



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos
Naturais



**Efeitos de diferentes agrotóxicos na sobrevivência e
comportamento de *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* (Apidae,
Meliponini)**

Maria Fernanda de Oliveira Ferreira

2019

Maria Fernanda de Oliveira Ferreira

**Efeitos de diferentes agrotóxicos na sobrevivência e
comportamento de *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* (Apidae,
Meliponini)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Augusto

Coorientador

Prof. Dr. Emerson Cristi de Barros

UBERLÂNDIA
Junho - 2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F383 Ferreira, Maria Fernanda de Oliveira, 1992-
2019 Efeitos de diferentes agrotóxicos na sobrevivência e
comportamento de *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* (Apidae,
Meliponini) [recurso eletrônico] / Maria Fernanda de Oliveira
Ferreira. - 2019.

Orientadora: Solange Cristina Augusto.
Coorientador: Emerson Cristi de Barros.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2056>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Ecologia. I. Augusto, Solange Cristina, 1966-, (Orient.). II. de
Barros, Emerson Cristi, 1978-, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ecologia e Conservação
de Recursos Naturais. IV. Título.

CDU: 574

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Maria Fernanda de Oliveira Ferreira

**Efeitos de diferentes agrotóxicos na sobrevivência e
comportamento de *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* (Apidae,
Meliponini)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Augusto
Orientadora - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof^a. Dr^a. Fernanda Helena Nogueira-Ferreira
Membro Titular - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof^a. Dr^a. Alanna do Socorro Lima da Silva
Membro Titular - Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Prof. Dr. Denis Coelho de Oliveira
Membro Suplente - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

UBERLÂNDIA
Junho - 2019

Dedico à minha família.

Principalmente aos meus pais e irmão.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais e ao seus professores. À Fapemig pelo apoio financeiro durante a execução do projeto e pela concessão da bolsa.

À professora Dr^a. Solange Cristina Augusto e ao professor Dr. Emerson Cristi de Barros pela orientação, ajuda e suporte. Em especial à Solange por ter acreditado em mim e mesmo diante de adversidades se manteve firme e segura desde o começo.

À Universidade Federal do Oeste do Pará e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade. Aos professores Dr. Rodrigo F. Fadini e Dr. Thiago José de C. André, foram as primeiras pessoas a me receber na UFOPA, sempre muito solícitos e abertos, fizeram esse primeiro contato ser leve e muito interessante. Aos professores Dr^a. Graciane C. dos Santos, Dr^a. Alanna do Socorro L. da Silva, Dr. Rafael de Fraga e Dr. Edson Varga Lopes por dividirem conhecimento e sempre estarem dispostos a ajudar. Ao professor e amigo Dr. Gustavo da Silva Claudiano, pessoa fundamental para que a pesquisa tenha acontecido, sempre interessado e ajudando a resolver qualquer problema que tenha aparecido. Ao técnico de laboratório Fernando Abreu por auxiliar nas atividades laboratoriais.

Aos amigos de turma de pós Morgana, Tauanny, Karen e em especial Francesca e Dian pela ajuda em laboratório e no processo de revisão. Obrigada por estarem sempre presentes e serem tão carinhosos e companheiros.

Aos amigos de vida, em especial José, Eduardo, Uiara, e Andressa por estarem presentes e preocupados com os acontecimentos do dia a dia e estarem dispostos pra ouvir e ajudar sempre que necessário.

À minha prima Ariana, parceira, amiga, confidente que está presente em todas as atividades em que eu me envolvo, sempre atenta e interessada. A pessoa que me ajuda a colocar a cabeça no eixo e enxergar as coisas por outras perspectivas.

Ao companheiro de vida João Paulo, presente desde que a vontade de fazer esse mestrado surgiu e um dos meus maiores apoiadores. Sempre incentivando e torcendo pelo melhor. Obrigada por ter proporcionado essa nova experiência e ter aberto as portas para que eu pudesse continuar com os meus planejamentos mesmo em um momento difícil. E por ter me auxiliado em todo esse processo, do começo ao fim.

Por último e mais importante, à minha família, meu alicerce e minha motivação para tudo na vida. Em especial aos meus pais Sandra e João Ivo e ao meu irmão João Gabriel. Meus maiores apoiadores, incentivadores e minha base. Obrigada por acreditarem em mim, por me incentivarem e por me chamarem a atenção quando necessário. Cada realização, cada conquista é dedicada a vocês como forma de agradecimento e como forma de demonstração de amor e carinho.

Muito obrigada a todos!

ÍNDICE

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	08
2.1 Dose Letal para a Intoxicação por Contato.....	08
2.2 Tempo Letal para a Intoxicação por Contato.....	10
2.3 Teste de Reflexo de Extensão da Probóscide (REP).....	11
2.4 Teste de Atividade Locomotora	14
3. RESULTADOS.....	16
3.1 Bioensaios de Mortalidade e Dose Letal para a Intoxicação por Contato...16	
3.2 Bioensaios de Tempo Letal para a Intoxicação por Contato.....17	
3.3 Bioensaios para o Teste de Reflexo de Extensão da Probóscide.....20	
3.4 Bioensaios para o Teste de Atividade Locomotora	24
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

Ferreira, Maria Fernanda O. **Efeitos de diferentes agrotóxicos na sobrevivência e comportamento de *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* (Apidae, Meliponini)**. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais. UFU. Uberlândia-MG.

As abelhas sem ferrão estão incluídas no grupo dos principais polinizadores cujo serviço ecológico é extremamente importante. Entretanto, elas vem sofrendo sérias ameaças, as quais estão causando um declínio em suas populações. Testes padronizados com *Apis mellifera* já são comuns, surgindo uma necessidade de criar parâmetros adequados para as abelhas sem ferrão. Dentre os fatores apontados como possíveis causas para seu declínio está a intoxicação por agrotóxicos. Este trabalho avaliou as dosagens letais, tempo letal e efeitos sub-letais (através dos testes de comportamento) de dois inseticidas utilizados em cultivos de soja: abamectina e acetamiprido em *Scaptotrigona* aff. *Xanthotricha* Moure, 1950 (Apidae, Meliponini). O acetamiprido é um neonicotinoide considerado extremamente tóxico e a abamectina é uma avermectina medianamente tóxica. Objetivou-se avaliar esses efeitos, confirmar essa premissa e propor adequação de metodologias para os testes de comportamento. As DLs encontradas para a abamectina foram $DL_{50} = 0.6993\mu\text{g/mL}$ e $DL_{90} = 0.90837\mu\text{g/mL}$; e para o acetamiprido, $DL_{50} = 0.494\mu\text{g/mL}$ e $DL_{90} = 0.753\mu\text{g/mL}$. Os TLs foram, sob efeito da abamectina, 8,25 horas e sob efeito do acetamiprido foram de 14,25 horas. Para o teste de Extensão da Probóscide houve diferenças significativas entre abamectina e controle ($z = 1,14$; $P < 0,0001$), e entre acetamiprido e controle ($z = 5,87$; $P < 0,0001$), mas não entre abamectina e acetamiprido. E para o teste de atividade locomotora houve diferenças significativas no tempo de duração da caminhada, abelhas contaminadas com acetamiprido demoraram até 413 segundos para completar a corrida, enquanto o tempo máximo do grupo controle foi de apenas 91 segundos. Esses resultados sugerem que o acetamiprido reduz a capacidade de dispersão das abelhas. Para abamectina não houve diferença significativa. Nossos resultados corroboram a hipótese de que o acetamiprido é mais tóxico para *S.* aff. *xanthotricha*, mas a abamectina também se mostrou prejudicial (exceto para o teste de atividade locomotora). Pesquisas afins realizadas com *A. mellifera* mostraram que estas são menos sensíveis aos inseticidas quando comparadas às abelhas sem ferrão, mas alguns estudos apontam uma maior sensibilidade à abamectina. Os testes de comportamento representam as atividades das abelhas em seus hábitos de vida, mostrando assim como as mesmas são afetadas e prejudicadas pela alteração cognitiva causada pelos inseticidas. Os organismos respondem de maneiras diferentes aos inseticidas, tamanho corporal, metabolismo, hábitos de forrageio, são fatores que alteram essas respostas. Dependendo da dose os inseticidas podem agir aumentando ou diminuindo o metabolismo das abelhas. A padronização de metodologias para as abelhas sem ferrão é extremamente importante, uma vez que as análises têm que se adequar aos limites desse grupo de abelhas eussociais. Essas pesquisas são fundamentais para o entendimento de fatores que causam esse declínio da população, para que seja feito um manejo correto e para que a preservação das espécies seja realizada, evitando terceiros prejuízos ao ecossistema.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão, acetamiprido, abamectina, neonicotinoide, avermectina, reflexo de extensão da probóscide, atividade locomotora.

ABSTRACT

Ferreira, Maria Fernanda O. Effects of different pesticides on the survival and behavior of *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* (Apidae, Meliponini). MSc.thesis. UFU. Uberlândia-MG.

The stingless bees are included in the group of the main pollinators whose ecological service is extremely important. However, they are undergoing serious threats, which are causing a decline in their populations. Standardized tests with *Apis mellifera* are already common, and there is a need to create adequate parameters for stingless bees. Among the factors identified as possible causes for its decline is pesticide poisoning. This work evaluated the lethal dosages, lethal time and sub-lethal effects (through behavioral tests) of two insecticides used in soybean crops: abamectin and acetamiprid in *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* Moure, 1950 (Apidae, Meliponini). Acetamiprid is a neonicotinoid considered extremely toxic and abamectin is a medically toxic avermectin. The objective was to evaluate these effects, confirm this premise and propose simple and applicable methodologies for behavioral tests. The DLs found for abamectin were LD50 = 0.6993 µg / mL and DL90 = 0.90837 µg / mL; and for acetamiprid, LD50 = 0.494 µg / mL and LD90 = 0.753 µg / mL. The TLs were, under the effect of abamectin, 8.25 hours and under the effect of acetamiprid were 14.25 hours. For the Proboscis Extension test there were significant differences between abamectin and control ($z = 1.14$, $P < 0.0001$), and between acetamiprid and control ($z = 5.87$, $P < 0.0001$), but not between abamectin and acetamiprid. For the locomotor activity test there were significant differences in the duration of the walk, acetamiprid contaminated bees took up to 413 seconds to complete the race, while the maximum time of the control group was only 91 seconds. These results suggest that acetamiprid reduces the dispersal capacity of bees. For abamectin, there was no significant difference. Our results corroborate the hypothesis that acetamiprid is more toxic to *S. aff. xanthotricha*, but abamectin was also detrimental (except for the locomotion test). Similar studies carried out with *A. mellifera* show that they are less sensitive to insecticides when compared to stingless bees, but some studies indicate a greater sensitivity to abamectin. Behavior tests represent bees activities in their living habits, thus showing how they are affected and impaired by the cognitive alteration caused by insecticides. The organisms respond differently to insecticides, body size, metabolism, foraging habits, are factors that alter these responses. Depending on the dose, the insecticides can act increasing or decreasing the metabolism of the bees. The standardization of methodologies for stingless bees is extremely important, the analyzes have to fit the limits of this group of social bees. These researches are fundamental for the understanding of factors that cause this decline of the population, so that a correct management is made and for the preservation of the species is carried out, avoiding third damages to the ecosystem.

Keywords: stingless bees, acetamiprid, abamectin, neonicotinoid, avermectin, proboscis extension reflex, locomotor activity.

1. Introdução

As abelhas são os principais agentes polinizadores (BIESMEIJER & SLAA, 2004) contribuindo com a preservação vegetal, manutenção das comunidades de plantas silvestres e de cultivo agrícola (ASHMAN et al., 2004; AGUILAR et al., 2006; KLEIN et al., 2007; RICKETTS et al., 2008). A eficiência das abelhas como polinizadores da maioria das espécies de angiosperma, está relacionada ao uso de pólen e néctar como alimento nas diferentes fases de vida. Estes insetos possuem estruturas especializadas para coleta e transporte de recursos, metabolismo, sincronização com eventos florais e memória temporal, fatores estes que auxiliam na exploração dos recursos florais (SILVEIRA et al., 2002; MOORE, 2001).

As abelhas foram identificadas como visitantes florais de 132 tipos de cultivos associados à produção de alimentos, sendo reconhecidas como polinizadoras de 91 destes tipos (BPBES, 2019). Dentre os polinizadores destes cultivos, predominam a espécie *Apis mellifera* e abelhas da Tribo Meliponini, popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão, sendo estas últimas registradas como visitantes em 107 cultivos e confirmadas como polinizadoras de 52 (BPBES, 2019). Além da importância dos serviços de polinização, *A. mellifera* e algumas espécies de abelhas sem ferrão contribuem produzindo produtos de valores econômicos como mel e própolis (ROCHA, 2012).

O declínio do serviço da polinização pode levar à extinção de plantas e animais, alterando a paisagem e funções do ecossistema (KEVAN & VIANA, 2003), uma vez que desde o surgimento da flor, essa relação mutualista envolvendo planta e polinizador, vem se estabelecendo e proporcionando o sucesso reprodutivo das angiospermas (KEARNS & INOUE, 1997). Algumas mudanças ambientais estão associadas ao

declínio das abelhas e seus serviços de polinização, tais como mudanças climáticas e perda de habitat (POTTS et al., 2010). Sem a atuação dos polinizadores, a biodiversidade é afetada e menos biodiversidade pode causar maior vulnerabilidade a pragas e doenças da fauna e flora. Outra consequência da perda de biodiversidade é a restrição de alimentos e da agricultura, colocando a segurança alimentar em risco (FAO, 2019).

Um fenômeno mais recentemente detectado nas populações de abelhas melíferas, caracterizado pela rápida perda da população adulta de uma colônia (UNDERWOOD & VANENGELSDORP, 2007), foi denominado *Desordem do Colapso da Colônia* (DCC). Acredita-se que apenas um fator isolado não seja a possível causa para a desordem, mas sim a interação de alguns desses fatores. Assim, foram apontados como possíveis causas para a DCC, a presença de novo parasita ou patógeno, desnutrição, intoxicação por agrotóxico, manejo inadequado ou consanguinidade exacerbada (JOHNSON, 2010; VANENGELSDORP & MEIXNER, 2010; BECHER et al., 2013).

Muitos trabalhos recentes têm demonstrado o efeito negativo dos agrotóxicos na sobrevivência e comportamento das abelhas, colocando-os como os principais responsáveis pelo declínio populacional e seus serviços ambientais (BECHER et al., 2013; JACOB et al., 2015; JOHNSON, 2010; NOCELLI et al., 2012; POTTS et al., 2010; ROCHA, 2012), além dos riscos à saúde humana (SPADOTTO, 2004). Dos agrotóxicos consumidos no Brasil, aproximadamente 30% são inseticidas e, desse valor, cerca de 40% apresentam toxicidade para as abelhas (FREITAS & PINHEIRO, 2010). As abelhas podem ser intoxicadas por inseticidas por três vias: contato, ingestão e fumigação e seus efeitos variam dentre as espécies e vão desde a morte imediata a

efeitos subletais, os quais causam problemas no funcionamento da colônia (VANENGELSDORP & MEIXNER, 2010).

Alguns dos efeitos tóxicos das doses letais dos inseticidas podem ocorrer através de alterações no sistema nervoso causando a morte pela paralisação de atividades ou hiperexcitação (NOCELLI et al., 2012). Além da letalidade, os efeitos subletais têm cada vez mais enfoque como outra perspectiva de ameaça para as abelhas. Paralisia, desorientação, mudanças comportamentais para curto e longo prazo também são resultados dessa toxicidade causada pelos pesticidas (VANENGELSDORP & MEIXNER, 2010), assim como comportamento, tempo de vida, desenvolvimento das larvas, alterações no metabolismo celular e inibições enzimáticas (DESNEUX et al., 2007), alteração em cognições que causam prejuízos na colônia como redução da motilidade, perda da capacidade de comunicação e de aprendizagem, dificuldades de forrageamento e de orientação (BORTOLLI et al., 2003). Algumas das explicações para essas diferentes respostas em relação aos inseticidas podem ser: o desenvolvimento de enzimas de desintoxicação, o tamanho corporal, os níveis de gordura corporal ou pH da hemolinfa (AHMAD & JOHANSEN 1973, apud JACOB et al., 2015).

As alterações comportamentais causadas nas abelhas pelo uso de agrotóxicos podem ser monitoradas por meio de testes de comportamento, como reflexo de extensão da probóscide (REP) e o teste de atividade locomotora, mostrando assim como o desempenho dos indivíduos é afetado por essas substâncias, prejudicando o forrageamento e a polinização (NOCELLI et al., 2012). O método de REP busca reproduzir a interação abelha-flor no momento em que a abelha capta o pólen. Quando o indivíduo reconhece a presença de alimento através de um estímulo nas antenas, ele estende a probóscide para captar esse recurso. O método de REP, após a exposição da abelha a algum químico, pode ser realizado através desse estímulo seguido de uma

oferta de solução, geralmente de sacarose, para avaliar o limiar gustativo (ARMENGAUD et al., 2002). Essa análise é possível uma vez que os agrotóxicos causam grande redução da capacidade de detecção de fontes de alimento (DESNEUX, 2007). Esse método foi introduzido por KIMIHISA TAKEDA em 1961 e geralmente é avaliado como uma resposta dicotômica (1 ou 0) podendo ser utilizado como um índice para o desempenho de aprendizado e memória.

Outra avaliação utilizada para analisar o efeito dos inseticidas sobre o comportamento das abelhas é a avaliação da atividade locomotora. Por meio do método de LAMBIM e colaboradores (2001), a habilidade de orientação e atividade locomotora são avaliadas com o auxílio de uma fonte luminosa. Avalia-se a capacidade das abelhas em percorrer um trajeto e o tempo gasto para finalizar o percurso. A atividade locomotora das abelhas pode ser comprometida por inseticidas a base de neonicotinoide e avermectina, uma vez que essas substâncias diminuem o deslocamento e provocam paralisias nestes insetos.

A medida de toxicidade dos inseticidas para as abelhas se baseia na determinação da dose média letal (DL50) e/ou de uma concentração média letal (CL50), ou seja, um valor que reflete a mortalidade de 50% da população experimental e, por meio desse valor, podemos estimar os pontos acima e abaixo para obter a curva dose-resposta. A curva dose-resposta mostra o quanto o aumento de cada dosagem da substância tem como resposta o aumento da mortalidade da população amostrada. Outra maneira de avaliar a toxicidade da substância é através do tempo letal médio (TL50) que é o tempo corrido para causar a mortalidade de 50% da população amostrada após a exposição à substância (COSTA, 2015).

Muitos estudos baseados na mortalidade e/ou resistência a compostos tóxicos são direcionados a *A. mellifera*. Entretanto o uso desta espécie como único representante

de agentes importantes para a polinização, gerou controvérsia (JACOB et al., 2015), fazendo necessários os testes de toxicidade também em abelhas nativas solitárias ou sociais. O desmatamento, a carência de informação a respeito das abelhas nativas e seu manejo, e os efeitos dos pesticidas sobre essas abelhas nativas constituem os maiores obstáculos para o atual uso sustentável de polinizadores na agricultura (FREITAS & PINHEIRO, 2010).

Dentre as abelhas nativas, estudos sobre a toxicidade de compostos químicos em espécies da tribo Meliponini são relativamente escassos, uma vez que esses estudos são realizados, na sua maioria, em locais de clima temperado e essas espécies não ocorrem nesses locais (MORAES et al., 2000). As abelhas da tribo Meliponini possuem ferrão atrofiado, característica que deu nome a esse grupo de abelhas sem ferrão (SILVEIRA et al., 2002). É constituído de aproximadamente 40 gêneros e são abelhas eussociais, semelhantes a *A. mellifera* (VALDOVINOS-NÚÑEZ et al., 2009). As abelhas da tribo Meliponini têm distribuição tropical e, no Brasil, há mais de 400 espécies descritas (SILVEIRA et al., 2002). Além da produção de alimentos, seus serviços de polinização auxiliam na reconstituição de florestas tropicais e conservação de remanescentes (SILVA & PAZ, 2012). Espécies dessa tribo também podem ser utilizadas como indicadoras de qualidade ambiental (PALAZUELOS BALLIVIÁN, 2008; SILVA & PAZ, 2012).

A meliponicultura consiste na criação de abelhas sem ferrão nativas, as quais podem ser exploradas através de técnicas de manejo que respeitem a biologia do grupo e, ao mesmo tempo, permitem a colheita de produtos armazenados, sem prejudicar a espécie, para fins de uso e comercialização. As abelhas sem ferrão apresentam vantagens por serem nativas e conseqüentemente adaptadas à flora da região e seu mel obtém melhores preços no mercado. Aproximadamente 10 espécies podem ser criadas

através da meliponicultura e sua tecnologia é relativamente bem estudada e difundida (MATEUS, 1998). Essa criação ainda é capaz de causar impactos positivos tanto sociais quanto econômicos (PEREIRA et al., 2003). O clima, umidade, riqueza e diversidade de plantas da região propiciam melhores condições as quais favorecem a criação dessas abelhas.

A meliponicultura é uma atividade cuja prática é de uso sustentável de recursos naturais, amplamente utilizada no Brasil, e é uma alternativa para a região amazônica, e pode ser integrada em áreas naturais e/ou para contribuir com a produção agrícola (VENTURIERI, 2008). Na região amazônica, a meliponicultura oferece renda complementar, no contexto da agricultura familiar das comunidades, através da venda do mel e própolis (FRAZÃO 2013). O mel também é base para a produção de cosméticos como sabonetes e shampoos produzidos por essas comunidades.

A região Amazônica é a maior floresta tropical contínua do planeta, sendo o Brasil possuidor da segunda maior reserva de florestas do mundo. No Pará o avanço da exploração agrícola e florestal vem aumentando ao longo dos anos e um dos cultivos predominantes na região e proximidades de Santarém, é o cultivo de soja. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja com produção de 116,996 milhões de toneladas, 35,100 milhões de hectares de área plantada e produtividade de 3.333 kg/ha (EMBRAPA, 2019). Uma das preocupações com o desmatamento crescente devido ao avanço da soja é o uso de inseticidas utilizados nesse cultivo e o impacto dessa atividade sob as populações de abelhas nativas (VENTURIERI, 2008).

O acetamiprido e abamectina estão entre os principais inseticidas utilizados no cultivo da soja e que podem ter efeito nas populações de abelhas, incluindo as sem ferrão, tanto em áreas naturais e em colônias mantidas de Meliponários. O acetamiprido está incluído em uma classe de inseticidas cujo grupo químico é o neonicotinoide,

atuando como antagonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) presentes no sistema nervoso central dos insetos (MACEDO, 2016). É um composto altamente tóxico para as abelhas e em contra partida, tem baixa toxicidade para os vertebrados, fazendo assim um dos químicos mais utilizados no mundo (JESCHKE et al., 2011). A abamectina, por sua vez, faz parte de uma classe de inseticidas cujo grupo químico é a avermectina. Além de atuar como inseticida é utilizada também como acaricida. É altamente tóxica para as abelhas e seus resíduos permanecem por aproximadamente 28 horas (CARVALHO et al., 2009), entretanto, seus efeitos ainda são pouco documentados. A abamectina tem a toxicologia classificada como medianamente tóxica e o acetamiprido extremamente tóxico. A toxicidade da maioria dos agrotóxicos é expressa em valores referentes à Dose Média Letal (DL50) representada por miligramas do ingrediente ativo do produto por quilograma de peso vivo, necessários para matar 50% da população de ratos ou de outro animal teste (VALADARES, 2006).

Considerando a diversidade das abelhas nativas brasileiras da região amazônica, o crescente aumento do cultivo de soja nessa região e, conseqüentemente, a crescente exposição das abelhas aos inseticidas, os objetivos deste trabalho foi testar o efeito do acetamiprido e da abamectina na sobrevivência e comportamento cognitivo da espécie de abelhas sem ferrão, *Scaptotrigona aff. xanthotricha* (Moure, 1950), abelha da tribo Meliponini usada na meliponicultura. Determinou-se as DL50, DL90 e Tempo Letal destes, assim como avaliou-se os efeitos subletais no comportamento alimentar e de atividade locomotora da espécie *Scaptotrigona aff. xanthotricha*.

Assim, temos como objetivo mostrar a possível relação destes inseticidas com a *Desordem do Colapso da Colônia* para que medidas de conservação da abelha sejam aplicadas. A principal hipótese do trabalho é que a exposição de abelhas aos inseticidas AbamectinNortox® e Battus® exercem efeitos de acordo com suas classes

toxicológicas. Assim, acredita-se que os dois inseticidas se apresentarão tóxicos, entretanto, o acetamiprido será o mais tóxico em relação a todos os parâmetros analisados.

2. Materiais e Métodos

Os testes experimentais foram conduzidos no Laboratório de Sanidade Animal (LaRSana) do Instituto de Biodiversidade e Floresta (IBEF) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, PA. Os inseticidas utilizados são AbamectinNortox® e Battus® cujos princípios ativos são abamectina e acetamiprido respectivamente (AGROFIT, 2018). A colônia de espécie *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* é oriunda do município de Belterra, Pará, e foi mantida no Meliponário da UFOPA durante todo o experimento.

2.1 Dose Letal para a Intoxicação por Contato

Para a determinação dos parâmetros relativos à dose letal 50 e 90 de intoxicação por contato, foram realizadas diferentes diluições a partir das doses comerciais indicadas pelos fabricantes nos rótulos dos produtos para a cultura de soja.

Para o preparo do material, papéis filtros foram embebidos nas soluções preparadas, secados em temperatura ambiente e dispostos em placas de Petri, de 9 cm de diâmetro por 2 cm de altura. Tampas coroa metálicas foram utilizadas como alimentadores com chumaço de algodão inseridos dentro banhados com solução de 75% de água e 25% de mel. Para o grupo controle os papéis filtros foram embebidos apenas em água destilada.

Para a realização do procedimento, vasilhas de plástico transparentes de 1000 ml foram posicionadas nas entradas das colônias para a coleta dos indivíduos (FIGURA 1A). Para o manuseio das abelhas, anestesiou-se os indivíduos em gelo e 10 abelhas foram colocadas em cada placa de Petri com tecido filó usufruído como contenção (FIGURA 1B). As primeiras doses foram frações 10 vezes a concentração recomendada para a soja, esse fracionamento foi realizado até obter uma faixa de mortalidade de 0 a 100% das populações, em seguida, dentro desta faixa foram estipulados 5 pontos para compor a curva dose resposta. Para cada ponto foram utilizadas quatro placas de Petri com 10 indivíduos inseridos, somados os 40 indivíduos para o grupo controle, totalizando 240 abelhas por inseticida (FIGURA 2).

A porcentagem da mortalidade das abelhas foi contabilizada ao término de 24h corridas desde o momento do aprisionamento das mesmas. Foram considerados mortos os indivíduos que não manifestaram nenhum movimento durante o período observado. A curva dose-resposta foi obtida através dos pontos encontrados. Os valores calculados foram analisados através de Probite, por meio deste, obtiveram-se a DL50 e DL90 dos inseticidas.

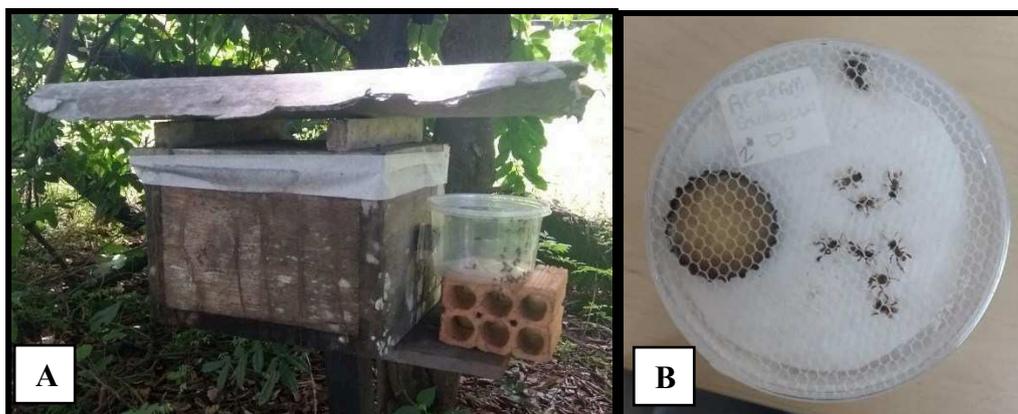


FIGURA 1 - **A)** Coleta de indivíduos da colônia da abelha *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha*. **B)** Placa de Petri contendo 10 indivíduos.

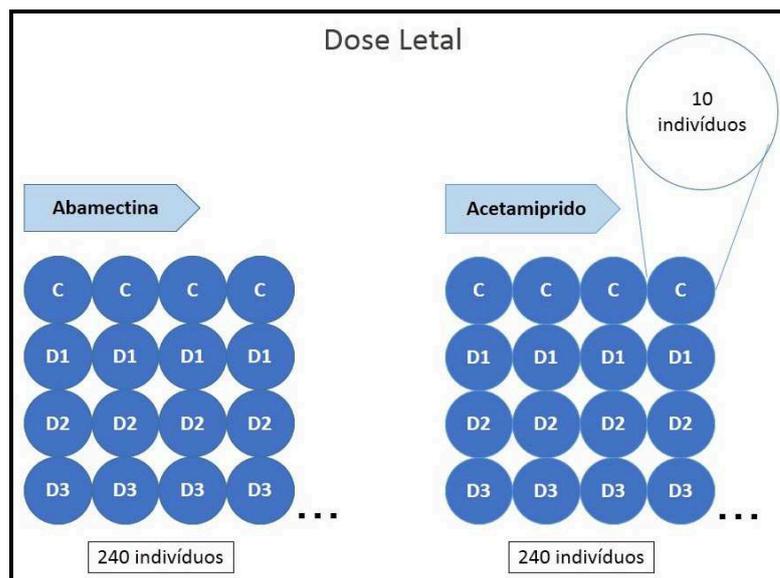


FIGURA 2 - Delineamento amostral para a obtenção da dose letal. Cada círculo azul representa uma placa de Petri contendo 10 indivíduos (C representa o grupo controle, D1 a dose 1, D2 a dose 2, D3 a dose 3 e assim sucessivamente até a dose 5), totalizando 240 indivíduos por inseticida.

2.2 Tempo Letal para a Intoxicação por Contato

Para a determinação dos parâmetros relativos ao tempo letal 50, foram utilizadas as DL90s dos dois inseticidas. Foram manipuladas 40 abelhas por tratamento, 10 em cada placa de Petri, totalizando 80 indivíduos por inseticida (FIGURA 3). As abelhas foram intoxicadas com os inseticidas pela via de exposição de contato através da mesma metodologia anterior (*vide* item 2.1) e a mortalidade foi monitorada a cada três horas durante o período de 27 horas.

A TL50 dos inseticidas foi obtida através do modelo Kaplan-meier, um estimador não paramétrico da análise de sobrevivência. Para o grupo controle, as abelhas entraram em contato apenas com os papéis filtros embebidos em água destilada.

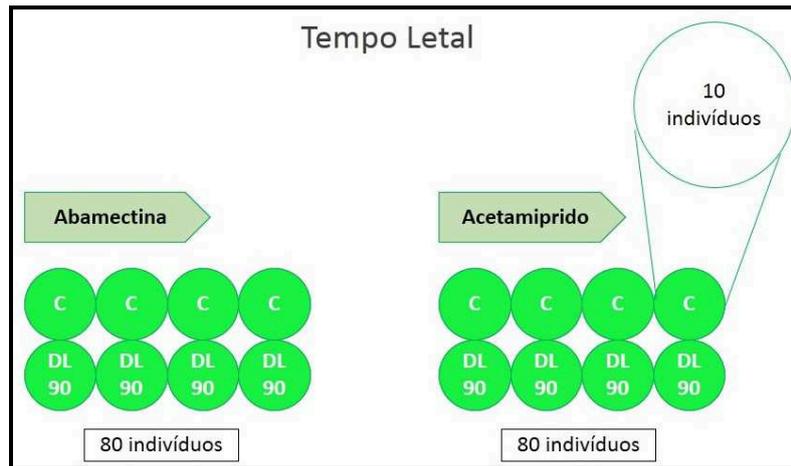


FIGURA 3 - Delineamento amostral para a obtenção do tempo letal. Cada círculo verde representa uma placa de Petri contendo 10 indivíduos (C representa o grupo controle e DL90 o grupo tratado com a dose letal 90 obtida no item 2.1), totalizando 80 indivíduos por inseticida.

2.3 Teste de Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)

Para o teste de REP, a metodologia das pesquisas relacionadas a esse teste sofrem grande variação, tornando difícil a decisão de qual método utilizar. As dificuldades encontradas para a padronização do teste incluem logísticas, experiência do pesquisador e técnicas, dificultando a distinção desses efeitos causadores de confusão (FROST et al., 2012), mesmo que algumas alterações (financeiras, temporais) sejam inevitáveis.

No nível comportamental pode-se detectar a memória de curto prazo em nível de minutos. Uma única tentativa leva a uma resposta que dura algumas horas em mais de 50% dos animais e de acordo com SANDOZ et al., (1995), as memórias de odor das abelhas podem perdurar por toda a vida de um indivíduo a partir desse primeiro contato. Então neste presente trabalho optou-se realizar três ofertas de alimento partindo do princípio de que a primeira oferta já seria suficiente para o aprendizado de curto prazo.

Para melhor execução do teste de REP, foram realizados pré-testes para avaliar a capacidade de suporte da população amostrada. Primeiro foi observado quanto tempo as abelhas em cada placa de Petri suportavam o jejum até os primeiros indivíduos morrerem e, em seguida, foi observado quanto tempo os indivíduos ficavam em contato com a superfície intoxicada pelo inseticida até as primeiras mortes acontecerem. Esses testes foram realizados, pois seguindo a metodologia para *A. mellifera*, o período em jejum são de quatro horas, mas as abelhas sem ferrão são mais sensíveis e morrem antes dessas quatro horas se completarem. O resultado foi uma hora em jejum e 30 minutos em contato com o acetamiprido e uma hora em contato com a abamectina.

Para aprisionar cada indivíduo, foram desenvolvidas capsulas individuais feitas de ponteiros de micropipetas, com uma abertura tampada por tecido filó e a outra abertura com uma tampa de fita adesiva (FIGURA 4), assim a abelha fica com o movimento livre dentro de cada capsula e pode se alimentar através do tecido filó. Essa adequação da metodologia ocorreu devido a dificuldade de mobilizar cada indivíduo em ponteiros de micropipeta, uma vez que esses testes normalmente são realizados com *A. mellifera*, a qual tem o tamanho corporal muito maior e, logo, são mais fáceis de manipular, e para deixá-los com movimentos livres visando menor estresse.

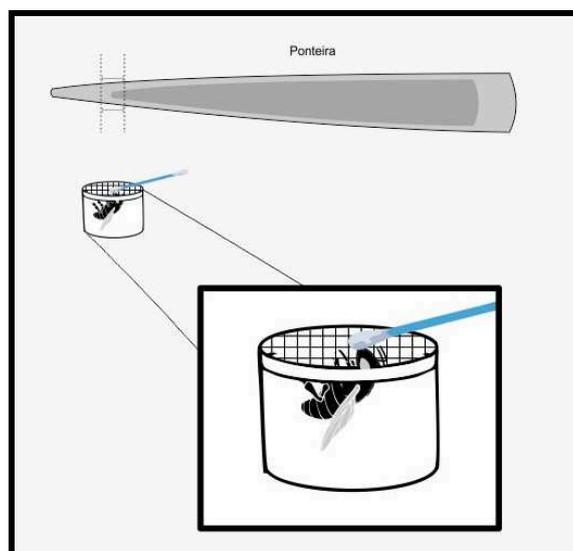


FIGURA 4 - Esquema representativo da cápsula confeccionada a partir de uma ponteira de micropipeta para a realização do teste de REP.

Após a realização dos pré-testes, as abelhas passaram por um período de uma hora em jejum: para o acetamiprido, 30 minutos inseridas nas placas de Petri em contato com a DL50 e 30 minutos aclimatando nas capsulas de aprisionamento; e para a abamectina 1h em contato com a DL50. Para facilitar o manuseio das mesmas, os indivíduos foram anestesiados sob refrigeração por 30 segundos. Com o auxílio de hastes flexíveis de plástico com algodões em suas pontas, foi disponibilizada uma mistura de água e mel (25% mel e 75% água) para cada abelha, as hastes flexíveis foram aproximadas das antenas de cada indivíduo durante 10 segundos para incentivar a extensão da probóscide. Foram realizadas três ofertas de alimento para cada abelha e foram avaliadas as respostas positivas e negativas para cada uma. Foram utilizados 30 indivíduos por tratamento, totalizando 90 abelhas (FIGURA 5).

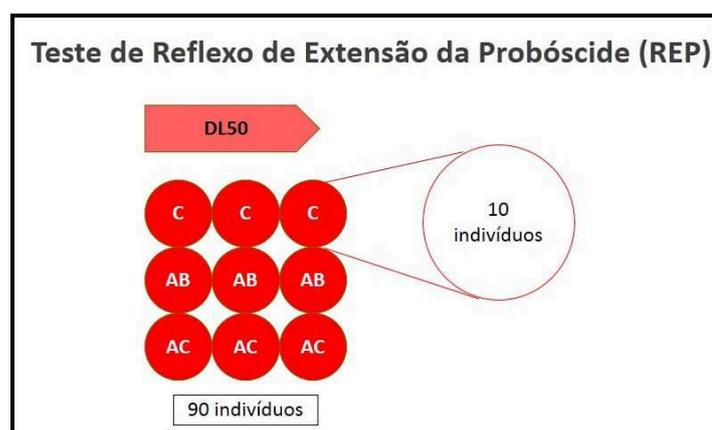


FIGURA 5 - Delineamento amostral para a obtenção do teste de REP. Cada círculo vermelho representa uma placa de Petri contendo 10 indivíduos (C representa o grupo controle, AB o grupo tratado com abamectina e AC o grupo tratado com acetamiprido).

As frequências de respostas positivas de extensão de probóscide entre os dois tratamentos e o grupo controle foram comparadas, separadamente para cada oferta de alimento. Também foram comparados os dados binários de respostas usando modelos de regressão logística, os quais foram implementados no programa R (R Core Team 2019). Os resultados foram demonstrados por meio de frequências brutas de respostas positivas, e frequências previstas pelos modelos de regressão logística, as quais foram plotadas usando o pacote *effects* do R (FOX & HONG, 2009).

Alternativamente, foram sumarizadas as três ofertas de alimento por meio de uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA) implementada no pacote *vegan* do R (OKSANEN et al., 2019). Aplicamos a PCoA sobre uma matriz de dissimilaridades Gower entre amostras pareadas, o que foi útil para testar diferenças nas frequências de extensão da probóscide ao longo de sucessivas ofertas de alimento, simultaneamente. O primeiro eixo da PCoA capturou 100% da variância original nos dados, o que sugere que os escores produzidos pela PCoA são representações confiáveis do espaço multivariado composto pelas três ofertas de alimento. As diferenças nos escores produzidos foram testadas pelo primeiro eixo da PCoA usando uma combinação entre teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn.

2.4 Teste de Atividade Locomotora

Para a realização do teste de atividade locomotora soluções estoques dos dois inseticidas foram preparadas baseadas nas DL50s (*vide* item 2.1). Foram utilizadas 30 abelhas para cada inseticida e para o controle, totalizando 90 abelhas (FIGURA 6). O grupo controle passou pelo mesmo procedimento, entretanto não entrou em contato com as DL50s.

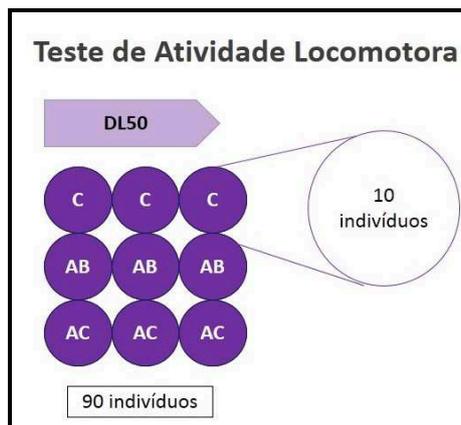


FIGURA 6 - Delineamento amostral para a obtenção do teste de atividade locomotora. Cada círculo roxo representa uma placa de Petri contendo 10 indivíduos (C representa o grupo controle, AB o grupo tratado com abamectina e AC o grupo tratado com acetamiprido).

A arena foi confeccionada de madeira de 80 x 60 x 4 cm de tamanho (FIGURA 7), com dez divisões internas formando raias de 50 cm de comprimento com uma entrada individual em cada uma. Disposta em sua superfície superior foi instalada uma lâmpada fluorescente para estimular o movimento das abelhas em sua direção, uma vez que as abelhas são insetos fototáticos positivos. Uma tampa de vidro transparente foi utilizada para fechar a arena e uma tela de tecido filó foi usada para impedir que os indivíduos ultrapassassem a marcação de 50 cm. Uma câmera digital filmou o andamento do teste para auxiliar em sua futura análise.

As abelhas foram colocadas em placas de Petri durante 30 minutos (abamectina) e uma hora (acetamiprido) em contato com a DL50 e em seguida foram inseridas individualmente em eppendorfs acoplados em cada raia da arena. Para o manuseio, os indivíduos foram anestesiados sob refrigeração por 30 segundos. Foram colocados 10 indivíduos por vez na arena e com o auxílio do temporizador da câmera, foi quantificado o tempo que cada abelha gastou para percorrer o trajeto de 50 cm.

Utilizou-se análise de variância ANOVA para testar diferenças no tempo médio de duração da corrida entre o grupo controle e os dois tratamentos (acetamiprido e abamectina). Os dois químicos testados podem exercer efeitos contrários nas abelhas (e.g. excitação vs. letargia), então modelos de ANOVA foram testados separados para cada químico. Os modelos foram construídos com presença e ausência de cada químico como variável independente categórica, e o tempo de duração da corrida como variável dependente. Com a transformação logarítmica dos valores de tempo de duração, os dois modelos de ANOVA produziram resíduos seguindo distribuição normal (Shapiro-Wilk $P > 0,12$ em ambos os casos).

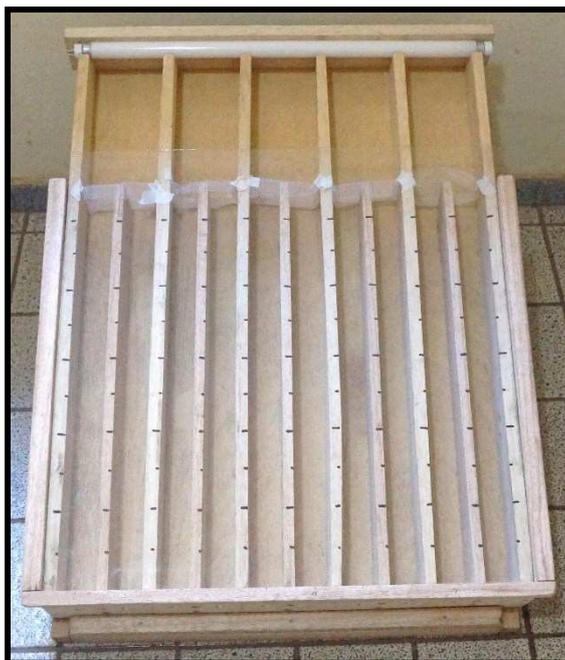


FIGURA 7 - Arena confeccionada em madeira para o teste de atividade locomotora.

3. Resultados

3.1 Bioensaios de Mortalidade e Dose Letal para a Intoxicação por Contato

Curvas de concentração-mortalidade para *S. aff. xanthotricha* apresentaram baixos valores de X^2 (<8,00) e altos valores de p (> 0,063), indicando a adequação dos dados ao modelo Probite, utilizado para estimar as curvas de mortalidade. Isso permitiu a estimativa das DL50s e DL90s (TABELA 1).

Após as análises da mortalidade obtivemos os seguintes valores para *S. aff. xanthotricha*: sob efeito da abamectina, DL50 = 0.6993 μ g/mL (IC =0.29012 a 0.61209 μ g/mL) e DL90 = 0.90837 μ g/mL (IC =0.72361 a 1.35652 μ g/mL); e para o acetamiprido, DL50 = 0.494 μ g/mL (IC = 0.391 a 0.591 μ g/mL), e DL90 =0.753 μ g/mL (IC =0.643 a 1.000 μ g/mL) (TABELA 1).

Em relação a comparação da toxicidade de cada inseticida para *S. aff. xanthotricha*, o acetamiprido teve a maior toxicidade que a abamectina tanto para a DL50 como para a DL90, mostrando assim que são necessárias menores quantidades do ingrediente ativo acetamiprido para levar a letalidade de 50% e 90% da população, respectivamente, quando comparada com o outro ingrediente ativo.

3.2 Bioensaios de Tempo Letal para a Intoxicação por Contato

A análise de sobrevivência de abelhas da espécie *S. aff. xanthotricha* expostas às concentrações referentes às DL90s dos inseticidas abamectina e acetamiprido (DL90 = 0,90837 μ g/mL e DL90 = 0,753 μ g/mL, respectivamente), indicou diferenças significativas entre os defensivos agrícolas ($X^2 = 89,33$, gl = 1, $p < 0,0001$). A sobrevivência das abelhas foi de 100% no grupo controle (sem exposição aos inseticidas) após 27 horas de exposição, enquanto os inseticidas abamectina e acetamiprido levaram a 100% de mortalidade após 18 e 27 horas, respectivamente. Ou seja, o acetamiprido é mais tóxico, mas demanda mais tempo para matar 100%

(FIGURA 8). Os TL50s para *S. aff. xanthotricha* sob efeito da abamectina foram de 8,25 horas e sob efeito do acetamiprido foram de 14,25 horas. O tempo médio de sobrevivência não foi estimado para o grupo sem exposição a inseticidas devido à mortalidade de 0% observada.

TABELA 1: Toxicidade relativa por contato dos inseticidas abamectina e acetamiprido para a espécie *S. aff. xanthotricha*.

Espécie	Inseticidas	Inclinação	DL50	Intervalo de Confiança (DL50)	DL90	Intervalo de Confiança (DL90)	χ^2	p
<i>S. aff. xanthotricha</i>	Abamectina	2.837	0.6993	0.330 (0.29012-0.61209)	0.90837	0.632 (0.72361-1.35652)	0.838	0.8404
<i>S. aff. xanthotricha</i>	Acetamiprido	4.949	0.494	0.2 (0.391-0.591)	0.753	0.357 (0.643-1.000)	0.92	0.821

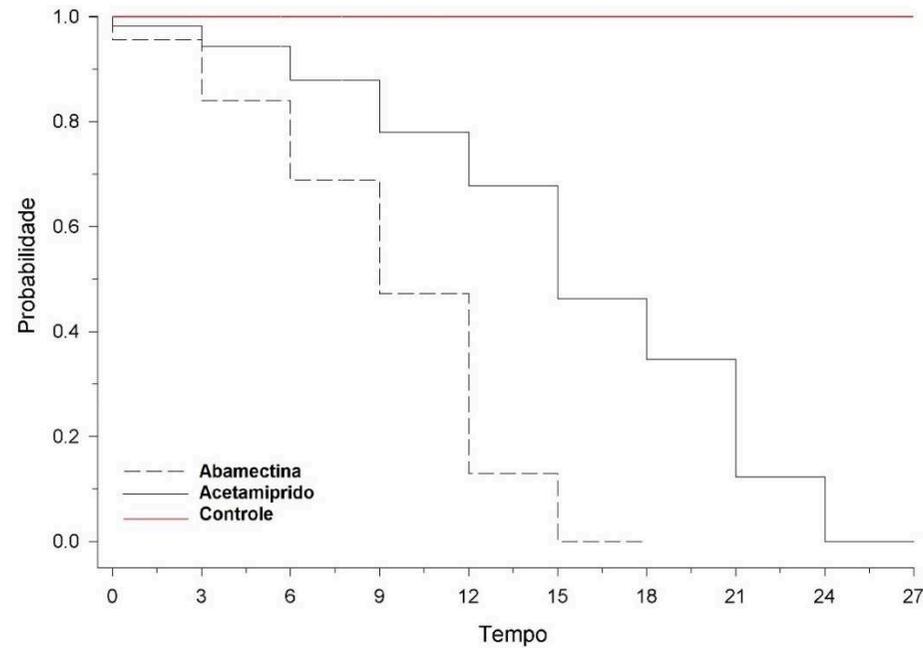


FIGURA 8 - Curvas de sobrevivência de *Scaptotrigona aff. Xanthotricha* exposta a abamectina, acetamiprido e água destilada (controle).

3.3 Bioensaios para o Teste de Reflexo de Extensão da Probóscide

As frequências de respostas positivas de extensão da probóscide tenderam a ser reduzidas ao longo de sucessivas ofertas de alimento, mas a redução foi consideravelmente mais acentuada nos grupos tratados com inseticidas (FIGURA 9). Para esses grupos as frequências de extensão da probóscide foram particularmente mais baixas na segunda oferta de alimento (13–17%), em comparação ao grupo controle (87%). Esses resultados sugerem que as respostas positivas a duas ofertas de alimento foram reduzidas por efeitos dos inseticidas, e não porque as abelhas estiveram saciadas ou estressadas pelo manuseio.

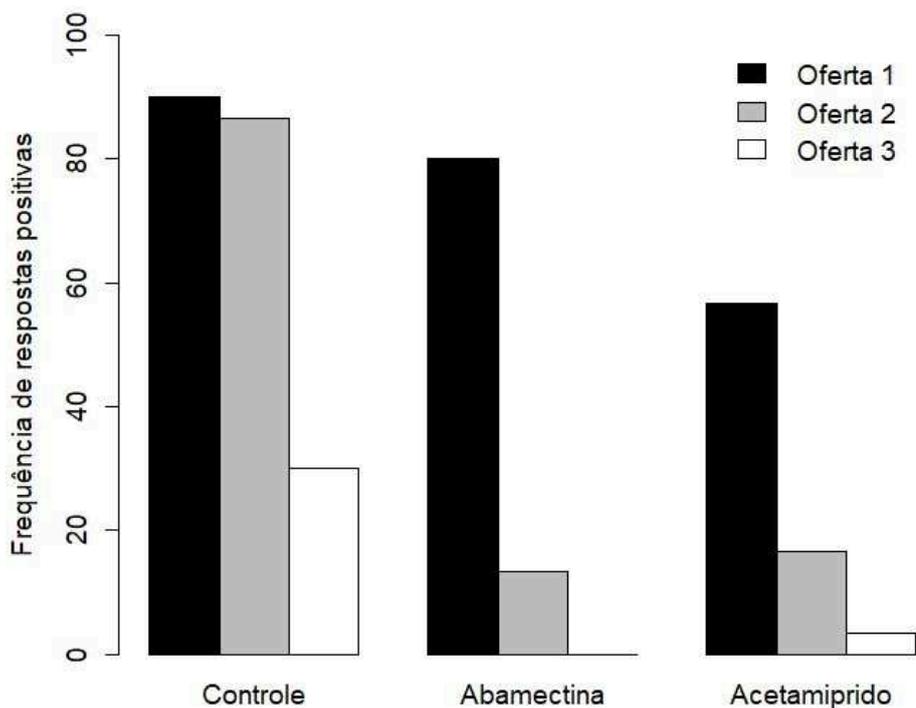
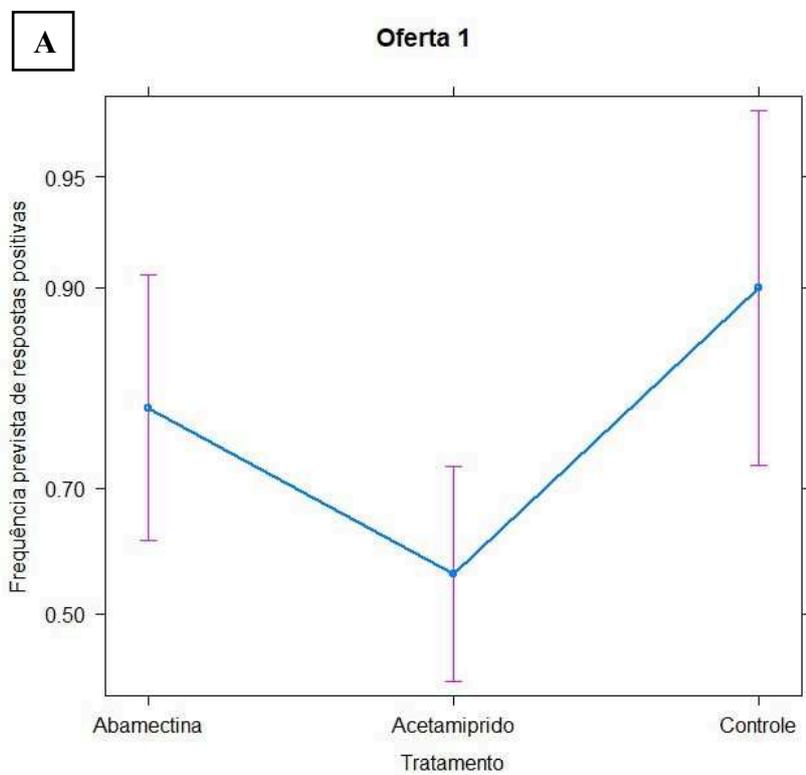


FIGURA 9 - Frequência de respostas positivas de extensão da probóscide em três grupos com 30 abelhas cada, ao longo de três ofertas sucessivas de uma solução de sacarose pura (controle) e uma contaminada com abamectina e outra com acetamiprido.

As diferenças nas frequências de respostas positivas foram sustentadas pelos modelos de regressão logística (FIGURA 10), para os quais a hipótese nula foi rejeitada para a primeira ($z = 3,07$; erro padrão = 0,45; $P = 0,002$) e segunda ($z = 3,48$; erro padrão = 0,53; $P = 0,0004$) ofertas de alimento, mas não para a terceira ($P = 0,99$). Esses resultados sugerem que os efeitos dos agrotóxicos sobre o reflexo de probóscide não foram consistentemente detectados após duas ofertas de alimento.



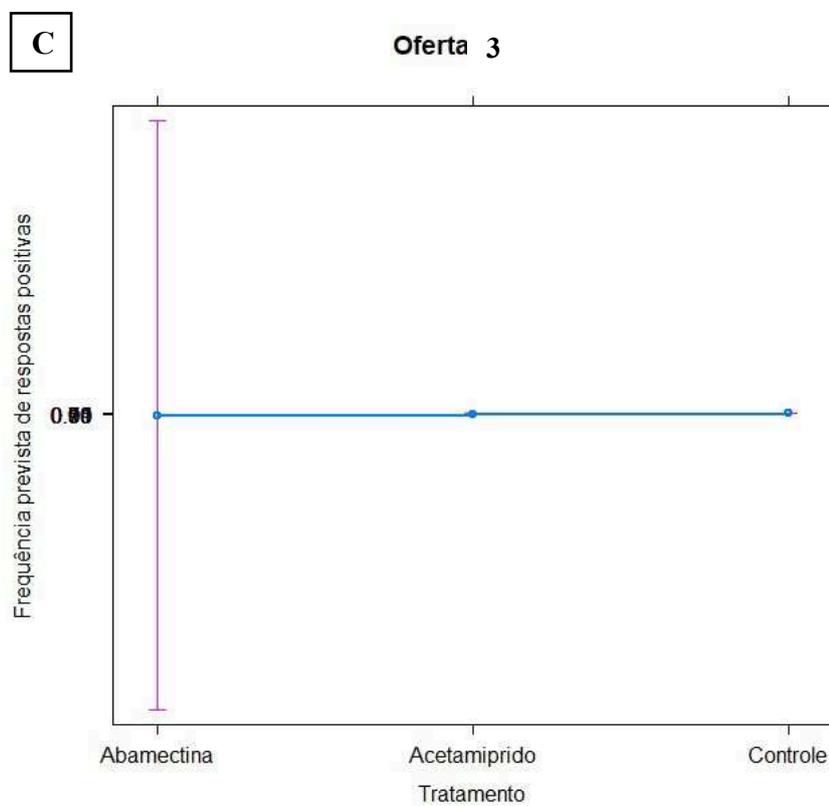
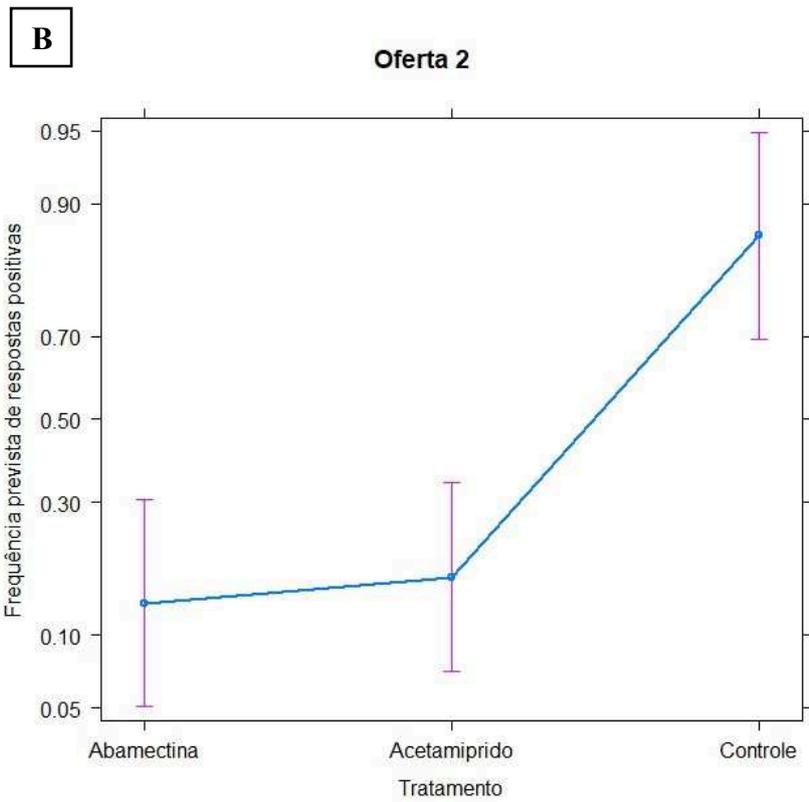


FIGURA 10 - Frequências de respostas positivas de extensão de probóscide previstas por modelos de regressão logística. Os dados são provenientes de três grupos com 30 abelhas cada, para as quais foram oferecidas soluções puras e contaminadas com acetamiprido e abamectina cada. **A)** Primeira oferta realizada aos três grupos. **B)** Segunda oferta realizada aos três grupos. **C)** Terceira oferta realizada aos três grupos. Linhas verticais delimitam intervalos de confiança 95%.

Considerando as três ofertas de alimento simultaneamente (PCoA 1), as frequências de respostas positivas diferiram significativamente entre os grupos de abelhas (Kruskal-Wallis $X^2_{2-87} = 40,44$; $P < 0,0001$). Comparando os grupos pareados (teste de Dunn), encontramos diferenças significativas entre abamectina e controle ($z = 1,14$; $P < 0,0001$), acetamiprido e controle ($z = 5,87$; $P < 0,0001$), mas não entre abamectina e acetamiprido ($P = 0,25$). Esses resultados sustentam os efeitos negativos dos agrotóxicos sobre o reflexo de probóscide, os quais foram detectados tanto pelas análises baseadas em cada oferta de alimento individualmente, quanto pelas análises baseadas nas três ofertas de alimento sumarizadas por um eixo de coordenadas principais. No entanto, os resultados das análises baseadas em PCoA sugerem que as respostas de extensão de probóscide não diferem entre os dois agrotóxicos testados (FIGURA 11).

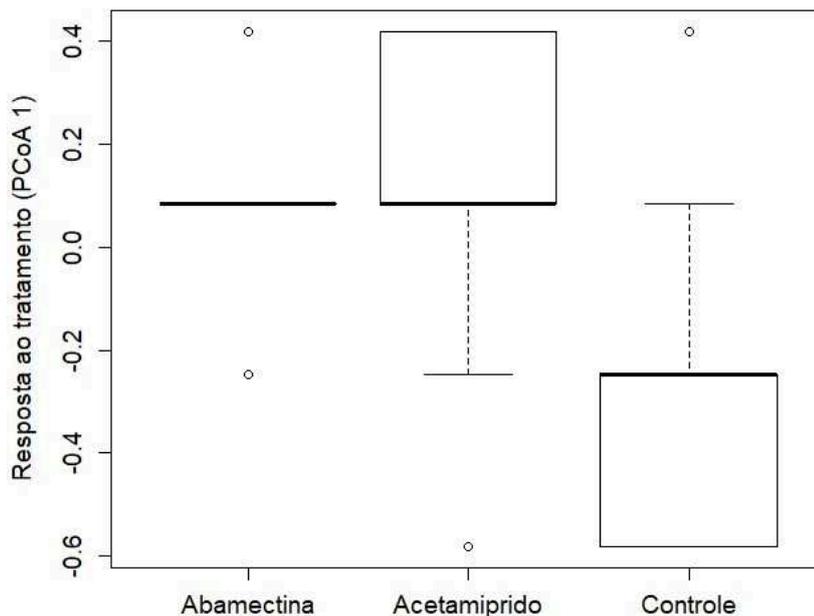


FIGURA 11 - Diferenças nas respostas de extensão de probóscide em três grupos com 30 abelhas cada. As respostas contêm dados binários de três ofertas de uma solução de sacarose pura e contaminada com duas bases de agrotóxicos. As três ofertas de alimento são sumarizadas por um eixo de Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Círculos brancos são outliers.

3.4 Bioensaios para o Teste de Atividade Locomotora

O modelo de ANOVA utilizando presença e ausência de acetamiprido como variável independente retornou diferenças significativas no tempo de duração da corrida (ANOVA $F_{1-53} = 7,73$; $P = 0,007$). Esse resultado é caracterizado pelo fato de que abelhas contaminadas demoraram até 413 segundos para completar a corrida (média = 95,72), enquanto o tempo máximo do grupo controle foi de apenas 91 segundos (média = 50,2). Esses resultados sugerem que o acetamiprido reduz a capacidade de dispersão das abelhas (FIGURA 12). O modelo de ANOVA utilizando presença ou ausência de

abamectina como variável independente não retornou diferenças significativas no tempo de duração da corrida entre grupos controle e tratamento ($P = 0,31$), ou seja, somente o acetamiprido teve influência nesse parâmetro.

Foi possível observar que o acetamiprido retardou o tempo necessário para as abelhas concluírem o percurso em relação ao controle e à abamectina. Entretanto, não houve diferença significativa para a abamectina em relação ao controle. Embora não tenha sido possível detectar diferenças significativas entre abamectina e controle, alguns indivíduos intoxicados pela abamectina levaram de 107 a 230 segundos para percorrerem os 50 cm, enquanto que para o controle o tempo máximo foi de 91 segundos. O grupo tratado com acetamiprido foi o único em que cinco indivíduos não se locomoveram para percorrerem o trajeto.

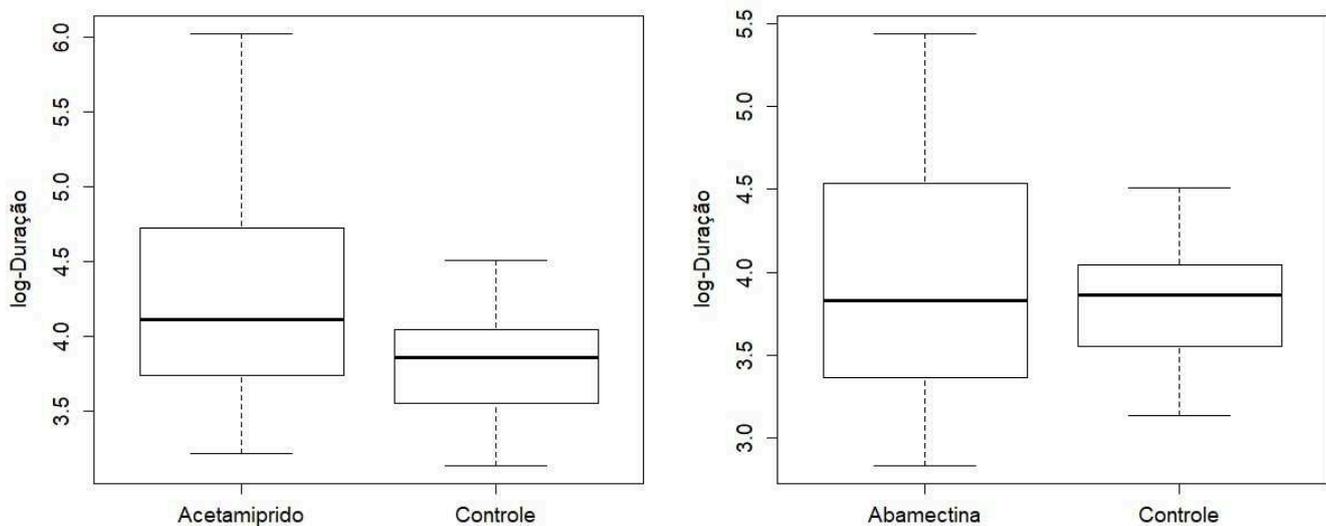


FIGURA 12 - Diferenças no tempo de duração da corrida de abelhas entre um grupo controle e grupos contaminados por acetamiprido e abamectina. Cada grupo foi composto por 30 abelhas.

4. Discussão

Os resultados deste trabalho corroboram a premissa de que ambos inseticidas são altamente tóxicos, entretanto o acetamiprido é mais tóxico para *S. aff. xanthotricha* do que a abamectina para todos os parâmetros avaliados. Embora a abamectina também tenha se apresentado tóxica para a espécie, o resultado do teste de atividade locomotora não apresentou diferença significativa entre esse inseticida e o grupo controle.

As classificações de toxicidade são baseadas no trabalho de FELTON e colaboradores (1986) e utilizando essa classificação, os valores encontrados para as DL50s e DL90s em *S. aff. Xanthotricha* sob efeito da abamectina e acetamiprido foram avaliados como altamente tóxicos ($DL50 < 1 \mu\text{g/mL}$), embora a espécie tenha se apresentado mais sensível ao acetamiprido. As doses encontradas foram todas calculadas a partir das primeiras diluições as quais foram frações 10 vezes a concentração recomendada para o cultivo de soja. Os resultados para a abamectina foram diferentes dos encontrados na literatura (toxicidade mediana), entretanto, esse valor mais tóxico avaliado neste trabalho reforça que esse inseticida é altamente tóxico para as abelhas, corroborando com os resultados de CARVALHO e colaboradores (2009).

Utilizando as DL90s para a abamectina e acetamiprido, foi possível avaliar o TL50. Pôde-se observar que apesar do acetamiprido ser mais tóxico para *S. aff. xanthotricha*, a letalidade de 100% da população amostrada demandou mais tempo para acontecer do que para a abamectina. Esse comportamento pode ser explicado através da atuação dos metabólitos, com baixas doses há alta mortalidade e com doses maiores a mortalidade é reduzida, uma vez que pode ser desencadeada a ação de enzimas desintoxicadoras que reduzem a mortalidade (PEREIRA, 2010). A mortalidade de

abelhas que foram expostas a alguma via de neonicotinoide (grupo químico do acetamiprido) podem sofrer um atraso com maior concentração da substância tóxica, sugerindo o envolvimento do metabolismo (SUCHAIL et al., 2000). O metabolismo do neonicotinoide pode variar sua resposta de acordo com o receptor de acetilcolina (TOMIZAWA & CASIDA, 2005).

Nos insetos, duas proteínas são conhecidas por degradar compostos como pesticidas e inseticidas: glutathione S-transferases (GST) e citocromo P450 (P450) (CLAUDIANOS et al., 2006). A P450 está relacionada com a fase inicial da detoxificação através da metabolização de compostos químicos utilizados na agricultura. A GST participa do processo de desintoxicação metabólica contra danos celulares (KETTERMAN, et al., 2011). Os resultados obtidos nesse trabalho podem indicar que essas proteínas podem ter se expressado mais na presença do acetamiprido. Além disso, pode-se inferir também que a abamectina demora mais para ativar essa proteção celular através da degradação do inseticida. Os inseticidas que apresentam maior tempo letal podem ser mais prejudiciais, pois não matam imediatamente, permitindo que a abelha volte para a colônia e intoxique outros indivíduos.

Inseticidas a base de neonicotinoides tem propriedades que se ligam aos receptores nicotínicos em regiões responsáveis pelo aprendizado, memória e processamento das informações olfatórias prejudicando o reconhecimento de uma fonte de alimento (GAUTHIER, 2010). Entretanto, de acordo com DECOURTYE et al., (2005), ao realizarem um pré-teste por intoxicação oral, observaram que 66% das abelhas avaliadas responderam ao REP, sugerindo que a exposição aos pesticidas testados não alteram o comportamento. No presente trabalho, através de intoxicação por contato, a diferença de respostas entre inseticidas e controle foi nítida, mas não houve diferenças entre abamectina e acetamiprido.

Quando comparado o REP com abelhas *A. mellifera* e espécies de abelhas sem ferrão foi observado que as abelhas nativas apresentam respostas mais baixas (MCCABE et al., 2007) e um motivo apresentado causador do aumento das respostas positivas foi a adequação do teste para inserir as abelhas em cápsulas e deixá-las com os movimentos livres (TODA et al., 2009). Neste presente trabalho, mesmo alterando a metodologia para inserir os indivíduos em cápsulas de aprisionamento, foi possível observar um declínio nas respostas com os grupos tratados com os inseticidas.

A comparação de resultados entre pesquisas que envolvam o mesmo tema apresenta obstáculos, além de pouca quantidade de trabalhos realizados com abelhas sem ferrão, as vias de intoxicação, inseticidas e dosagens são muito diversas. DEL SARTO (2014), representa as diferentes respostas de acordo com as vias de intoxicação e inseticidas: foi avaliada a toxicidade de três inseticidas, dentre eles a abamectina sob a abelha sem ferrão *M. quadrifasciata* e abelha *A. mellifera*. As três vias de intoxicação (ingestão, tópica e contato) foram testadas. Houve baixa toxicidade para a aplicação tópica, toxicidade moderada por contato e alta para ingestão. *A. mellifera* foi mais suscetível apenas à abamectina.

ARENA & SGOLASTRA (2014), realizaram uma revisão sistemática da literatura sobre a sensibilidade das abelhas em relação aos pesticidas e compararam a sensibilidade de 19 espécies em relação à *A. mellifera*. Foram avaliados 150 estudos de caso, o quais demonstraram alta variabilidade de sensibilidade. As abelhas sem ferrão se mostraram mais sensíveis, porém houve baixa quantidade de casos revisados na literatura, e as abelhas solitárias foram as menos sensíveis, deixando assim *A. mellifera* em uma posição intermediária. Corroborando com esse resultado, o presente resultado e os resultados de MORAIS et al., (2018) e CHAM et al., (2018) mostraram que abelhas sem ferrão podem ser mais sensíveis do que *A. mellifera*.

As espécies respondem de formas diferentes aos inseticidas e umas das possibilidades é referente a reação idiossincrásica e na resposta tóxica dos organismos, e podem variar devido a morfologia e fisiologia dos indivíduos e ao modo de ação dos inseticidas (DEL SARTO, 2009). A capacidade de desintoxicação pelo metabolismo aumentado tem sido associado à sensibilidade diferencial aos pesticidas (HARDSTONE & SCOTT 2010; BRITAIN & POTTS 2011). A resposta variada da toxicidade de muitos compostos está relacionada com alguns fatores como o tempo de exposição e organismo do indivíduo tratado como tamanho do corpo, a idade, a especialização floral e período de voo (BRITAIN & POTTS, 2011).

MORAES et al., (2000), observaram a relação entre o tamanho e peso corporal dos indivíduos e a reação aos inseticidas e foi suportado por DEL SARTO (2009) em sua pesquisa com abelhas sem ferrão e *A. mellifera*. DEL SARTO (2009) indica essa relação como um componente importante para explicar essa diferença de tolerância e cita pesquisas relacionadas: VAN DER STEEN, 2001; THOMPSON, 2001; LADAS, 1972. Segundo ARENA & SGOLASTRA (2014), a sensibilidade mais alta das abelhas sem ferrão poderia ser explicada pelo menor tamanho corporal junto com seu maior nível de sociabilidade. DEVILLERS et al., (2007) afirmam que a sensibilidade de diferentes espécies de abelhas é geralmente inversamente proporcional ao seu peso corporal médio. No entanto, uma relação semelhante entre peso corporal e sensibilidade não foi confirmada em outro estudo (HELSON et al., 1994).

Dentre as alterações provocadas pelos efeitos subletais dos agrotóxicos nas abelhas eussociais, uma de suas consequências é a possível perturbação resultante na colônia. Por serem insetos de grande nível organizacional, os cuidados com a prole, as alterações na atividade de forrageamento, a limpeza da colônia e a rotina da rainha podem ser afetados (ROCHA, 2012). Alguns pesticidas ainda podem atuar como

repelentes em insetos não-alvo prejudicando o comportamento alimentar (DESNEUX et al., 2007; FREITAS & PINHEIRO, 2010; PINHEIRO & FREITAS, 2010) e tendem a suprimir ou encolher a produção de néctar e pólen em algumas plantas, restringindo a oferta de recursos para polinizadores (JOHANSEN & MAYER 1990).

Os inseticidas a base de neonicotinoide afetam a produção de progênes cujo efeito é mais danoso do que a perda de abelhas forrageadoras (THOMPSON, 2003). Esses inseticidas também destroem áreas naturais diminuindo as flores silvestres e os locais de nidificação (FREE, 1993; OSBORNE et al., 1991), podem afetar a mobilidade das abelhas, causar tremores, movimentos descoordenados e hiperatividade (BLAQUIÈRE et al., 2012). Baixas doses não-letais de neonicotinoides também afetam os deslocamentos de abelhas (MICHELSEN & BRAUN, 1987). Foi observado também que as abelhas se tornam mais sensíveis aos neonicotinoides durante as temperaturas mais baixas de inverno (LU et al., 2012).

Pesquisas de KESSLER et al., (2015) e ARCE et al., (2018) mostraram que abelhas estão adquirindo preferência por alimento contaminado com neonicotinoide. KESSLER et al., (2015) mostraram que *A. mellifera*, e *Bombus terrestris*, preferem se alimentar mais de soluções de sacarose misturadas com imidacolorido ou tiametoxam do que somente com a sacarose, apresentando um perigo considerável para as abelhas forrageadoras. ARCE et al., (2018) descobriram que, ao longo do tempo, a proporção de visitas a comedouros com alimentos contaminados aumentou em relação à sacarose não tratada. Mesmo alterando as posições dos comedouros, as abelhas preferiram se alimentar com o alimento contaminado. Indicando uma possível detecção do inseticida e provável aumento de risco de contaminação da colônia.

Já a abamectina possui compostos que atuam como agonistas do ácido gama-amino butírico (GABA) ligando a seus receptores e estimulando o fluxo de cloro para o

interior da membrana, resultando em um bloqueio da transmissão do estímulo nervoso entre neurônio e músculo, causando imobilização e paralisia (LASOTA & DYBAS, 1991; BLOOMQUIST, 1996). As abelhas tem grande sensibilidade à abamectina, uma vez que a DL50 exige um valor muito baixo, e também oferece toxicidade aguda dada a sua exposição por contato em folhas e flores contaminadas (BAI & OGBOURNE, 2016). Entretanto, a toxicidade pode oferecer menos risco após 24 horas desde a aplicação, pois sua meia-vida é curta (menor do que 24 horas) (LUMARET et al., 2012), e sua rápida dissipação minimiza potenciais ameaças.

Outra preocupação relacionada à exposição da abamectina sob as abelhas é a resistência adquirida das pragas contra essa substância, pois pode levar a um aumento de uso nos cultivos para controle de praga (BAI & OGBOURNE, 2016). Entretanto, essa resistência não é estável, ela diminui dentro de seis meses após a interrupção do uso do inseticida (SATO et al., 2005). Uma alternativa para evitar a alta toxicidade da abamectina em organismos não-alvo é não fazer uso desse inseticida ininterruptamente.

O uso de inseticidas vem aumentando em resposta a crescente produção de alimento. O cultivo de soja vem se destacando e os fatores que tem contribuído para a expansão do consumo mundial de soja são: mudança de poder aquisitivo em países em desenvolvimento e, logo, mudança no hábito alimentar (troca de cereais por carne bovina, suína e frango); avanços científicos em tecnologias para manejo de solos; e implantação do manejo integrado de pragas (FREITAS & PINHEIRO, 2010). As regiões brasileiras que mais produzem soja são centro-oeste e sul. Entretanto, uma nova fronteira agrícola se formou nos meados de 2011 na região norte e nordeste (CONAB, 2019). Os produtos finais dos cultivos de soja no Brasil são em maior parte para a exportação do que para importação e a área plantada por região vem sofrendo um

aumento significativo na região norte, logo, o uso de inseticidas também sofre esse aumento (CONAB, 2019).

Para a utilização dos inseticidas, as concentrações recomendadas para o acetamiprido podem variar de 50 µg/mL a 150 µg/mL dependendo do método de aplicação e tipo de cultivo, porém a DL50 desse inseticida para *S. aff. xanthotricha* foi avaliada em 0,494 µg/mL, valor muito menor ao recomendável. As instruções de uso de aplicação do acetamiprido para a cultura de soja é de iniciar com um tratamento preventivo ou quando observado os primeiros adultos de *Bemisia tabaci* (mosca-branca), repetindo a aplicação após intervalo de dez dias e intercalando com produtos de modo de ação diferentes para evitar a resistência da praga. E recomenda-se fazer ao máximo duas aplicações por ciclo da cultura. A menor dose é utilizada para o tratamento preventivo (AGROFIT, 2019). Para abamectina o valor recomendável em cultivo de soja para aplicação é de 0,20 - 0,30 Litros/ha, correspondente a, aproximadamente, 0,025 Litros/m². As instruções de aplicação é dar início quando a infestação do ácaro *Tetranychus urticae* for detectada e efetuar no máximo duas aplicações com intervalo de 10 a 14 dias (AGROFIT, 2019).

A maior parte da contaminação das abelhas pelos agrotóxicos ocorre durante a atividade de forrageio, quanto maior a quantidade de plantas tratadas pelos defensivos no período de floração, maior a quantidade de visitantes florais e polinizadores, logo, maior a contaminação (RIELD et al., 2006). De acordo com PINHEIRO & FREITAS (2010), para evitar a contaminação por agrotóxicos, os cuidados devem ser: manter os cultivos próximos a áreas naturais; aplicar agrotóxicos no solo (quando houver essa possibilidade) que sejam de menor risco para as abelhas e fracionar as aplicações em culturas perenes; manter faixas de plantas nativas entre as plantas do cultivo dependentes da polinização, retirando-as no período de floração do cultivo; respeitar

limites estabelecidos em relação ao tempo residual (RT) de cada substância e evitar os acima de 8h; evitar pulverização quando a temperatura estiver muito baixa ou muito alta, pois isso aumenta o RT; não aplicar o produto em época de floração; usar defensivos menos agressivos aos organismos não alvo; respeitar às instruções presentes na bula de cada defensivo e isolar as colônias de abelhas próximas a cultivos que são tratados com pulverização intensa. Ainda, as tomadas de decisões de controle devem se basear no nível de ataque, no número e tamanho dos insetos pragas e no estágio de desenvolvimento da soja (FREITAS & PINHEIRO, 2010).

5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que a intoxicação por contato por concentrações subletais do acetamiprido é mais tóxica para a espécie *S. aff. xanthotricha* quando comparada a abamectina, embora os dois inseticidas tenham se apresentado altamente tóxicos para a espécie. Dentre os parâmetros avaliados é possível destacar que embora o acetamiprido seja mais tóxico, o tempo letal necessário é maior para esse inseticida do que para a abamectina.

Os resultados obtidos neste trabalho são exemplos que nos possibilitam ilustrar a importância dessas pesquisas com abelhas nativas, principalmente na região amazônica a qual vem sofrendo mudanças bruscas decorrentes de ações antrópicas. E também vem com o intuito de reforçar a necessidade de estudos comportamentais dessas espécies para colaborar com a preservação destas.

Deve haver um comprometimento com o uso correto desses compostos químicos em cultivos, uma vez que em campo as condições de intoxicação extrapolam o que foi avaliado em laboratório, podendo afetar não só os indivíduos intoxicados diretamente,

como as colônias e proles também. Assim como é importante a padronização desses parâmetros avaliados em espécies nativas brasileiras.

Essas pesquisas são fundamentais para o entendimento de fatores que causam o declínio das abelhas, para que seja feito um manejo correto e para que a preservação das espécies seja realizada, evitando terceiros prejuízos ao ecossistema.

6. Referências Bibliográficas

AGROFIT – Sistema de Informação sobre Agrotóxicos.

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Acesso em 20 de nov de 2018.

AGUILAR, R., ASHWORTH, L., GALETTO, L., & AIZEN, M. A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9(8), 968–980. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00927.x>

ARCE, A. N., RAMOS RODRIGUES, A., YU, J., COLGAN, T. J., WURM, Y., GILL, R. J. (2018). Foraging bumblebees acquire a preference for neonicotinoid-treated food with prolonged exposure. *Proc. R. Soc. B.* <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0655>

ARENA, M., SGOLASTRA, F. (2014). A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology* 23: 324–334. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1190-1>

ARMENGAUD, C., LAMBIN, M., GAUTHIER, M. (2002). Effects of imidacloprid on the neural processes of memory in honey bees. See Ref. 48a, pp. 85–100. <https://doi.org/10.1201/9780203218655.ch6>

ASHMAN, T. L., KNIGHT, T. M., STEETS, J. A., AMARASEKARE, P. et al. (2004). "Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and

consequences." *Ecology* 85(9): 2408-2421. Copyright by the Ecological Society of America. <https://doi.org/10.1890/03-8024>

BAI, S. H., OGBOURNE, S. (2016). Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere*, 154, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.113>

BECHER, M. A., OSBORNE, J. L., THORBEEK, P., KENNEDY, P. J., GRIMM, V. (2013). Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. *J. Appl. Ecol.* 50(4), 868–880. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12112>

BIESMEIJER, J. C., SLAA, E. J. (2004). Information Flow Organization of Stingless Bee Foraging, *Apidologie*, v. 35, p. 143-157. <https://doi.org/10.1051/apido:2004003>

BLACQUIÈRE, T., SMAGGHE, G., VAN GESTEL, C. A. M., & MOMMAERTS, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>

BLOOMQUIST, J. R. (1996). Ion channels as target for insecticides. *Annu Rev Entomol* 41: 163-190. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.001115>

BORTOLLI, L., MONTANARI, R., MARCELINO, J., MENDRZYCHI, P., MAINI, S., PORRINI, C. (2003). Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate

and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology, Bologna*, v. 56, n. 1, 63–67.

BPBES – Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos. <https://www.bpb.es.net.br/produto/polinizacao-producao-de-alimentos/>. Acesso em 20 de Mar de 2019.

BRITAIN, C., POTTS, S. (2011). The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic Appl. Ecol.*, 12, 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2010.12.004>

CARVALHO, S. M., CARVALHO, G. A., CARVALHO, C. F., BUENO FILHO, J. S. S., BAPTISTA, A. P. M. (2009). Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 76, n. 4, 597–606.

CHAM, K. O., NOCELLI, R. C. F., BORGES, L. O., VIANA-SILVA, F. E. C., TONELLI, C. A. M., MALASPINA, O., MENEZES, C., ROSA-FONTANA, A. S., BLOCHTEIN, B., FREITAS, B. M., PIRES, C. S. S., OLIVEIRA, F. F., CONTRERA, F. A. L., TOREZANI, K. R. S., RIBEIRO, M. F., SIQUEIRA, M. A. L., ROCHA, M. C. L. S. A. (2018). Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. *Environmental Entomology*, Volume 48, Issue 1, February 2019, Pages 36–48. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy137>

CLAUDIANOS, C. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect molecular biology*, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x>

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em 02 de Jun de 2019.

COSTA, L., M. (2015). Avaliação dos efeitos associados dos inseticidas fipronil e imidacloprido sobre a mortalidade da abelha nativa *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). Dissertação (Dissertação em agricultura e ambiente) – UFSCar. Araras.

DECOURTYE, A., DEVILLERS, J., GENEQUE, E., LE MENACH, K., BUDZINSKI, H., CLUZEAU, S., PHAM-DELÈGUE, M. H. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48:242–50. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0262-7>

DEL SARTO, M. C. L. (2009). Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae). Dissertação (Dissertação em Entomologia) – UFV. Viçosa.

DEL SARTO, M. C. L., OLIVEIRA, E. E., GUEDES, R. N. C., & CAMPOS, L. A. O. (2014). Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 45(5), 626–636. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0281-6>

DESNEUX, N., DECOURTYE, A., DELPOECH, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>

DEVILLERS, J., DECOURTYE, A., BUDZINSKI, H., PHAM-DELEGUE, M. H., CLUZEAU, S., MAURIN, G (2007). Comparative toxicity and hazards of pesticides to APIS and non-APIS bees. A chemometrical study. *SAR QSAR Environ Res* 14(5–6):389–403. <https://doi.org/10.1080/10629360310001623980>

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em 08 de mar de 2019.

FAO (Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Organization). (2019). The state of the world’s biodiversity for food and agriculture. In: BÉLANGER, F., PILLING, D (eds.). Rome. 572 pp.

FELTON, J. C., OOMEN, P. A., & STEVENSON, J. H. (1986). Toxicity and Hazard of Pesticides to Honeybees: Harmonization of Test Methods. *Bee World*, 67(3), 114–124. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1986.11098883>

FOX, J., HONG, J. (2009). Effect displays in R for multinomial and proportional-odds logit models: extensions to the effects package. *Journal of Statistical Software* 32(1): 1–24. <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i01>

FRAZÃO, R. F. (2013). Abelhas Nativas da Amazônia e Populações Tradicionais: Manual de Meliponicultura. Instituto Peabiru. Belém, Brasil.

FREE, J. B. (1993). Insect Pollination of Crops. San Diego: Academic Press.

FREITAS, B. M., PINHEIRO, J. N. (2010). Efeitos Sub-letais dos Pesticidas Agrícolas e seus Impactos no Manejo de Polinizadores dos Agroecossistemas Brasileiros. *Oecologia Australis*, v. 14, n. 1, p. 282-298. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.17>

FROST, E. H., SHUTLER, D., & HILLIER, N. K. (2012). The proboscis extension reflex to evaluate learning and memory in honeybees (*Apis mellifera*): some caveats. *Naturwissenschaften*, 99(9), 677–686. <https://doi.org/10.1007/s00114-012-0955-8>

GAUTHIER, M. (2010). State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in learning and memory. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683, 97-115. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_9

HARDSTONE, M. C., SCOTT, J. (2010). Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Manag. Sci.* 66(66), 1171–1180. <https://doi.org/10.1002/ps.2001>

HELSON, B. V., BARBER, K. N., KINGSBURY, P. D. (1994) Laboratory toxicology of 6 forestry insecticides to 4 species of bee (Hymenoptera, Apoidea). *Arch Environ Contam Toxicol* 27(1):107–114. <https://doi.org/10.1007/BF00203895>

JACOB, C. R., SOARES, H. M., NOCELLI, R. C., MALASPINA, O. (2014). Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest Management Science*, 71(1), 114–122. <https://doi.org/10.1002/ps.3776>

JESCHKE, P; NAUEN, R; SCHINDLER, M; ELBERT, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.59, p.2897-2908. <https://doi.org/10.1021/jf101303g>

JOHANSEN, C. A., MAYER, D. F. (1990). *Pollinator Protection: a bee and pesticide handbook*. Wicwas Press, Cheshire.

JOHNSON, R. (2010). Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 120–125.

KEARNS, C. A., INOUYE, D. W. (1997). Pollinators, Flowering Plants, and Conservation Biology. *BioScience*, v. 47, n. 5, p. 297-306. <https://doi.org/10.2307/1313191>

KESSLER, S. C., TIEDEKEN, E. J., SIMCOCK, K. L., DERVEAU, S., MITCHELL, J., SOFTLEY, S. WRIGHT, G. A. (2015). Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature*, 521(7550), 74–76. <https://doi.org/10.1038/nature14414>

KETTERMAN, A. J.; SAISAWANG, C.; WONGSANTICHON, J. (2011). Insect glutathione transferases. *Drug metabolism reviews*, v. 43, n. 2, p. 253-265. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552911>

KEVAN, P. G., VIANA, B. F. (2003). The Global decline of Pollination Services. *Tropical Conservancy*, n. 4, v. 4, p. 3-8. <https://doi.org/10.1080/14888386.2003.9712703>

KLEIN, A., VAISSIÈRE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C., TSCHARNTKE, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Royal Soc. B* 274: 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

LADAS, A. (1972). Effect of certain internal factors on the resistance of honeybees to insecticides, *Apidologie* 3, 55-78. <https://doi.org/10.1051/apido:19720103>

LAMBIN, M., ARMENGAUD, C., RAYMOND, S., GAUTHIER, M. (2001). Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch Insect Biochem Physiol* 4:129–134. <https://doi.org/10.1002/arch.1065.abs>

LASOTA, J. A., DYBAS, R. A. (1991). Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. *Ann. Rev. Entom.* 36, 91e117. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.000515>

LU, C., WARCHOL, K. M., CALLAHAN, R. (2012). In situ replication of honeybee colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology*, v.65, n.1, p.99-106.

LUMARET, J.-P., ERROUSSI, F., FLOATE, K., ROMBKE, J., WARDHAUGH, K. (2012). A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in

terrestrial and aquatic environments. *Curr. Pharm. Biotech.* 13, 1004.

<https://doi.org/10.2174/138920112800399257>

MACEDO, R. C. (2016). Toxicidade do acetamiprido e dimetoato para abelha *Scaptotrigona postica* latreille, 1804. Dissertação (Dissertação em qualidade ambiental) – UFU. Uberlândia.

MATEUS, S. (1998). Abundância relativa, fenologia e visita as flores pelos Apoidea do cerrado da Estação Ecológica de Jataí. Dissertação (Mestrado Entomologia).

MCCABE, S. I., HARTFELDER, K., SANTANA, W. C., & FARINA, W. M. (2007). Odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in two stingless bee species in comparison to Africanized honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, 193(11), 1089–1099. <https://doi.org/10.1007/s00359-007-0260-8>

MICHELSEN, D. B., BRAUN, G. H.-U. (1987). Circling behavior in honey bees. *Brain Research*, 421(1-2), 14–20. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91269-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91269-8)

MOORE, D. (2001). Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *Journal of Insects Physiology* 47: 843-857. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00057-9)

MORAES, S. S., BAUTISTA, A. R. L., VIANA, B. F. (2000). Avaliação da toxicidade aguda (DL50 e CL50) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de contato. *An. Soc. Entomol. Bras.*, v. 29, n.1. <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000100004>

MORAIS, C. R., TRAVENÇOLO, B. A. N., CARVALHO, S. M., BELETTI, M. E., VIEIRA SANTOS, V. S., CAMPOS, C. F., CAMPOS JÚNIOR, E. O., PEREIRA, B. B., CARVALHO, N. M. P., REZENDE, A. A. A., SPANÓ, M. A., VIEIRA, C. U., BONETTI, A. M. (2018). Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). *Chemosphere* 206:632–642. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.153>

NOCELLI, R. C. F., ROAT, T. C., ZACARIN, E. C. M., MALASPINA, O. (2012). Riscos de pesticidas sobre as abelhas. In: SEMANA DOS POLINIZADORES, 3, Petrolina. Palestras e resumos. Petrolina: Embrapa Semiárido, (Embrapa Semiárido. Documentos, 249).

OKSANEN, J., BLANCHET, F. G., FRIENDLY, M., KINDT, R., LEGENDRE, P., MCGLINN, D., MINCHIN, P. R., O'HARA, R. B., SIMPSON, G. L., SOLYMOS, P., STEVENS, M. H. H., SZOECS, E., WAGNER, E. (2019). *vegan: Communityecologypackage*. R packageversion 2.5-4. Disponível em <https://www.R-project.org/package=vegan>. Acessado em 19/05/2019.

OSBORNE, J. L., WILLIAMS, I. H., CORBET, S. A. (1991). Bees, pollination and habitat change in the European Community. *Bee World*, v. 72, p. 99-116. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1991.11099088>

PALAZUELOS BALLIVIAN, J. M. P. (2008). Abelhas nativas sem ferrão - M̃g. São Leopoldo, Oikos.

PEREIRA, J. C., VINCENZI, M. L., LOVATO, P. E. (2003). Roland Ristow: uma contribuição ao estudo da agricultura sustentável. *Eisforia*, v. 1, n. 1, p. 63-97.

PEREIRA, A. M. (2010). Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas. Dissertação (Dissertação em Zoologia). Unesp – Rio Claro.

PINHEIRO, J. N., FREITAS, B. M. (2010). Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis*, v. 14, p. 266-281. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.16>

POTTS, S. G., BIESMEIJER, J. C., KREMEN, C., NEUMANN, P., SCHWEIGER, O., KUNIN, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

R Core Team. (2019). R: a language for statistical computing. Disponível em <https://www.R-project.org>. Acessado em 19/05/2019.

RICKETTS, T. H., REGETZ, J., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C., BOGDANSKI, A., GEMMILL-HERREN, B., GREENLEAF, S. S., KLEIN, A. M., MAYFIELD, M. M., MORANDIN, L. A., OCHIENG, A., POTTS, S. G., VIANA, B. F. (2008). Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecol. Lett.* 11, 499–515. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01157.x>

RIEDL, H.; JOHANSEN, E.; BREWER, L.; BARBOUR, J. (2006). How to reduce bee poisoning from pesticides. Oregon State University, Corvallis. PNW (Pacific Northwest Extension). 26 p.

ROCHA, M. C. L. S. A. (2012). Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: Ibama, 88p.

SANDOZ, J. C., ROGER, B., PHAM-DELÈGUE, M. H. (1995). Olfactory learning and memory in the honeybee: comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. C R Acad Sci Paris Sci Vie 318:749–755.

SATO, M. E., SILVA, M. Z. D., RAGA, A., SOUZA FILHO, M. F. D. (2005). Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. Neotrop. Entomol. 34, 991e998.
<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000600016>

SILVA, W. P., PAZ, J. R. L. (2012). Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica.

SILVEIRA, F. A., MELO, G. A. R., ALMEIDA, E. A. B. (2002). Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 253 p.

SPADOTTO, C. A., GOMES, M. A. F., LUCHINI, L. C., ANDREA, M. M. (2004). Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, p. 29.

STEVENS, M. H. H., SZOECS, E., WAGNER, E. (2019). Vegan: Community ecology package. R package version 2.5-4. Disponível em <https://www.R-project.org/package=vegan>. Acessado em 19/05/2019.

SUCHAIL, S., GUEZ, D., BELZUNCES, L. P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, v. 19, n. 7, p. 1901-1905. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190726>

TAKEDA, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. J Insect Physiol. 6:168–79. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(61\)90060-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(61)90060-9)

THOMPSON, H. M. (2001). Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.), Apidologie 32, 305-321. <https://doi.org/10.1051/apido:2001131>

THOMPSON, H. M. (2003). Behavioural effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. Ecotoxicology, v. 12, p. 317-330. <https://doi.org/10.1023/A:1022575315413>

TODA, N. R. T., SONG, J., & NIEH, J. C. (2009). Bumblebees exhibit the memory spacing effect. Naturwissenschaften, 96(10), 1185–1191. <https://doi.org/10.1007/s00114-009-0582-1>

TOMIZAWA, M., CASIDA, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>

UNDERWOOD R. B., VANENGELSDORP, D. (2007). Colony Collapse Disorder: Have We Seen This Before?

VALADARES, M. C. (2006). Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia*. Vol 3(2). p. 93-98. <https://doi.org/10.5216/ref.v3i2.2083>

VALDOVINOS-NÚÑEZ, G. R., QUEZADA-EUÁN, J. J. G., ANCONA-XIU, P., MOO-VALLE, H., CARMONA, A., SÁNCHEZ, E. R. (2009). Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of Economic Entomology*, v. 102, n. 5, p.1737-1742. <https://doi.org/10.1603/029.102.0502>

VAN DER STEEN, J. J. M. (2001). Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. *Apidologie*, 32(5), 399–406. <https://doi.org/10.1051/apido:2001139>

VANENGELSDORP, D., MEIXNER, M. D. (2010). A historical review of managed honeybee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80–S95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>

VENTURIERI, G. C. (2008). *Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. 2nd ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; 2008.