



POTENCIAL EFEITOS DE FUNGICIDAS AGRÍCOLAS EM IMATUROS DE ABELHAS SEM FERRÃO

Mario Henrique Ortolan **Alves**¹; Artur Nagy **Castagna**²; Guilherme Fernando **Campanha**³

Ana Carolina Martins de **Queiroz**⁴; Jenifer Dias **Ramos**⁵; Simone de Souza **Prado**⁶

Nº 24412

RESUMO – Reconhecidas como um dos principais agentes polinizadores de culturas agrícolas e plantas selvagens, as abelhas têm se tornado uma preocupação mundial devido ao declínio de suas populações. Pesquisas recentes sugerem que o uso de fungicidas poderiam estar contribuindo para esse processo. Amplamente utilizados nos cultivos agrícolas, esse tipo de agrotóxico entra em contato com as abelhas através do pólen e do néctar. O objetivo desse estudo foi observar a sobrevivência da espécie de abelha sem ferrão Scaptotrigona depilis quando exposta a fungicidas durante seu desenvolvimento larval. Nesse ensaio foram testados dois tipos, um químico e outro biológico, adicionados diretamente ao alimento das larvas em diferentes concentrações. As abelhas foram monitoradas e as taxas de mortalidade foram registradas em todas as fases de desenvolvimento, até que as sobreviventes emergissem. Em todos os tratamentos houve redução na taxa de sobrevivência da abelha. Os resultados reforçam a necessidade de se ampliarem os estudos sobre a toxicidade dos fungicidas químicos e biológicos sobre organismos não-alvo.

Palavras-chaves: fungicida, *Scaptotrigona depilis*, Mancozeb, *Bacillus* spp., sobrevivência.

¹Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, IB / Unicamp, Campinas-SP; marioyoga@outlook.com

²Bolsista Embrapa: Graduado em Agroecologia, UFPR, Matinhos – PR

³Bolsista Embrapa: Graduado em Medicina Veterinária, UniFAJ - Jaguariúna-SP.

⁴Apoio Técnico: Analista e Gestora Operacional da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

⁵Bolsista Pós-doc Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

⁶Orientador: Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; simone.prado@embrapa.br



ABSTRACT - Recognized as one of the main pollinators of agricultural crops and wild plants, bees have become a global concern due to the decline in their populations. Recent research suggests that the use of fungicides could be contributing to this process. Widely used in agricultural crops, this type of pesticide comes into contact with bees through pollen and nectar. The aim of this study was to observe the survival of the stingless bee species Scaptotrigona depilis when exposed to fungicides during their larval development. In this experiment, two types of fungicides were tested, one chemical and one biological, added directly to the larval food at different concentrations. The bees were monitored, and mortality rates were recorded at all stages of development until the survivors emerged. In all treatments, there was a reduction in the bee survival rate. The results reinforce the need to expand studies on the toxicity of chemical and biological fungicides on non-target organisms.

Keywords: fungicide, *Scaptotrigona depilis*, Mancozeb, *Bacillus* spp., survival.

1. INTRODUÇÃO

Os polinizadores cumprem um importante papel como promotores da diversidade biológica, estabilidade de ecossistemas e segurança alimentar, sendo os insetos responsáveis pela polinização da maioria das plantas selvagens e cultivadas (Potts et al., 2016). O declínio das populações de polinizadores, principalmente das abelhas, é uma preocupação crescente em todo o mundo. As causas desse declínio são variadas e complexas, mas podemos destacar a perda de habitat, exposição a pesticidas e infestações por parasitas entre as principais (Neumann; Carreck, 2010).

Frequentemente pesquisas têm sido atribuídas aos efeitos prejudiciais dos inseticidas sobre as abelhas, todavia, estudos recentes têm demonstrado que a exposição a fungicidas também podem prejudicar esses importantes polinizadores (Belsky; Joshi, 2020). A aplicação de fungicidas nas plantas é uma prática comum na agricultura. Constantemente usado de forma profilática, é considerado seguro para o meio ambiente e para as abelhas. Pode ser pulverizado em um cultivo inúmeras vezes na estação e diretamente nas flores. Portanto, há uma probabilidade alta de que abelhas forrageiras entrem em contato diretamente com fungicidas por meio do pólen e do néctar (Rondeau; Raine, 2022).

O Mancozeb, por exemplo, é um fungicida de amplo espectro usado extensivamente na agricultura há mais de 50 anos (Gullino et al., 2010). De ação multissítio, é capaz de interferir em múltiplos processos metabólicos dos fungos. Devido a essa característica, é necessário aplicá-lo em



taxas e frequências relativamente altas para compensar os efeitos do clima e do crescimento das plantas (Gullino et al., 2010). O Mancozeb é empregado em diversos tipos de cultivo, incluindo alguns que são frequentemente visitados por abelhas, como cítricos, abóboras, melões, pepinos, cebolas e mangas (Giannini et al., 2015).

Diversas espécies de insetos mantêm relações simbióticas com microrganismos (Prado; Zucchi, 2012). Uma eventual contaminação das abelhas forrageiras por fungicida poderia comprometer sua microbiota intestinal (Motta; Moran, 2024). Não somente as forrageiras, mas também as larvas podem ser prejudicadas por fungicidas. O alimento larval das abelhas é composto por uma combinação de pólen fermentado, mel e secreções glandulares, e está associado a diversas espécies de bactérias e fungos (Menezes et al., 2018; Santos et al., 2023). Foi demonstrado que a *Scaptotrigona depilis*, uma espécie de abelha sem ferrão nativa do Brasil, possui uma relação mutualística, onde um fungo específico contido no alimento larval é essencial para o crescimento da larva (Menezes et al., 2015).

Enquanto as pesquisas sobre a possível toxicidade de fungicidas em abelhas concentram-se em grande parte na América do Norte e Europa, na região sul do globo há uma escassez de dados (Rondeau; Raine, 2022). No Brasil são reconhecidas mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão (Pedro, 2014). Ainda pouco estudadas, elas desempenham papéis ecológicos fundamentais nos ecossistemas, contribuindo para a polinização de plantas nativas e cultivadas.

O propósito deste estudo foi avaliar potenciais efeitos na sobrevivência de imaturos de *Scaptotrigona depilis* expostos via alimento larval a fungicidas agrícolas. Originária das regiões sul e sudeste do Brasil, a *Scaptotrigona depilis* é uma abelha sem ferrão caracterizada por ter colônias amplamente dispersas e que podem conter mais de 10.000 indivíduos (Figueiredo-Mecca et al., 2013).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esse ensaio teve duração de 48 dias e foi realizado entre os meses de novembro e dezembro de 2023, na unidade da Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna - SP. Foram testados dois tipos de fungicidas, o químico Mancozeb (princípio ativo ditiocarbamato de manganês e zinco), e o biológico Bombardeiro, composto pelas bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis* e *Bacillus pumilus*.

O protocolo de criação in vitro da espécie *Scaptotrigona depilis* foi utilizado nesse experimento (Menezes et al., 2013). Diferentemente das abelhas melíferas, as abelhas sem ferrão não alimentam gradualmente suas larvas. Neste grupo, as larvas são alimentadas por meio de uma deposição única

de alimento dentro das células de cria. A rainha coloca seus ovos sobre o alimento larval e as operárias fecham a célula. Consequentemente, as células de cria permanecem fechadas desde a oviposição até que os adultos emergem (Menezes et al., 2013).

O alimento larval foi extraído de favos e homogeneizado com os fungicidas em diferentes concentrações. Outros favos contendo larvas de *Scaptotrigona depilis* foram coletados de 5 colônias diferentes oriundas do meliponário da Embrapa Meio Ambiente. Logo após a coleta, foram transportados para o Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da unidade.

Para simular as condições de temperatura e umidade como no interior de uma colônia (28°C com umidade relativa do ar entre 83% e 90%), a manipulação das larvas foi feita em uma sala fechada com ar-condicionado regulado a 30°C e com um ebulidor elétrico aquecendo água em um recipiente metálico. Larvas com idade entre 1-2 dias foram selecionadas e transferidas com auxílio de pinças para placas multipoços já contendo uma dose única de 35µl de alimento tratado.

Os tratamentos foram preparados usando uma série de diluições em uma escala de base 10, onde o mais concentrado foi projetado para refletir a dose recomendada para aplicação no campo, enquanto os tratamentos subsequentes representavam concentrações residuais cada vez mais diluídas. Um grupo contendo alimento larval (controle negativo) e outro contendo alimento larval e inseticida dimetoato (controle positivo) também foram preparados. Em cada placa multipoços foi pipetado um tratamento específico. Desta forma, o ensaio toxicológico ficou estruturado para distribuir as larvas em 10 tratamentos experimentais (Tabela 1). Cada tratamento recebeu 20 larvas, e foram produzidas 5 réplicas, totalizando 100 indivíduos por tratamento.

Tabela 1. Tratamentos com fungicidas em que as larvas de *Scaptotrigona depilis* foram expostas. O tratamento FQ1 (fungicida químico Mancozeb) e FB1 (fungicida biológico Bombardeiro) foram preparados seguindo a dose recomendada para aplicação no campo. Um grupo com alimento larval e outro com alimento larval e inseticida dimetoato foram incluídos, representando um controle negativo e um positivo, respectivamente.

Tratamento	Composição	Concentração
controle negativo	Alimento larval	-
controle positivo	Alimento larval + Dimetoato	0,01mg/mL
FQ 1	Alimento larval + Fungicida Químico	0,32g/L
FQ 2	Alimento larval + Fungicida Químico	0,032g/L
FQ 3	Alimento larval + Fungicida Químico	0,0032g/L
FQ 4	Alimento larval + Fungicida Químico	0,00032g/L
FB 1	Alimento larval + Fungicida Biológico	0,66g/L
FB 2	Alimento larval + Fungicida Biológico	0,066g/L
FB 3	Alimento larval + Fungicida Biológico	0,0066g/L
FB 4	Alimento larval + Fungicida Biológico	0.00066g/L

Durante o período de desenvolvimento dos imaturos até a emergência dos adultos, as placas multipoços foram acondicionadas em placas de Petri fechadas e mantidas em câmara de crescimento controlada a 28° C. Água destilada foi adicionada no fundo das placas de Petri para que a umidade relativa se mantivesse em 98%. No 8º dia, estágio aproximadamente em que a larva termina de consumir todo o alimento, cloreto de sódio foi adicionado a água destilada, na concentração de 0,36g/mL, para reduzir a umidade a 75%. A mortalidade das abelhas foi registrada diariamente, desde o estágio larval até que todas as sobreviventes emergissem após 48 dias.

A análise dos dados foi feita utilizando o Software R. A probabilidade de sobrevivência dos indivíduos submetidos aos diferentes tratamentos foi baseada no modelo de curvas de Kaplan-Meier, utilizando a função 'surv' do pacote survival, enquanto que a diferença de sobrevivência entre os grupos de tratamento foi analisada com o teste de Log-Rank, usando a função 'survidiff' do mesmo pacote estatístico (Therneau, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a exposição aos fungicidas, foi observado que as larvas consumiram todo o alimento disponível no poço, independente do tratamento utilizado. A probabilidade de sobrevivência do controle após os 48 dias foi de 92,8% (95% CI: 87-98%). No teste de Log-Rank, as comparações entre o grupo de controle e cada um dos tratamentos resultaram em valores $p < 0,05$, o que sugere uma diferença significativa na sobrevivência dos tratamentos em comparação com o controle (Figura 1).

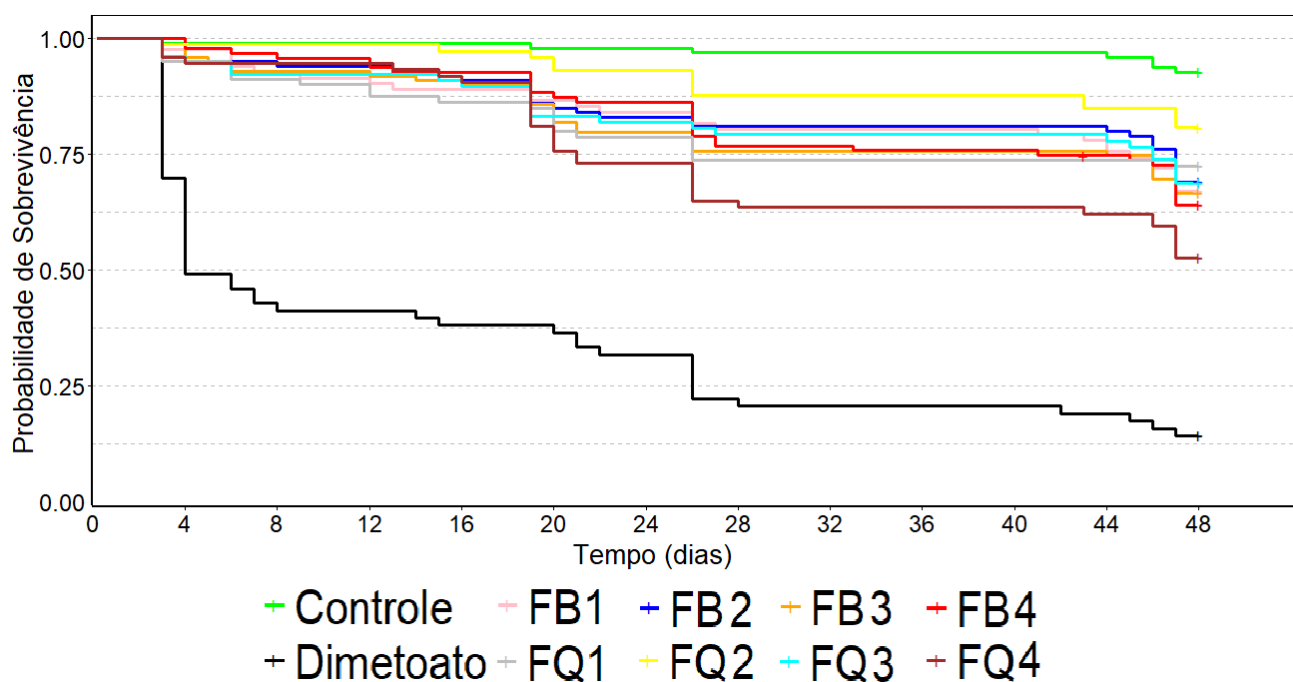


Figura 1. Probabilidade de sobrevivência de imaturos de *Scaptotrigona depilis* criadas in vitro e expostas a fungicidas durante o período larval. Control = somente alimento larval; dimetoato = 0,01mg/mL; FB1 = Fungicida Biológico Bombardeiro 0,66g/L; FB2 = Fungicida Biológico Bombardeiro 0,066g/L; FB3 = Fungicida Biológico Bombardeiro 0,0066g/L; FB4 = Fungicida Biológico Bombardeiro 0,00066g/L; FQ1 = Fungicida Químico Mancozeb 0,32g/L; FQ2 = Fungicida Químico Mancozeb 0,032g/L; FQ3 = Fungicida Químico Mancozeb 0,0032g/L; FQ4 = Fungicida Químico Mancozeb 0,00032g/L. Grupo Controle diferente estaticamente dos demais tratamentos ($p > 0,05$).

O fungicida químico obteve os seguintes resultados na sobrevivência: FQ1 = 72% (95% CI: 63-83%), FQ2 = 80% (95% CI: 72-90%), FQ3 = 68% (95% CI: 59-80%), FQ4 = 52% (95% CI: 42-65%) (Figura 2).

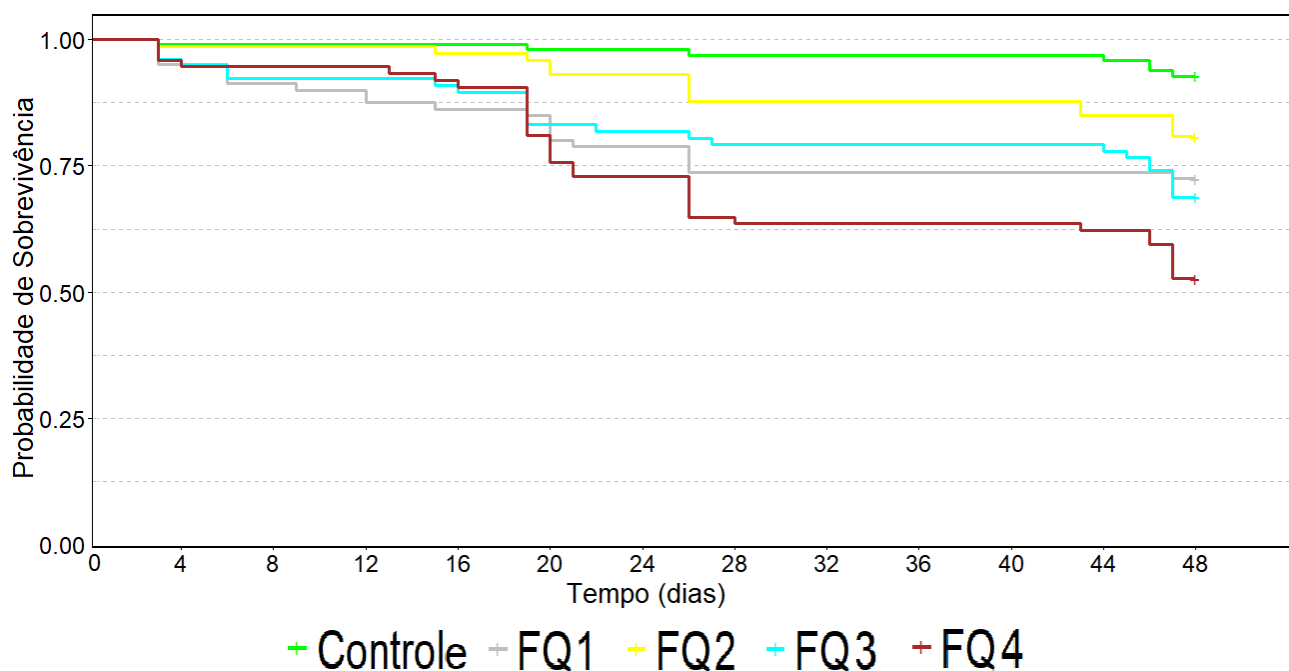


Figura 2. Probabilidade de sobrevivência de imaturos de *Scaptotrigona depilis* criadas in vitro e expostas ao fungicida químico Mancozeb durante o período larval. Concentrações dos tratamentos: FQ1 = 0,32g/L; FQ2 = 0,032g/L; FQ3 = 0,0032g/L; FQ4 = 0,00032g. Grupo Controle diferente estaticamente dos demais tratamentos ($p > 0,05$).

Estudos publicados recentemente também obtiveram efeitos negativos em abelhas com a exposição do fungicida Mancozeb na dieta. Um trabalho realizado com exposição de Mancozeb por meio da dieta em adultos de *Apis mellifera* indicou redução na sobrevivência da espécie (Gomes et al., 2023). Em outra pesquisa, foi constatado que a microbiota intestinal da *Osmia cornifrons*, uma espécie de abelha solitária, foi reduzida quando suas larvas eram alimentadas com pólen tratado com Mancozeb (Porrás et al., 2024).

Em relação ao fungicida biológico, as probabilidades de sobrevivências foram: FB1 = 56% (95% CI: 47-66%), FB2 = 69% (95% CI: 60-78%), FB3 = 66% (95% CI: 58-76%), FB4 = 64% (95% CI: 55-74%). Apesar de os níveis de concentração do fungicida biológico terem sido ajustados em uma série de diluições com base 10, não foi encontrada uma diferença estatística na sobrevivência quando os tratamentos foram comparados entre si (Figura 3). A concentração do tratamento FB4, por exemplo, foi 1000 vezes menor que a concentração do FB1, mas a diferença na probabilidade de sobrevivência comparada com o controle foi significativa. Isso implica que a sobrevivência da abelha foi afetada mesmo quando exposta a doses mínimas do fungicida biológico durante seu estágio larval.

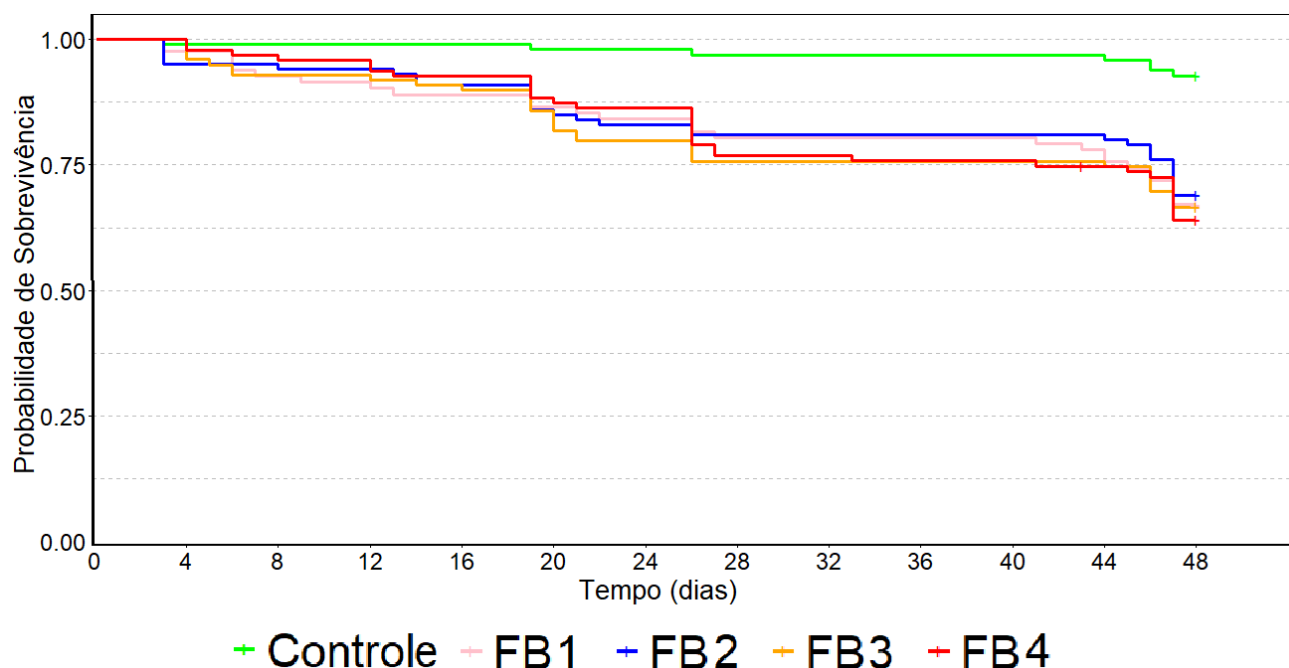


Figura 3. Probabilidade de sobrevivência de imaturos de *Scaptotrigona depilis* criadas in vitro e expostas ao fungicida biológico Bombardeiro durante o período larval. Concentrações dos tratamentos: FB1 = 0,66g/L; FB2 = 0,066g/L; FB3 = 0,0066g/L; FB4 = 0,00066g/L. Grupo Controle diferente estaticamente dos demais tratamentos ($p > 0,05$).

Embora os dados tenham indicado uma diferença estatística na probabilidade de sobrevivência da abelha ao ser exposta por todos os tratamentos com fungicidas, químico e biológico, convém destacar que esses resultados provêm de um único ensaio toxicológico. Foi apenas parte de um projeto mais abrangente, envolvendo também a exposição aos mesmos tipos de fungicidas em abelhas recém-emergidas e forrageiras de *Scaptotrigona depilis* e *Apis mellifera*. Portanto, é necessário a continuidade dos estudos, incluindo aqueles que investigam o efeito de fungicidas sobre microrganismos associados com as abelhas.

Os fungicidas biológicos têm sido reconhecidos como uma alternativa inovadora na agricultura devido à sua origem natural e menor impacto ambiental em comparação com os fungicidas químicos convencionais. Contudo, avaliações de risco desses tipos de fungicidas agrícolas em relação a organismos não-alvo são importantes e precisam ser ampliados, especialmente durante aplicação em períodos críticos como de pré-floração e a floração das plantas, visando tornar as diretrizes para o uso desses produtos mais seguras para as abelhas e o meio ambiente.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a exposição ao fungicida químico Mancozeb e ao fungicida biológico Bombardeiro afetam a sobrevivência de imaturos da espécie *Scaptotrigona depilis*.



5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica ao primeiro autor.

6. REFERÊNCIAS

BELSKY, J.; JOSHI, N. K. Effects of Fungicide and Herbicide Chemical Exposure on Apis and Non-Apis Bees in Agricultural Landscape. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, Jul. 2020.

FIGUEIREDO-MECCA, G.; BEGO, L. R.; NASCIMENTO, F. S. Foraging behavior of *Scaptotrigona depilis* (hymenoptera, apidae, meliponini) and its relationship with temporal and abiotic factors. **Sociobiology**, v. 60, n. 3, p. 277–282, 2023.

GIANNINI, T. C. et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, n. 2, p. 209–223, 2015.

GOMES, I. N. et al. The survival and flight capacity of commercial honeybees and endangered stingless bees are impaired by common agrochemicals. **Ecotoxicology**, v. 32, n. 7, p. 937–947, 2023.

GULLINO, M. L. et al. Mancozeb: Past, present, and future. **Plant Disease**, v. 94, n. 9, p. 1076–1087, 2010.

MENEZES, C.; PALUDO, C. R.; PUPO, M. T. A review of the artificial diets used as pot-pollen substitutes. In: VIT, P.; PEDRO, S; R; M; ROUBIK, D. W. (ed.). **Pot-pollen in stingless bee melittology**. [S.l.]: Springer, 2018. p. 253-262.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; FONSECA, V. L. I. An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. **Apidologie**, v. 44, n. 5, p. 491–500, 2013.

MENEZES, C. et al. A brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851–2855, 2015.

MOTTA, E. V. S.; MORAN, N. A. The honeybee microbiota and its impact on health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 122–137, 2024.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research** v. 49, Issue 1, p. 1–6, 2010.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4), p. 348–354, 2024.

PORRAS, M. F. et al. Fungicide ingestion reduces net energy gain and microbiome diversity of the solitary mason bee. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 3229, 2024.

POTTS, S. G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220–229, 2016.



PRADO, S. S.; ZUCCHI, T. D. Host-symbiont interactions for potentially managing heteropteran pests. **Psyche: a Journal of Entomology** v. 2012, 269473, p. 1-9, 2012.

RONDEAU, S.; RAINE, N. E. Fungicides and bees: a review of exposure and risk. **Environment International** v. 165, 107300, 2022.

SANTOS, A. C. C. et al. Bacteria, yeasts, and fungi associated with larval food of Brazilian native stingless bees. **Scientific Reports**, v. 13, 5147, 2023.

THERNEAU T. M. **A package for survival analysis in R**. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/vignettes/survival.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2024.