidas por indivíduo, descarregadas exteriormente e que originam respostas fisiológicas específicas ou comportamentais em indivíduos da mesma espécie, que são chamadas de feromonas. Estima-se que a rainha, só na região da cabeça, produza cerca de 32 feromonas, que atuam individualmente ou em inúmeras combinações.

❖ Glândulas de cera ou ceríferas

A cera é produzida por quatro pares de glândulas, localizadas entre o 4º e 7º segmento ventrais do abdómen. Após segregada, a cera solidifica muito rapidamente em contacto com o ar, na forma de pequenas escamas. Estas escamas são retiradas pelas obreiras com os basitarsos das pernas traseiras e manipuladas, para construção dos favos, pelas pernas anteriores e a mandíbulas (Couto *et al.*, 2006).

A secreção de cera depende de uma alimentação rica em proteína durante a fase larval, que resulte num desenvolvimento adequado das glândulas e do corpo gorduroso. É importante a presença de mel na colmeia, ou de outra fonte rica em açúcares, que será metabolizada em cera, pelas glândulas de cera associadas a células de gordura (Couto *et al.*, 2006).

❖ Glândulas de defesa

As glândulas de defesa estão associadas à glândula de veneno, que produz o veneno, no reservatório do veneno (saco do veneno), situado perto da base do ferrão. O ferrão é um longo tubo, bifurcado na extremidade distal (Couto *et al.*, 2006).

❖ Glândulas de comunicação

Na comunicação estão envolvidas várias glândulas, tais como, as mandibulares, anexas ao ferrão, de Nasonov e as tarsais (Arnhat). As glândulas mandibulares produzem secreções originárias das mandíbulas, podendo ser produzidas por obreiras jovens, que produzem alimento ácido, sendo este o principal componente lipídico do alimento larval, ou por obreiras mais velhas, que produzem a feromona de alarme, utilizada para marcar um intruso após o ter ferroadado e perdido o ferrão (Couto *et al.*, 2006).

As glândulas do ferrão estão associadas às glândulas localizadas na base do ferrão que, durante a eversão do ferrão, libertam iso-amil-acetato e outras feromonas, que provavelmente estão associados ao sistema de alarme (Couto *et al.*, 2006).

As glândulas de Nasonov ou de cheiro estão localizadas no sétimo segmento, que produz secreções constituídas por geraniol, ácido gerânico, ácido nerólico, citral Z, citral E e farnesol. Essa secreção é utilizada pelas abelhas obreiras para auxiliar a entrada na colmeia, na formação de enxames, no seu agrupamento, na identificação de fontes de alimento e água. As obreiras levantam o abdómen e, através de contrações dos segmentos abdominais, exibem a glândula de cheiro. Juntamente, batem as asas, ajudando na dispersão dessa secreção (Couto *et al.*, 2006).

As glândulas tarsais Arnhat encontram-se nos “pés” das abelhas, sendo que as suas funções ainda não estão bem definidas, mas é possível que produzam secreções, que são depositadas nas fontes de alimento e no alvéolo, com função de orientar as abelhas campeiras (Couto *et al.*, 2006).

❖ Glândulas processadoras de alimento

Relacionado com as glândulas processadoras de alimento estão as glândulas salivares, as hipofaríngeas e as mandibulares. As glândulas salivares podem-se encontrar na cabeça (produzem secreção oleosa) e no tórax, (produzem secreções com a função de dissolver os açúcares e amolecer o alimento) (Couto *et al.*, 2006).

As glândulas hipofaríngeas juntamente com as glândulas mandibulares, produzem secreções que formam a geleia real. As glândulas hipofaríngeas nas obreiras velhas ainda produzem a invertase, que é responsável pela transformação da sacarose do néctar em glicose e frutose formando o mel (Couto *et al.*, 2006).

As glândulas anteriormente identificadas, não se encontram em todas as castas. As glândulas mandibulares presentes nas rainhas têm funções diferentes, como a inibição de alvéolos reais da enxameação, da postura de ovos pelas obreiras e a atração do zangão. Existem ainda algumas glândulas exclusivas das rainhas como, as glândulas de koschevnikov, que estão associadas ao ferrão e têm como função a produção de odores atrativos. Também as glândulas epidermais, são exclusivas das rainhas e estão presentes em todo o corpo, exercendo a função de atração e de comunicação da presença da rainha na colmeia (Couto *et al.*, 2006).

❖ Sistema reprodutor

A reprodução sexual é essencial para a evolução da espécie, contribuindo para a variedade genética da descendência. O aparelho reprodutor masculino apresenta dois testículos, onde se localizam túbulos que produzem os espermatozoides. Depois do amadurecimento, os espermatozoides são encaminhados para as vesículas seminais, produtoras de sémen, onde ficam armazenados até ao acasalamento. Na cópula, os espermatozoides atravessam um ducto ejaculatório, tubo fino e longo, até ao pênis ou endofalo. O sémen possui coloração amarela, distinguindo-se do muco, que é branco (Couto *et al.*, 2006; Morse *et al.*, 1986).

Durante o acasalamento, que demora aproximadamente 5 segundos, o zangão everte o órgão genital (pênis) dentro da rainha. Ele possui dois ganchos que o prendem à rainha durante o ato sexual. O saco do pênis quebra sendo deixado na rainha. Os espermatozoides atravessam pela vagina até à espermateca, e sobrevivem devido ao suprimento de nutrientes fornecidos por glândulas acessórias à espermateca (Couto *et al.*, 2006).

O aparelho reprodutor da rainha é constituído por dois ovários bem desenvolvidos, tem um oviduto cada, que posteriormente se unem num oviduto comum, onde existe uma ligação com a espermateca, continuando como um canal único até à vagina. O ovário apresenta em média cerca de 150 a 180 ovariolos que produzem óvulos, que atravessam o oviduto até à vagina. Na passagem da região do oviduto, que tem uma ligação com a espermateca, pode originar ou não a fecundação do óvulo pelos espermatozoides. Se o óvulo for fecundado, o ovo formado é diploide ($2n$), que dá origem a uma fêmea. Se não for fecundado, o óvulo origina um zangão, que é haploide (n). O aparelho reprodutor das obreiras é idêntico ao da rainha, apresentando um aparelho reprodutor, no entanto, estes são pouco desenvolvidos e não funcionais; não possui capacidade de receber e armazenar espermatozoides. Porém, na ausência da rainha, as obreiras podem pôr ovos não fertilizados, originando zangãos (Couto *et al.*, 2006; Hooper, 1976).

1.2.4. Produtos das abelhas

Uma colmeia pode oferecer diversos produtos, tais como, mel, geleia real, própolis, cera, pólen, veneno. Para além destes produtos pode-se comercializar enxames, rainhas e serviços de polinização, resultando num retorno financeiro para a apicultora.

❖ Mel

O mel é o resultado modificado das substâncias colhidas pelas abelhas. O mel, em condições normais apresenta uma solução líquida com alta concentração de matéria seca e baixo teor em água (entre 13 a 20%). Possui elevadas quantidades de açúcares simples, em média 38% de frutose e 32% de glicose, de rápida assimilação pelo aparelho digestivo. Apresenta também, pequenas quantidades de outros açúcares (maltose, sacarose, outros dissacarídeos e açúcares superiores), sais minerais (sódio, potássio, enxofre, cloro, fósforo, cálcio, ferro, magnésio e silício), enzimas (glicose, oxidase, catálase, fosfatase, diástase e invertase), aminoácidos, algumas vitaminas, ácidos, pigmentos e substâncias aromáticas. A sua densidade é de 1,40 a 1,44 a 20°C (Couto *et al.*, 2006; Sequeira).

O mel é produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores. As abelhas voam de flor em flor e sugam o néctar com a sua trompa, enchendo-se deste antes de voltar à colmeia. O néctar é produzido pelas plantas nos seus nectários florais ou extraflorais, distribuídos estrategicamente com o objetivo de atrair animais, especialmente insetos, que lhes são úteis no seu processo produtivo (polinização). Após ser coletado pelas abelhas, passa por dois processos para se transformar em mel. Um processo físico que é a desidratação do néctar e, outro químico, a transformação dos açúcares presentes (Couto *et al.*, 2006; Darrigol, 1979).

O néctar quando coletado pode ter de 5 a 75 % de açúcares, sendo que a maioria contém de 25 a 40%. Na colmeia, as abelhas campeiras regurgitam o néctar transportado no papo, transferindo-o para as abelhas recetoras. Estas abelhas executam uma operação que consiste em envolver a língua distendida com uma gota de néctar, posicionando-se num local da colmeia em que as obreiras produzem uma corrente de ar. Assim, o néctar perde água e arrefece. As abelhas colocam-no no favo de mel,

aquecendo. Em seguida repetem o processo, tantas vezes quanto necessário, desidratando o néctar até que se atinja uma concentração de 75 a 87% de açúcares (Couto *et al.*, 2006; Darrigol, 1979).

Depois destas transformações realizadas pelas obreiras, o mel é depositado nos alvéolos existentes nos favos, sendo operculado pelas abelhas com uma camada fina de cera. Para as abelhas está pronta a sua principal reserva de alimentos (Couto *et al.*, 2006; Darrigol, 1979).

O mel pode ser classificado de acordo com a sua origem floral, podendo ser quase incolor (flores como a assa-peixe), escuro (urze, castanheiro), âmbar (laranjeira) e pardo escuro (trigo sarraceno) (Couto *et al.*, 2006).



Figura 5- Mel Serra da Lousã (Lousamel, 2017).

❖ Geleia real

A geleia real é o alimento dado às larvas de obreiras, de zangãos e de rainhas durante toda a vida. Esta, é segregada pelas jovens obreiras encarregues de criar as larvas, com o auxílio das secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, localizadas na cabeça das abelhas e, com a adição de soluções regurgitadas do papo das obreiras nutrizas, contendo principalmente açúcares (Couto *et al.*, 2006; Darrigol, 1979; Morse, 1986).

A geleia real apresenta consistência cremosa, com uma coloração que varia de branco a marfim, com sabor característico ligeiramente ácido e picante. É constituída em média por 66% de água e 34% de matéria seca. Na matéria seca pode-se encontrar

13% de carboidratos (açúcares), 12% de proteínas, 5% de lípidos, 3% de vitaminas, enzimas e coenzimas e 1% de sais minerais (Couto *et al.*, 2006).

❖ Própolis

O própolis é um produto produzido pelas abelhas a partir da colheita de resinas de plantas e cera. A resina é recolhida da casca de algumas árvores, brotos, flores e algumas folhas. A sua origem determina a qualidade do própolis, atividade biológica e uso medicinal (Couto *et al.*, 2006; Darrigol, 1979).

As abelhas usam grandes quantidades de própolis para isolar os quadros e fixa-los à colmeia, e também no revestimento das paredes interiores da colmeia para obstruir os buracos e frestas e unir partes. Serve também como ferramenta na regulação da temperatura interna e para “envernizar” os alvéolos de criação com uma camada fina ao final de cada ciclo de criação (Couto *et al.*, 2006; Morse, 1986).

O própolis é constituído maioritariamente, por 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos voláteis, e 5% de pólen. Este pode ser amarelado, pardo, vermelho escuro, cinza esverdeado, verde limão e marron. Apresenta um aroma balsâmico e resinoso com um sabor forte e picante, variando conforme a sua origem (Couto *et al.*, 2006).

❖ Cera

A cera é segregada pelas abelhas por quatro pares de glândulas ceríferas localizadas do quarto ao sétimo segmento do lado ventral do abdómen das abelhas obreiras, com idade entre 12 a 18 dias. Para a construção dos favos as obreiras juntam-se e ficam dependuradas muito quietas, enquanto os seus órgãos digestivos e de secreção transformam o conteúdo dos seus papos em energia e cera. Na produção de cera as abelhas precisam de açúcares na colmeia; para um quilograma de cera é necessário entre seis e sete quilogramas de mel (Couto *et al.*, 2006; Darrigol, 1979; Morse, 1986).

A cera das abelhas *Apis mellifera* é muito diversificada, tendo sido separada em mais de trezentos componentes que podem ser resumidos em: 35% monoésteres, 14% diésteres, 12% ácidos livres, 8% hidroxipoliésteres, 4% hidroximonoésteres, 3% triésteres, 2% ácidos poliésteres, 1% ácidos monoésteres e 7% de material não identificado (Couto *et al.*, 2006).

❖ Pólen

O pólen colhido pelas abelhas é o gâmeta masculino das plantas. Uma flor pode produzir quase 4 milhões de grãos de pólen. Os grãos de pólen podem apresentar diversas formas (rectangular, circular, pentagonal, triangular), dimensões (entre 10µm a 200µm), ornamentação, cor (amarelo, vermelho, verde, cinza, castanho) e composição química. Esta varia consoante a planta de origem, podendo ter de 8 a 40% de proteína bruta, um teor de humidade entre 4 a 35%, 1 a 18% de carboidratos, 0,7 a 7% de minerais, vitaminas, enzimas e pigmentos (Couto *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2006).

O pólen é um alimento de grande importância para as abelhas pois é a sua principal fonte de proteínas, minerais e gorduras, sem os quais as abelhas não teriam condições de desenvolver satisfatoriamente os seus órgãos e glândulas (Couto *et al.*, 2006; Morse, 1986).

❖ Veneno ou apitoxina

O veneno ou apitoxina é produzido pela glândula do veneno e armazenado no saco do veneno, situado na base do ferrão da abelha. Só as fêmeas o produzem, sendo que, ao nascer já possuem uma pequena quantidade de veneno. Este é transparente, solúvel em água e apresenta 12% de matéria seca (proteínas, açúcares, aminoácidos livres, lipídeos, enzimas, feromona). O principal componente é a melitina, que é responsável pela lise das células sanguíneas, libertação de histamina e serotonina dos mastócitos e redução da pressão sanguínea (Couto *et al.*, 2006; Morse, 1986).

1.2.5. Declínio das abelhas

A perda de todos os polinizadores poderia reduzir cerca de 8% da produção agrícola mundial, sendo que determinadas plantações poderiam vir a diminuir mais de 90% sem a presença de abelhas. Este declínio no número de polinizadores poderia trazer também um paralelo declínio no número de espécies vegetais (Pereira, 2010).

Muitos podem ser os fatores relacionados com a perda de colônias na Europa e nos EUA, não podendo ser um único fator responsável por todas as perdas. Estes fatores podem ocorrer em simultâneo e até influenciar-se mutuamente (Pereira, 2010; vanEngelsdorp *et al.*, 2010).

As abelhas possuem diversos inimigos que lhes afetam a sobrevivência, sendo que, alguns dos agentes bióticos são as doenças, como a loque, ácaro traqueal, nosemas, varroa, predadores (vespas asiáticas) e parasitas. Outros fatores são a biodiversidade, gases dos escapes, genética, distúrbio do colapso das colônias e pesticidas (Vasconcelos, 2014).

❖ Doenças

Existe a loque europeia, (*Melissococcus plutonius*), e a loque americana (*Paenibacillus larvae*) que são bacterioses da criação. Estas foram, até 1970, o maior problema sanitário das colônias de abelhas o que levou a que muitos apicultores utilizassem antibióticos para protegerem as suas colônias. O ácaro traqueal aloja-se nas traqueias das abelhas causando-lhes problemas respiratórios e debilitando-as. As nosemas transmitem-se por esporos que podem ser ingeridos dentro da colmeia ou quando as abelhas desenvolvem a sua atividade forrageira. São responsáveis por causar irritação intestinal e diarreia às abelhas, por lhes diminuírem a longevidade, causarem grande mortalidade na estação desfavorável e obrigarem a cuidados acrescidos de limpeza e higiene no interior da colmeia (Vasconcelos, 2014).

A varroa (*Varroa destructor*), é um ácaro e é considerado o maior inimigo das colônias de abelhas. A fêmea alimenta-se nas abelhas adultas. A reprodução ocorre nos

alvéolos de criação onde a alimentação do ácaro causa deficiências nutricionais, enfraquecimento do sistema imunitário, alterações na fisiologia e infecções secundárias às larvas de abelhas. A varroa é responsável pela transmissão de diversas espécies de vírus como o vírus da paralisia aguda (ABPV), o vírus das asas deformadas (DWV) e o vírus Kashmir (KBV) (Vasconcelos, 2014).

❖ Predadores e parasitas

A vespa asiática *velutina nigrithorax* é originária da Ásia e é um problema na atualidade apícola. Existem muitas espécies de vespas que são predadoras de abelhas, obtendo assim as proteínas necessárias para alimentarem as suas larvas. As vespas asiáticas são capazes de invadir a colmeia, exigindo, por parte das abelhas, um comportamento permanente de alerta, diminuindo a sua atividade forrageira (Vasconcelos, 2014; Villemant, 2011).

A mosca, *Apocephalus borealis*, um parasitóide das abelhas selvagens do género *Bombus*, parece ter migrado para as colónias de *A. mellifera* e ser responsável pela alteração comportamental que se tem vindo a verificar. No atual cenário de alterações climáticas, muitas espécies desenvolvem alterações comportamentais, colonizando novas áreas e diversificando a espécie. Daí, é expectável que novos inimigos da abelha continuem a surgir no atual contexto sociogeográfico (Vasconcelos, 2014).

❖ Biodiversidade

A biodiversidade é muito importante para a qualidade dos alimentos ingeridos visto que é fundamental para a sanidade das abelhas. Alguns fatores que causam a diminuição da biodiversidade são, as monoculturas, agricultura intensiva e os incêndios florestais, que afetam a quantidade e a qualidade do alimento disponível para as abelhas (Vasconcelos, 2014).

❖ Gases de escapes

As abelhas têm um olfacto muito desenvolvido, que ajuda na localização das plantas apícolas. Os gases libertados pelos escapes da maquinaria agrícola e dos automóveis,

interferem na fisiologia das abelhas impedindo-as de reconhecer certos odores e intoxicando-as lentamente (Girling, 2013; Vasconcelos, 2014).

❖ Genética

As abelhas como indivíduos apresentam apenas 1/3 dos genes de imunidade comparativamente à maioria dos insetos. Esta fragilidade foi resolvida na colônia, com o auxílio das obreiras que são muito próximas geneticamente, mas com a diferenciação necessária para fazer face às perturbações de origem biótica a que estão sujeitas, obtendo-se assim uma imunidade geral que protege a colônia e a espécie no seu todo. Porém, como a maioria das espécies domesticadas, as abelhas têm vindo a ser cruzadas artificialmente e conseqüentemente têm vindo a perder variabilidade genética e a aumentar a imunodeficiência (Vasconcelos, 2014).

❖ Distúrbio do colapso das colônias

A primeira vez que foi relatado o distúrbio do colapso das colônias (DCC) foi no outono de 2006 nos EUA. As colônias apresentaram sintomas claramente diferentes dos demais sintomas clássicos de doenças, o que inclui a total ausência de abelhas mortas na colônia ou apiário, a rápida perda de abelhas adultas, apesar da presença de mel e pólen nas colônias. Acredita-se que outros fatores de stress, atuando sozinhos ou em conjunto, contribuem para o enfraquecimento da colônia e permitem a ação de patogênicos oportunistas. A mortalidade das abelhas após a estação do inverno é comum, porém em 2007, apicultores chegaram a perder cerca de 80 a 100% das suas colônias (Oldroyd, 2007; Pereira, 2010).

A agricultura moderna é cada vez mais dependente do uso de produtos químicos para controlar fungos, plantas daninhas e insetos pragas para assegurar a produtividade. As abelhas melíferas podem ficar expostas a estes agentes químicos devido sua atividade de forrageira. Assim, novas classes de inseticidas surgem para aumentar a produtividade das culturas, podendo estar relacionadas com o DCC (Oldroyd, 2007; Pereira, 2010; Thompson, 2003).

❖ Pesticidas

Os pesticidas são usados para controlo das populações de inimigos das culturas e aumento dos rendimentos das colheitas. É de salientar a presença de neonicotinóides na constituição dos inseticidas. Estes são inseticidas sistémicos que atuam nos recetores do sistema nervoso dos insetos. Acumulam-se no pólen e no néctar o que leva a que as abelhas os ingiram, em doses sub-letais, enquanto desenvolvem a sua atividade forrageira. A ingestão contínua destes produtos em pequenas doses causa alterações na memória, mobilidade, termorregulação, orientação, e performance forrageira das abelhas e, aumenta a sua suscetibilidade a doenças, nomeadamente, aos ataques de nosema (*Nosema* sp) e varroa (*Varroa destructor*) (Vasconcelos, 2014).

1.3. Eucalipto

Eucalyptus globulus Labill de nome comum eucalipto pertence à família *Myrtaceae*. É uma espécie aromática que pode chegar aos 55 metros de altura, apresenta um ritidoma liso e destaca-se em tiras longitudinais. É uma planta perene com dimorfismo foliar com folhas jovens, opostas, ovadas a lanceoladas, sésseis e verde-azuladas e as folhas adultas com 12-25 cm de comprimento e 1,7 -3 cm de largura, acuminadas lanceoladas-falciformes e verde-brilhantes. As flores são sésseis, ou quase, solitárias, com estames muito numerosos, grandes e branco-amarelados. Os frutos também são solitários, pseudo-cápsulas lenhosas costas (14-25mm). (Marchante *et al*, 2014; Paiva, 2016).

Existem várias espécies do género eucalipto, nomeadamente as espécies *Eucalyptus botryoides* Smith, *E. maidenii* Müll, *E. camaldulensis* Dehnhardt e *E. globulus*. Em Portugal, a espécie dominante é *Eucalyptus globulus* Labill que apresenta uma área de superfície florestal de 812 mil ha (ICNF, 2013).

O eucalipto é nativo do Sudeste da Austrália e Tasmânia, tendo sido introduzido em Portugal com a finalidade da produção florestal. Atualmente encontra-se cultivado em grande parte do território nacional, devido ao seu comportamento invasor em locais mais húmidos. O eucalipto apresenta diversas características invasoras, como a frequente germinação das sementes, inclusive fora dos povoamentos e a formação de mantos contínuos que impedem o desenvolvimento de outras espécies (Marchante *et al.*, 2014).

O *Eucalyptus globulus* Labill assume um papel relevante no quadro da atividade económica portuguesa pela elevada rentabilidade da sua cultura, pelo significado macroeconómico da produção a que dá origem, e também pela importância da área ocupada. Esta é a matéria-prima de um dos principais sectores industriais da economia do país, a indústria de pasta de papel, com participação proeminente na balança comercial externa (Alves, 2007).

Desde a década de oitenta que se têm vindo a verificar vários problemas provocados pela ação de agentes bióticos, levando a perdas na produtividade na espécie eucalipto (Paiva, 2016).

Têm surgido vários problemas fitossanitários que afetam a espécie eucalipto, principalmente o Gorgulho do eucalipto (*Gonipterus platensis*). Este é natural da Tasmânia e afecta várias regiões como a Austrália, Europa, América do Norte, América do Sul e, potencialmente, África. Em 1996, foi detetado pela primeira vez em Portugal na região do Norte e, passados sete anos (2003) já se encontrava por todo o território português com maior incidência no Centro e Norte do país, com uma concentração preferencial nas regiões montanhosas de altitudes superior a 400-500 metros (Sarmento, 2015; ICNF, 2014; Valente *et al.*, 2010).



Figura 6 – Gorgulho do eucalipto (*Gonipterus platensis*) (ICNF, 2014).

Em Portugal, o gorgulho do eucalipto apresenta duas gerações por ano, na Primavera e no Outono, apresentando um ciclo de vida com 4 fases (posturas, larvas, pupas e adultos). Tanto na fase larvar como na fase adulta, este insecto, consome sobretudo as folhas adultas recém-formadas, causando uma diminuição da capacidade fotossintética da árvore e conseqüentemente, do seu crescimento, o que por sua vez vai ter impactes a nível económico (Sarmento, 2015; ICNF, 2014).

Com a afirmação de Portugal como um dos maiores produtores de pasta de papel da Europa, surge a necessidade de uma melhor gestão das populações de eucalipto,

nomeadamente na gestão de pragas. O gorgulho tem vindo ser controlado recorrendo ao plano de controlo e a diversos tipos de tratamentos: físicos, culturais, biológicos, genéticos e químicos (Sarmiento, 2015; Paiva, 2016).

O Plano de Ação Nacional para o controlo das populações de *Gonipterus platensis* tem como objetivos controlar a praga, reduzir os estragos e prejuízos, aumentar a produtividade, sensibilizar e informar (ICNF, 2014).

O controlo físico consiste na queima, realizada apenas em situações extremas, e nas podas (consiste no corte de ramos que apresentam sinais de doença e enfraquecimento). O tratamento cultural utilizado para controlar a espécie envolve a irrigação, fertilização, cultivo e práticas culturais que exponham as câmaras de pupação a agentes abióticos e bióticos. Sendo que estas são mais promissoras e teriam de ser praticadas em larga escala químicos (Sarmiento, 2015; Paiva, 2016).

A luta biológica tem como objetivo introduzir um organismo específico que atue diretamente sobre as populações de uma praga ou doença específica. Para altitudes inferiores a 600m utilizou se o parasitoide de ovos *Anaphes nitens* (Pinto, 2015; ICNF, 2014).

Outro método de controlo é a luta genética, que consiste na produção de clones híbridos e espécies que sejam mais tolerantes e resistentes aos ataques bióticos. Depois dos vários ensaios realizados, selecionou se uma espécie que é menos atacada pelo gorgulho, mas que possui menor produtividade (Sarmiento, 2015; ICNF, 2014).

O controlo químico é uma forma de luta a curto prazo utilizada contra o eucalipto. Um inseticida é considerado eficiente para *G. platensis*, se este não afetar outros parasitóides, abelhas ou mesmo outro tipo de insectos (Sarmiento, 2015).

1.4. Pesticidas

Segundo o IUPAC, os pesticidas são substâncias naturais, sintéticas ou químicas, utilizadas com a finalidade de prevenir, controlar ou eliminar pragas, tais como insetos, ervas daninhas, fungos, nematoides, bactérias, roedores, ácaros, e entre outras formas de vida, que são indesejáveis ou prejudiciais às atividades económicas agroflorestais e de produção e sanidade animal.

O uso crescente dos pesticidas, principalmente inseticidas e herbicidas na agricultura, produção animal e outras atividades, acarreta algumas consequências colaterais muito perigosas e sérias para o Homem e para outros seres vivos. Os produtos resultantes do metabolismo ou degradação dos pesticidas originam resíduos que se podem acumular e infiltrar no ambiente. É frequente encontrar vestígios em águas superficiais ou lençóis freáticos, no solo, em produtos agrícolas e agroalimentares e também no ar (Duro, 2013).

Existem alguns riscos para o meio ambiente, resultantes da aplicação de pesticidas, que estão dependentes das propriedades físicas e químicas, de processos de degradação e dissipação e de outros fatores como o grau de toxicidade, a fórmula utilizada, extensão do uso, tempo de aplicação e o método. Os trabalhadores expostos a este tipo de substâncias apresentam alguns sintomas como dores de estômago, dores de cabeça/enxaquecas, diarreia e vômitos (Duro, 2013; Quandt, *et al.*, 2006).

O consumo de pesticidas no mundo tem vindo a aumentar exponencialmente nos últimos anos. Tendo em conta a dimensão territorial, relativamente aos outros países, Portugal é um dos grandes consumidores de pesticidas na Europa. Segundo dados do Portal Do Estado Do Ambiente (REA), em 2015 as vendas de produtos fitofarmacêuticos foram de 10 006 toneladas, expressas em teor de substância ativa (Duro, 2013).

Devido ao consumo elevado dos pesticidas na Europa, tem havido alguma preocupação no sentido de limitar a sua utilização, procurando otimizar os seus efeitos positivos e reduzir ou eliminar os seus efeitos adversos. Para tal, a legislação referente aos pesticidas tem vindo a ser ajustada por todos os estados da União Europeia, com

esforços comuns a serem levados a cabo no sentido de adotar medidas oficiais adequadas na monitorização, controlo e fiscalização de pesticidas. Este controlo na monitorização de resíduos de pesticidas assume extrema importância quando alguns compostos têm uma elevada toxicidade, tanto para o ambiente como para o ser humano (Duro, 2013).

A ecotoxicologia foi considerada como o ramo da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias, naturais e artificiais, sobre os organismos vivos, animais ou vegetais, aquáticos ou terrestres, que constituem a biosfera. O teste ecotoxicológico permite medir os efeitos de diferentes concentrações de uma amostra em indivíduos de uma determinada espécie. A concentração de efeito-CE50 ou a concentração letal CL-50 corresponde à concentração da amostra responsável pelo efeito em 50 % dos organismos testados. Estes testes podem ser crónicos ou agudos, consoante a sua duração e o efeito observado. No caso dos testes agudos o efeito avaliado relaciona-se com as taxas de mortalidade, de inibição ou imobilização do crescimento e quanto mais baixo for este valor, mais elevada é a toxicidade da amostra (APA, 2017).

É indiscutível que todos os pesticidas têm a função de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos. Existem vários tipos de pesticidas e, conseqüentemente, várias formas de os agrupar e classificar. A tabela 1 apresenta o organismo-alvo mais comum de cada pesticida (Duro, 2013).

Tabela 1 – Tipo de pesticida e o seu organismo alvo (Duro, 2013).

Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Pássaros
Bactericida	Bactérias
Fungicida	Fungos
Herbicida	Ervas e Plantas
Inseticida	Insectos
Raticida	Roedores
Nematicida	Nematoides

Em 1984, o cientista Paul Muller ganhou o prêmio Nobel da Medicina, tendo também descoberto o mais famoso inseticida de todos os tempos, o DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano). Os inseticidas são uma classe de pesticidas com o objetivo de prevenir, controlar e destruir pragas de insetos, larvas ou formigas. Durante muitos anos o controle de pesticidas apenas estava associado a inseticidas. As formulações comerciais foram produzidas como uma tentativa de melhorar o controle de insetos, mas efeitos indesejáveis foram surgindo durante este tempo, como por exemplo a elevada atuação tóxica e resistência dos insetos (Duro, 2013).

Os inseticidas atuam ao nível do sistema nervoso, bloqueando os processos bioquímicos e fisiológicos dos insetos. Estes podem ser classificados em grupos químicos, entre os quais Carbamatos, Organofosforados, Piretróides, Organoclorados, e Neonicotinóides (Duro, 2013).

Outra classe de inseticidas muito utilizados na agricultura contra os insetos são os neonicotinóides, porém eles podem também afetar os insetos que não são o seu alvo, tais como as abelhas. Neonicotinóides nitrossubstitutos (imidaclopride e thiamethoxam) aplicados topicamente são os mais tóxicos às abelhas, com valores de DL 50 de contato em nanogramas por abelha (Iwasa et al., 2004; Stuchi, 2009).

Atualmente, os neonicotinóides são uma das categorias mais importantes de inseticidas introduzidas no mercado desde os piretróides sintéticos. Na última década, estes compostos tiveram uma grande expansão, tornando-se na maior classe de inseticidas utilizada no controle, prevenção e tratamento de pestes quer a nível veterinário como ambiental. Os neonicotinóides estão registados em mais de 120 países, sendo bastante eficazes no controle de insetos da ordem Hemíptera e Coleóptera, como por exemplo, afídios, moscas-brancas e o gorgulho do eucalipto, que são insetos que surgem nas folhas das plantas (Duro, 2013).

Os neonicotinóides tiveram origem na molécula de nicotina, um alcaloide de ocorrência natural proveniente das folhas da planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*),

apesar da nicotina ser de baixa eficiência e alta toxicidade para os humanos (Duro, 2013; Pereira, 2010).

A Shell em 1980 e a Bayer em 1990 desenvolveram esta classe de inseticidas. A Shell demonstrou pela primeira vez a capacidade inseticida dos compostos, sendo a base deste estudo um derivado heterocíclico do nitrometileno. Aí nasceu o primeiro neonicotinóide, que serviu de composto-base para a síntese de todos os neonicotinóides, apesar de nunca ter sido comercializado. O Imidaclopride é o primeiro neonicotinóide e foi introduzido em 1990 na Europa e no Japão (Duro, 2013).

Da classe dos neonicotinóides fazem parte ainda o Acetamiprida, Tiametoxam, Nitempiram, Clotianidina, Dinotefurano e o Tiaclopride (Duro, 2013; Pereira, 2010).

A literatura internacional apresenta inúmeras pesquisas que demonstram os malefícios que os neonicotinóides em geral causam às abelhas melíferas. Muitos trabalhos tratam dos efeitos causados por doses sub-letais dos inseticidas. Esses estudos são fundamentais para compreender a interferência desses produtos tóxicos no desempenho comportamental e na vitalidade das abelhas. Os neonicotinóides são caracterizados por afetar a mobilidade das abelhas, causar tremores, movimentos descoordenados e hiperatividade (Bovi, 2013).

1.4.1. Epik SG

Na realização deste estudo utilizou-se o inseticida neonicotinóide, designado de Epik SG (Figura 4). Este é um inseticida sistémico que atua por ingestão e contacto. A sua atividade translaminar e sistémica garantem uma boa proteção da planta. O Epik pode ser utilizado para tratamento de pragas existentes em várias espécies, por exemplo a macieira, pereira, eucalipto, batateira e tomateiro (SIPCAM, 2017).



Figura 7 - Frasco de Epik SG.

O Epik pertence à classe química dos cloronicotinóides e tem como substância ativa a acetamiprida. Esta é de efeito sistémico que atua por contacto e ingestão e apresenta-se na forma de cristais incolores. É solúvel em água, metanol e acetona e é estável à luz solar. O seu mecanismo de ação é atuar seletivamente no sistema nervoso dos insetos. (Pessini, 2003)

Na Figura 9 pode-se verificar a fórmula química da acetamiprida, pertencente à neonicotinóide de segunda geração e comercializado inicialmente no Japão em 1995 por Nippon Soda (Akeju, 2014).

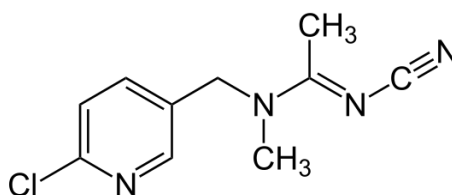


Figura 8 - Estrutura química da acetamiprida (Akeju, 2014).

1.5. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito da aplicação do inseticida EPIK por contacto e ingestão da dose recomenda na mortalidade direta e de longo termo das abelhas. Como objetivos específicos pretende-se: encontrar a dose letal deste inseticida; e avaliar as alterações causadas pela aplicação deste inseticida na expressão genética.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização do local de estudo

A Serra da Lousã constitui a extremidade sudoeste da Cordilheira Central é caracterizada pela sua altitude (1204 m), fortemente sulcada por uma rede ramificada de vales, paisagem típica de grande parte do relevo das Beiras, e declives abruptos no seu rebordo noroeste. As características edafo-climáticas, a existência de uma área de flora melífera que dá origem ao tão apreciado mel de urze, a atração das pessoas por tão nobre atividade, que vêm no contacto com as abelhas um motivo de desconcentração, lazer e proximidade com a natureza, fazem desta região um enorme potencial para o desenvolvimento da atividade apícola (Lousamel, 2017).

Pela necessidade de uma instituição que ajudasse os apicultores a resolver os seus problemas, fundou-se a Lousamel a 28 de Março de 1988. De modo a unir-se esforços e vontades no sentido de dinamizar o sector apícola da região (Lousamel, 2017).

Em 1990, ocorre o processo de definição da Zona de Abrangência do Mel da Serra da Lousã, bem como as suas características específicas, com o apoio das Autarquias da Região, dos Serviços Florestais e da Faculdade da Farmácia da Universidade de Coimbra (Lousamel, 2017).

Em 1994, foi reconhecida a Denominação de Origem (DOP) através do despacho nº 27/94 de 4 de Fevereiro. DOP é o nome de um produto cuja produção, transformação e elaboração ocorrem numa área geográfica delimitada com um saber fazer reconhecido e verificado. Os concelhos da área da Denominação de Origem Protegida são Arganil, Castanheira de Pera, Figueiró dos Vinhos, Góis, Lousã, Miranda do Corvo, Pampilhosa da Serra, Pedrogão Grande, Penela e Vila Nova De Poiares (Lousamel, 2017).

Foi em 1996, que construíram a primeira sede própria, na Zona Industrial dos Matinhos da Lousã, com o apoio da Câmara Municipal da Lousã e são criadas melhores condições para os seus dirigentes e associados trabalharem. Em 2010, as instalações são reestruturadas e ampliadas por via do crescimento e forte implementação, quer no sector do mel, quer na comercialização de todo o material apícola. Atualmente está equipada com a mais moderna tecnologia de extração, embalagem e processamento do mel e

dotada de instalações polivalentes que podem cumprir diversas funções, nomeadamente, espaços de formação, atividades e exposições (Lousamel, 2017).

Foi distinguida pelo BPI e Cofina com a Menção Honrosa na Categoria Associações/Cooperativas do Premio Agricultura 2014. Em 2015, no concurso nacional do Mel, a Lousamel ganhou a Medalha de Bronze na categoria Mel de Eucalipto. Em 2017, ganhou uma Medalha de Ouro na Categoria de Mel de Multiflora pelo Mel de Urze e Castanheiro.

O que começou por ser um ponto de encontro de apicultores, nos dias de hoje, presta serviços técnicos (assistência técnica aos apicultores, consultoria apícola, elaboração de projetos de investigação, criação de rainhas), formação e divulgação (formação na área de apicultura e em áreas diversas para apicultores e público em geral, ações de divulgação e sensibilização na comunidade escolar), (apoio na recolha de amostras de mel, abelhas e criação para análise laboratorial), produtos (compra e venda de mel, comercialização de material apícola, compra e venda de cera, própolis e pólen, moldagem de cera para utilização nas colmeias, rainhas virgens e fecundadas), material (empréstimo de material apícola aos cooperantes) e registos (registos de apicultor e declaração de existências, modelo IB do IFAP). Atualmente a cooperativa tem 436 cooperantes.

2.2. Obtenção de material biológico

Para a experiência foram recolhidos indivíduos adultos de abelhas *Apis mellifera iberiensis*, localizadas nos terrenos da LOUSAMEL, Lousã (40°08'00''N 8°15'24''W). Após a colheita, as abelhas foram submetidas aos bioensaios com o inseticida EPIK SG.

O inseticida foi diluído como descrito no aviso que é enviado para as cooperativas a informar da sua aplicação nas diferentes áreas (anexo1). Calcula-se a dose recomendada para a área adequada, que é 0,11mg/mL e verifica-se que existe mortalidade (ao fim de 48 horas conta-se as abelhas que morreram, com esta dose). Como consta no aviso do Anexo1, 200 gramas de Epik para um hectare, calcula-se a área da caixa de Petri e, depois, através de uma regra de três simples obtém-se as gramas de inseticida a usar. A partir daí procura-se a concentração letal para cada um dos testes, inicialmente foi aumentado 1mg (em 1mg) em cada concentração. Como não se obteve logo resultados aumentou-se de 10mg em 10mg.

2.2.1. Teste de contacto

As abelhas foram colocadas em garrafas de plástico e colocadas no frigorífico durante 1 minuto para ficarem imóveis e fáceis de manipular. De seguida foram colocadas em caixas de Petri, previamente montadas, contendo alimento (candi – pasta de açúcar concentrada com mel) e papel de filtro, embebido em 1mL da solução que contém o inseticida (Figura 10).

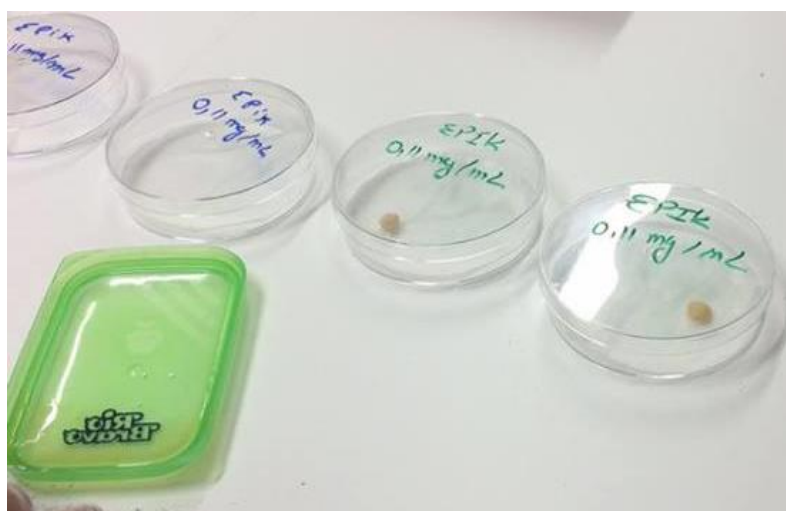


Figura 9 - Caixa de Petri preparadas.

Para cada caixa, foram colocadas 10 abelhas, tendo sido utilizadas cinco caixas; três repetições e uma caixa controlo (contendo alimento e papel filtro embebido em água), perfazendo um total de 16 caixas e 160 abelhas. Na Figura 11 pode-se observar a colocação das abelhas nas caixas de Petri.



Figura 10 - Colocação das abelhas na caixa de Petri

Depois de finalizadas as cinco repetições e a caixa controlo, vezes 3 repetições, o que perfaz um total de 15 caixas com Epik e 3 caixas de controlo. Foram colocadas numa estufa, regulada para 32 graus °C e para 60% de humidade, sendo estes, consideradas como as condições ótimas, durante 48 horas



Figura 11 - Caixas de Petri prontas para a estufa

Ao fim das 48h, numa estufa em condições ótimas, foi realizada a contagem das abelhas mortas e retiradas as vivas, utilizadas para a análise eletroforética.

2.2.2. Testes de ingestão

Na preparação dos testes de toxicidade por ingestão, as abelhas foram instaladas em garrafas de plástico e colocadas no frigorífico durante um minuto para ficarem imóveis. Seguidamente, foram inseridas em gaiolas (20cm x 10cm x 10cm) com um frasco alimentador previamente preparado. Na Figura 12 pode-se observar os frascos do alimentador que continham xarope (água com açúcar) e o inseticida.



Figura 12 - Frascos do alimentador com xarope e inseticida.

Em cada gaiola foram colocadas 20 abelhas (Figura 13). Foram utilizadas cinco gaiolas, três repetições e uma gaiola controlo (contendo alimento), perfazendo um total de 18 gaiolas e 360 abelhas.

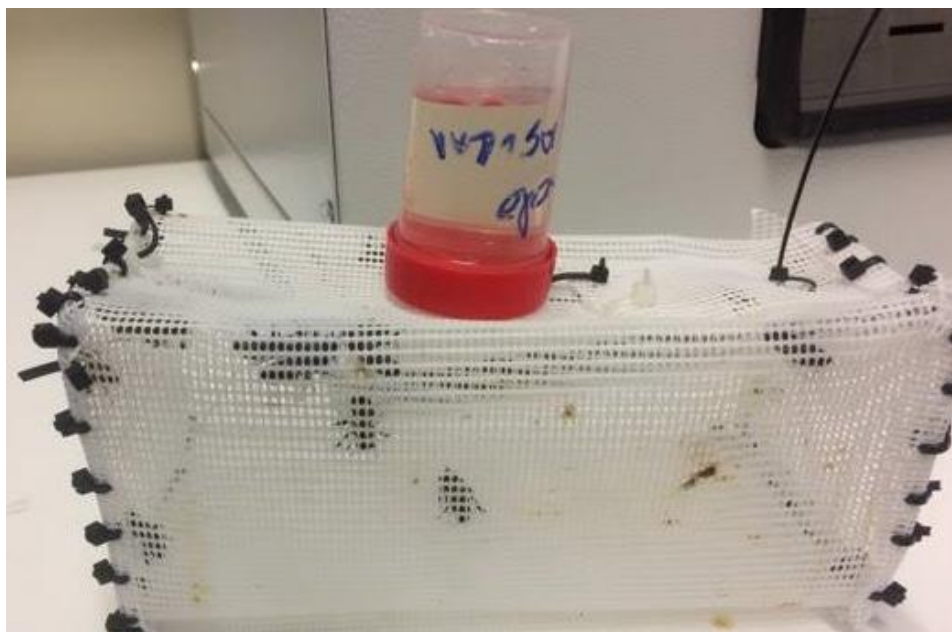


Figura 13 - Gaiola com abelhas e frasco alimentador (xarope e inseticida).

As abelhas foram armazenadas nas gaiolas durante 48h, em condições ótimas (Figura 14). Por último, foi realizada a contagem das abelhas mortas e retiradas as vivas para a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida.



Figura 14 - Estufa com os testes de contaminação e de ingestão.

2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As abelhas que sobreviveram aos testes de toxicidade, foram colocadas em frascos devidamente identificados e numerados a - 20°C para cada teste (contacto e ingestão), utilizaram-se dez indivíduos sobreviventes e dez de controlo.

Para realizar as eletroforeses foi necessário preparar as abelhas. Inicialmente cortou-se cabeça e o tórax das abelhas, colocaram-se num tubo de propileno com 35 µL da solução 2 mercaptoetanol com glicerol a 10%, onde sofreram um esmagamento. De seguida, foram a centrifugar a 54 000G, quinze minutos a uma temperatura de 4 °C.

Seguidamente pipetaram-se 15 µL do sobrenadante para um tubo com 10 µL do tampão de amostra Tris-HCl (1,5M pH 8,8). O tubo foi aquecido a 100 °C durante três minutos, e por fim colocado em gelo para arrefecer.

O sistema de eletroforese adaptado foi constituído por dois tipos de géis: um gel de resolução e um gel de concentração, dois reservatórios, um superior (junto dos géis) e um inferior (recipiente maior). Para a elaboração dos géis de poliacrilamida seguiu-se o protocolo do Western Blotting, que está explicado no Anexo 2, na tabela 2 estão os constituintes e as quantidades para preparar os dois géis.

Tabela 2 - Composição dos géis utilizados para a análise SDS-PAGE.

	Gel de resolução 8%	Gel de concentração 4%
H2O	10,6 mL	3 mL
Acrilamida/Bisacrilamida(30%)	5,33 mL	650 µL
Tampão gel	5,23 mL	1,25 mL
PSA (10% (m/v))	198 µL	25 µL
TEMED	19,8 µL	5 µL



Figura 15 - Retirar a amostra do frasco para carregar os poços

Tabela 3 - Composição dos tampões necessários para a análise SDS-PAGE.

Tampão de amostra Tris-HCL (1,5M pH 8,8)	SDS 10% 2 mercaptoetanol 25 mL Glicerol 10% Azul de bromofenol 0,042g
Tampão gel de resolução	Tris-HCL (1,5 M pH8,8) SDS10% 0,4%
Tampão gel de concentração	Tris-HCL (0,5 M pH8,8) SDS10% 0,4%
Tampão de corrida Tris-Glicina (0,1 M pH 8,3) + SDS 10%	SDS 10% Tris 12,14g Glicina 75,07 g

Realizados estes procedimentos, “correu-se” o gel, durante 20 minutos a 80 V e depois passou-se para 120V durante 60 minutos. O gel é constituído por 9 poços, sendo que 4 são carregados pela amostra de controlo e os outros 4 pela amostra contaminada, cada poço foi carregado com 30µL. Por fim, retirou-se o gel, colocou-se na solução de coloração, durante três dias. Findo este período, o gel foi descorado em sucessivas lavagens com a solução descorante, previamente preparada, até à completa visualização das bandas.

Enquanto o gel “corria”, procedeu-se à preparação da solução destinada à coloração das proteínas, constituída por 100 mg de azul brilhante de comassie e 100 mL da solução descorante (45% etanol, 10% ácido acético glacial, 45% de água destilada).



Figura 16 - Retirada do gel do suporte. Imersão e lavagem com a solução colorantes de proteínas.

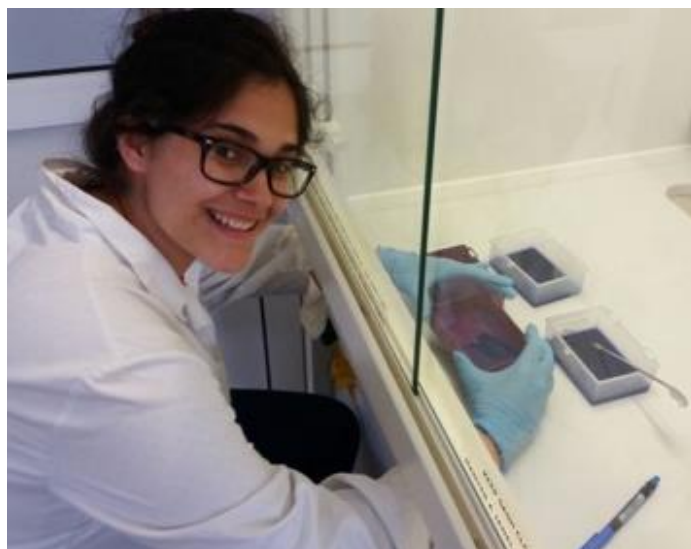


Figura 17 - Descoloração das proteínas.

Foram feitas duas repetições para cada gel. Cada gel era composto pelo controlo, dose letal ou dose recomendada e, correspondia à contaminação por ingestão ou contacto.

Para estudar a significância dos resultados procedeu-se à análise de variância (Teste t Student e regressão linear através do programa Excel, Anova e Teste Tukey com a ajuda do Past 3.x –the Past of the Future).

3. Resultados e Discussão

3.1. Teste de contacto vs Teste de ingestão

3.1.1. Dose recomendada

Pode-se verificar que na dose recomendada para a aplicação de Epik SG na cultura de eucaliptos, tanto no teste por contacto ou por ingestão existe mortalidade das abelhas. Nas caixas de Petri e nas gaiolas usadas como controlo verificou-se que não existiu mortalidade das abelhas, o que significa que o Epik afeta as abelhas, o que vem ao encontro de vários estudos com inseticidas, como é o caso, Suchail et al., (2001), Stuchi (2009) e Bovi (2013). Este último autor no seu estudo usou um neonicotinóide, Imidacloprido, onde verificou também a existência da mortalidade das abelhas.

Na Figura 18 está presente a mortalidade das abelhas em percentagem ao longo de 24 horas e 48 horas por contacto. A concentração usada é de 0,11mg/mL (dose recomendada) (Anexo 3 – teste t).

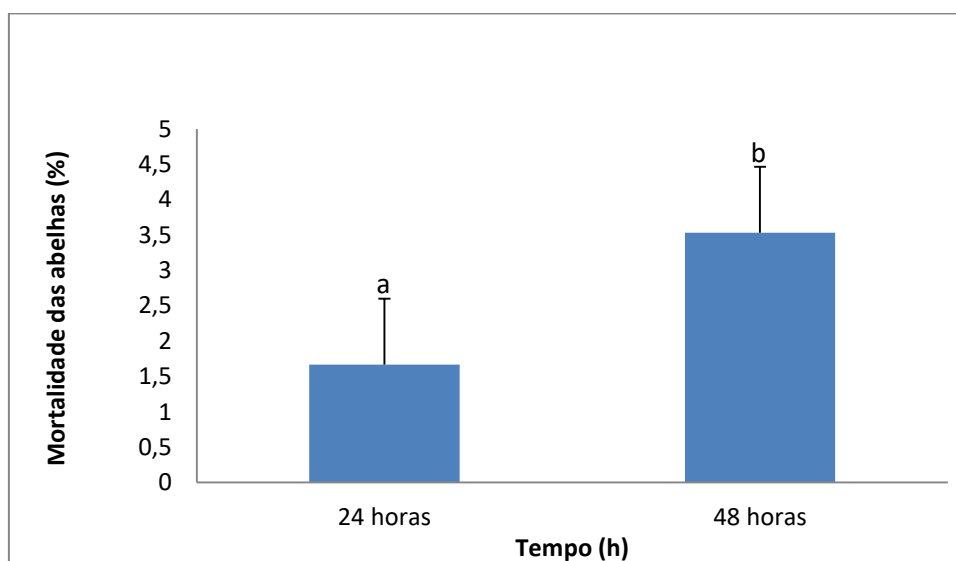


Figura 18 - Mortalidade verificada para a dose recomendada em 24 e 48 horas no teste de contacto, com os respetivos erros padrões. As letras a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P=0,000282$, $t = -4,8$, (t crítico =1,76131).

A Figura 19 apresenta a mortalidade das abelhas em percentagem ao longo de 24 horas e 48 horas por ingestão. A concentração usada é 0.11mg/mL (dose recomendada), o valor $P=0,00280$; $t = -4,8$ e t crítico = 1,76131 (Anexo 4 – teste t).

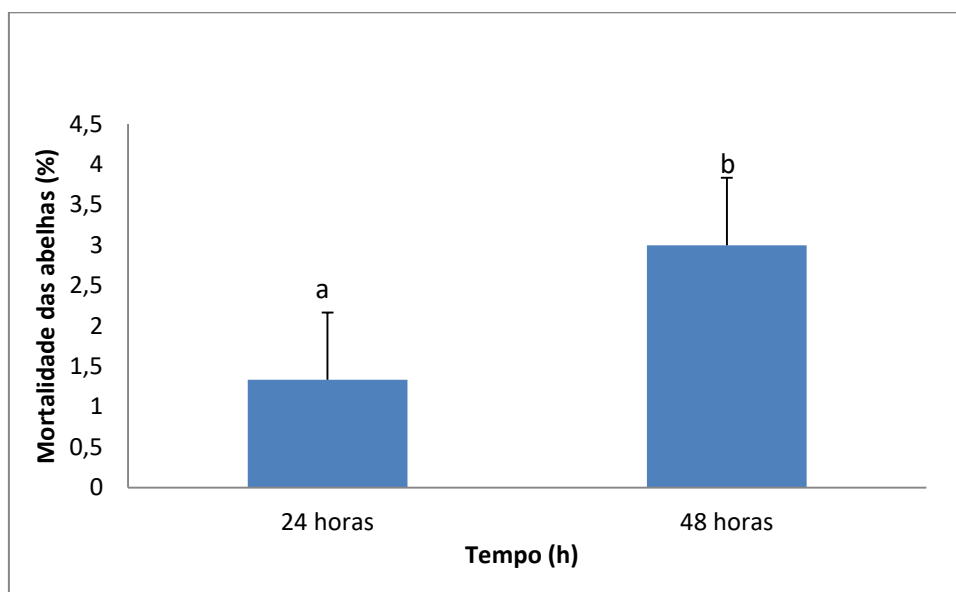


Figura 19 - Mortalidade verificada para a dose recomendada em 24 e 48 horas no teste de ingestão, com os respetivos erros padrões. As letras a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P = 1,545 \cdot 10^{-5}$, $t = -6,44$ e t crítico = 2,1448

Pela comparação dos gráficos das Figuras 18 e 19 pode-se verificar que existe maior mortalidade ao fim das 48 horas e que é pelo teste de contacto que morrem mais abelhas. Os inseticidas neonicotinóides são derivados da nicotina, são de largo espectro, sistémicos, solúveis em água e são aplicados nas plantas através de pulverizações, revestimento de sementes e através do solo. São absorvidos através das folhas ou raízes das plantas e distribuídos pelos tecidos (AKEJU, 2014). Como as abelhas voam perto das folhas de eucalipto à procura do néctar tendem a estar em contacto durante mais tempo, daí os testes de contacto terem uma maior mortalidade. Iwasa et al., (2004) afirma que os neonicotinóides aplicados topicamente são mais tóxicos às abelhas.

Pode verificar-se que existe uma maior mortalidade ao fim das 48 horas, apesar deste facto, há estudos que afirmam que há uma expressiva mortalidade ocorrida na primeira hora após a aplicação do inseticida, aproximadamente 25%, seguida de queda nesta taxa (pouca ou nenhuma mortalidade foi observada após a 6ª hora) (Pereira, 2010).

Tanto nos testes de ingestão como nos teste de contacto, com o neonicotinóide usado, verifica-se uma mortalidade das abelhas. Em doses mais baixas a mortalidade era

mais rápida e nas doses mais altas as abelhas pareciam mais resistentes. Isto pode ser explicado devido à presença e à ação de metabólitos que atuam no organismo do inseto. Desta forma, doses maiores favoreceriam a ação de enzimas desintoxicadoras, reduzindo ou retardando os efeitos tóxicos que poderiam aparecer nas abelhas. Por outro lado, doses menores demorariam mais para ativar o sistema enzimático, promovendo o aparecimento de efeitos tóxicos (Bovi, 2013; Pereira, 2010). Suchail et al. (2000) observam que com o neonicotinóide Imidacloprido, após o teste de ingestão em abelhas melíferas, a cinética da mortalidade sofreu um atraso quando foram oferecidas doses maiores, sugerindo que padrões metabólicos possam estar envolvidos com a toxicidade deste inseticida.

Na Figura 20 está representada a comparação entre a mortalidade das abelhas em percentagem com os testes de contacto e ingestão ao fim de 24 horas, o valor de $P=0,000281$; $t = -4,80$ e t crítico $=2,1448$, (Anexo 5 – teste t).

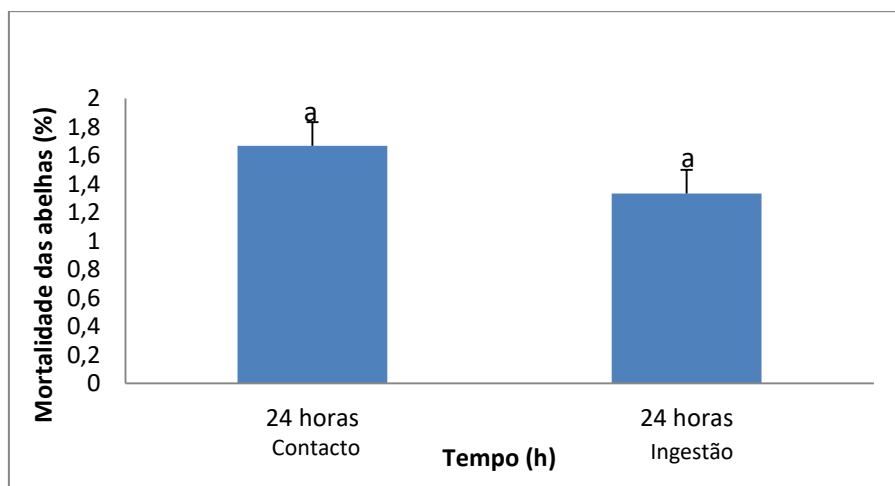


Figura 20 - Comparação da mortalidade verificada para a dose recomendada em 24 horas entre os testes de contacto e ingestão, com os respetivos erros padrões. A letra a mostra que não há diferenças estatísticas observadas. $P = 0,000281$, $t = -4,80$ e t crítico $= 2,1448$.

Na Figura 21 está representada a comparação entre a mortalidade das abelhas em percentagem com os testes de contacto e ingestão ao fim de 48 horas, o valor $P = 1,55 \cdot 10^{-5}$; $t = -6,44$ e $t_{\text{crítico}} = 2,1448$, (Anexo 6 – test t).

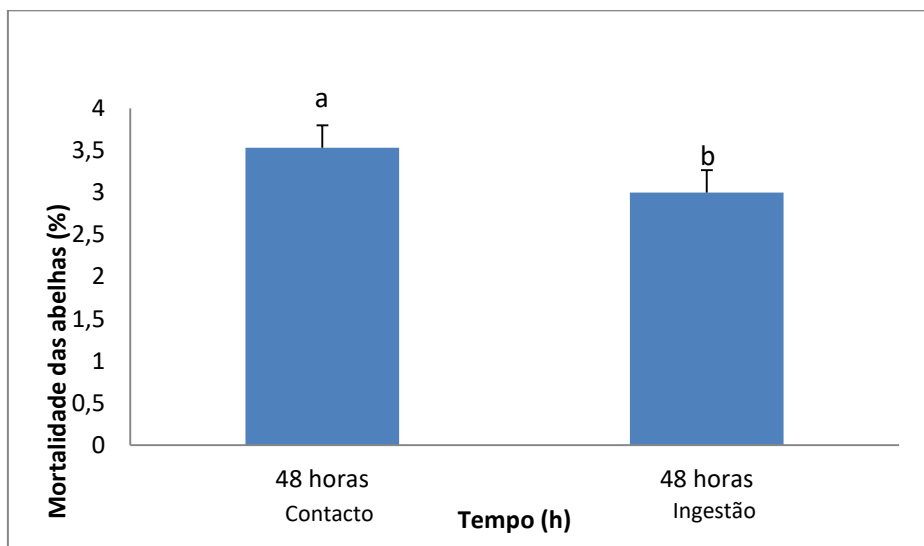


Figura 21 - Comparação da mortalidade verificada para a dose recomendada em 48 horas entre os testes de contacto e ingestão, com os respetivos erros padrões. As a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P = 1,55 \cdot 10^{-5}$, $t = -6,44$ e $t_{\text{crítico}} = 2,1448$.

Pela análise das Figuras 20 e 21, pode-se verificar que tanto em 24 horas como em 48 horas, o teste de contacto é onde existe maior mortalidade, apesar de só haver diferenças estatísticas significativas na comparação das 48 horas. Deve-se ter em atenção a altura em que é feita a aplicação do inseticida na cultura, de maneira a que não coincida com a altura que as abelhas precisem de recolher néctar e pólen nos eucaliptos.

3.1.2. Dose letal - contacto

Para os testes de contacto a concentração da dose letal é de 0,41mg/mL. Na Figura 22 pode-se observar que existe correlação entre o aumento da concentração do inseticida e a média da mortalidade das abelhas *A. mellifera*, através da regressão linear, o valor $P = 1,363 \cdot 10^{-17}$, $F = 25,55$ (Anexo 7 –Anova, Teste Tukey's). No estudo da Stuchi, o inseticida thiamethoxam apresentou correlação para os dois tipos de contaminação, e o maior coeficiente de correlação (R) foi observado na contaminação por ingestão, com valor de 0,902. Enquanto no nosso estudo o maior coeficiente de correlação (R) foi observado por contacto, com valor de 0,9059.

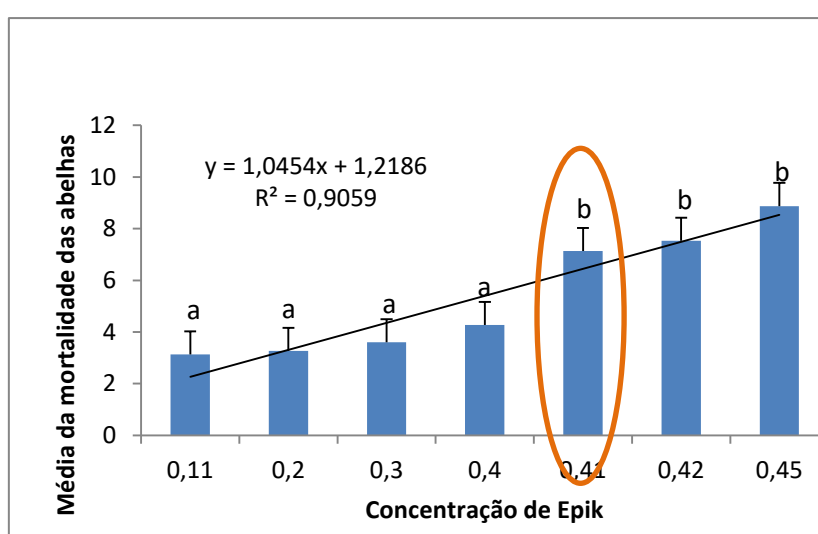


Figura 22 - Mortalidade média das abelhas por aplicação de várias doses de Epik por contacto, com os respectivos erros padrões. a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P = 1,363 \cdot 10^{-17}$, $F = 25,55$. A equação de regressão $y = 1,0454x + 1,2186$.

A toxicidade da acetamiprida já é conhecida, no entanto, pouco se conhece sobre os efeitos fisiológicos e comportamentais das suas doses subletais sobre as abelhas. A toxicidade tóxica de inseticidas neonicotinóides em abelhas melíferas pode ser classificada em dois grupos: um com a presença do grupo funcional nitro e o outro com a presença do grupo funcional ciano. Os inseticidas com o agrupamento nitro são os mais tóxicos como o Imidacloprid. Já os neonicotinóides que apresentam o grupo funcional ciano, apresentam uma toxicidade menor como é o caso da acetamiprida apresentando uma dose letal com valor de $7,1 \mu\text{g}/\text{abelha}$ (IWASA *et al.*, 2004; Stuchi, 2009).

Pode se verificar que com o aumento da concentração, a mortalidade das abelhas também aumenta, e que as abelhas que sobreviviam ficavam desorientadas (verifica-se

na observação das abelhas que sobrevivem ao ensaio). Existem variações nos valores de dose letal encontradas neste estudo, em comparação a outras pesquisas, com neonicotinóides. Estas variações podem ser atribuídas à influência de fatores como variabilidade genética de cada população de abelhas estudada, mudanças ambientais dos locais de origem das populações, execução da metodologia empregada e diferença na capacidade de desintoxicação de um enxame para o outro bem como, diferentes formulações comerciais de inseticidas com o mesmo princípio ativo, os quais variam quanto ao tipo e quantidade dos ingredientes inertes (Bovi., 2013; Suchail et al., 2001).

3.1.3. Dose Letal – ingestão

Para os testes de ingestão a concentração da dose letal é de 1mg/mL. Na Figura 23 pode-se observar que existe correlação entre o aumento da concentração do inseticida e a mortalidades das abelhas *Apis mellifera*, através da regressão linear, o valor $P = 6,816 \cdot 10^{-64}$, $F = 88,39$. (Anexo 8 –Anova, Teste Tukey's).

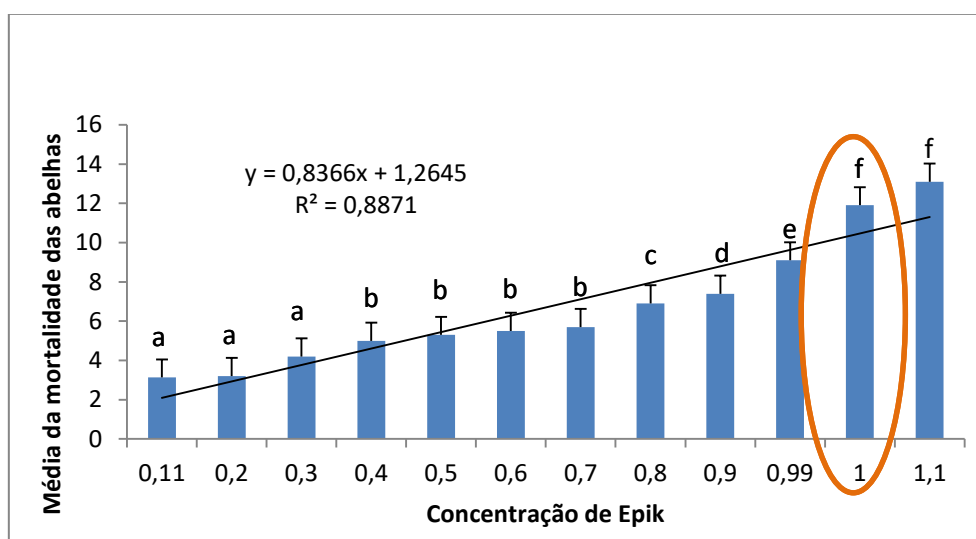


Figura 23 - Mortalidade média das abelhas por aplicação de várias doses de Epik por ingestão, com os respectivos erros padrões. a e b mostram as diferenças estatísticas observadas. $P = 6,816 \cdot 10^{-64}$, $F = 88,39$. A equação de regressão $y = 0,8366x + 1,2645$.

A relação entre dose e mortalidade pode ser evidenciada no gráfico da Figura 23, onde se observa uma taxa de mortalidade crescente quando aumenta a concentração do inseticida. Verifica-se que no teste de ingestão, a dose letal é muito superior à dose letal do teste de contacto, porque apesar, do Epik poder-se acumular no néctar, precisa de uma maior concentração.

Os inseticidas neonicotinóides podem acumular-se no pólen e no néctar, pois são sistémicos, assim, a abelha pode levar resíduos desses inseticidas para a colmeia, contaminar os seus produtos, crias, rainha e as outras obreiras. Estes inseticidas podem afetar o comportamento das abelhas incluindo falta de orientação para a polinização (Stuci,2009).

3.2. Gel em poliacrilamida

3.2.1. Dose recomendada - contacto

A Figura 24 e 25 representam o perfil eletroforético das proteínas, onde foram observadas algumas bandas que correspondem a peptídeos. Este é composto por uma zona de controlo e outra com a dose recomendada. A Fig. 24 representa a primeira repetição do teste por contacto e a figura 25 a segunda repetição..

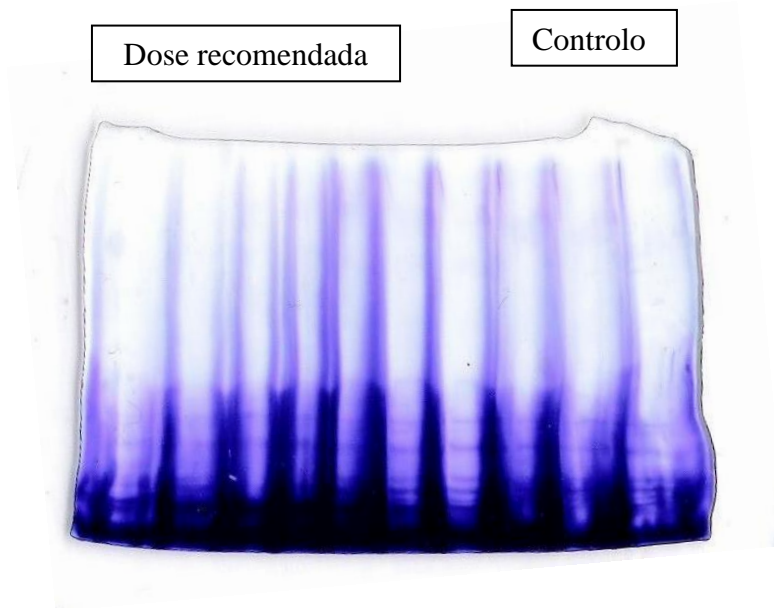


Figura 24 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de contacto com a dose recomendada e o controlo, primeira repetição.

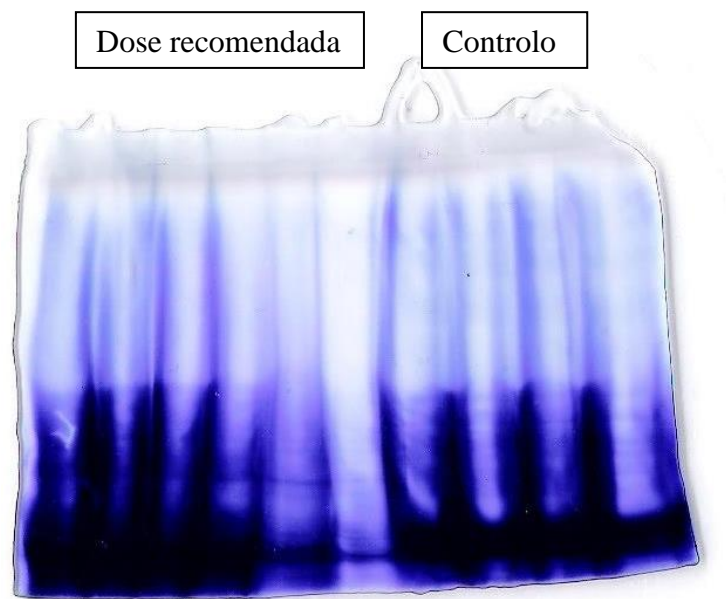


Figura 25 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de contacto com a dose recomendada e o controlo, segunda repetição.

No perfil eletroforético das proteínas pode-se verificar que existem bandas na zona da dose recomendada que desapareceram ou que ficam menos intensas, isto significa que o inseticida afeta as abelhas ao nível cerebral. No caso de estudo Stuchi (2009), houve também uma região da proteína que não desapareceu, mas que reduziu de tamanho, quando em contacto com o inseticida neonicotinóide.

3.2.2. Dose recomendada - ingestão

As Figura 26 e 27 representam o perfil eletroforético das proteínas, onde foram observadas algumas bandas que correspondem a peptídeos. Este é composto por uma zona de controlo e outra com a dose recomendada. A Figura 26 representa a primeira repetição do teste por ingestão. A Figura 27 é a segunda repetição.

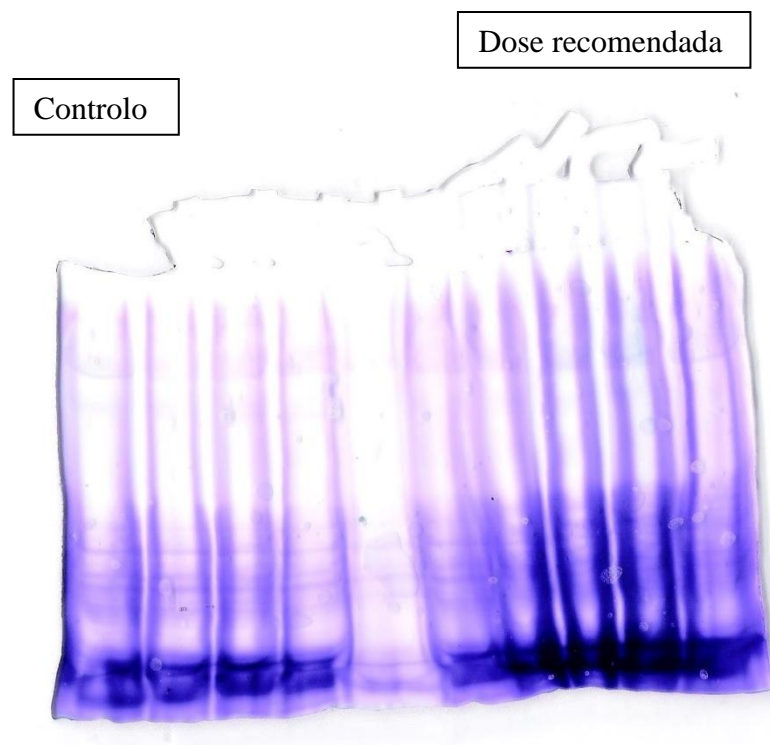


Figura 26 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de ingestão com a dose recomendada e o controlo, primeira repetição.

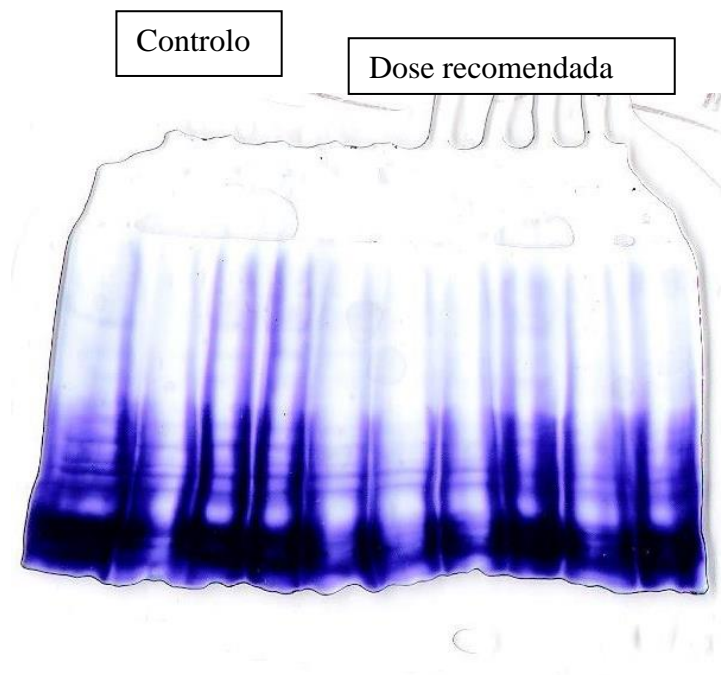


Figura 27 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de ingestão com a dose recomendada e o controlo, segunda repetição.

No perfil eletroforético das proteínas, pode-se verificar que tanto nos testes de contacto, como nos testes de ingestão, também acontece o desaparecimento, ou a diminuição do tamanho das bandas nas zonas com o inseticida usado. Isto significa que, o inseticida, afeta as abelhas ao nível cerebral.

3.2.3. Dose letal

❖ Contacto

As Figuras 28 e 29 representam o perfil eletroforético das proteínas, onde foram observadas algumas bandas que correspondem a peptídeos. Este é composto por uma zona de controlo e outra com a dose letal (0,41 mg/mL). A Figura 28 representa a primeira repetição do teste por contacto. A Figura 29 é a segunda repetição.

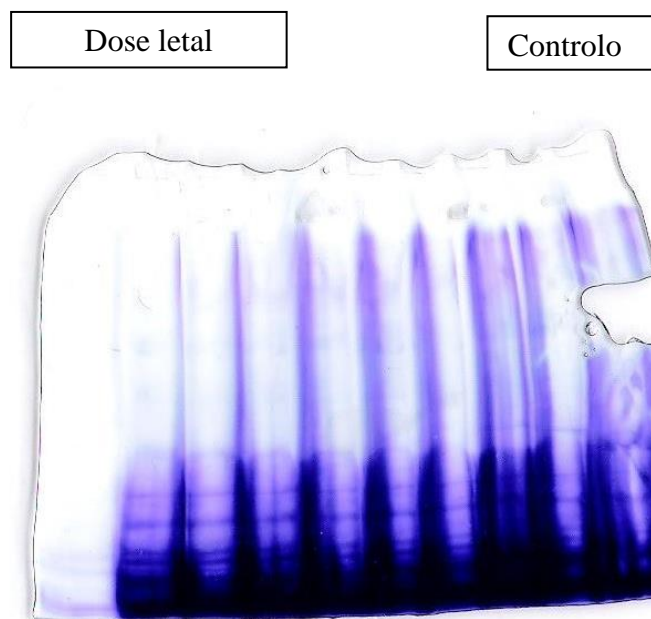


Figura 28 – Perfil eletroforético das proteínas para o teste de contacto com a dose letal e o controlo, primeira repetição.

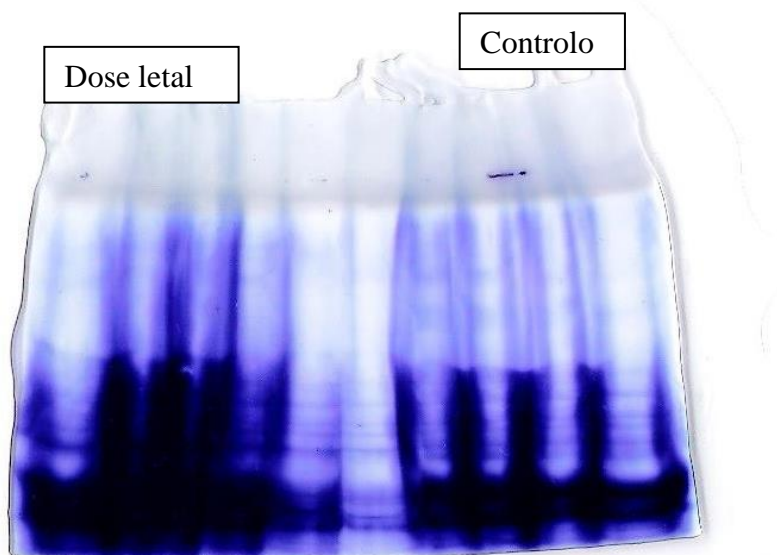


Figura 29 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de contacto com a dose letal e o controlo, segunda repetição.

❖ Ingestão

As Figuras 30 e 31 representam o perfil eletroforético das proteínas, onde foram observadas algumas bandas que correspondem a peptídeos. Este é composto por uma zona de controlo e outra com a dose letal (1 mg/mL). A figura 30 representa a primeira repetição do teste por ingestão. A Figura 31 é a segunda repetição.

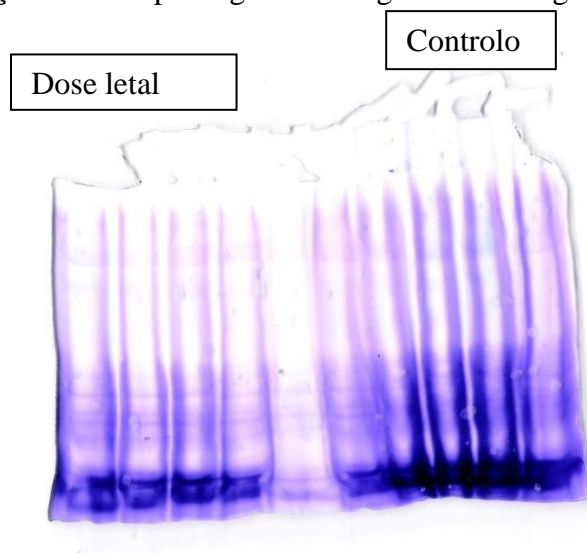


Figura 30 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de ingestão com a dose letal e o controlo, primeira repetição.

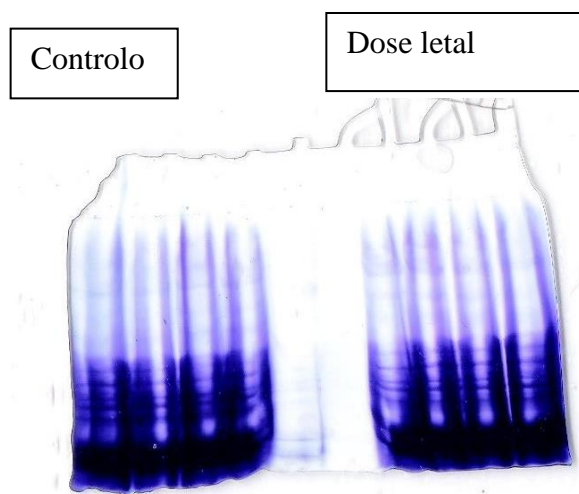


Figura 31 - Perfil eletroforético das proteínas para o teste de ingestão com a dose letal e o controlo, segunda repetição.

Pela análise dos perfis eletroforéticos das proteínas das doses letais pode se verificar que existe alteração nas bandas do perfil, provocando o seu desaparecimento ou diminuição de tamanho, quando contaminadas pelo inseticida, tanto nos testes de contacto como por ingestão.

4. Conclusões

A síndrome conhecida como CCD caracterizada por grande parte da perda das abelhas obreiras, sem a presença de abelhas mortas no interior ou nas proximidades da colmeia, presença de alimento no ninho e abandono das crias, acredita-se ser a causa da grande perda de colónias nos EUA e Europa. Não é ocasionada por um único fator, mas sim por um conjunto de fatores que podem ocorrer simultaneamente e até influenciar mutuamente. Doenças causadas por fungos, vírus, bactérias, ação de predadores, de parasitas, e até mesmo as novas gerações de inseticidas, nomeadamente, neonicotinóides, podem contribuir para um enfraquecimento da colónia (Bovi, 2013; Pereira, 2010).

Os neonicotinóides competem com o neurotransmissor acetilcolina, promovendo sintomas semelhantes aos causados por carbamatos e organofosforados, incluindo tremores, colapso do sistema nervoso e morte (Faria, 2009).

O método mais utilizado de aplicação dos inseticidas é a pulverização, que provoca o aumento da dispersão do princípio ativo. Além disso, a pulverização aérea pode provocar o “efeito deriva” fazendo com que determinado inseticida atinja organismos não alvos localizados distantes ou perto do local de aplicação (Pereira, 2010).

Os testes de avaliação de efeitos de tais produtos em organismos não alvos, como as abelhas, e pertencentes à fauna local mostram-se de grande importância, pois podem conduzir a discussões sobre a comercialização destes produtos dentro dos países (Pereira, 2010).

Para o desenvolvimento do presente relatório foi sugerido perceber se o inseticida Epik SG quando aplicado na cultura do eucalipto era prejudicial às abelhas, uma vez que existiam queixas de apicultores com apiários nas redondezas dessas culturas.

Deste modo, foi necessário obter-se parâmetros para avaliar o efeito do inseticida na mortalidade das abelhas, através dos testes de contacto e ingestão. Para comprovar que o inseticida afeta as abelhas que não morreram mas que estiveram em contacto ou ingeriram o inseticida realizou-se o perfil eletrofórico.

Os resultados obtidos permitiram a obtenção de um conjunto de informações que possibilita justificar que o Epik SG é prejudicial à saúde das abelhas, afetando as proteínas do sistema nervoso e provocando muitas vezes a morte. Apesar das doses letais serem muitos superiores às doses recomendadas.

Espera-se com este estudo, dar a conhecer à população que os inseticidas neonicotinóides são prejudiciais às nossas abelhas. Uma vez que as abelhas, são um bem essencial para a nossa vida na terra.

O inseticida em estudo foi recentemente, um dos produtos fitofarmacêuticos retirados, pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária, em Outubro.

Como trabalho futuro, e considerando, os resultados obtidos, seria útil e necessário que, os avisos enviados para as organizações de apicultores, relativos às datas e locais de aplicação dos fitofármacos para o Gorgulho do eucalipto, fossem mais eficientes, uma vez que, apenas se recebe informação da mancha na área no mapa onde vai ser aplicado (formato carta militar), não sendo possível cruzar esses dados com os dados da localização geográfica dos apiários em tempo útil. A Direção Geral de Alimentação e Veterinária juntamente com a Federação Nacional de Apicultores de Portugal, poderiam através da plataforma idigital (IFAP) desenvolver uma ferramenta informática que permitisse relacionar as coordenadas dos apiários com as coordenadas dos eucaliptais alvo de aplicação desses mesmos fitofármacos, para que os apicultores, recebam os avisos individualmente, através de email ou de telemóvel.

5. Bibliografia

Akeju, T.O. - **Assessment of the Effects of the Neonicotinoids Thiacloprid and Acetamiprid on Soil Fauna**. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2017.

Alves, A. M.; Pereira, J. S.; Silva, J. M. N. -**A introdução e a expansão do eucalipto em Portugal**. Departamento de Engenharia Florestal. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 2007.

Bovi, T. S. - **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis melífera***. Tese de Mestre – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucato, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

Carvalho, J.P.; Branco, M. R. - **A abelha morfologia externa e comportamento**. Universitária Editora, LDA. Lisboa, 1995.

Chambó, E.D., Garcia, R. C., Oliveira, N. T. E., Duarte- Júnior, José, B. - **Aplicação de inseticida e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera L.*) no girassol (*Helianthus annuus L.*)**. Revista Brasileira de Agroecologia, v.5, n. 1, p.37-42, 2010.

Couto, R.H.N., Couto, L.A. - **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

Crane, E. - **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1.ed. New York:Routledge, 1999.

Darrigol, J. - **O mel e a saúde**. Guias da saúde. Editorial Presença, 1979.

Duro, P. N. - **Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para quantificação de pesticidas neonicotinóides em amostras de água contaminadas.** Dissertação de Mestrado- Universidade de Évora, Departamento de Química, 2013.

Gallai, N., Salles, J., Settele, J., Vaissière, B. E. - **Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline.** Ecological Economics, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.

Girling, R. D., Lusebrink, I., Farthing, E., Newman, T. A., & Poppy, G. M. - **Diesel exhaust rapidly degrades floral odours used by honeybees.** Scientific reports, 3, 2013.

Hooper, T. - **Guia do Apicultor.** Coleção Euroagro. Publicações Europa-América, 1976.

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. - **IFN6 - Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental,** 2013.

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. - **Plano de Controlo para o insecto *Gonipterus platensis* (gorgulho-do-eucalipto),** 2ª fase, 2014-2015, 2014.

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. - **Pragas florestais.** Acção de formação para Vigilantes da Natureza, 2014.

Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M. - **Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*.** Crop Protec. 23, 371-378, 2004.

Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Tscharntke, T. - **Importance of pollinators in changing landscapes for world crops.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, London, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

Marchante, H., Morais, M., Freitas, H., Marchante, E. - **Guia Prático para a Identificação de Plantas Invasoras em Portugal**. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra, 2014.

Morse, R.; Hooper, T. - **Enciclopédia Ilustrada de Apicultura**. Volume 2. Coleção Euroagro. Publicações Europa-América, 1986.

Morse, R.; Hooper, T. - **Enciclopédia Ilustrada de Apicultura**. Volume 1. Coleção Euroagro. publicações Europa-América, 1986.

Nocelli, R.C.F.; Roat, T.C.; Zacarin, E.C.M. S.; Malaspina, O. - **Risco de pesticidas as abelhas**. Ainfo, 2017.

Oldroyd, B. P. - **What's killing American honey bees?** Plos Biology, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, 2007.

Paiva, R. - **Avaliação do efeito de duas variedades distintas de Solanum sisymbriifolium Lamarck (Melody e SIS 6001) no controlo de larvas e adultos do gorgulho do eucalipto, G. platensis**. Relatório de Estágio (Licenciatura em Engenharia dos Recursos Florestais) – Escola Superior Agrária de Coimbra, 2016.

PAN – **Programa Apícola Nacional 2017-2019**. Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral – Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural. República Portuguesa, 2016.

PARKER, R.; Melathoulos, A. P.; White, R. Pernal, S. F.; Guarna, M. M.; Foster, L. J. - **Ecological Adaptation of diverse Honey Bee (Apis mellifera) populations**. Plos One, 2010.

Pereira, A.M. - **Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

Pessini, M. M. O. - **Resíduos de acetamiprid e thiamethoxam em tomate estaqueado (*Lycopersicon esculentum* Mill.), em diferentes modalidades de aplicação.** Dissertação (Mestrado em Entomologia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2003.

Pham-Delègue, M. H.; Decourtye, A.; Kaiser, L.; Devillers, J. - **Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees.** *Apidologie*, Les Ulis, v. 33, n. 5, p. 425-432, 2002.

Pinto, M. A. - **Proteção das árvores contra agentes nocivos.** In Azevedo, J.C.; Gonçalves, A. (Coords.) Manual de boas práticas em espaços verdes. Bragança: Câmara Municipal, 2010.

Pirani, J.R.; Cortopassi-Laurino, M. - **Flores e abelhas em São Paulo.** 1.ed, 2010.

Potts, S.G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. - **Global pollinator declines: trends, impacts and drivers.** *Trends in Ecology and Evolution*, v.25, n.6, p.345-353. São Paulo: Edusp/Fapesp, 2010.

Quandt, S. A.; Hernández-Valero, M. A.; Grzywacz, J. G.; Hovey, J. D.; Gonzales, M.; Arcury, T. A. - **Workplace, Household, and Personal Predictors of Pesticide Exposure for Farmworkers.** *Environmental Health Perspectives*, 114(6): 943-952, 2006.

Sarmiento, A. M. P. - **A first approach to the development of an innovative trapping system for *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae, Gonipterini).** Dissertação (Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental) - Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal, 2015.

Sequeira, E. - **As abelhas.** Editorial Domingos Barreira. Porto.

Stuchi, A. - **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonisca* após a contaminação com agrotóxicos.** Tese de Doutorado – Universidade Estadual De Maringá, Centro de Ciências Agrárias, 2009.

Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L.P. - **Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies.** Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, v.19, n.7, p.1901-1905, 2000.

Suchail, S.; Guez, D.; Belzunces, L.P. - **Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*.** Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, v.20, n.11, p.2482-2486, 2001.

Tautz, J. - **O fenômeno das abelhas.** 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

Teixeira, G.; Branco, M. - **Pólen.** Série Didáctica Botânica. Isa press.

vanEngelsdorp, D., & Meixner, M. D. - **A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them.** Journal of invertebrate pathology, 103, S80-S95, 2010.

Vasconcelos, T. - **Polinizadores em Risco. A importância ecológica e económica da polinização e dos polinizadores.** Jornal Quercus nº 63, Suplemento de Ambiente, 2014.

Villemant, C., Barbet-Massin, M., Perrard, A., Muller, F., Gargominy, O., Jiguet, F., & Rome, Q. - **Predicting the invasion risk by the alien bee-hawking Yellow-legged hornet *Vespa velutina nigrithorax* across Europe and other continents with niche models.** Biological Conservation, 144(9), 2142-2150, 2011.

6. Webgrafia

APA. Disponível em: «http://apambiente.pt/_zdata/LRA/Ecotoxicologia.pdf». Consultado em: 06/06/2017.

Apisantos. Disponível em: «<http://apisantos.com/2017/06/01/corpo-da-abelha/>». Consultado em: 20/10/2017.

Cantinho da ciência. Disponível em: «<http://cantinhodaciencia-igrejas.blogspot.pt/2011/08/biologia-o-mundo-secreto-dos-jardins-01.html>». Consultado em: 20/10/2017.

FAO. Disponível em: «<http://www.fao.org/news/story/pt/item/384726/icode/>». Consultado em: 06/06/2017.

Lousamel. Disponível em: «<http://www.lousamel.pt/>». Consultado em: 10/08/2017.

Projeto avalia a importância da polinização para a agricultura. Disponível em: «<http://sanagua.com.br/noticias/projeto-avalia-a-importancia-da-polinizacao-para-a-agricultura-285.html>». Consultado em 07/08/2017.

REA- Portal do Estado do Ambiente Portugal. Disponível em: «<https://rea.apambiente.pt/content/venda-de-produtos-fitofarmac%C3%AAuticos>». Consultado em 12/05/2017.

SIMPAC Portugal. Disponível em: «http://www.sipcam.pt/produtos_det.asp?ID_produto=31&ID_categoria=2». Consultado em: 08/09/2017.

Slidhare. Disponível em: «<https://pt.slideshare.net/hortenciamatos/abelhas-37503741>». Consultado em: 20/10/2017.

Anexos

Anexo 1 – Aviso enviado para a cooperativa referente a aplicação de Epik.

AVISO

No âmbito do Plano de Ação Nacional para o controlo das populações de *Gonipterus platensis* (gorgulho do eucalipto) (<http://www.icnf.pt/portal/florestas/prag-doe/plan-rel/p-control/pc-g-eucalipt>), aprovado pelo Governo em junho de 2011, no seguimento do Despacho n.º 6670/2011, de 28 de abril, do Secretário de Estado das Florestas e Desenvolvimento Rural, torna-se necessário proceder à aplicação de medidas de proteção fitossanitária com o objetivo de reduzir as populações deste agente biótico nocivo e, deste modo, reduzir os efeitos negativos causados ao eucalipto.

Neste âmbito, serão efetuadas aplicações do produto fitofarmacêutico autorizado em território nacional, EPIK SG (Autorização de venda n.º 0071, de 21 de julho de 2007) ou EPIK SL (Autorização de venda n.º 0717, de 06 de Janeiro de 2016), produtos de uso vulgar e generalizado na agricultura em diversas culturas agrícolas, tais como batateira, morangueiro, pereira, macieira, ameixeira, pessegueiro e oliveira.

As substâncias ativas destes produtos fitofarmacêuticos são respetivamente a acetamiprida, na concentração de 200 g s.a./kg. Ambos os produtos são isentos de classificação para as abelhas, não constituindo perigo para estes insectos úteis quando usados nas doses e concentrações para os quais de encontram autorizados. São ainda considerados não prejudiciais nem incompatíveis com os métodos de controlo biológico da referida praga, em curso.

Assim, a partir do próximo dia **28 Abril** proceder-se-á à aplicação de um dos produtos autorizados, na dose de 200 gramas (EPIK SG) por hectare ou 0,8lts (EPIK SL) diluídos em 4 litros de calda por hectare. Esta calda é aplicada em pulverização terrestre em ultra baixo volume para as copas das árvores, e é feita por técnicos responsáveis ou aplicadores habilitados de empresas de prestação de serviços de aplicação terrestre de produtos fitofarmacêuticos, cumprindo-se os princípios de proteção integrada e o protocolo de boas práticas associado a estas aplicações.

Estes tratamentos só serão realizados nos povoamentos de eucalipto que se encontram seriamente afetados pelo referido gorgulho e nos locais onde o eucalipto não se encontra em floração.

Para cumprimento ao estipulado na alínea c) do n.º 2 do artigo 16.º, da Lei n.º 26/2013, de 11 de abril apresentam-se a relação por concelho da área que se prevê tratar que pertencem a DRAPC e a relação dos mapas (localização à 1:25000 com indicação da freguesia) enviados por email.

Anexo 2 - Protocolo de Preparação do gel

1º Colocar os vidros no suporte e carregar, com auxílio de uma pipeta o gel de resolução, até ao 1º traço verde.

2º Preencher com água até ao 2º traço verde, cuidadosamente, de modo a água não se misturar com o gel, para não deixar secar o gel.

3º Esperar cerca de 30 minutos até solidificar o gel.

4º Retirar a água, por inversão do suporte, secar com papel entre os vidros.

5º Colocar o gel de concentração até cima.

6º Colocar o pente de 1,5 mm, sem deixar entrar ar.

7º Deixar secar durante cerca de 1,30h.

Montagem da eletroforese:

1º Colocar o gel previamente feito no suporte (retirar o pente). Nota: o vidro mais pequeno fica sempre virado para dentro, isto é a parte do pente, fica virada para a parte de dentro.

2º Adicionar tampão de corrida até cobrir totalmente o gel. Verificar se está a perder tampão depois de montar o gel.

3º O tampão tem que estar até acima no suporte.

4º Carregar com 20 μ de amostra, em que metade dos poços é com o controlo e a outra metade com contaminada.

6º Registrar a ordem das amostras carregadas.

7º Ligar a fonte a (80 voltes durante 15-20 minutos) e depois passar para 120 minutos e ter atenção para as amostras não saírem para fora do gel.

Anexo 3 – test t da comparação de 24 e 48 horas dos testes de contacto.

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	1,666666667	3,533333333
Variância	4,80952381	9,266666667
Observações	15	15
Correlação de Pearson	0,884483184	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	14	
	-	
Stat t	4,801960384	
P(T<=t) uni-caudal	0,000140763	
t crítico uni-caudal	1,761310136	
P(T<=t) bi-caudal	0,000281526	
t crítico bi-caudal	2,144786688	

Anexo 4 - test t da comparação de 24 e 48 horas dos testes de ingestão.

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	1,333333333	3,133333333
Variância	1,238095238	3,40952381
Observações	15	15
Correlação de Pearson	0,845959709	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	14	
	-	
Stat t	6,441102769	
P(T<=t) uni-caudal	7,72641E-06	
t crítico uni-caudal	1,761310136	
P(T<=t) bi-caudal	1,54528E-05	
t crítico bi-caudal	2,144786688	

Anexo 5 - Teste t entre o teste de contacto e o teste de ingestão em 24 horas.

	<i>Variável</i>	<i>Variável</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>
Média	1,666667	1,333333
Variância	4,809524	1,238095
Observações	15	15
Correlação de Pearson	0,370771	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	0,627103	
P(T<=t) uni-caudal	0,270342	
t crítico uni-caudal	1,76131	
P(T<=t) bi-caudal	0,540684	
t crítico bi-caudal	2,144787	

Anexo 6 - Teste t entre o teste de contacto e o teste de ingestão em 48 horas.

	<i>Variável</i>	<i>Variável</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>
Média	1,333333	3,133333
Variância	1,238095	3,409524
Observações	15	15
Correlação de Pearson	0,84596	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	-6,4411	
P(T<=t) uni-caudal	7,73E-06	
t crítico uni-caudal	1,76131	
P(T<=t) bi-caudal	1,55E-05	
t crítico bi-caudal	2,144787	

Anexo 7 - Dados referentes a dose letal por contacto.

❖ Anova

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	458,245	6	76,3741	25,55	1,363E-17
Within groups:	272	91	2,98901		Permutation p (n=99999)
Total:	730,245	97			1E-05

*omega*²: 0,6005

Levene's test for homogeneity of variance, from means p (same): 2,736E-05
 Levene's test, from medians p (same): 0,005838

Welch F test in the case of unequal variances: F=38,72, df=40,18, p=3,429E-15

❖ Teste Tukey's

	A	B	C	D	E	F	G
A		0,9755	1	0,998	3,19E-05	1,253E-06	5,522E-10
B	1,237		0,9876	0,7891	7,761E-07	2,526E-08	4,651E-10
C	0,1546	1,082		0,9946	2,036E-05	7,761E-07	5,162E-10
D	0,7729	2,01	0,9275		0,000277	1,294E-05	1,639E-09
E	7,266	8,502	7,42	6,493		0,9876	0,07811
F	8,348	9,584	8,502	7,575	1,082		0,3751
G	11,28	12,52	11,44	10,51	4,019	2,937	

Anexo 8 - Dados referentes a dose letal por contacto.

❖ Anova

Test for equal means

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	1709,93	11	155,448	88,39	6,816E-64
Within groups:	295,467	168	1,75873		Permutation p (n=99999)
Total:	2005,39	179			1E-05

*omega*²: 0,8423

Levene's test for homogeneity of variance, from means *p* (same): 0,004871
 Levene's test, from medians *p* (same): 0,02581

Welch *F* test in the case of unequal variances: *F*=91,04, *df*=65,99, *p*=1,824E-35

❖ Teste Tukey's

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
A		1	0,5501	0,008781	0,001108	0,0001987	3,147E-05	3,115E-11	5,618E-14	0	0	0
B	0,1947		0,6481	0,01409	0,001907	0,0003575	5,892E-05	6,938E-11	1,874E-13	0	0	0
C	3,115	2,92		0,8867	0,5501	0,2795	0,1095	4,462E-06	3,235E-08	0	0	0
D	5,451	5,257	2,336		1	0,9982	0,9664	0,005371	0,0001089	4,816E-13	0	0
E	6,23	6,036	3,115	0,7788		1	0,9996	0,03419	0,001108	1,389E-11	0	0
F	6,814	6,62	3,699	1,363	0,5841		1	0,1095	0,005371	1,534E-10	0	0
G	7,398	7,204	4,283	1,947	1,168	0,5841		0,2795	0,02218	1,591E-09	0	0
H	11,1	10,9	7,982	5,646	4,867	4,283	3,699		0,9982	0,0006342	0	0
I	12,46	12,27	9,345	7,009	6,23	5,646	5,062	1,363		0,02218	0	0
J	17,52	17,33	14,41	12,07	11,29	10,71	10,12	6,425	5,062		2,275E-06	2,691E-12
K	25,7	25,51	22,58	20,25	19,47	18,89	18,3	14,6	13,24	8,177		0,3611
L	29,2	29,01	26,09	23,75	22,97	22,39	21,81	18,11	16,74	11,68	3,505	