Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”

Impacto de inseticidas neonicotinoides em abelhas africanizadas e nativas sem ferrão (Hymenoptera: Apoidea): toxicidade, alterações na atividade de locomoção e riqueza de espécies em pomares de citros

Cynthia Renata de Oliveira Jacob

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Cynthia Renata de Oliveira Jacob
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Impacto de inseticidas neonicotinoides em abelhas africanizadas e nativas sem ferrão
(Hymenoptera: Apoidea): toxicidade, alterações na atividade de locomoção e riqueza de
espécies em pomares de citros
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PEDRO TAKAO YAMAMOTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Jacob, Cynthia Renata de Oliveira

Impacto de inseticidas neonicotinoides em abelhas africanizadas e nativas sem ferrão (Hymenoptera: Apoidea): toxicidade, alterações na atividade de locomoção e riqueza de espécies em pomares de citros/Cynthia Renata de Oliveira Jacob. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2019.

82 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Detecção residual 2. Hplc-UV 3. Inseticidas neurotóxicos 4. Toxicidade oral aguda 5. Função motora I. Título

Aos meus pais José Maria Jacob e Luiza Aparecida de Oliveira Jacob, minha irmã Jéssica
Fernanda de Oliveira Jacob e sobrinho Paulo Eduardo Silva Jacob pelo carinho, incentivo e apoio
em minha formação profissional e pessoal.

DEDICO

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Pedro T. Yamamoto pela orientação, ensinamentos, confiança e oportunidade para realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos fornecidos ao Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Exatas-ESALQ/USP (processos: 2013/50228-8 e 2014/15760-3) e ao Laboratório de Ecologia de Insetos; Departamento de Entomologia e Acarologia-ESALQ/USP (processo: 2014/16607-9)

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” (ESALQ/USP), pelos ensinamentos.

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” (ESALQ/USP) e seus funcionários por toda infraestrutura disponibilizada e serviços prestados para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro, pela colaboração e empréstimo de colônias de abelhas sem ferrão.

A todos os amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” (ESALQ/USP), em especial a amiga Carina Ap. S. Silva e à sua família por todo companheirismo, auxílio e tudo que fizeram por mim, sou imensamente grata.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (ESALQ/USP) em especial ao amigo Odimar Z. Zanardi pelo aprendizado, conversas, contribuição para a condução deste trabalho e toda paciência.

Aos amigos e colaboradores Profa. Simone Possedente de Lira e ao técnico de laboratório Felipe G. Andrino do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Exatas (ESALQ/USP), por toda infraestrutura disponibilizada, auxílio, aprendizado e contribuição para a condução deste trabalho.

Aos amigos e colaboradores Rafael de Andrade Moral, José Bruno Malaquias, Gabriel R. Rugno, Lucas Barros, Monique B. Oliveira, Carlos Roberto dos Santos, Hellen P. P. Leite, Emilia Notalgiacomo, Karen Viana, Rodrigo Faria, Matheus R. Moraes, sem a ajuda de cada um de vocês, esse trabalho não seria possível.

A todos que contribuíram de alguma maneira durante o doutorado para minha formação, crescimento profissional e, principalmente, pessoal.

Gratidão

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
1.1. Introdução geral.....	11
REFERÊNCIAS	14
2. DETECÇÃO DE IMIDACLOPRIDO EM FLORES DE CITROS E SEUS IMPACTOS SOBRE A RIQUEZA DE ABELHAS E ATIVIDADE MOTORA	19
RESUMO	19
ABSTRACT	19
2.1. Introdução.....	20
2.2. Material e Métodos.....	22
2.2.1. Análise de resíduos – Cromatografia Líquida (HPLC- UV)	22
2.2.1.1. Amostras.....	22
2.2.1.2. Extração	22
2.2.1.3. Quantificação de resíduos e condições do HPLC.....	23
2.2.2. Riqueza de espécies de abelhas	23
2.2.3. Ensaio de comportamento – Atividade de locomoção	24
2.2.3.1. Preparo da dieta com inseticida e insetos	24
2.2.3.2. Atividade de locomoção	24
2.2.4. Análise de Dados	25
2.3. Resultados.....	25
2.3.1. Análise de resíduos - Cromatografia Líquida (HPLC-UV).....	25
2.3.2. Riqueza de espécies de abelhas	26
2.3.3. Avaliação da atividade locomotora	27
2.4. Discussão	31
REFERÊNCIAS	36
3. IMPACTO DE QUATRO INSETICIDAS NEONICOTINOIDES AMPLAMENTE UTILIZADOS SOBRE <i>Tetragonisca angustula</i> (LATREILLE) (HYMENOPTERA: APIDAE)	41
RESUMO	41
ABSTRACT	41

3.1. Introdução	42
3.2. Material e Métodos	44
3.2.1. Insetos	44
3.2.2. Produtos Químicos	44
3.2.3. Ensaios	44
3.2.4. Avaliação dos níveis de suscetibilidade oral de <i>Tetragonisca angustula</i> a inseticidas neonicotinoides.....	45
3.2.5. Efeito de inseticidas neonicotinoides na atividade de locomoção de <i>Tetragonisca angustula</i>	45
3.3. Resultados e discussão	46
REFERÊNCIAS	52
4. TOXICIDADE ORAL AGUDA E IMPACTO DOS NEONICOTINOIDES SOBRE <i>Apis mellifera</i> L. E <i>Scaptotrigona postica</i> LATREILLE (HYMENOPTERA: APIDAE).....	59
RESUMO	59
ABSTRACT	59
4.1. Introdução	60
4.2. Material e métodos.....	62
4.2.1. Insetos	62
4.2.2. Produtos Químicos	62
4.2.3. Estimativa da concentração letal média oral (CL ₅₀)	62
4.2.4. Efeito dos inseticidas neonicotinoides nas habilidades de locomoção	63
4.2.5. Análise de dados	64
4.3. Resultados	65
4.3.1. Estimativa da concentração letal média oral (CL ₅₀)	65
4.3.2. Efeito dos inseticidas neonicotinoides nas habilidades de locomoção	67
4.4. Discussão	69
REFERÊNCIAS	74
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80

RESUMO

Impacto de inseticidas neonicotinoides em abelhas africanizadas e nativas sem ferrão (Hymenoptera: Apoidea): toxicidade, alterações na atividade de locomoção e riqueza de espécies em pomares de citros

Os polinizadores são organismos fundamentais para o funcionamento de ecossistemas naturais e agrícolas, incrementando mais de 75% na produção das culturas agrícolas. Dentre os animais que participam do processo de polinização, as abelhas são consideradas as mais efetivas. Entretanto, um constante declínio na população desses polinizadores vem sendo reportado em diversos países, levando a preocupações ecológicas e econômicas, devido às perdas, tanto na produtividade agrícola como na biodiversidade. Dentre as diversas hipóteses para o declínio, o uso intensivo de agrotóxicos na agricultura tem causado preocupação, já que muitos destes compostos possuem um amplo espectro de ação, atingindo não somente os organismos alvo, mas também insetos benéficos, como as abelhas. Assim, objetivou-se com este estudo avaliar resíduos do inseticida neonicotinoide imidacloprido em amostras de flores de citros e a sua influência na riqueza de espécies de abelhas presentes nos pomares, bem como os possíveis efeitos dessas concentrações na atividade locomotora de abelhas *Apis mellifera* africanizada, *Scaptotrigona postica* e *Tetragonisca angustula* após exposição oral em condições de laboratório. Além disso, estimou-se a concentração letal média (CL_{50}) dos neonicotinoides mais utilizados (acetamiprido, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam) para estas espécies de abelhas, e os níveis de comprometimento motor após exposição de abelhas a essas concentrações. Imidacloprido foi detectado em amostras de flores de todo os pomares, com maior concentração para área em Anhembi/SP (6,26 ng g⁻¹ de imidacloprido) e menor concentração em Barretos/SP (3,24 ng g⁻¹ de imidacloprido). Foram identificadas, no total, 17 espécies de abelhas visitando flores de citros, com predominância de *A. mellifera* em todos os pomares. No entanto, não houve relação entre a riqueza de espécies e de imidacloprido residual. Alterações significativas na atividade locomotora foram verificadas após exposição às concentrações de 0,006 e 6,26 ng µL⁻¹ de imidacloprido, com maior alteração nas variáveis de duração e frequência de repouso. Além disso, verificaram-se diferentes níveis de toxicidade entre os ingredientes ativos estudados, com menor toxicidade oral aguda para os compostos com radical ciano (acetamiprido e tiacloprido) e maior para os que apresentam radical nitro (imidacloprido e tiametoxam). A locomoção das três espécies de abelhas foi reduzida em relação ao controle após exposição a todos os neonicotinoides. Com menor nível de comprometimento quando expostas ao acetamiprido. Assim, os resultados obtidos neste estudo esclarecem os efeitos dos inseticidas neonicotinoides sobre as espécies de abelhas na região Neotropical, e contribuem para a formulação de estratégias para integrar o controle de pragas e conservação dos polinizadores.

Palavras-chave: Detecção residual; HPLC-UV; Inseticidas neurotóxicos; Toxicidade aguda oral; Função motora

ABSTRACT

Impact of neonicotinoid insecticides on Africanized and native stingless bees (Hymenoptera: Apoidea): toxicity, changes in locomotion activity and species richness in citrus orchards

Pollinators are fundamental organisms for the functioning of natural and agricultural ecosystems, increasing more than 75% the production of agricultural crops. Among the animals that participate in the pollination process, bees are considered the most effective. However, a steady decline in the population of these pollinators has been reported in several countries, leading to ecological and economic concerns, due to the losses in both agricultural productivity and biodiversity. Among the several hypotheses for the decline, the intensive use of pesticides in agriculture the fields has caused concern, as many of these compounds possess a broad spectrum of action, reaching not only the target organisms, but also beneficial insects, as bees. Thus, the objectives of this study were to detect and quantify the residual concentration of imidacloprid in samples of citrus flowers and if these concentrations influence the richness of bee species present in the orchards, as well as the possible effects of these concentrations on the locomotion activity of three bee species (Africanized *Apis mellifera*, *Scaptotrigona postica* and *Tetragonisca angustula*) after oral exposure under laboratory conditions. In addition, the median lethal concentration (LC₅₀) the most used neonicotinoids (acetamiprid, imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam) to these bee species was estimated, and the levels of motor impairment after bee exposure to these concentrations. Imidacloprid was detected in flower samples in all orchards, with a higher concentration in Anhembi/SP (6.26 ng g⁻¹ of imidacloprid) and lower concentration in Barretos/SP (3.24 ng g⁻¹ of imidacloprid). A total of 17 species of bees were identified visiting citrus flowers, predominating *A. mellifera* in all orchards. However, there was no relationship between species richness and residual imidacloprid concentrations in the flowers of each evaluated region. Significant changes in the activity bee locomotion were observed after exposure to concentrations of 0.006 and 6.26 ng µL⁻¹ of imidacloprid, with a higher level of impairment for the variables duration and frequency of rests. In addition, different levels of toxicity were observed among the active ingredients studied, with lower acute oral toxicity for cyano compounds (acetamiprid and thiacloprid) and higher for those with nitro radical (imidacloprid and thiamethoxam). The locomotion of the three bee species was reduced in relation to the control after exposure to all neonicotinoids, with a lower level of impairment when exposed to acetamiprid. Thus, the results obtained in this study shed light on the effects of neonicotinoid insecticides on bee species the Neotropical region, and contribute the formulation of strategies to integrate pest control and pollinator conservation.

Keywords: Residual detection; HPLC-UV; Neurotoxic insecticides; Acute oral toxicity; Motor function

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Introdução geral

A citricultura é uma das culturas mais importantes do Brasil, sendo o país líder mundial na produção de laranjas e suco concentrado. A produção brasileira responde por cerca de 76% do mercado internacional de suco de laranja e exporta cerca de 98% de sua produção (Kalaki & Neves 2017, Neves & Trombin 2017). O cultivo é realizado em praticamente todos os Estados da Federação, com um parque citrícola de aproximadamente 631 mil hectares de área cultivada, com produção estimada na safra 2018/2019 de 285,98 milhões de caixas de 40,8 kg (Fundo de Defesa da Citricultura 2019). Dentre as variedades de citros cultivadas no país estão as tangerineiras, as limeiras ácidas, os limões verdadeiros e as laranjeiras doces, sendo a última o produto de maior importância econômica para o país (Sanches et al. 2018).

Em busca de obter maior produtividade e qualidade dos frutos, estudos demonstram a importância da polinização por abelhas para o aumento da frutificação efetiva e desenvolvimento de frutos com maior peso, volume de polpa, equilíbrio acidez/açúcar e quantidade de micronutrientes, características estas que agregam valor econômico a estes produtos (Gamito et al. 2006, Malerbo-Souza et al. 2003, Malerbo & Halak 2013, Nascimento et al. 2011).

Dentre os animais que participam do processo de polinização, as abelhas se destacam como importantes agentes de polinização, uma vez que, apresentam alta diversidade morfológica entre as espécies e comportamento especializado, principalmente em regiões tropicais (Cardinal & Danforth 2013, Moore 2001, Richards & Koptur 1993). De acordo com estimativas da FAO (2004), 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo são polinizadas por alguma espécie de abelha, colaborando, dessa forma, com o incremento de mais de 35% na produção agrícola com importância alimentar humana (Costanza et al. 1997, Klein et al. 2007). Segundo Gallai et al. (2009), a polinização realizada por insetos gerou, em 2005, um valor estimado em 153 bilhões de euros, o que corresponde ao percentual de quase 10% do valor total da produção agrícola global.

Das cerca de 20.000 espécies de abelhas descritas no mundo (Ascher & Pickering 2019, Michener 2007), aproximadamente 5.000 espécies de abelhas estão presentes na região Neotropical (Freitas et al. 2009, Moure et al. 2007) e o Brasil conta com 1.902 espécies descritas (Ascher & Pickering 2019). As abelhas podem apresentar comportamento solitário, parassocial, subsocial e eussocial (Michener 2007). As relações sociais mais complexas, eussociais, constituem o principal grupo de insetos que visitam as flores de vários grupos de plantas em ecossistemas naturais e agrícolas (Michener 1979, Roubik 1989, Wilms et al. 1996). Em uma colônia existem

diferenças anatômicas, fisiológicas e comportamentais entre os indivíduos que resultam numa divisão nítida de trabalho. Enquanto a rainha e o zangão possuem função reprodutiva, as operárias são responsáveis pela realização de atividades para a manutenção do ninho. Elas realizam, inicialmente, cuidados com a cria, construção de células, armazenamento de alimento e desidratação de néctar, de acordo com a idade e necessidade da colônia. A partir de 21 dias de idade, as operárias realizam atividades fora do ninho com a coleta de pólen e néctar, podendo atuar, assim, como agentes polinizadores (Free 1980).

Entre as espécies, *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae), está amplamente distribuída no mundo, devido a sua grande capacidade de adaptação a diferentes climas, hábitos alimentares generalistas e fácil manejo (Free 1980). No Brasil, a maioria dos ninhos naturais encontrados correspondem às formas híbridas, denominadas *A. mellifera* africanizada, provenientes do cruzamento de diversas subespécies originárias da Europa e África (Imperatriz-Fonseca et al. 1993). Por sua vez, os meliponíneos (Meliponini) ou abelhas nativas sem ferrão, têm distribuição subtropical e tropical no mundo (Nogueira-Neto 1997). O Brasil possui grande riqueza, com aproximadamente 244 espécies, com grande diversidade morfológica, tamanho corporal, preferências florais e fisiologia (Nogueira-Neto 1997, Pedro 2014, Slaa et al. 2006). Além disso, esse grupo apresenta indivíduos de baixa agressividade, forrageamento contínuo e constância floral, características que favorecem o processo de polinização de diferentes espécies de plantas, inclusive em casas de vegetação (Heard 1999, Michener 2007).

No entanto, as populações de abelhas têm diminuído substancialmente em diversos países, com tendência de reduzir ainda mais. Esta redução tem gerado preocupações ecológicas e econômicas, devido às perdas, tanto na produtividade agrícola como na biodiversidade. Em meados de 2006, detectou-se nos Estados Unidos um fenômeno conhecido hoje por “Desordem do Colapso das Colônias” (do inglês *Colony Collapse Disorder* - CCD), no qual os apicultores verificaram perdas de 50 a 90% no número de colônias de *A. mellifera* (van Engelsdorp et al. 2009).

Cientistas definiram algumas características do CCD e embora esse fenômeno ainda não esteja completamente compreendido, algumas hipóteses foram apresentadas, entre elas, a falta de recursos para a sobrevivência das colônias devido à fragmentação do habitat, existência de parasitas e patógenos, intensificação na utilização do solo, plantas geneticamente modificadas (OGM) e o uso indiscriminado de agrotóxicos (Blacquiere et al. 2012, Kluser & Peduzzi 2007, Neumann & Carrek 2010, Potts et al. 2016, Vidau et al. 2001). Estudos prévios têm apontado que nenhum fator isolado deve ser responsável pelo CCD, sustentando a hipótese de que esta

síndrome está relacionada ao estresse causado por diferentes fatores que atuam em combinação sobre os indivíduos da colônia (Cornman et al. 2012).

No Brasil, apicultores brasileiros têm relatado grande mortalidade de colônias de abelhas melíferas, com presença de elevado número de operárias mortas no entorno das colmeias, principalmente nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina (Lima & Rocha 2012, Pires et al. 2016). Estudos sustentam a hipótese de que, tanto a CCD quanto as mortalidades em massa verificadas no Brasil estão relacionadas à exposição das abelhas a agrotóxicos utilizados nos sistemas agrícolas, os quais podem apresentar efeitos sinérgicos com parasitas ou patógenos que acometem os indivíduos nas colônias (Mullin et al. 2010, Pettis et al. 2013). Portanto, estudos mais detalhados são necessários para verificar os níveis de toxicidade desses compostos sobre as abelhas melíferas e nativas do país.

Entre os agrotóxicos, os inseticidas neonicotinoides ganham especial destaque, pois apresentam características químicas e biológicas notáveis como sua sistemicidade em plantas, efeito residual prolongado, diferentes métodos de aplicação e alta eficácia contra insetos sugadores, tornando-se importantes ferramentas para a agricultura moderna (Elbert et al. 2008, Jeschke & Nauen 2008). Trata-se de uma classe de inseticidas com ação neurotóxica e age como mímicos dos neurotransmissores de acetilcolina, ligando-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina localizados nos neurônios pós-sinápticos (Suchail et al. 2004). Diferentemente da acetilcolina, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase, esses compostos não são degradados imediatamente. Assim, os impulsos nervosos são transmitidos de forma contínua e levam a hiperexcitação e colapso do sistema nervoso dos insetos (Belzunces et al. 2012, Jeschke & Nauen 2008).

Contudo, existe um intenso debate sobre os riscos ambientais dos neonicotinoides, uma vez que, após sua aplicação em plantas, baixas concentrações podem ser encontradas em pólen e néctar das culturas (Botias et al. 2015). Portanto, a dependência das abelhas por recursos florais, especialmente pólen e néctar para garantir o suprimento proteico e energético das abelhas (Gordón et al. 2014), podem causar efeitos deletérios que comprometem o desempenho das colônias. Além da mortalidade dos indivíduos, subdoses desses produtos pode induzir alterações fisiológicas que afetam o normal desenvolvimento, reprodução, aprendizagem, memória e longevidade das abelhas, reduzindo o tamanho populacional das colônia (Belzunces et al. 2012, Bonmatin et al. 2003, Brandt et al. 2016, Desneux et al. 2007, Devillers 2002, Goulson et al. 2015, Pisa et al. 2015, Stanley & Peetha 2016).

Diante deste contexto e da necessidade de estudos que avaliam os níveis de toxicidade dos inseticidas neonicotinoides sobre polinizadores, objetivou-se com estudo:

-Determinar e quantificar, por meio de cromatografia líquida, os resíduos do inseticida neonicotinoide imidacloprido em amostras de flores de citros [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] coletadas em seis diferentes áreas de cultivo de laranjeira-doce no estado de São Paulo;

-Avaliar a riqueza de espécies de abelhas que visitam as flores de citros tratados com imidacloprido;

-Avaliar os efeitos dos inseticidas neonicotinoides sobre a atividade locomotora de *A. mellifera* africanizada, *S. postica* e *T. angustula* após exposição oral de imidacloprido nas concentrações determinadas pelas análises de cromatografia;

-Estimar a concentração letal média (CL_{50}) de inseticidas neonicotinoides após exposição oral aguda de *A. mellifera*, *S. postica* e *T. angustula*;

-Avaliar as alterações na atividade locomotora das abelhas *A. mellifera*, *S. postica* e *T. angustula* após exposição às dietas contaminadas com as concentrações letais médias (CL_{50}) dos inseticidas neonicotinoides.

Referências

- Ascher, J.S., Pickering, J. 2018. Discover Life: bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species. Acesso 15 Julho 2019.
- Belzunces L.P., Tchamitchian S., Brunet J.L. 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*. 43, 348-370.
- Blacquire T., Smaghe G., van Gestel C.A.M., Mommaerts V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*. 21, 973-992.
- Bonmatin J.M., Moineau I., Charvet R., Fleche C., Colin M.E., Bengsch E.R. 2003. A LC/ APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal. Chem*. 75, 2027–2033.
- Botas C., David A., Horwood J., Abdul-Sada A., Nicholls E., Hill E., Goulson D. 2015. Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. *Environm. Sci. Technol*. 49, 12731-12740.
- Brandt A., Gorenflo A., Siede R., Meixner M., Bchler R. 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol*. 86, 40–47.
- Cardinal S., Danforth B.N. 2013. Bees diversified in the age of eudicots. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 280, 20122686.

- Costanza R., d'Arge R., de Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O'Neill R.V., Paruelo J., Raskin, R.G., Sutton P., van den Belt M. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*. 387, 253-260.
- Cornman R.S., Tarpy D.R., Chen Y., Jeffreys L., Lopez D., Pettis J.S., vanEngelsdorp D., Evans J.D. 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE* 7, e43562.
- Devillers J. 2002. The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. In: Devillers J., Pam-Delegue M. (eds). *Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals*. Taylor & Francis, London and New York, pp. 1-11.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 52, 81–106.
- Elbert A., Haas M., Springer B., Thielert W., Nauen R. 2008. Applied aspects of neonicotinoid use in crop protection. *Pest Manag. Sci.* 64, 1099–1105.
- Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2018. Produção brasileira de laranja em 2017. http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/laranja/b1_laranja.pdf. Acesso em 26 Dezembro 2018.
- FAO. 2004. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture: the international response. In: Freitas B.M., Pereira J.O.P. (eds). *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Imprensa Universitária, Fortaleza, Brasil, pp.19-22.
- Free J.B. 1980. *A organização social das abelhas (Apis)*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 79 pp.
- Freitas B.M., Imperatriz-Fonseca V.L., Medina L.M., Kleinert A.D.M.P., Galetto L., Nates-Parra G., Quezada-Euán J.J.G. 2009. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*. 40, 332-346.
- Fundo de Defesa da Citricultura, 2019. Reestimativa da safra de laranja 2018/19 do cinturão citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro – fechamento em abril/2019 https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0419_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf Acesso em 25 Maio 2019.
- Gallai N., Salles J.M., Settele J., Vaissière B.E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econom.* 68, 810–821.
- Gamito L.M., Malerbo-Souza D.T. 2006. Visitantes florais e produção de frutos em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Acta Sci. Anim. Sci.* 28, 483-488.
- Gordón M.A.R., Atlántico J.B., Ornos C. 2014. Polinizadores y biodiversidad. <http://apolo.entomologica.es/index.php?d=polbiodiv>>. Acesso 20 Junho 2014.

- Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E.L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255-1257.
- Heard T.A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 183-206.
- Imperatriz-Fonseca V.L., Ramalho M., Kleinert-Giovannini A. 1993. Abelhas sociais e flores: Análise polínica como método de estudo. In: Azoubel M.L., Bego L.R., Cortopassi-Laurino M., Giannini T.C., Guibu L.S., Imperatriz-Fonseca V.L., Kleinert-Giovannini A., Knoll F.R.N., Pirani J.R., Ramalho M., Simão-Bianchini R., Souza V.C. (eds). *Flores e abelhas em São Paulo*. São Paulo: Edusp, pp. 17-30.
- Jeschke P., Nauen R. 2008. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* 64, 1084-1098.
- Kalaki R.B., Neves M.F. 2017. Plano estratégico para o sistema agroindustrial citrícola brasileiro. *Rev. Gest. Prod.* 24, 338-354.
- Klein A.M., 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. R. Soc. B* 274, 303-313.
- Kluser S., Peduzzi P. 2007. Global pollinator decline: A literature review. UNEP/GRID, Europe, 10 pp.
- Lima M.C., Rocha S.A. 2012. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil. Brasília: Ibama, 88 pp.
- Malerbo-Souza D.T., Nogueira-Couto R.H., Couto L.A. 2003. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio). *Braz. J. Vet. Res. Anim.* 40, 237-242.
- Malerbo-Souza D.T., Halak A.L. 2013. Efeito da interação abelha-flor na produção de frutos em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Zootecnia Trop.* 31, 78-93.
- Michener C.D. 1979. The social behavior of bees: a comparative study. Harvard University Press, 404 pp.
- Michener C.D. 2007. The bees of the world, Baltimore, London: John Hopkins University Press. 953 pp.
- Moore D. 2001. Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *J. Insect Physiol.* 47, 843-857.
- Moure J.M., Urban D., Melo G.A.R. 2007. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region, Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia.

- Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J.S. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. PLoS ONE 5, e9754.
- Nascimento E.T., Pérez-Maluf R., Guimarães R.A., Castellani M.A. 2011. Diversidade de abelhas visitantes das flores de *Citrus* em pomares de laranjeira e tangerineira. Rev. Bras. Frutic. 33, 111-117.
- Neumann P., Carreck N.L. 2010. Honey bee colony losses. J. Apic. Res. 49, 1-6.
- Neves M.F., Trombin V.G. 2017. Anuário da citricultura 2017. São Paulo: CitrusBR., 57pp.
- Nogueira-Neto P. 1997. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. Nogueirapis, São Paulo, Brasil, 446 pp.
- Pedro S.R. 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). Sociobiology 61, 348-354.
- Pettis J.S., Lichtenberg E.M., Andree M., Stitzinger J., Rose R., vanEngelsdorp D. 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alter their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. PLoS ONE 8, e70182.
- Pires C.S.S., Pereira F.M., Lopes M.T.R., Nocelli R.C.F., Malaspina O., Pettis J.S., Teixeira E.W. 2016. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? Pesq. Agropec. Bras. 51, 422-442.
- Pisa L.W., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bonmatin J.M., Downs C.A., Goulson D., Kreutzweiser D.P., Krupke C., Liess M., McField M., Morrissey C.A., Noome D.A., Settele J., Simon-Delso N., Stark J.D., van der Sluijs J.P., van Dyck H., Wiemers M. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 68–102.
- Potts S.G., Imperatriz-Fonseca V.L., Ngo H.T., Aizen M.A., Biesmeijer J.C., Breeze T.D., Dicks L.V., Garibaldi L.A., Hill R., Settele J., vanBergen A.J. 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. Nature. 540, 220–229.
- Richards J.H., Koptur S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* L. (Rubiaceae). Am. J. Bot. 80, 31-40.
- Roubik D.W. 1989. Ecology and natural history of tropical bees. New York, Cambridge University Press, 314 pp.
- Sanches M.M., Wulff N.A., Silva M.R.L., Júnior R.P.L., Ferreira E.A., dos Santos J.F., Lopes-Silva M., Oliveira M.B., Angarten M.B.O., Ishida A.K.N., Oliveira R.P., Luccas B.E.G., Carbonari J.J., Martins O.M. 2018. Levantamento de huanglongbing (HLB) em citros no Brasil e diagnose dos agentes etiológicos. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E) 337, 21pp.

- Slaa E.J., Chaves L.A.S., Malagodi-Braga K.S., Hofstede F.E. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*. 37, 293-315.
- Stanley J., Preetha G. 2016. Pesticide toxicity to non- target organisms. Exposure, toxicity and risk assessment methodologies. Springer, New York, 501 pp.
- Suchail S., de Sousa G., Rahmani R., Belzunces L.P. 2004. In vivo distribution and metabolism of ^{14}C -imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manag. Sci.* 60, 1056-1062.
- vanEngelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpay D.R., Pettis J.S. 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* 4, e6481.
- Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Vigues B., Brunet J.L., Texier C., Biron D.G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L.P., Delbac F. 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* 6, e21550.
- Wilms W., Imperatriz-Fonseca V.L., Engels W. 1996. Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic rainforest. *Stud.Neotrop. Fauna Environ.* 31, 137-51.

2. DETECÇÃO DE IMIDACLOPRIDO EM FLORES DE CITROS E SEUS IMPACTOS SOBRE A RIQUEZA DE ABELHAS E ATIVIDADE MOTORA

RESUMO

A polinização é um serviço ecossistêmico fundamental nos sistemas naturais e agrícolas. Na cultura de citros, as abelhas desempenham importante papel na polinização, aumentando a produtividade das plantas. No entanto, o uso de pesticidas para o controle de pragas tem sido apontado como uma das causas do declínio polinizadores nos sistemas de produção. Neste estudo, a avaliação de resíduos de inseticida imidacloprido foi realizada em amostras de flores coletadas em seis áreas de cultivo de citros no Estado de São Paulo. Além disso, as abelhas que visitavam flores cítricas foram capturadas e identificadas para avaliar a riqueza de espécies de polinizadores de cada região. Adicionalmente, três espécies de abelhas foram expostas a duas concentrações de imidacloprido, e os efeitos sobre a atividade de locomoção das abelhas avaliados. Imidacloprido foi detectado em pólen nas concentrações que variaram de 3,24 a 6,26 ng g⁻¹, em todas as áreas amostradas. Foram coletadas 14 espécies de abelhas da família Apidae e três da família Halictidae. Entre as espécies, *Apis mellifera* foi a mais frequente, seguida por *Trigona spinipes* e *Exomalopsis analis*. Não houve influência das concentrações de imidacloprido na riqueza de espécies de abelhas nos campos avaliados. No entanto, houve redução na atividade de locomoção para todas as espécies de abelhas, após exposição oral a duas concentrações subletais (0,006 e 6,26 ng µL⁻¹ de imidacloprido). A duração e a frequência de repouso foram as variáveis com maior comprometimento para as três espécies de abelhas avaliadas. Esses resultados irão contribuir para o uso seguro de pesticidas, visando reduzir os efeitos colaterais nos polinizadores e na definição de estratégias de conservação da biodiversidade de polinizadores em agroecossistemas cítricos.

Palavras-chave: Neonicotinoide; Abelhas nativas; Cromatografia líquida; Locomoção

ABSTRACT

Pollination is a key ecosystem service in natural and agricultural systems. In citrus orchards, bees play an important role in pollination, increasing plant productivity. However, the use of pesticides for pest control has been pointed as one of the causes for the decline of pollinators' agents in production systems. In this study, the evaluation of imidacloprid insecticide residues was carried out in flower samples collected from six citrus growing areas in the State of São Paulo. In addition, the bees visiting citrus flowers were captured and identified to evaluate the pollinator species richness in each region. Furthermore, three bee species were exposed to two concentrations of imidacloprid, and the effects on bee locomotion activity were evaluated. Imidacloprid was detected in the pollen at concentrations ranging from

3.24 to 6.26 ng g⁻¹ in the sampled areas. Fourteen species of bees of the family Apidae and three of the family Halictidae were collected. Among species, *Apis mellifera* was the most frequent, followed by *Trigona spinipes* and *Exomalopsis analis*. There was no influence of imidacloprid concentrations on bee species richness in the evaluated fields. However, there was a reduction in locomotion activity for all evaluated bee species after oral exposure to two sublethal concentrations (0.006 and 6.26 ng µL⁻¹ of imidacloprid). Duration and frequency of rest were the variables with the highest impairment for the three bee species evaluated. These results will contribute to the safe use of pesticides, aiming to reduce the side effects on pollinators and in the definition of conservation strategies for pollinator biodiversity in citrus agroecosystems.

Keywords: Neonicotinoid; Native bees; Liquid chromatography; Locomotion

2.1. Introdução

A citricultura é uma das culturas mais importantes para economia do Brasil, com um parque citrícola de aproximadamente 631 mil ha, o país é responsável por 34% dos frutos e 56% do suco de laranja produzido em todo o mundo, gerando um Produto Interno Bruto (PIB) setorial de aproximadamente US\$ 6.5 bilhões de dólares por ano (Kalaki & Neves 2017, Neves & Trombin 2017, Sanches et al. 2018). Diversas espécies de artrópodes fitófagos se alimentam de plantas de citros, entretanto, apenas algumas delas causam dano econômico nos pomares (Chiaradia et al. 2013). Dentre as doenças e pragas que acometem essa cultura, o huanglongbing (HLB) tem sido a mais importante devido aos prejuízos econômicos causados para o agronegócio citrícola, com redução na qualidade e na produção dos frutos, além da necessidade de erradicação de plantas infectadas para prevenir a propagação da doença nos pomares (Belasque-Jr. et al. 2010, Neves et al. 2010).

Nos programas de manejo de populações do psíldeo asiático do citros, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae), inseto vetor das bactérias '*Candidatus* Liberibacter spp.' associadas ao HLB (Bové 2006, Langdon & Rogers 2017, Leiva et al. 2016) o controle químico é uma das principais ferramentas utilizadas, sendo imidacloprido, o inseticida mais utilizado. Imidacloprido é um inseticida do grupo dos neonicotinoides que atua como mímicos do neurotransmissor de acetilcolina no sistema nervoso dos insetos, causando hiperexcitação, colapso funcional do sistema nervoso e morte do inseto (Badawy et al. 2015, Belzunces et al. 2012, Jeschke & Nauen 2008).

Com alta sistemicidade, persistência e eficiência no controle de pragas sugadoras, imidacloprido se tornou um inseticida amplamente utilizado nos agroecossistemas (Elbert et al. 2008, Jeschke & Nauen 2008, Langdon & Rogers 2017). Sua aplicação pode ser feita via solo,

drench ou tronco, o que minimizam o contato direto e, conseqüentemente, os efeitos negativos sobre insetos benéficos, entre eles os polinizadores (Stansly & Qureshi 2008).

As abelhas são os polinizadores mais importantes economicamente, sendo responsáveis por 35% da produção de alimentos, incluindo àqueles com alto teor de nutrientes (Park et al. 2015). Das 124 principais culturas utilizadas na alimentação humana, cerca de 70% são dependentes da polinização de insetos para produção de frutos e sementes (Chagnon et al. 2015, Ramirez et al. 2018, Ricketts et al. 2008). O Brasil conta com aproximadamente 1.902 espécies de abelhas, das cerca de 20.000 espécies descritas no mundo (Ascher & Pickering 2019). É justamente essa diversidade e abundância de comunidades de abelhas que realizam um papel fundamental e eficiente dos serviços de polinização nos diferentes ecossistemas, incluindo os sistemas agrícolas (Garibaldi et al. 2014).

Entretanto, a presença de inseticidas sistêmicos em concentrações significativas nas principais fontes de alimento de abelhas, néctar e pólen, durante o período de floração, trazem o questionamento sobre os riscos ambientais causados pelos neonicotinoides (Bonmantin et al. 2003, Botias et al. 2015, Goulson et al. 2015, Pisa et al. 2015). Uma vez que, estes são coletados e transportados pelas abelhas forrageiras, contaminando e comprometendo a sobrevivência, desenvolvimento e manutenção de toda colônia (Goulson et al. 2015, Pisa et al. 2015).

Diante deste cenário e das informações limitadas sobre as concentrações de neonicotinoides em pólen durante a floração das plantas cítricas, objetivou-se com esse estudo: i) quantificar os resíduos de imidacloprido em amostras de flor de laranjeiras, coletas em diferentes pomares do Estado de São Paulo, Brasil, ii) avaliar a riqueza de abelhas presentes em pomares citrícolas, e a relação entre riqueza e concentração de imidacloprido presente em amostras de flores e; iii) avaliar as possíveis alterações sobre a atividade de locomoção de três espécies de abelhas (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758, *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) e *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)) após exposição oral a duas concentrações subletais, entre elas a concentração equivalente à detecção de imidacloprido nas amostras. Esses resultados irão fornecer dados sobre os níveis de contaminação em campo por imidacloprido e os possíveis impactos sobre as populações de abelhas, auxiliando, dessa forma na definição de estratégias de conservação de polinizadores nos agroecossistemas citrícolas.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Análise de resíduos – Cromatografia Líquida (HPLC- UV)

2.2.1.1. Amostras

As amostras para análise de resíduos do inseticida imidacloprido foram preparadas a partir dos estames (antera e filete) de flores de laranjeiras [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] coletadas em diferentes regiões. Foram escolhidos pomares localizados nos municípios de Anhembi (22°44'7.47"S 47°55'28.35"O), Barretos (20°25'58.97"S 48°36'16.16"O), Colômbia (20°21'9.10"S 48°41'11.07"O), Itápolis (21°21'34.03"S 49°3'4.49"O), Mogi Mirim (22°32'39.33"S 47°1'14.96"O) e Onda Verde (20°35'5.38"S 49°17'46.64"O) todos no Estado de São Paulo, Brasil. Nestes locais o manejo de pragas é realizado por meio de aplicações de inseticidas sintéticos, entre eles o neonicotinoide imidacloprido. As coletas ocorreram nos meses de outubro e novembro de 2016.

As flores foram coletadas aleatoriamente de 10 árvores ao longo de linhas intercaladas dos pomares, totalizando 10 repetições/amostras por área de cultivo, totalizando 60 amostras. As amostras foram mantidas em caixas com gelo, e posteriormente, os estames das flores foram retirados e mantidos sob a temperatura de -25 °C até o momento do seu processamento em laboratório.

2.2.1.2. Extração

Para extração, 5 g de estames foram adicionados em 5 mL de água ultra pura e 10 mL de acetonitrila (ACN), triturados em almofariz, transferidos para tubo Falcon (50 mL) e agitados vigorosamente por 1 min. Feito isso, 1 g de acetato de sódio, 4 g de sulfato de magnésio e 100 µL de ácido acético foram adicionados e novamente agitados por 5 min. O tubo com a solução foi colocado em uma centrífuga a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um recipiente de vidro e o extrato concentrado em evaporador rotativo (Speed Vac, Concentration Savant SC 210A) com taxa média de secagem. O extrato foi resuspendido em 5 mL de água ultra pura e submetido a um “cleanup” por extração em fase sólida por meio de uma coluna de fase estacionária de fase reversa (Discovery®, PSC-18 SPE, 1 g) e água ultra pura, acetonitrila (99,8%) e metanol (99,9%) como eluentes, resultando em três frações para análise. Posteriormente, as frações foram concentradas em evaporador rotativo, resuspendidas em 1 mL de metanol (99,9%) e transferidas para um frasco (Niell et al. 2015, com modificações) para análise por HPLC-UV.

2.2.1.3. Quantificação de resíduos e condições do HPLC

Uma solução estoque de imidacloprido (98,9% de pureza, Sigma Aldrich) foi preparada em metanol na concentração de 10 000 mg L⁻¹ e, posteriormente, diluições foram realizadas para obtenção nas concentrações finais de 1, 20, 100 e 500 mg L⁻¹. As frações foram analisadas no equipamento HPLC Agilent® 1100 Series UV/Vis com bomba quartenária, acoplado a um detector de ultravioleta MWD (Multiple Wavelength Detector). Uma coluna sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Phenomenex® Kinetex 5µ C₁₈ 100 A, 250 × 4,6 mm) foi utilizada como fase estacionária e os solventes metanol, acetonitrila e água ultra pura como fase móvel, em modo gradiente iniciando com H₂O:MeOH:ACN (78:2:20) até 100% MeOH, totalizando 14 minutos e permanecendo nesta última condição por 5 min para limpeza da coluna e depois a condição inicial foi reestabelecida. O volume de injeção foi de 10 µL da amostra, e a vazão de 1 mL min⁻¹. O comprimento de onda utilizado no detector UV/Vis para visualização do imidacloprido foi de 272 nm.

2.2.2. Riqueza de espécies de abelhas

Para a identificação e avaliação da riqueza de espécies de abelhas que visitaram as flores de citros, foram realizadas coletas em seis áreas de cultivo (item 2.2.1.1). A amostragem foi realizada por meio de coleta ativa, com auxílio de tubos Falcon (50 mL) e rede entomológica. Um observador caminhou ao longo de uma linha no interior do pomar, parando a cada 5 m em frente a uma árvore e coletou os insetos que estavam visitando as flores. Após 5 min, o observador se locomovia para mais 5 m de distância repetindo o procedimento. A amostragem de insetos foi realizada durante um único dia em cada pomar no período de janela de forrageamento entre 10:00 – 12:00 h (Vaissière et al. 2011, modificado).

Todas as abelhas capturadas na coleta ativa foram condicionadas em freezer e, posteriormente, realizada a identificação taxonômica de acordo com Michener (2007).

2.2.3. Ensaio de comportamento – Atividade de locomoção

2.2.3.1. Preparo da dieta com inseticida e insetos

Neste estudo, uma formulação comercial de imidacloprido (Provado 20%, m/v suspensão concentrada, Bayer Crop Science Ltda., Belford Roxo, RJ, Brasil) foi diluída em água e uma alíquota da solução estoque foi adicionada ao xarope de sacarose (50%) para preparar a dieta com 0,006 ng μL^{-1} de imidacloprido (maior concentração residual detectada em amostras de flor de laranjeira) e de uma concentração subletal acima de 6,26 ng μL^{-1} de imidacloprido. Alimento sem inseticida foi utilizado como controle

Abelhas operárias forrageiras de *A. mellifera*, *S. postica* e *T. angustula* foram coletadas diretamente na entrada das colônias no apiário e meliponário do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil.

2.2.3.2. Atividade de locomoção

As abelhas forrageiras foram coletadas e colocadas em gaiolas plásticas (250 mL) forradas, previamente, com papel de filtro. As operárias de *A. mellifera*, *S. postica* e *T. angustula* foram mantidas isoladas dos alimentos por 120, 60 e 30 min, respectivamente, para garantir que elas se alimentariam quando o ensaio fosse iniciado. Posteriormente, alimentos contaminados foram ofertados as abelhas por 2 h para *A. mellifera* e 1 h para *S. postica* e *T. angustula*. Durante esse período, as unidades experimentais foram mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de 28 ± 2 °C e $70 \pm 10\%$ UR, no escuro. Após o período de exposição ao alimento, grupos de 10 abelhas foram anestesiadas em gelo e transferidas para placas de Petri (150 mm diâmetro $\times$ 15 mm de altura) forradas com papel filtro. Após a aclimatização das abelhas (5 min), os vídeos foram iniciados, com uma câmera digital acoplada a um computador equipado com software de rastreamento de vídeo (EthoVision XT - Noldus Information Technology Inc., Wageningen, Holanda). As gravações para cada placa de Petri foram realizadas durante 5 min, em sala climatizada a 25 ± 2 °C, sob luz fluorescente artificial, no período da manhã.

O ensaio foi realizado seguindo um desenho de blocos com parcelas aleatorizadas. Cada bloco foi composto por 6 vídeos (3 tratamentos e 3 controles). Para cada tratamento, foram utilizadas 10 repetições (blocos) ($n = 300$). Posteriormente, os vídeos foram submetidos à análise utilizando um software de rastreamento de vídeo para avaliação da velocidade média (cm s^{-1}),

distância total percorrida na arena (cm), duração (s) e frequência (n) do tempo de repouso (período total interrompido durante os 5 min de gravação do vídeo) para as três espécies de abelhas. As avaliações entre espécies foram realizadas de modo independente.

2.2.4. Análise de Dados

Modelos lineares mistos foram ajustados aos dados de cromatografia, sendo o ano de coleta o efeito fixo, área e amostragem os efeitos aleatórios. Testes de razão de verossimilhança (LR) entre modelos aninhados foram realizados para avaliar a significância dos efeitos. Múltiplas comparações para efeitos aleatórios foram realizadas obtendo-se os intervalos de confiança de 95% para os valores preditos.

A riqueza de abelhas em cada área de estudo representou o número total de espécies capturadas durante os experimentos de campo. Posteriormente, foi calculada a média da quantidade de imidacloprido das amostras de flores de laranjeiras por área. Para avaliar a influência do neonicotinoide na riqueza de espécies de abelhas em cultivos de citros, foram realizados modelos de regressão linear simples e modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição Poisson no programa R versão 3.2.1 (R Development Core Team 2014). Além disso, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis.

Os efeitos do inseticida neonicotinoide na atividade de locomoção das abelhas foram comparados pelo teste *F*. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico “R”, versão 3.5.136.

Os dados de velocidade média, distância percorrida, duração e frequência de repouso não apresentaram normalidade e homogeneidade de variância e, portanto, transformações adequadas foram obtidas pelo método da potência máxima de Box-Cox (Box & Cox 1964), as pressuposições do modelo foram observadas após as transformações.

2.3. Resultados

2.3.1. Análise de resíduos - Cromatografia Líquida (HPLC-UV)

A quantificação do imidacloprido foi calculada pelas áreas de cada banda cromatográfica de cada concentração, e o coeficiente de correlação foi de 0,9984. Utilizando a mesma metodologia, foi realizada a quantificação do inseticida residual presente em cada amostra.

As frações aquosas, acetonitrilas e metanólicas foram analisadas e foi confirmada a adequação do protocolo de extração com a detecção do inseticida imidacloprido, sendo que este estava presente apenas na fase de acetonitrila.

O inseticida imidacloprido foi detectado em todas as seis áreas de coleta das amostras. Entretanto foram verificadas diferenças significativas entre o pomar em Anhembi/SP, que apresentou maior concentração média de imidacloprido ($6,26 \text{ ng g}^{-1}$) nas amostras e o pomar em Barretos/SP, com a menor concentração ($3,24 \text{ ng g}^{-1}$) (LR = 27,39; g.l. = 2; $p < 0,0001$). As outras áreas apresentaram valores intermediários a essas duas concentrações (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de inseticida imidacloprido residual em amostras de flor de laranjeira coletadas em pomares no Estado de São Paulo.

Região de Coleta	Média (ng g^{-1}) ($\pm$ EP)
Anhembi	$6,26 (\pm 0,35)$ a
Barretos	$3,24 (\pm 0,10)$ b
Colômbia	$4,20 (\pm 0,27)$ ab
Itápolis	$5,30 (\pm 0,73)$ ab
Mogi mirim	$4,27 (\pm 0,12)$ ab
Onda Verde	$4,05 (\pm 0,32)$ ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem em nível de significância, com base nos testes de razão de verossimilhança.

2.3.2. Riqueza de espécies de abelhas

No total, foram amostradas 17 espécies de abelhas visitando as flores de citros nas seis regiões de estudo (Figura 1). Os pomares em Barretos/SP e Colômbia/SP apresentaram a maior riqueza de espécies (oito espécies de abelhas), enquanto as áreas Anhembi/SP e Mogi Mirim/SP as menores (duas espécies de abelhas por área) (Figura 1). Apidae foi a família mais importante, com 14 espécies, o que correspondeu a 86,11% do total amostrado, seguida por Halictidae, com três espécies (13,89%). As espécies da tribo meliponini (abelhas sem ferrão) representaram 70,58% dos indivíduos coletados.

Não foi significativa a relação entre a riqueza de espécies de abelhas e as concentrações residuais de imidacloprido detectadas nas amostras de flores das seis áreas de coleta ($\rho = -0,61$; $p = 0,19$).

	<i>Augochlora cf. thalia</i>	<i>Augochlora sp.</i>	<i>Dialictus creusa</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Exomalopsis analis</i>	<i>Friesonellita varia</i>	<i>Geotrigona mombuca</i>	<i>Leurotrigona muelleri</i>	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	<i>Paratrigona subnuda</i>	<i>Plebeia droryana</i>	<i>Schwarziana quadripunctata</i>	<i>Tetragonisca angustula</i>	<i>Tetragona clavipes</i>	<i>Trigona helinata</i>	<i>Trigona recurva</i>	<i>Trigona spinipes</i>
Anhembi/SP																	
Barretos/SP																	
Colômbia/SP																	
Itápolis/SP																	
Mogi-Mirim/SP																	
Onda Verde/SP																	

Figura 1. Relação da riqueza de espécies de abelhas e sua ocorrência nas regiões de amostragem no cultivo de *Citrus* sp.

2.3.3. Avaliação da atividade locomotora

Neste estudo foi verificado que as duas concentrações subletais utilizadas nas dietas ofertadas causaram alterações comportamentais para todas as variáveis avaliadas (velocidade média, distância percorrida, duração e frequência de descanso) em relação ao grupo controle para todas as espécies de abelhas avaliadas (Tabela 2 e 3, respectivamente). Dentre as espécies, *T. angustula* apresentou o menor impacto sobre as variáveis avaliadas após exposição à concentração de $0,006 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, enquanto, *A. mellifera* apresentou maior nível de comprometimento motor, com aumento de cerca de 2,5 vezes ($F_{1,59} = 67,88$; $P = 1,12 \times 10^{-15}$) na duração de repouso em relação ao grupo controle. A velocidade média e distância percorrida foram as variáveis de menor nível de comprometimento, sendo *A. mellifera* a espécie mais sensível com redução de aproximadamente 1,5 vezes ($F_{1,59} = 64,71$; $P = 4,77 \times 10^{-15}$ e $F_{1,59} = 43,64$; $P = 8,79 \times 10^{-11}$, respectivamente), seguido por *S. postica* com redução de cerca de 1,2 vezes ($F_{1,59} = 26,90$; $P = 2,95 \times 10^{-7}$ e $F_{1,59} = 10,36$; $P = 0,001$, respectivamente) e *T. angustula* com ausência de diferença entre a velocidade média do grupo tratado e controle, e redução de apenas 1 vez na distância percorrida pelas abelhas ($F_{1,59} = 0,01$; $P = 0,90$ e $F_{1,59} = 2,08$; $P = 0,14$, respectivamente) em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Enquanto a exposição de abelhas à concentração de $6,26 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ demonstraram maior sensibilidade das espécies de abelhas nativas, com maior comprometimento motor de *S. postica*, onde a duração de repouso aumentou cerca de 32 vezes ($F_{1,59} = 3536,49$; $P = 2,2 \times 10^{-16}$) e de *T. angustula* cerca de 3,5 vezes ($F_{1,59} = 204,32$; $P = 2,2 \times 10^{-16}$) em relação ao controle. A velocidade média e distância percorrida apresentaram diminuição de aproximadamente 1,3 vezes para *A. mellifera* ($F_{1,59} = 26,48$; $P = 3,6 \times 10^{-7}$ e $F_{1,59} = 24,30$; $P = 1,06 \times 10^{-6}$, respectivamente), 5,0 vezes para *S. postica* ($F_{1,59} = 2248,75$; $P = 2,2 \times 10^{-16}$ e $F_{1,59} = 4,15$; $P = 0,0451$, respectivamente) e de cerca de 2,5 vezes para *T. angustula* ($F_{1,59} = 252,94$; $P = 2,2 \times 10^{-16}$ e $F_{1,59} = 283,52$; $P = 2,0 \times 10^{-16}$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 2. Avaliação da atividade de locomoção após exposição oral de abelhas operárias forrageiras de *Apis mellifera*, *Scaptotrigona postica* e *Tetragonisca angustula* à concentração de $0,006 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ do inseticida imidacloprido.

Espécies	Grupos	Locomoção		Tempo de Repouso	
		Velocidade média (cm s^{-1})	Distância percorrida (cm)	Média (s)	Frequência (n)
<i>A. mellifera</i>	Controle	1,59 ($\pm 0,05$) a	0,85 ($\pm 0,03$) a	9,71 ($\pm 0,86$) a	44,46 ($\pm 1,43$) a
	Tratamento	1,06 ($\pm 0,04$) b	0,60 ($\pm 0,02$) b	24,83 ($\pm 2,87$) b	33,72 ($\pm 1,38$) b
	$F_{1,59}$	64,71	43,64	67,88	38,46
	P	$4,77 \times 10^{-15}$	$8,79 \times 10^{-11}$	$1,12 \times 10^{-15}$	$1,05 \times 10^{-9}$
<i>S. postica</i>	Controle	1,39 ($\pm 0,03$) c	0,65 ($\pm 0,01$) c	13,18 ($\pm 2,48$) c	55,85 ($\pm 1,56$) c
	Tratamento	1,15 ($\pm 0,03$) d	0,57 ($\pm 0,01$) d	27,95 ($\pm 3,75$) d	44,46 ($\pm 1,69$) d
	$F_{1,59}$	26,90	10,36	35,16	30,27
	P	$2,95 \times 10^{-7}$	0,001	$5,15 \times 10^{-9}$	$5,60 \times 10^{-8}$
<i>T. angustula</i>	Controle	1,25 ($\pm 0,02$) e	0,61 ($\pm 0,01$) e	13,32 ($\pm 2,37$) e	47,34 ($\pm 1,10$) e
	Tratamento	1,23 ($\pm 0,03$) e	0,58 ($\pm 0,01$) e	18,54 ($\pm 3,07$) e	42,89 ($\pm 1,27$) f
	$F_{1,59}$	0,01	2,08	0,0014	6,52
	P	0,90	0,14	0,97	0,01

Médias seguidas das mesmas letras evidenciam que não existe diferença estatística entre os grupos (inseticida *vs* controle) com base no teste F .

Tabela 3. Avaliação da atividade de locomoção após exposição oral de abelhas operárias forrageiras de *Apis mellifera*, *Scaptotrigona postica* e *Tetragonisca angustula* à concentração de 6,26 ng μL^{-1} do inseticida imidacloprido.

Espécies	Grupos	Locomoção		Tempo de Repouso	
		Velocidade média (cm s ⁻¹)	Distância percorrida (cm)	Média (s)	Frequência (n)
<i>A. mellifera</i>	Controle	1,00 ($\pm$ 0,03) a	0,50 ($\pm$ 0,01) a	22,18 ($\pm$ 2,79) a	38,09 ($\pm$ 1,55) a
	Tratamento	0,75 ($\pm$ 0,03) b	0,38 ($\pm$ 0,01) b	41,03 ($\pm$ 4,24) b	25,90 ($\pm$ 1,19) b
	$F_{1,59}$	28,41	25,52	30,93	38,42
	P	$1,39 \times 10^{-7}$	$5,83 \times 10^{-7}$	$4,06 \times 10^{-8}$	$1,07 \times 10^{-9}$
<i>S. postica</i>	Controle	1,65 ($\pm$ 0,02) c	0,83 ($\pm$ 0,01) c	4,22 ($\pm$ 0,51) c	64,73 ($\pm$ 1,12) c
	Tratamento	0,31 ($\pm$ 0,01) d	0,16 ($\pm$ 0,006) d	136,85 ($\pm$ 5,95) d	4,48 ($\pm$ 0,34) d
	$F_{1,59}$	2302,64	2302,53	3536,49	4318,16
	P	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$
<i>T. angustula</i>	Controle	0,48 ($\pm$ 0,01) e	0,23 ($\pm$ 0,008) e	47,37 ($\pm$ 4,41) e	18,15 ($\pm$ 0,85) e
	Tratamento	0,18 ($\pm$ 0,01) f	0,08 ($\pm$ 0,009) f	166,59 ($\pm$ 7,27) f	2,87 ($\pm$ 0,22) f
	$F_{1,59}$	302,49	299,49	204,32	533,57
	P	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,2 \times 10^{-16}$	$2,0 \times 10^{-16}$

Médias seguidas das mesmas letras evidenciam que não existe diferença estatística entre os grupos (inseticida *vs* controle) com base no teste F .

2.4. Discussão

Neste estudo, a detecção de imidacloprido residual em amostras de flor de laranjeira foi positiva para todas as áreas de coleta com variação entre 3,24 - 6,26 ng g⁻¹. Concentrações maiores foram relatadas por Byrne et al. (2014) para detecção de imidacloprido (9,58 ng mL⁻¹) e dois de seus metabólitos (5-OH imidacloprido e oleofina) em néctar floral, após aplicação por pulverização foliar, 232 dias antes da floração das plantas cítricas. Segundo os autores, plantas tratadas com duas aplicações de imidacloprido antes da florada, apresentaram concentrações residuais 2,5 vezes maior do que àquelas que receberam apenas uma aplicação. Apesar do reduzido número de estudo com frutíferas, Coslor et al. (2018) detectaram imidacloprido em pólen (1,15 ng g⁻¹) e néctar (7,36 ng g⁻¹) de macieiras, após aplicação via tronco do inseticida durante a primavera. No entanto, em árvores que receberam inseticida no outono anterior, não foi detectado resíduo de imidacloprido, demonstrando que a época de aplicação pode diminuir os riscos de exposição das abelhas aos resíduos deste inseticida.

Estudos prévios de quantificação de imidacloprido residual em pólen, após tratamento de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), milho (*Zea mays* L.), canola (*Brassica napus* L.) e mostarda (*Brassica juncea* (L.) Czern.) verificaram concentrações variáveis entre 0,0 e 3,0 ng g⁻¹ (Bonmantin et al. 2005, Choudhary et al. 2008, Pohorecka et al. 2012). Stoner & Eitzer (2012) encontraram variações nas concentrações de imidacloprido em pólen de abóbora (*Cucurbita pepo* var. “Multipik,” “Sunray” e “Bush Delicata”), de acordo com o método de aplicação deste inseticida. A aplicação em solo antes de semeadura resultou nas maiores concentrações do neonicotinoide (28,0 ng mL⁻¹) em comparação com a aplicação por irrigação após transplante (15,0 ng mL⁻¹), confirmando que os métodos de aplicação do inseticida alteram os níveis de resíduos no pólen das plantas. Também na cultura de abóbora (*Cucurbita pepo* L. var. “Howden”), Dively & Kamel (2012) constataram que as concentrações mais elevadas de imidacloprido foram observadas no pólen de plantas que receberam pulverização foliar e aplicação via irrigação por gotejamento em relação às plantas que receberam aplicações de inseticidas via tratamento de sementes, drench ou aplicação durante o plantio, com níveis médios de 122 ng g⁻¹ de imidacloprido em pólen.

Esses estudos demonstram que a exposição potencial de polinizadores aos resíduos de imidacloprido presentes no pólen é influenciada por diferentes variáveis, como o método de aplicação, espécie e estágio de crescimento da planta, tipo de solo, irrigação, quantidade de inseticida aplicado, intervalo entre aplicação e o início da florada (Bonmantin et al. 2005, Byrne et al. 2014, Dively & Kamel 2012, Stoner & Eitzer 2012). Segundo Dively & Kamel (2012), essas

concentrações residuais encontradas em matrizes empregadas na alimentação de abelhas não são consideradas alarmantes, uma vez que estes valores não atingem as doses letais médias (DL_{50}) previamente reportadas em avaliações de toxicidade de pesticidas para abelhas *A. mellifera*. Entretanto, deve-se considerar a sensibilidade de espécies de abelhas não-*Apis*, além de que, a exposição de abelhas às concentrações subletais podem alterar o comportamento de forrageamento, habilidades cognitivas de memória e aprendizagem, desenvolvimento e sobrevivência de crias, e as atividades desempenhadas para a manutenção da colônia (Goulson et al. 2015, Pisa et al. 2015).

O estudo de levantamento de visitantes das flores de citros demonstrou predominância de indivíduos da família Apidae. Essa é a família mais diversificada de abelhas, contendo o maior número de tribos do que qualquer outra família, além de ampla distribuição geográfica (Silveira et al. 2002, Michener 2007). Muitas espécies dessa família são generalistas florais (poliléticas), forrageando uma ampla gama de espécies de plantas o que aumenta a probabilidade de captura (Kleinert et al. 2009).

A espécie exótica, *A. mellifera* africanizada, apresentou maior frequência em todos os pomares amostrados. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados em diferentes anos e localidades que relatam a predominância dessa espécie em pomares cítricos paulistas (Gamito et al. 2006, Malerbo-Souza et al. 2003, Nascimento et al. 2011). Malerbo-Souza et al. (2003) relatam a presença frequente de *A. mellifera*, seguida de *T. spinipes* e visitas esporádicas de *Xylocopa* spp. em pomares de citros durante dois anos de avaliação. *T. spinipes* e *T. angustula* são espécies presentes em sistemas de produção de citros, no entanto, são consideradas dominantes (Nascimento et al. 2011) ou acessórias de acordo com o local de captura (Gamito et al. 2006). Em estudo realizado em seis pomares de citros durante os anos de 2001 a 2011, Malerbo-Souza & Halak (2013) verificaram que as abelhas *A. mellifera* foram as visitantes mais frequentes nas flores das laranjeiras, representando cerca de 78% das espécies observadas, enquanto que, *T. spinipes* e *T. angustula* representaram cerca de 16%, e *Xylocopa* sp. cerca de 0,6% das visitas.

Neste estudo, verificamos a presença de 17 espécies de abelhas capturadas enquanto realizavam a coleta de recursos florais. Um número elevado de espécies em pomares de citros também foi relatado por Nascimento et al. (2011) em amostragem realizada em Salinas/MG, com captura de 12 espécies de abelhas, das quais apenas 2 delas são semelhantes às obtidas no presente estudo. Outro fator semelhante é a maior presença de espécies de abelhas sociais, o que contribui para alta densidade de indivíduos nas flores desta cultura. Uma vez que, o número de visitas e o comportamento das abelhas na flor influenciam na frutificação e produção de frutos de

melhor qualidade (Malerbo-Souza et al. 2003, Malerbo-Souza & Halak 2013, Nascimento et al. 2011, Toledo et al. 2013).

Apesar do uso indiscriminado de agrotóxicos em áreas agrícolas ser considerado um dos principais causadores do declínio das populações de abelhas silvestres e manejadas (Pisa et al. 2015, Toledo et al. 2013), no presente estudo não houve relação significativa entre as concentrações de imidacloprido detectadas em amostras de flores de laranjeiras e o número de espécies de abelhas capturas. Estudos realizados em áreas de cultivo de maçãs indicaram redução na abundância de comunidades e na riqueza de espécies de abelhas silvestres de modo linear com o aumento no uso de pesticidas (Park et al. 2015). Tuell & Isaacs (2010) relataram que a riqueza de espécies e abundância de abelhas silvestres em áreas de cultivo de mirtilo sofreram impactos negativos em locais onde o manejo de pragas era realizado com grande número de aplicações de pesticidas. Segundo os autores, a frequência de aplicação e a toxicidade residual dos inseticidas são componentes importantes para avaliação de risco e impactos sobre as comunidades de polinizadores. No entanto, neste estudo, não houve aplicações de inseticidas sistêmicos, o que pode ter diminuído o risco de contaminação do néctar e pólen por resíduos durante a florada.

O número reduzido de espécies de abelhas capturadas em algumas áreas, no presente estudo, possivelmente, está relacionado aos programas de manejo implantados, já que estes incluem múltiplos inseticidas, com diferentes modos de ação e taxas de aplicação durante o crescimento da cultura (Tuell & Isaacs 2010). Além das práticas agrícolas utilizadas, a complexidade da paisagem circundante e a distância entre as áreas de cultivo e habitats naturais (Kennedy 2013, Kremen et al. 2002, Kremen et al. 2007) também podem ter contribuído para o baixo número de espécies. Segundo alguns autores, esses são fatores importantes para a abundância e diversidade de abelhas nativas, e seu comprometimento causa a redução dos serviços de polinização e, conseqüentemente, interfere na produção de culturas dependentes de polinizadores (Ricketts 2004, Ricketts et al. 2008, Winfree & Kremen 2008).

A fim de compreender se concentrações de imidacloprido residuais detectadas em cultura tratada prejudica a função motora de abelhas, três espécies foram expostas oralmente a duas concentrações subletais de imidacloprido, a avaliação de diferentes variáveis relacionadas à atividade de locomoção (velocidade média, distância percorrida, duração e frequência de repouso) apresentaram alterações, confirmando que mesmo em baixas concentrações a exposição ao inseticida imidacloprido pode afetar negativamente a função motora de polinizadores. Tais resultados corroboram os relatados por Williamson et al. (2014) após exposição oral de *A. mellifera* às doses subletais de 2,56 e 25,6 ng mL⁻¹ de imidacloprido. Esses autores relataram que o inseticida afetou as variáveis de voo, caminhar, duração de repouso, posição do corpo e

grooming. Redução de aproximadamente 1,5 vezes na atividade de locomoção foi verificada após exposição oral ($0,16 \text{ ng abelha}^{-1}$) e tópico ($0,12 \text{ ng abelha}^{-1}$) de *A. mellifera* a doses subletais de imidacloprido (Lunardi et al. 2017).

Apesar da ampla variedade de espécies de abelhas nativas, ainda são poucos os estudos abordando os efeitos sobre exposição e toxicologia desses polinizadores. Segundo Cresswell et al. (2012) a exposição oral de abelhas *Bombus terrestris* L. às concentrações entre $0,08$ e $125 \mu\text{g L}^{-1}$ de imidacloprido causou a redução na taxa de alimentação e locomoção, sendo o efeito sobre a alimentação dose-dependente. No entanto, nenhuma alteração sobre a locomoção, taxa de alimentação ou sobrevivência, foi verificada nos testes realizados com *A. mellifera*. Já para *Tetragonisca angustula* a exposição oral à concentração de $1,70 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de dieta (CL_{50}) causou uma redução na velocidade média de cerca de 5 vezes e na distância percorrida de cerca de 10 vezes em relação ao grupo controle (Jacob et al. 2019a). Resultados semelhantes foram relatados para a espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille após exposição oral à CL_{50} ($89,11 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Segundo os autores houve alterações em todas as variáveis avaliadas (velocidade média, distância percorrida, duração e frequência de repouso, e mobilidade contínua), com maior nível de comprometimento para a duração e frequência de repouso. Tais efeitos foram verificados também para espécie *A. mellifera* africanizada (CL_{50} $22,78 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), no entanto, os efeitos foram menos pronunciados em relação à espécie nativa (Jacob et al. 2019b).

No presente estudo, a exposição à concentração de imidacloprido detectada em amostras de flor de laranja ($0,006 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) causou maior nível de comprometimento nas habilidades de locomoção de *A. mellifera*, seguido por *S. postica* e *T. angustula*. Enquanto que, a exposição à concentração subletal de $6,26 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ *S. postica* se mostrou a espécie mais sensível, com alterações na atividade de locomoção de até 32 vezes em relação ao grupo controle, diferentemente de *A. mellifera* que para esta concentração apresentou os menores níveis de comprometimento das variáveis avaliadas. Segundo Cressell et al. (2012), a relação dose-resposta é consistente com a existência de um sistema de desintoxicação induzível, onde as doses de imidacloprido abaixo do limiar de indução são tóxicos para as abelhas, prejudicando as funções cognitivas desses insetos. No entanto, quando o limiar é atingido, ocorre a ativação dos processos de desintoxicação e as habilidades das abelhas são normalizadas, mas, quando o nível de imidacloprido aumenta, o sistema é sobrecarregado e os efeitos tóxicos voltam a se tornar evidentes de acordo com a dose ministrada. Além disso, a variação na sensibilidade e resposta entre as diferentes espécies pode estar relacionada ao aumento no metabolismo (Suchail et al. 2004) ou de características fisiológicas e genéticas, pela expressão de genes decodificadores de enzimas de desintoxicação (Johnson 2015).

Outros estudos mostraram que os efeitos negativos sobre atividade motora de abelhas são dependentes da dose de imidacloprido ministrada. Exposição tópica de abelhas às doses de 0,05; 0,5 e 5 ng mL⁻¹ não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle, enquanto que, concentrações de 50 a 500 ng mL⁻¹ causaram a redução na distância percorrida e no tempo de interação entre os indivíduos, além de aumentar o tempo que as abelhas passaram na área de alimentação (Teeters et al. 2012). Segundo Lambin et al. (2001), a exposição tópica de abelhas *A. mellifera* à dose de 1,25 ng abelha⁻¹ induziu aumento da atividade locomotora, enquanto que, doses maiores (2,5–20 ng abelha⁻¹) afetaram negativamente a movimentação das abelhas com redução da caminhada. Em contrapartida, Bovi et al. (2018) relataram não haver alteração na atividade motora após exposição oral e tópica de *A. mellifera* as doses subletais de 0,2 e 0,06 ng abelha⁻¹, respectivamente. Ausência de alterações na velocidade de voo e na capacidade das abelhas de retornar à colônia foram relatadas por Fischer et al. (2014), entretanto, um comprometimento da memória de navegação foi observado em abelhas oralmente tratadas com concentrações subletais de imidacloprido (7,5 e 11,25 ng abelha⁻¹).

Apesar de o imidacloprido atuar como agonista parcial dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) e ser considerado um neonicotinoide de menor potencial inseticida, em relação a outras moléculas deste grupo químico, as abelhas apresentam altas densidades de nAChRs em regiões cerebrais responsáveis pela integração e processamento das informações (Brown et al. 2006, Déglise et al. 2002). Assim, o bloqueio dos nAChRs por doses subletais de imidacloprido interferem nas transmissões sinápticas e, consequentemente, prejudica as funções cognitivas das abelhas de integração sensorial e capacidade motora, afetando atividades vitais (Fischer et al. 2014) como cuidados com a crias, limpeza, construção de células, coleta e armazenamento de alimento, podendo comprometer a sobrevivência das colônias e os serviços de polinização prestados nos diferentes agroecossistemas.

Em conclusão, o presente estudo apresentou os níveis residuais do neonicotinoide imidacloprido presentes em amostras de flores cítricas de diferentes pomares, e a interferência na riqueza de espécies, bem como seus efeitos sobre a atividade de locomoção de abelhas africanizadas e nativas sem ferrão. Não houve influência significativa entre riqueza de espécies e as concentrações de imidacloprido detectadas nos seis pomares de citros, no entanto, a exposição de abelhas a estas concentrações causaram o comprometimento na função motora com alterações em todas as variáveis avaliadas, exceto para a velocidade média de *T. angustula*. Demonstrando que mesmo concentrações subletais podem afetar de modo significativo e em diferentes graus o comportamento de abelhas, colocando em risco a conservação das espécies.

Referências

- Ascher J.S., Pickering J. 2018. Discover life: bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species. Acesso 13 Julho 2019.
- Badawy M.E., Nasr H.M., Rabea E.I. 2015. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. *Apidologie* 46, 177-193.
- Belasque Jr J., Yamamoto P.T., Miranda M.P., Bassanezi R.B., Ayres A.J., Bové J.M. 2010. Controle do Huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. *Citrus Res. Technol.* 31, 53-64.
- Belzunces L.P., Tchamitchian S., Brunet J.L. 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43, 348-370.
- Bonmatin J.M., Marchand P.A., Charvet R., Moineau I., Bengsch E.R., Colin M.E. 2005. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5336-5341.
- Botías C., David A., Horwood J., Abdul-Sada A., Nicholls E., Hill E., Goulson D. 2015. Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. *Environ. Sci. Technol.* 49, 12731-12740.
- Bové J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88, 7-37.
- Bovi T.S., Zaluski R., Orsi R.O. 2018. Toxicity and motor changes in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) exposed to fipronil and imidacloprid. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 239-245.
- Box G.E.P., Cox D.R. 1964. An analysis of transformations. *J. R. Soc.* 26, 211-252.
- Brown L.A., Ihara M., Buckingham S.D., Matsuda K., Sattelle D.B. 2006. Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 99, 608-615.
- Byrne F.J., Visscher P.K., Leimkuehler B., Fischer D., Grafton-Cardwell E.E., Morse J.G. 2014. Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. *Pest Manag. Sci.* 70, 470-482.
- Chagnon M., Kreutzweiser D., Mitchell E.A., Morrissey C.A., Noome D.A., van der Sluijs J.P. 2015. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environ. Sci. Poll. Res.* 22, 119-134.
- Chiaradia L.A., Milanez J.M., Koller O.L. 2013. Pragas: caracterização, danos e manejo integrado In: Koller O.L. (org.) *Citricultura Catarinense*. Florianópolis: Epagri. pp 187-174.

- Choudhary A., Sharma D.C. 2008. Dynamics of pesticide residues in nectar and pollen of mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) grown in Himachal Pradesh (India). *Environ. Monit. Assess.* 144, 143-150.
- Coslor C.C., Vandervoort C., Wise J.C. 2018. Insecticide dose and seasonal timing of trunk injection in apples influence efficacy and residues in nectar and plant parts. *Pest Manag. Sci.* 75, 1453-1463.
- Cresswell J.E., Page C.J., Uygun M.B., Holmbergh M., Li Y., Wheeler J.G., Laycock I., Pook C.J., Ibarra N.H., Smirnoff N., Tyler C.R. 2012. Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology.* 115, 365-371.
- Dégise P., Grünewald B., Gauthier M. 2002. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci. Lett.* 321, 13-16.
- Dively G.P., Kamel A. 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4449-4456.
- Elbert A., Haas M., Springer B., Thielert W., Nauen R. 2008. Applied aspects of neonicotinoid use in crop protection. *Pest Manag. Sci.* 64, 1099–1105.
- Fischer J., Mueller T., Spatz A.K., Greggers U., Gruenewald B., Menzel R. 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PloS ONE* 9, e91364.
- Gamito L.M., Malerbo-Souza D.T. 2006. Visitantes florais e produção de frutos em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Acta Sci. Ani. Sci.* 28, 483-488.
- Garibaldi L.A., Carvalheiro L.G., Leonhardt S.D., Aizen M.A., Blaauw B.R., Isaacs R., Kuhlmann M., Kleijn D., Klein A.M., Kremen C., Morandin L., Scheper J., Winfree R. 2014. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. *Front Ecol. Environ.* 12, 439–447.
- Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E.L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957.
- Jacob C.R.O., Zanardi O.Z., Malaquias J.B., Silva C.A.S., Yamamoto P.T. 2019a. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere.* 224, 65-70.
- Jacob C.R.O., Malaquias J.B., Zanardi O.Z., Silva C.A.S., Jacob J.F.O., Yamamoto P.T. 2019b. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology* DOI: 10.1007/s10646-019-02070-w
- Jeschke P., Nauen R. 2008. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* 64, 1084-1098.
- Johnson R.M. 2015. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434.

- Kalaki R.B., Neves M.F. 2017. Plano estratégico para o sistema agroindustrial citrícola brasileiro. *Rev. Gest. Prod.* 24, 338-354.
- Kennedy C.M., Lonsdorf E., Neel M.C., Williams N.M., Ricketts T.H., Winfree R., Bommarco R., Brittain C., Burley A.L., Cariveau D., Carvalheiro L.G., Chacoff N., Cunningham S.A., Danforth B.N., Dudenhoffer J.H., Elle E., Gaines H.R., Garibaldi L.A., Gratton C., Holzschuh A., Isaacs R., Javorek S.K., Jha S., Klein A.M., Krewenka K., Mandelik Y., Mayfield M.M., Neame L.A., Otieno M., Park M., Potts S.G., Rundlof M., Saez A., Steffan-Dewenter I., Taki H., Viana B.F., Westphal C., Wilson J.K., Greenleaf S.S., Kremen C. 2013. A global quantitative synthesis of local and landscape effects on wild bee pollinators in agroecosystems. *Ecol. Lett.* 16, 584-599.
- Kleinert A.M.P., Ramalho M., Cortopassi-Laurino M., Imperatriz-Fonseca V.L. 2009. Abelhas sociais (Bombini, Apini, Meliponini). In: Panizzi A.R., Parra J.R.P. (Eds). *Bioecologia e nutrição de insetos*. EMBRAPA Informação Tecnológica, Brasília, pp. 371-424.
- Kremen C., Williams N.M., Thorp R.W. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16812-16816.
- Kremen C., Williams N.M., Aizen M.A., Gemmill-Herren B., LeBuhn G., Minckley R., Packer L., Potts S.G., Roulston T., Steffan-Dewenter I., Vázquez D.P., Winfree R., Adams L., Crone E.E., Greenleaf S.S., Keitt T.H., Klein A.M., Regetz J., Ricketts T.H. 2007. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecol. Lett.* 10, 299-314.
- 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.* 48, 129-134.
- Langdon K.W., Rogers M.E. 2017. Neonicotinoid-induced mortality of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) is affected by route of exposure. *J. Econ. Entomol.* 110, 2229-2234.
- Leiva J.A., Nkedi-Kizza P., Borejsza-Wysocki W.S., Bauder V.S., Morgan K.T. 2016. Imidacloprid extraction from citrus leaves and analysis by liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96, 671-677.
- Lunardi J.S., Zaluski R., Orsi R.O. 2017. Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides fipronil and imidacloprid in Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 64, 50-56.
- Malerbo-Souza D.T., Nogueira-Couto R.H., Couto L.A. 2003. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio). *Braz.J. Vet. Res. Anim. Sci.* 40, 237-242.

- Malerbo-Souza D.T., Halak A.L. 2013. Efeito da interação abelha-flor na produção de frutos em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Zootec. Trop.* 31, 78-93.
- Michener C.D. 2007. The bees of the world. Johns Hopkins University Press, 913 pp.
- Nascimento E.T., Pérez-Maluf R., Guimarães R.A., Castellani M.A. 2011. Diversidade de abelhas visitantes das flores de citrus em pomares de laranjeira e tangerineira. *Rev. Bras. Frutic.* 33, 111-117.
- Neves M.F., Trombin V.G., Milan P., Lopes F.F., Cressoni F., Kalaki R. 2010. O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto: Citrus BR, 137 pp.
- Neves M.F., Trombin V.G. 2017. Anuário da citricultura 2017. São Paulo: CitrusBR., 57pp.
- Niell S., Jesus F., Perez C., Mendoza Y., Diaz R., Franco J., Cesio V., Heinzen H. 2015. QuEChERS Adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4484–4492.
- Park M.G., Blitzer E.J., Gibbs J., Losey J.E., Danforth B.N. 2015. Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. *Proc. R. Soc. B* 282, 20150299.
- Pisa L.W., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bonmatin J.M., Downs C.A., Goulson D., Kreutzweiser D.P., Krupke C., Liess M., McField M., Morrissey C.A., Noome D.A., Settele J., Simon-Delso N., Stark J.D., van der Sluijs J.P., van Dyck H., Wiemers M. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 68–102.
- Pohorecka K., Skubida P., Miszczak A., Semkiw P., Sikorski P., Zagibajlo K., Teper D., Koltowski Z., Skubida M., Zdańska D., Bober A. 2012. Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *J. Apic. Sci.* 56, 115-134.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez V.M., Ayala R., González H.D. 2018. Crop pollination by stingless bees. In: Vit P., Pedro S., Roubik D. (Eds). *Pot-pollen in stingless bee melittology*. Springer, Cham, pp. 139-153.
- Ricketts T.H. 2004. Tropical forest fragments enhance pollinator activity in nearby coffee crops. *Conserv. Biol.* 18, 1262–1271.
- 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.,

- Viana B.F. 2008. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecol. Lett.* 11, 499-515.
- Sanches M.M., Wulff N.A., Silva M.R.L., Júnior R.P.L., Ferreira E.A., Santos J.F., Lopes-Silva M., Angarten M.B.O., Ishida A.K.N., Oliveira R.P., Luccas B.E.G., Carbonari J.J., Martins O.M. 2018. Levantamento de huanglongbing (HLB) em citros no Brasil e diagnose dos agentes etiológicos. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 22 pp.
- Silveira F.A., Melo G.A.R., Almeida E.A.B. 2002. *Abelhas brasileiras. Sistemática e identificação*. Belo Horizonte: Edição do Autor, 253 pp.
- Stansly P., Qureshi J. 2008. Controlling Asian citrus psyllids; sparing biological control. *Citr. Indus.* 89, 18-24.
- Stoner K.A., Eitzer B.D. 2012. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS ONE* 7, e39114.
- Suchail S., de Sousa G., Rahmani R., Belzunces L.P. 2004. In vivo distribution and metabolism of ^{14}C -imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manag. Sci.* 60, 1056-1062.
- Teeters B.S., Johnson R.M., Ellis M.D., Siegfried B.D. 2012. Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1349-1354.
- Toledo V.D.A.A., Ruvoletakasukuki M.C.C., Baitala T.V., Costa-Maia F.M., Pereira H.L., Halak A.L., Chambó E.D., Malerbo-Souza D.T. 2013. Polinização por abelhas (*Apis mellifera* L.) em laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Braz J Vet Res An Sci* 40, 237-242.
- Tuell J.K., Isaacs R. 2010. Community and species-specific responses of wild bees to insect pest control programs applied to a pollinator-dependent crop. *J. Econ. Entomol.* 103, 668-675.
- Vaissière B.E., Freitas B.M., Gemmill-Herren B. 2011. *Protocol to detect and assess pollination deficits in crops: a handbook for its use*. FAO, Rome, 82 pp.
- Williamson S.M., Willis S.J., Wright G.A. 2014. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology* 23, 1409-1418.
- Winfree R., Kremen C. 2008. Are ecosystem services stabilized by differences among species? A test using crop pollination. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 276, 229-237.

3. O IMPACTO DE QUATRO INSETICIDAS NEONICOTINOIDES AMPLAMENTE UTILIZADOS SOBRE *Tetragonisca angustula* (LATREILLE) (HYMENOPTERA: APIDAE)

Artigo publicado: “The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae)” Cynthia Renata de Oliveira Jacob, Odimar Zanuzo Zanardi, José Bruno Malaquias, Carina Aparecida Souza Silva, Pedro Takao Yamamoto. 2019. **Chemosphere**, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.02.105.

RESUMO

A aplicação de inseticidas neonicotinoides nas culturas pode reduzir os serviços de polinização e os níveis populacionais da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae) em agroecossistemas neotropicais. No entanto, o impacto desses inseticidas sobre esta espécie não foi totalmente investigado. Este estudo avaliou os níveis de suscetibilidade de *T. angustula* a quatro inseticidas neonicotinoides (acetamiprido, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam), amplamente utilizados no manejo de pragas de diferentes culturas e seus efeitos na locomoção das abelhas. Neonicotinoides com o radical ciano causaram menor mortalidade de abelhas (concentração letal média, CL₅₀), enquanto que compostos com o radical nitro foram altamente prejudiciais para *T. angustula*. A atividade de locomoção foi fortemente prejudicada nas abelhas tratadas com tiacloprido e imidacloprido, enquanto o acetamiprido não afetou a atividade de locomoção, sendo semelhante ao controle. A aplicação de tiametoxam causou hiperatividade, com aumento de cerca de 4,5 e 5,0 vezes a velocidade média e a distância percorrida, respectivamente. Os resultados sugerem que aplicações de inseticidas neonicotinoides podem afetar negativamente a atividade de polinização de *T. angustula*. Esses resultados também podem ajudar a desenvolver estratégias de conservação desses polinizadores em agroecossistemas.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão; Toxicidade aguda; Comportamento de locomoção; Suscetibilidade

ABSTRACT

Application of neonicotinoid insecticides on crops can reduce the pollination services and population levels of the stingless bee *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae) in Neotropical agroecosystems. However, the impact of these insecticides on this bee has not been fully investigated. This study assessed the susceptibility levels of *T. angustula* to four neonicotinoid insecticides (acetamiprid,

imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam), widely used to manage pests on different crops, and their effects on locomotion of the bee. Neonicotinoids with the cyano radical caused lower bee mortality (assessed by mean lethal concentration, LC_{50}), while those compounds with the nitro radical were highly harmful to *T. angustula*. Locomotion activity was strongly impaired in bees treated with thiacloprid and imidacloprid, while acetamiprid did not affect the locomotion activity, which was similar to the control. Application of thiamethoxam caused hyperactivity, as observed by increases of ~4.5 and 5.0-fold in mean speed and distance traveled, respectively. These results suggest that applications of neonicotinoid insecticides can negatively affect the pollination activity of *T. angustula*. These results can also help to develop strategies to conserve these pollinators in agroecosystems.

Keywords: Stingless bee; Acute toxicity; Walking behavior; Susceptibility

3.1. Introdução

Abelhas sem ferrão (Meliponini) são polinizadores eussociais que ocorrem em regiões subtropicais e tropicais (Nogueira-Neto 1997). A tribo Meliponini contém 51 gêneros e 500 espécies de abelhas com morfologia, tamanho corporal, preferências florais, fisiologia, comportamento de forrageamento e nidificação amplamente diversificada. Alguns ninhos têm milhares de abelhas operárias, enquanto outros têm apenas algumas dezenas (Ascher & Pickering 2018, Camargo & Pedro 2013, Slaa et al. 2006).

As abelhas sem ferrão fornecem um serviço essencial ao ecossistema, polinizando a vegetação nativa e as espécies de plantas consumidas por seres humanos (Heard 1999, Slaa et al. 2006, Klein et al. 2007). Estas abelhas são especializadas em explorar uma única fonte floral por um certo período de tempo e, portanto, polinizam a flor de forma mais eficiente (Slaa et al. 2006) em relação à *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), espécie que poliniza uma variedade de espécies de plantas cultivadas (Garibaldi et al. 2014). Independentemente da exigência de polinização (vento, auto- ou polinizadores), a visitação por abelhas sem ferrão melhora a quantidade, a qualidade e o valor de mercado das frutas (Ricketts et al. 2008, Klatt et al. 2014). As abelhas sem ferrão são altamente diversificadas em sua morfologia, tamanho de colônia, local de nidificação e outros atributos, o que torna possível selecionar as espécies mais adequadas para polinizar uma determinada cultura ou usar em um sistema agrícola específico, como em estufas ou campos abertos (Slaa et al. 2006, Vossler et al. 2018).

Tetragonisca angustula (Latreille), vulgarmente conhecida como "Jataí", é uma das espécies de Meliponini mais abundantes da região Neotropical (Malagodi-Braga & Kleinert 2004). Esta espécie é importante para agroecossistemas devido ao seu alto potencial como polinizador de diversas culturas, capacidade de adaptação a diferentes ambientes, facilidade de manejo de

colônias por meliponicultores e produção de mel, cera e própolis (Malagodi-Braga & Kleinert 2004, Slaat et al. 2006, Vossler et al. 2018).

Embora altamente importantes, as abelhas sem ferrão estão expostas a várias ameaças, especialmente em sistemas de produção agrícola, onde as aplicações de pesticidas podem afetar negativamente os níveis populacionais nas colônias de abelhas e reduzir os serviços de polinização que realizam (Desneux et al. 2007, Brittain & Potts 2011, Nocelli et al. 2014). O declínio desses polinizadores resulta de múltiplos fatores, principalmente práticas agrícolas (monoculturas), fragmentação, perda de habitat e uso disseminado de pesticidas, afetando negativamente a produção agrícola e os serviços de polinização por abelhas (Potts et al. 2010, Brittain & Potts 2011, Pisa et al. 2015).

Inseticidas neonicotinoides têm sido amplamente utilizados em sistemas agrícolas para o controle de insetos pragas. Embora altamente eficazes, esses inseticidas também podem causar alta mortalidade, interferência na aprendizagem e memória, e causar mudanças comportamentais que podem prejudicar os artrópodes benéficos, incluindo as abelhas (Decourtye et al. 2003, Han et al. 2010, Lundin et al. 2015, Lima et al. 2016, Ramirez-Romero et al. 2005).

A ação sistêmica, o longo período residual e o amplo espectro de ação dos neonicotinoides aumentam o período de proteção das plantas contra insetos sugadores altamente prejudiciais (Jeschke & Nauen 2008, Jeschke et al. 2011). Esses inseticidas atuam no sistema nervoso central como miméticos dos neurotransmissores que interagem com o receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), causando estimulação nervosa em baixas concentrações e bloqueio do receptor, paralisia e morte em concentrações mais altas (Jeschke & Nauen 2008, Simon-Delso et al. 2015). Eles podem ser classificados em um dos três grupos químicos, as N-nitroguanidinas (imidacloprido, tiametoxam, clotianidina e dinotefuram), nitrometilenos (nitenpiram) e N-cianoamidinas (acetamiprido e tiacloprido) (Jeschke et al. 2011), e apresentam diferentes níveis de toxicidade para polinizadores (Iwasa et al. 2004, Simon-Delso et al. 2015, Yue et al. 2018).

Estudos toxicológicos são o primeiro passo para entender os efeitos dos pesticidas nos indivíduos. Os efeitos primários dos pesticidas incluem reduções na capacidade de memória, aprendizagem, respostas olfativas e de extensão de probóscide, bem como diferentes parâmetros comportamentais das abelhas, incluindo forrageamento, caminhada e habilidades de comunicação (Decourtye et al. 2003, Medrzycki et al. 2003, Tison et al. 2016). Estudos toxicológicos podem ajudar a entender os efeitos negativos sobre a estrutura e as funções de toda a colônia e contribuir para a conservação desses polinizadores em agroecossistemas (Guedes et al. 2016). Neste estudo avaliaram-se os níveis de suscetibilidade de *T. angustula* a quatro inseticidas neonicotinoides amplamente utilizados na agricultura e os efeitos desses compostos na atividade de locomoção

desse polinizador. Os resultados ajudarão a entender os impactos desses inseticidas em uma espécie de abelha sem ferrão, além de fornecer informações sobre toxicidade que podem ser usadas em estudos posteriores e para o desenvolvimento de políticas e práticas de conservação desses polinizadores.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Insetos

Para todos os ensaios, abelhas operárias forrageiras de *T. angustula* foram coletadas diretamente da entrada do ninho de três colônias saudáveis em um meliponário do Departamento de Acarologia e Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.2.2. Produtos Químicos

Quatro inseticidas neonicotinoides comerciais registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA 2018) para o controle de insetos pragas em sistemas agrícolas foram avaliados em abelhas *T. angustula*. Os inseticidas testados foram: acetamiprido (Mospilan 20%, pó solúvel em água, Iharabras SA, Sorocaba, SP, Brasil), imidacloprido (Provado 20%, suspensão concentrada, Bayer CropScience Ltd., Belford Roxo, RJ, Brasil), tiacloprido (Calypso 48%, suspensão concentrada, Bayer CropScience Ltd.) e tiametoxam (Actara 25%, granulado dispersível, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., Paulínia, SP, Brasil).

3.2.3. Ensaios

Todos os ensaios (suscetibilidade oral e atividade de locomoção) foram realizados em câmara climatizada com temperatura de 28 ± 2 °C, umidade relativa do ar (UR) $70 \pm 10\%$, no escuro, seguindo um delineamento inteiramente casualizado.

3.2.4. Avaliação dos níveis de suscetibilidade oral de *Tetragonisca angustula* a inseticidas neonicotinoides

A fim de preparar a dieta usada para estimar os níveis de sensibilidade oral de *T. angustula*, os inseticidas (formulações comerciais) foram diluídos em água deionizada. Uma solução estoque para cada inseticida foi feita e volumes conhecidos foram adicionados ao xarope de sacarose (50%) para preparar dietas com diferentes concentrações de inseticidas. Alimentos sem inseticidas e alimentos contaminados com dimetoato (Dimexion 40%, concentrado emulsionável, Cheminova Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. O dimetoato é um inseticida amplamente utilizado como padrão de referência para estudos de toxicologia de abelhas (OCDE 1998). Dez abelhas forrageiras foram colocadas em gaiolas de plástico (250 ml) forradas previamente com papel filtro e mantidas por 30 min em jejum. Para cada concentração, foram utilizadas três repetições. Em seguida, alimentos contaminados com diferentes concentrações de cada inseticida foram colocados nas unidades experimentais (gaiolas plásticas), e o número de abelhas vivas e mortas foi registrado 24 h após a exposição. As abelhas eram consideradas mortas quando não reagiam ao toque de um pincel fino. Com base nos dados de mortalidade registrados para cada concentração, a concentração letal média (CL_{50}) (concentração necessária para matar 50% dos indivíduos testados) foi estimada para cada inseticida. Um modelo binomial com uma função complementar de ligação log-log (modelo gompit) foi utilizado para estimar a CL_{50} para cada inseticida, utilizando o procedimento Probit da versão SAS 9.2 (SAS Institute 2011).

3.2.5. Efeito de inseticidas neonicotinoides na atividade de locomoção de *Tetragonisca angustula*

Para avaliar a atividade de locomoção de *T. angustula*, abelhas operárias forrageiras foram coletadas na entrada do ninho, colocadas em gaiolas plásticas (250 mL) e mantidas sem alimento por 30 minutos para garantir que elas se alimentariam quando o ensaio fosse iniciado. Dietas contaminadas com a CL_{50} de cada inseticida neonicotinoide (acetamiprido, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam) foram preparadas como descrito acima (seção 3.2.4) e oferecido às abelhas por 1 h. Após o período de alimentação, grupos de 10 abelhas foram anestesiadas em baixa temperatura por 3 min, transferidas para placas de Petri (9,0 cm de diâmetro × 1,5 cm de altura) forradas com papel filtro e utilizadas como unidade experimental. Após as abelhas se aclimatarem (5 min), as gravações de vídeo foram iniciadas, usando uma câmera digital acoplada a

um computador equipado com software de rastreamento de vídeo (EthoVision XT, Noldus Information Technology Inc., Wageningen, Holanda) em uma sala climatizada temperatura de 25 ± 2 °C com luz artificial fluorescente, pela manhã.

A atividade de locomoção das abelhas em cada unidade experimental foi avaliada por 5 min. Para cada tratamento, 10 repetições por tratamento foram usadas. Posteriormente, os vídeos foram analisados com software de rastreamento de vídeo para determinar a velocidade média (cm s^{-1}), distância total percorrida (cm) em cada unidade experimental, duração (s) e frequência (n) do tempo de repouso (tempo total parado durante os 5 min de gravação de vídeo) e mobilidade contínua.

Os dados de velocidade média, distância percorrida, duração e frequência dos períodos de repouso não mostraram normalidade ou homogeneidade de variância e, portanto, foram transformados usando a função “*boxcox*” do pacote “*MASS*”. Foram extraídos os valores de lambda que maximizaram a função e foram substituídos na fórmula: $y^T = y^\lambda - 1/\lambda$ (Box & Cox 1964). Os valores lambda são apresentados nas tabelas. Não foi necessário transformar os dados para mobilidade contínua. Modelos bayesianos com 30 mil iterações aplicando o método de Monte Carlo e cadeias de Markov (MCMC), com três cadeias para cada variável e um *burn-in* de 5 mil amostras foram utilizados para analisar os efeitos de inseticidas neonicotinoides na atividade de locomoção das abelhas. As convergências das cadeias foram determinadas por análise gráfica. Os intervalos de credibilidade bayesianos (95% CrI) de todas as variáveis foram utilizados para determinar o grau de similaridade entre os grupos de tratamento e o controle. Para este propósito, uma análise de cluster usando o índice de Jaccard para avaliar a distância entre as observações foi realizada com o pacote *vegan*. Os resultados foram analisados usando o método de ligação média para estabelecer a similaridade de efeitos negativos entre os inseticidas neonicotinoides testados. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R versão 3.4.4 (R Development Core Team 2018).

3.3. Resultados e discussão

Os resultados indicaram que *T. angustula* apresenta diferentes níveis de sensibilidade aos quatro inseticidas neonicotinoides, sem similaridade significativa entre eles, mesmo para os inseticidas do mesmo grupo (radicais ciano ou nitro) (Tabela 1). O acetamiprido foi o neonicotinoide mais seguro para *T. angustula*, seguido, em ordem decrescente, por tiacloprido, imidacloprido e tiametoxam. Os maiores valores de CL_{50} foram observados para abelhas operárias tratadas por via oral com neonicotinoides pertencentes ao grupo ciano, com uma diferença de

aproximadamente 3 vezes no nível de sensibilidade entre o acetamiprido e o tiacloprido. Em contraste, os inseticidas com o radical nitro (imidacloprido e tiametoxam) apresentaram os menores valores de CL_{50} e a maior diferença nos níveis de toxicidade (~ 6 vezes). O tiametoxam foi o mais prejudicial para as abelhas forrageiras, seguido por imidacloprido e dimetoato (inseticida padrão usado como controle positivo).

A menor sensibilidade de abelhas operárias de *T. angustula* a neonicotinoides com o grupo ciano observado aqui está de acordo com os resultados relatados anteriormente para outras espécies de abelhas, tais como, *A. mellifera* (Decourtye & Devillers 2010, Iwasa et al. 2004, Laurino et al. 2011), *Apis cerana* Fabricius (Yue et al. 2018, Yasuda et al. 2017), *Osmia cornifrons* Radoszkowski (Biddinger et al. 2013), *Bombus terrestris* L. (Mommaerts et al. 2010), e *Nannotrigona perilampoides* Cresson (Valdovinos-Núñez et al. 2009). Os valores de CL_{50} estimados para tiametoxam e imidacloprido, mostraram alta toxicidade destes inseticidas para as abelhas operárias *T. angustula*. Estes resultados estão de acordo com os relatados para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier) tratada oralmente com $0,002 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de tiametoxam (Moreira et al. 2018), e para *Melipona quadrifasciata* Lepeletier ($23,54 \text{ ng abelha}^{-1}$) (Tomé et al. 2015), *Melipona scutellaris* Latreille ($CL_{50} 2,01 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) (Costa et al. 2015) e *Scaptotrigona postica* Latreille ($CL_{50} 42,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) tratados com imidacloprido (Soares et al. 2015). Portanto, *T. angustula* parece ser mais suscetível ao tiametoxam e a imidacloprido que a abelha *A. mellifera* (Decourtye & Devillers 2010).

A diferença nos níveis de toxicidade aguda dos grupos neonicotinoides está relacionada ao tempo de metabolização dos princípios ativos, onde o acetamiprido e tiacloprido são metabolizados mais rapidamente que o tiametoxam e o imidacloprido (Alptekin et al. 2016, Brunet et al. 2005). Além disso, enzimas de desintoxicação (P450) podem decompor mais eficientemente e transformar esses inseticidas em compostos menos tóxicos (Iwasa et al. 2004, Manjon et al. 2018). Segundo Manjon et al. (2018), os níveis de suscetibilidade de *A. mellifera* e *Bombus terrestris* L. aos neonicotinoides dos grupos ciano e nitro estão relacionados não apenas à afinidade dessas moléculas com os receptores nicotínicos de acetilcolina, mas também à alta capacidade das enzimas P450, especialmente as das famílias CYP6 e CPY9, para metabolizar o acetamiprido e o tiacloprido em compostos menos tóxicos, enquanto que para imidacloprido e tiametoxam, este processo de metabolização ocorre de forma ineficiente.

Tabela 1. Concentração letal média oral estimada (CL_{50} em n.a.i. μL^{-1}) para operárias forrageiras de abelha nativa sem ferrão *Tetragonisca angustula* tratadas com inseticidas neonicotinoides.

Inseticida	N ¹	CL_{50} (IC 95%) ²	Coefficiente angular ($\pm$ EP) (<i>P</i> -valor)	χ^2 (g.l.) ³	h ⁴
Acetamiprido	309	173,26 (93,63-291,09)	$2,61 \pm 0,91$ ($< 0,0001$)	13,18 (7)	1,88
Imidacloprido	240	1,70 (0,94-2,24)	$2,43 \pm 0,46$ ($< 0,0001$)	4,19 (5)	0,84
Tiacloprido	292	54,09 (41,91-66,84)	$2,56 \pm 0,42$ ($< 0,0001$)	6,30 (6)	1,05
Tiametoxam	284	0,28 (0,23-0,32)	$4,63 \pm 0,67$ ($< 0,0001$)	9,23 (6)	1,54
Dimetoato	240	7,81 (6,23-8,43)	$5,47 \pm 0,37$ ($< 0,0001$)	0,86 (5)	0,17

¹N: número de abelhas testadas;

²IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro;

³ χ^2 : valor qui-quadrado de Pearson e graus de liberdade;

⁴h: fator de heterogeneidade

Os resultados da atividade de locomoção demonstraram que todos os neonicotinoides avaliados causaram alterações comportamentais em relação ao grupo controle, exceto pela mobilidade contínua (Tabela 2). Os neonicotinoides com radicais ciano, particularmente o acetamiprido, causaram o menor comprometimento das variáveis comportamentais analisadas, com níveis semelhantes ao grupo controle (Figura 1). Exceto para distância percorrida, onde houve uma diminuição de aproximadamente 13 vezes em relação ao grupo controle. El Hassani et al. (2008) verificaram que a exposição oral de abelhas *A. mellifera* a 0,1 e 0,5 μg abelha⁻¹ de acetamiprido não causou alterações na distância percorrida, duração de imobilidade ou o número de subidas em um aparato vertical. No entanto, a aplicação tópica deste composto resultou em um aumento na distância percorrida 1 h após a exposição. Aliouane et al. (2009) não encontraram efeito significativo sobre a atividade de locomoção de *A. mellifera* tratada com 0,1 e 1,0 μg abelha⁻¹ de acetamiprido.

Tiacloprido, embora tenha apresentado baixa toxicidade em relação aos demais neonicotinoides ($\text{CL}_{50} = 54,09 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), mostrou ser o neonicotinoide mais prejudicial ao comportamento das abelhas, comprometendo as variáveis comportamentais em nível semelhante ao obtido para o imidacloprido (Figura 1). Este inseticida causou maiores impactos na velocidade média e na distância percorrida ($\sim 6,0$ e $5,8$ vezes menor, respectivamente) em relação ao controle. Fischer et al. (2014) demonstraram que, em campo, as abelhas *A. mellifera* expostas oralmente a tiacloprido ($1,25 \mu\text{g}$ abelha⁻¹) não apresentaram comprometimento significativo do desempenho do voo de forrageamento, embora diminuam a velocidade de voo. No entanto, Tison et al. (2016) relataram não apenas uma mudança na atividade de forrageamento e no desempenho de navegação, mas também uma redução no sucesso de retorno para colônia e na comunicação social (dança) após exposição oral crônica a $4,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de tiacloprido. Considerando esses resultados, o tiacloprido não pode ser considerado um neonicotinoide menos nocivo.

No presente estudo, entre os dois neonicotinoides com radical nitro, a exposição ao tiametoxam resultou em hiperatividade das abelhas expostas, indicado por aumentos significativos na velocidade média ($\sim 4,5$ vezes) e distância percorrida ($\sim 5,0$ vezes) em comparação as abelhas do tratamento controle. Apesar a alta toxicidade ($\text{CL}_{50} = 0,28 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), houve uma semelhança significativa na duração e frequência de repouso, e mobilidade contínua entre as abelhas expostas e o grupo controle. Da mesma forma, uma hiperatividade significativa foi registrada para abelhas *A. mellifera* tratadas por via oral com tiametoxam a $1,34 \text{ ng}$ abelha⁻¹ (Tosi et al. 2017). Os autores constataram que após um breve tempo de exposição (30 min), as abelhas apresentaram um aumento significativo de 109% na velocidade média e uma redução de

52% no tempo para chegar ao topo de um aparato vertical. No entanto, um maior tempo de exposição ao tiametoxam (60 min) não só prejudicou suas funções motoras, dificultou a caminhada e aumentou o tempo para atingir o topo do aparato vertical, mas também aumentou o número de quedas e causou alterações comportamentais. Da mesma forma, Charrenton et al. (2015) encontraram um déficit na habilidade locomotora quando as abelhas foram expostas topicamente ao tiametoxam ($3,8 \text{ ng abelha}^{-1}$). Em contraste, estudos anteriores relataram que o tiametoxam a 0,1, 0,5 e $1,0 \text{ ng abelha}^{-1}$ não causou alterações comportamentais para abelhas expostas oralmente (Aliouane et al. 2009, El Hassani et al. 2008), mas podem induzir perdas no controle postural após a exposição das abelhas (Williamson et al. 2014).

Apenas a mobilidade contínua das abelhas sem ferrão não foi afetada negativamente pelo inseticida imidacloprido (Tabela 2). Em comparação ao grupo controle, as maiores reduções na distância percorrida (~ 10 vezes) e na frequência de repouso (~ 2 vezes) foram registradas para as abelhas tratadas com imidacloprido. Lunardi et al. (2017) verificaram uma redução significativa na atividade motora de *A. mellifera* após tratamento oral com a DL_{50} ($0,08 \mu\text{g abelha}^{-1}$) e uma concentração subletal ($0,00016 \mu\text{g abelha}^{-1}$) de imidacloprido. Da mesma forma, uma redução significativa no movimento foi registrada para *A. mellifera* exposta a doses de 2,5 a $20 \text{ ng abelha}^{-1}$ de imidacloprido (Lambin et al. 2001). Segundo alguns autores, os riscos de intoxicação de abelhas dependem não apenas da presença de enzimas de desintoxicação, mas também das características fisiológicas de cada espécie e do tempo necessário para metabolizar cada composto (Claudianos et al. 2006, Iwasa et al. 2004, Johnson 2015, Tomizawa et al. 1995, Yue et al. 2018). Além disso, a afinidade de ligação entre os subtipos nAChR e os ingredientes ativos neonicotinoides e/ou seus metabólitos pode ser responsável pelas diferenças de sensibilidade entre as espécies (Nauen et al. 2001, Decourtye et al. 2003, Casida 2011, Simon-Delso et al. 2015).

Tabela 2. Avaliação de diferentes variáveis de atividade de locomoção de operárias forrageiras de abelhas nativa sem ferrão *Tetragonisca angustula* tratadas oralmente com inseticidas neonicotinoides.

Inseticida	Locomoção		Repouso		Mobilidade contínua
	Velocidade média (cm s ⁻¹)	Distância percorrida (cm)	Média (s)	Frequência (n)	
Controle	1,9 ± 0,80 b	485,5 ± 200,41 b	26,2 ± 2,22 b	19,9 ± 1,37 a	29674,8 ± 896,53 a
Acetamiprido	0,5 ± 0,04 bc	34,8 ± 4,03 c	34,8 ± 4,03 ab	19,0 ± 2,30 a	30011,2 ± 1219,23 a
Imidacloprido	0,4 ± 0,03 c	47,6 ± 5,80 c	47,6 ± 5,80 a	10,2 ± 1,33 b	24609,4 ± 2005,22 a
Tiacloprido	0,3 ± 0,03 c	83,0 ± 8,64 c	49,0 ± 5,02 a	10,8 ± 1,39 b	21660,7 ± 896,53 a
Tiametoxam	9,0 ± 5,55 a	2621,2 ± 1626,02 a	42,1 ± 6,21 ab	17,4 ± 2,50 a	29664,3 ± 1371,18 a
χ^*	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	1,00

Médias seguidas pela mesma letra evidenciam que a densidade posterior não se sobrepõe a zero, mostrando, portanto, ausência de diferença estatística significativa entre os grupos (inseticidas) com base nos intervalos de credibilidade bayesianos a 95%.

*Valores usados na transformação de dados com a fórmula: $y^T = y^\lambda - 1/\lambda$.

Figura 1 - Agrupamento por meio da “*average linkage*” dos tratamentos considerando as variáveis: velocidade média, distância percorrida, duração e frequência do repouso e mobilidade contínua da abelha nativa sem ferrão *Tetragonisca angustula* tratadas oralmente com inseticidas neonicotinoides.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou os níveis de suscetibilidade de abelhas operárias de *T. angustula* tratadas por via oral a quatro inseticidas neonicotinoides. Acetamiprido e tiacloprido foram considerados menos nocivos a *T. angustula*, enquanto imidacloprido e tiametoxam demonstraram alta toxicidade aguda para este polinizador. Além disso, todos os inseticidas afetaram a atividade de locomoção, sendo o acetamiprido o composto de menor impacto. O tiacloprido, apesar de ter baixa toxicidade, prejudicou fortemente as funções motoras de *T. angustula*, assim como os neonicotinoides com radicais nitro. Portanto, todos esses inseticidas devem ser usados com cautela em sistemas de produção agrícola.

Referências

- Aliouane Y., Hassani A.K.E., Gary V., Armengaud C., Lambin M., Gauthier M. 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 113–122.
- Alptekin S., Bass C., Nicholls C., Paine M.J., Clark S.J., Field L., Moores G.D. 2016. Induced thiacloprid insensitivity in honeybees (*Apis mellifera* L.) is associated with up-regulation of detoxification genes. *Insect Mol. Biol.* 25, 171–180.

- Ascher J.S., Pickering J. 2018. Discover Life: bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species&flags=HAS. Acesso 13 Fevereiro 2018.
- Biddinger D.J., Robertson J.L., Mullin C., Frazier J., Ashcraft S.A., Rajotte E.G., Joshi N.K. Vaughn M. 2013. Comparative toxicities and synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). PLoS ONE 8, e72587.
- Box G.E.P., Cox D.R. 1964. An analysis of transformations. J. R. Soc. 26, 211-252.
- Brittain C., Potts S.G. 2011. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. Basic Appl. Ecol. 12, 321-331.
- Brunet J.L., Badiou A., Belzunces L.P. 2005. *In vivo* metabolic fate of [¹⁴C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. Pest Manag. Sci. 61, 742–748.
- Camargo J.M.F., Pedro S.R.M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure J.S., Urban D., Melo G.A.R. (orgs). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso 04 Junho 2018.
- Casida J.E. 2011. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. J. Agric. Food Chem. 59, 2923–2931.
- Charreton M., Decourtye A., Henry M., Rodet G., Sandoz J.C., Charnet P., Collet C. 2015. A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. PLoS ONE 10, e0144879.
- Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M., Biswas S., Schuler M.A., Berenbaum M.R., Oakeshott J.G. 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. Insect Mol. Biol. 15, 615-636.
- Costa L.M., Grella T.C., Barbosa R.A., Malaspina O., Nocelli R.C.F. 2015. Determination of acute lethal doses (LD₅₀ and LC₅₀) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). Sociobiology 62, 578–582.
- Decourtye A., Lacassie E., Pham-Delègue M.H. 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. Pest Manag. Sci. 59, 269–278.
- Decourtye A., Devillers J. 2010. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In Tany S.H. (eds). Insect nicotinic acetylcholine receptors. Springer, New York, pp. 85-95.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annu. Rev. Entomol. 52, 81-106.

- El Hassani A.K., Dacher M., Gary V., Lambin M., Gauthier M., Armengaud C. 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 54, 653-661.
- Fischer J., Mueller T., Spatz A.K., Greggers U., Gruenewald B., Menzel R. 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. PloS ONE 9, e91364.
- Garibaldi L.A., Carvalheiro L.G., Leonhardt S.D., Aizen M.A., Blaauw B.R., Isaacs R., Kuhlmann M., Kleijn D., Klein A.M., Kremen C., Morandin L., Scheper J., Winfree R. 2014. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. Front. Ecol. Environ. 12, 439-447.
- Guedes R.N.C., Smagghe G., Stark J.D., Desneux N. 2016. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. Ann. Rev. Entomol. 61, 43-62.
- Han P., Niu C.Y., Lei C.L., Cui J.J., Desneux N. 2010. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. Ecotoxicology. 19, 1612-1619.
- Heard T.A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. Annu. Rev. Entomol. 44, 183-206.
- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop Prot. 23, 371-378.
- Jeschke P., Nauen R. 2008. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. Pest Manag. Sci. 64, 1084-1098.
- Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A. 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. J. Agric. Food Chem. 59, 2897-2908.
- Johnson, R.M. 2015. Honey bee toxicology. Annu. Rev. Entomol. 60, 415-434.
- Klatt B.K., Holzschuh A., Westphal C., Clough Y., Smitm I., Pawelzik E., Tscharnkte T. 2014. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. Proc. R. Soc. B 281, 20132440.
- Klein A.M., Vaissière B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Tscharnkte T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. R. Soc. B 274, 303-313.
- 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. 48, 129-134.

- Laurino D., Porporato M., Patetta A., Manino A. 2011. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bull. Insectol.* 64, 107-13.
- Lima M.A.P., Martins G.F., Oliveira E.E., Guedes R.N.C. 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J. Comp. Physiol. A* 202, 733-747.
- Lunardi J.S., Zaluski R., Orsi R.O. 2017. Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides fipronil and imidacloprid in Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 64, 50-56.
- Lundin O., Rundlöf M., Smith H.G., Fries I., Bommarco R. 2015. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS ONE* 10, e0136928.
- Malagodi-Braga K.S., Kleinert A.D.M.P. 2004. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses? *J. Agric. Res.* 55, 771-773.
- Manjon C., Troczka B.J., Zaworra M., Beadle K., Randall E., Hertlein G., Singh K.S., Zimmer C.T., Homem R.A., Lueke B., Reid R., Kor L., Kohler M., Benting J., Williamson M.S., Davies T.G.E., Field L.M., Bass C., Nauen R. 2018. Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Curr. Biol.* 28, 1137–1143.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2018. AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. MAPA/CGAF/DFIA/DAS, Brasília, Brazil. http://www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso 10 Fevereiro 2018.
- Medrzycki P., Montanari R., Bortolotti L., Sabatini A.G., Maini S., Porrini C. 2003. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bull. Insectol.* 56, 59-62.
- Mommaerts V., Reynders S., Boulet J., Besard L., Sterk G., Smagghe G. 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* 19, 207–215.
- Moreira D.R., Sinópolis Gigliolli A.A., Falco J.R.P., Julio A.H.F., Volnistem E.A., Chagas F.D., Toledo V.A.A., Ruvoletto M.C.C. 2018. Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Toxicol.* 33, 463-475.
- Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Schmuck R. 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag. Sci.* 57, 577–586.

- Nocelli R.C.F., Cintra-Socolowski P., Roat T.C., Ferreira R.A.C., Pereira A.M., Carvalho S.M., Malaspina O. 2014. Pollinator safety in agriculture. Pesticide exposure routes for Brazilian wild bees. In Roubik D.W. (eds). Pollinator safety in agriculture. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, pp. 21-39.
- Nogueira-Neto P. 1997. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. Nogueirapis, São Paulo, Brazil, 446 pp.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 1998. Guidelines for testing of chemicals Number 214. Honeybees, acute oral toxicity test. Environmental Health Safety Division, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Pisa L.W., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bonmatin J.M., Downs C.A., Goulson D., Kreutzweiser D.P., Krupke C., Liess M., McField M., Morrissey C.A., Noome D.A., Settele J., Simon-Delso N., Stark J.D., van der Sluijs J.P., van Dyck H., Wiemers M. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 68–102.
- 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, 345–353.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ramirez-Romero R., Chaufaux J., Pham-Delègue M.H. 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. Apidologie. 36, 601-611.
- 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., Viana B.F. 2008. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? Ecol. Lett. 11, 499-515.
- SAS Institute. 2011. Statistical analysis system: getting started with the SAS learning. Version 9.2. SAS Institute, Cary.
- Simon-Delso N., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bonmatin J.M., Chagnon M., Downs C., Furlan L., Gibbons D.W., Giorio C., Girolami V., Goulson D., Kreutzweiser D.P., Krupke C.H., Liess M., Long E., McField M., Mineau P., Mitchell E.A.D., Morrissey C.A., Noome D.A., Pisa L., Settele J., Stark J.D., Tapparo A., van Dyck H., van Praagh J., van der Sluijs J.P., Whitehorn P.R., Wiemers M. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 5–34.
- Slaa E.J., Chaves L.A.S., Malagodi-Braga K.S., Hofstede F.E. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. Apidologie 37, 293-315.

- Soares H.M., Jacob C.R.O., Carvalho S.M., Nocelli R.C., Malaspina O. 2015. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 675–680.
- Tison L., Hahn M.L., Holtz S., Rößner A., Greggers U., Bischoff G., Menzel R. 2016. Honey bees' behavior is impaired by chronic exposure to the neonicotinoid thiacloprid in the field. *Environ. Sci. Technol.* 50, 7218–7227.
- Tomé H.V.V., Barbosa W.F., Corrêa A.S., Gontijo L.M., Martins G.F., Guedes R.N.C. 2015. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Ann. Appl. Biol.* 167, 186–196.
- Tomizawa M., Otsuka H., Miyamoto T., Eldefrawi M.E., Yamamoto I. 1995. Pharmacological characteristics of insect nicotinic ion channel and the comparison of the effect of nicotinoids and neonicotinoids. *J. Pestic. Sci.* 20, 57–64.
- Tosi S., Nieh J.C. 2017. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. *Sci. Rep.* 7, 15132.
- Valdovinos-Núñez G.R., Quezada-Euán J.J.G., Ancona-Xium P., Moo-Valle H., Carmona A., Sánchez E.R. 2009. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *J. Econ. Entomol.* 102, 1737–1742.
- Vossler F.G., Blettler D.C., Fagúndez G.A., Dalmazzo M. 2018. Stingless bees as potential pollinators in agroecosystems in Argentina: Inferences from pot-pollen studies in natural environments. In Vit P., Pedro S.R.M., Roubik D.W. (eds). *Pot-pollen in stingless bee melittology*. Springer, New York, pp. 155–175
- Williamson S.M., Willis S.J., Wright G.A. 2014. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology.* 23, 1409–1418.
- Yasuda M., Sakamoto Y., Goka K., Nagamitsu T., Taki H. 2018. Insecticide susceptibility in Asian honey bees (*Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae)) and implications for wild honey bees in Asia. *J. Econ. Entomol.* 110, 447–452.
- Yue M., Luo S., Liu J., Wu J. 2018. *Apis cerana* is less sensitive to most neonicotinoids, despite of their smaller body mass. *J. Econ. Entomol.* 111, 39–42.

4. TOXICIDADE ORAL AGUDA E IMPACTO DOS NEONICOTINOIDES SOBRE *Apis mellifera* L. E *Scaptotrigona postica* (LATREILLE) (HYMENOPTERA: APIDAE).

Artigo publicado: “Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae)” Cynthia Renata de Oliveira Jacob, José Bruno Malaquias, Odimar Zanuzo Zanardi, Carina Aparecida Souza Silva, Jéssica Fernanda de Oliveira Jacob, Pedro Takao Yamamoto. 2019. **Ecotoxicology**, DOI: 10.1007/s10646-019-02070-w

RESUMO

As abelhas silvestres e manejadas são essenciais para a polinização das culturas e para a produção de alimentos. No entanto, o amplo uso de inseticidas, como os neonicotinoides, podem afetar a sobrevivência, o desenvolvimento, o comportamento e a manutenção das colônias de abelhas. Portanto, neste estudo, foram avaliados os impactos de três inseticidas neonicotinoides sobre a sobrevivência e a habilidade de locomoção da abelha africanizada *A. mellifera* e da abelha sem ferrão *S. postica*. *A. mellifera* foi mais suscetível que *S. postica* a todos os neonicotinoides testados. Os valores estimados para as concentrações letais média (CL₅₀) do acetamiprido, imidacloprido e tiacloprido foram de 189,62; 22,78 e 142,31 ng µL⁻¹ de dieta para *A. mellifera* e 475,94; 89,11 e 218,21 ng µL⁻¹ de dieta para *S. postica*, respectivamente. Todos os neonicotinoides testados afetaram a velocidade, a distância percorrida, a duração e a frequência de repouso, e a mobilidade contínua de ambas as espécies de abelhas. Os resultados indicaram que, apesar da diferente suscetibilidade a compostos com radicais ciano e nitro, as variáveis comportamentais apresentaram diferentes níveis de comprometimento, de acordo com a molécula inseticida e espécies de abelhas. Estes resultados contribuem não só para a compreensão dos efeitos dos inseticidas neonicotinoides sobre *A. mellifera* e *S. postica*, como também auxiliam no desenvolvimento de estratégias que visam reduzir o impacto desses inseticidas em ambientes Neotropicais.

Palavras-chave: Abelha africanizada; Abelha sem ferrão; Suscetibilidade; Comprometimento motor; Conservação.

ABSTRACT

Wild and managed bees are essential for crop pollination and food production. However, the widespread use of insecticides such as neonicotinoids may affect the survival, development, behavior, and maintenance of bee colonies. Therefore, in this study we evaluated the impacts of three neonicotinoid insecticides

on the survival and walking abilities of the Africanized honeybee *A. mellifera* and stingless bee *S. postica*. *A. mellifera* was more susceptible than *S. postica* to all neonicotinoids tested. The median lethal concentrations LC_{50} values estimated for acetamiprid, imidacloprid, and thiacloprid were 189.62, 22.78, and 142.31 ng μL^{-1} of diet for *A. mellifera*, and 475.94, 89.11, and 218.21 ng μL^{-1} of diet for *S. postica*, respectively. All tested neonicotinoids affected the speed, distance traveled, duration and frequency of resting, and continuous mobility of both bee species. The results showed that in spite of the different susceptibility to compounds with cyano and nitro radicals, the behavioral variables showed different levels of commitment according to the molecule insecticide and bee species. These results contribute not only to the understanding of the effects of neonicotinoid insecticides on *A. mellifera* and *S. postica*, but also to help in the development of protocols that aim to reduce the impact of these insecticides in Neotropical environments.

Keywords: Africanized honeybee; Stingless bee; Susceptibility; Motor impairment; Conservation

4.1. Introdução

Os polinizadores desempenham papéis funcionais importantes na maioria dos ecossistemas terrestres e fornecem serviços essenciais para a manutenção da biodiversidade em comunidades de plantas nativas e produção agrícola (Garibaldi et al. 2014, Klein et al. 2007). É estimado que 98% das espécies vegetais necessitam da polinização por animais para produção de frutos e sementes. Serviço este que, contribui com um aumento de cerca de 75% na produção agrícola com importância alimentar humana (Costanza et al. 1997, Garibaldi et al. 2012, Klein et al. 2007). Entre os polinizadores, as abelhas são os mais eficientes (Kremen et al. 2007, Potts et al. 2010), pois, possuem muitas adaptações morfológicas e comportamentais que lhes permitem explorar diferentes tipos de flores (Thorp 1979). Além disso, as abelhas são altamente dependentes de recursos florais (pólen, néctar, óleo, resina e essências) para sua sobrevivência e reprodução (Palladini & Maron 2014).

Das quase 20.000 espécies de abelhas descritas no mundo (Ascher & Pickering 2018), as abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e as espécies nativas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae) desempenham um importante papel na polinização de plantas nativas e cultivadas em ecossistemas Neotropicais (Imperatriz-Fonseca & Nunes-Silva 2010, Kerr et al. 2010). Apesar da importância desses polinizadores para a manutenção da biodiversidade e da produção agrícola em agroecossistemas, o número de colônias de abelhas diminuiu em muitos países (Ellis et al. 2010, Neumann & Carreck 2010, Haddad 2011), incluindo o Brasil (Barbosa et al. 2015). Múltiplos fatores podem estar associados com o declínio nas populações de abelhas, incluindo má nutrição, aumento da pressão de ecto- e endoparasitas, aumento de cargas bacterianas e/ou virais,

desmatamento, fragmentação de áreas florestais e uso intensivo de pesticidas nas plantações (Ellis et al. 2010, Johnson et al. 2010, Staveley et al. 2014).

Entre os pesticidas, os inseticidas neonicotinoides têm sido amplamente utilizados para controlar pragas de diferentes culturas (Goulson et al. 2015, Jeschke et al. 2011), devido à sua ação sistêmica em plantas, longa atividade residual, versatilidade de aplicação (por exemplo, foliar, tratamento de solo, tronco e sementes) (Elbert et al. 2008, Jeschke et al. 2011) e baixa toxicidade para mamíferos (Tomizawa & Casida 2003). Os inseticidas neonicotinoides agem como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) em neurônios pós-sinápticos do sistema nervoso central, que competem pelo sítio de ligação do neurotransmissor acetilcolina (Tomizawa & Casida 2003, Johnson 2015). A ligação das moléculas inseticidas com nAChR é irreversível, interferindo na transmissão dos impulsos nervosos e causando paralisia e morte de insetos (Elbert et al. 2008, Jeschke et al. 2011). Embora os neonicotinoides tenham sido bem-sucedidos no controle de pragas sugadoras, como pulgões, moscas-brancas, psílídeos, eles também têm sido considerados um dos principais fatores associados ao declínio populacional de abelhas e outros insetos benéficos (Goulson et al. 2015, Pisa et al. 2015).

O impacto dos inseticidas neonicotinoides nas abelhas resulta não apenas de sua atividade residual, mas principalmente de sua atividade sistêmica, onde os resíduos do inseticida são encontrados em concentrações significativas nos fluidos de pólen, néctar e fluido de gutação das plantas. O contato com resíduos e a ingestão de alimentos contaminados podem afetar sua taxa de sobrevivência, desenvolvimento, sistema imunológico, reprodução, comportamento e manutenção de colônias de abelhas (Bonmatin et al. 2003; Brandt et al. 2016; Goulson et al. 2015; Pisa et al. 2015). Estudos anteriores mostraram que os inseticidas neonicotinoides são altamente tóxicos para *A. mellifera*, causando distúrbios comportamentais, dificuldades de orientação, comprometimento das atividades sociais e mortalidade (Brandt et al. 2016, Decourtye et al. 2003, Lu et al. 2014, Sánchez-Bayo et al. 2017, Tadei et al. 2019). Estudos também relataram o impacto de inseticidas em abelhas sem ferrão (Costa et al. 2015, Jacob et al. 2019, Tomé et al. 2015), embora poucos tenham examinado os efeitos de inseticidas neonicotinoides em *S. postica* (Silva et al. 2016, Soares et al. 2015).

Considerando a importância destes polinizadores para as relações ecológicas, polinização de culturas e produção de alimentos, neste estudo, os níveis de toxicidade oral aguda de três inseticidas neonicotinoides comumente usados no controle de pragas e seus efeitos nas habilidades de locomoção (velocidade média, distância percorrida, duração e frequência do tempo de repouso, e mobilidade contínua) de abelhas operárias *A. mellifera* africanizada e nativa sem ferrão *S. postica* foram avaliadas em condições de laboratório. Os resultados deste estudo ajudarão

a entender os impactos desses inseticidas neonicotinoides sobre as duas espécies de abelhas. Além de contribuir para o desenvolvimento de futuras estratégias de manejo que visem reduzir os impactos desses compostos nas populações de abelhas em agroecossistemas.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Insetos

Para estimar a concentração letal média (CL_{50}) (concentração necessária para reduzir em 50% o número de indivíduos sobreviventes), operárias recém-emergidas (~ 24 h) de *A. mellifera* e *S. postica* foram obtidos de favos coletados em três colônias saudáveis de um apiário em Rio Claro, São Paulo, Brasil, e em um meliponário no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo. (ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil, respectivamente. Os favos foram removidos das colônias e transferidos para uma sala climatizada a 32 ± 2 °C para *A. mellifera* e 28 ± 2 °C para *S. postica*, $70 \pm 10\%$ para umidade relativa (UR), e mantidos no escuro, simulando mesmas condições das colônias, até os adultos emergirem.

Assumindo que as abelhas forrageiras são mais suscetíveis à exposição de pesticidas. As abelhas operárias forrageiras de verão de ambas as espécies foram usadas para avaliar os efeitos sobre a habilidade de locomoção. Para este propósito, as abelhas foram coletadas diretamente da entrada de cada uma das três colônias, colocadas em gaiolas plásticas (250 mL), e mantidas nas mesmas condições ambientais descritas acima até o início dos ensaios.

4.2.2. Produtos Químicos

Para ambas as espécies de abelhas, os seguintes inseticidas neonicotinoides foram testados: acetamiprido (Mospilan 20%, pó solúvel em água, Iharabras SA, Sorocaba, SP, Brasil), imidacloprido (20%, suspensão concentrada, Bayer CropScience Ltda., Belford Roxo, RJ, Brasil) e tiacloprido (Calypso 48%, suspensão concentrada, Bayer CropScience Ltda.).

4.2.3. Estimativa da concentração letal média oral (CL_{50})

Os níveis de toxicidade aguda por via oral de abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* e *S. postica* para inseticidas neonicotinoides foram determinados pelo método proposto

pela OECD (1998), com algumas modificações. Para preparar a dieta, os inseticidas (formulações comerciais) foram diluídos em água deionizada. Considerando a concentração de ingrediente ativo de cada produto, uma solução estoque para cada inseticida foi preparada e volumes conhecidos foram adicionados ao alimento [mel: água (1: 1) enriquecido com 30% de sacarose e 4% de gelatina] para preparar dietas com diferentes concentrações de inseticidas. Dieta sem inseticidas e dieta contaminada com dimetoato (Dimexion 40%, concentrado emulsionável, Cheminova Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada como controles negativo e positivo, respectivamente. O dimetoato é um inseticida registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA 2018) e utilizado como padrão de referência para estudos toxicológicos com abelhas (OCDE, 1998). Antes do início dos ensaios, as abelhas foram privadas de alimento por 2 h para *A. mellifera* e 1 h para *S. postica* para garantir que elas se alimentariam quando o ensaio fosse iniciado. Em seguida, dez operárias recém-emergidas foram colocadas em gaiolas plásticas (250 mL) revestidas com papel filtro, totalizando três repetições para cada concentração. A dieta contaminada e algodão embebido em água estavam disponíveis ad libitum. As unidades experimentais foram mantidas em câmaras climatizadas a uma temperatura de 32 ± 2 °C para *A. mellifera* e 28 ± 2 °C para *S. postica* e $70 \pm 10\%$ UR, no escuro. O número de abelhas vivas e mortas em cada unidade experimental foi registrado 24 h após a exposição. As abelhas eram consideradas mortas quando não reagiam ao toque de um pincel fino. Com base nos dados de mortalidade para *A. mellifera* e *S. postica* obtidos a partir de diferentes níveis de tratamento (concentrações), a CL_{50} foi estimada para cada inseticida com seus respectivos intervalos de confiança.

4.2.4. Efeito dos inseticidas neonicotinoides nas habilidades de locomoção

Para os testes comportamentais de locomoção, a dieta foi preparada como acima (item 4.2.3) utilizando a concentração letal média (CL_{50}) previamente estimada para cada inseticida neonicotinoide. Dieta sem inseticida foi utilizada como tratamento controle. Foram utilizadas três colônias diferentes e grupos de 10 abelhas forrageiras foram coletadas aleatoriamente e colocadas em gaiolas de plástico (250 mL) revestidas com papel filtro. Antes do início dos testes, as abelhas africanizadas e nativa sem ferrão foram mantidas em jejum por 2 e 1 h, respectivamente. Posteriormente, alimentos contaminados foram colocados por 2 e 1 h para *A. mellifera* e *S. postica*, respectivamente. Durante esse período, as unidades experimentais foram mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de 28 ± 2 °C e $70 \pm 10\%$ UR, no escuro.

Após o período de alimentação, as abelhas foram anestesiadas a baixa temperatura por 3 min, para evitar fugas durante a transferência para placas de Petri (150 mm de diâmetro × 15 mm de altura) revestidas com papel de filtro. Após a aclimatização das abelhas (5 min) em placas de Petri, os vídeos foram iniciados, com uma câmera digital acoplada a um computador equipado com software de rastreamento de vídeo (EthoVision XT - Noldus Information Technology Inc., Wageningen, Holanda). Cada placa de Petri foi gravada por 5 min, a 25 ± 2 °C sob luz fluorescente artificial, no período da manhã.

O ensaio foi realizado seguindo um desenho de blocos ao acaso, onde cada bloco foi composto por 6 placas de Petri (3 para o controle e 3 contaminados). Em cada placa de Petri, foram colocadas 10 abelhas. Para cada tratamento, foram utilizadas 10 repetições (blocos) ($n = 300$). Posteriormente, os vídeos foram submetidos à análise utilizando um software de rastreamento de vídeo para avaliação da velocidade média (cm s^{-1}), distância total percorrida (cm) pela arena, duração (s) e frequência (n) do tempo de repouso (período total de repouso durante os 5 min de gravação do vídeo) e mobilidade contínua.

4.2.5. Análise de dados

Para estimar as concentrações letais médias de inseticidas neonicotinoides para cada espécie de abelha, utilizou-se um modelo binomial com função log-log complementar (modelo gompit) utilizando o procedimento Probit do software SAS versão 9.2 (SAS 2011). Para as análises dos efeitos dos inseticidas neonicotinoides sobre as habilidades de locomoção das abelhas, foram utilizados modelos bayesianos com 30 mil iterações aplicando o método de Monte Carlo e cadeias de Markov (MCMC), com três cadeias para cada variável e um *burn-in* de 5 mil amostras. As convergências das cadeias foram determinadas por análise gráfica (não mostrada). Para o presente estudo, modelos normais com prioris normais foram utilizados. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico “R”, versão 3.5.1 (R Core Team 2018) com o auxílio do suporte do pacote R2Openbugs.

Os dados de velocidade média, distância percorrida, duração e frequência de repouso não mostraram normalidade e homogeneidade de variância e, portanto, foram transformados pela função *box-cox* do pacote “*mass*”. Foram extraídos os valores de lambda que maximizaram a função e foram substituídos na fórmula: $y^T = y^\lambda - 1/\lambda$ (Box & Cox 1964). Os valores de lambda usados são fornecidos nas tabelas. Não houve necessidade de transformação dos dados de mobilidade contínua.

4.3. Resultados

4.3.1. Estimativa da concentração letal média oral (CL₅₀)

Os resultados obtidos indicaram que os inseticidas neonicotinoides causaram significativa mortalidade de operárias recém- emergidas de abelhas *A. mellifera* e *S. postica*. Os níveis de toxicidade foram dependentes da espécie de abelha, inseticida e concentração utilizada nos ensaios (Tabela 1). *Apis mellifera* foi 2,51; 3,91 e 1,53 vezes mais suscetível que *S. postica* ao acetamiprido, imidacloprido e tiacloprido, respectivamente. Com base nas concentrações letais medianas estimadas, o acetamiprido foi o inseticida menos prejudicial, seguido do tiacloprido e imidacloprido para ambas as espécies de abelhas. O inseticida dimetoato, utilizado como controle positivo causou alta toxicidade aguda. (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativa de concentração média letal (CL₅₀ em ng i.a µL⁻¹) oral de inseticidas neonicotinoides para abelhas operárias recém-emergidas de *Apis mellifera* africanizada e abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica*, 24 h após a exposição.

Inseticida	Espécie	N ¹	CL ₅₀ (IC 95%) ²	Coeficiente angular (± EP) (P-valor)	χ ² (g.l.) ³	h ⁴	RS ⁵
Acetamiprido	<i>A. mellifera</i>	323	189,62 (107,38–256,58)	2,62 (± 0,39) (< 0,0001)	6,78 (6)	1,13	2,51
	<i>S. postica</i>	595	475,94 (406,65–546,03)	2,43 (± 0,25) (< 0,0001)	4,73 (6)	0,79	
Imidacloprido	<i>A. mellifera</i>	360	22,78 (14,58–31,15)	1,63 (± 0,20) (< 0,0001)	11,34 (7)	1,62	3,91
	<i>S. postica</i>	310	89,11 (63,14–117,74)	1,91 (± 0,51) (< 0,0001)	8,77 (6)	1,46	
Tiacloprido	<i>A. mellifera</i>	324	142,31 (101,31–194,05)	2,38 (± 0,40) (< 0,0001)	8,71 (6)	1,45	1,53
	<i>S. postica</i>	354	218,21 (159,07–276,21)	2,50 (± 0,32) (< 0,0001)	9,32 (6)	1,55	
Dimetoato	<i>A. mellifera</i>	310	0,75 (0,61–0,81)	5,94 (± 1,23) (< 0,0001)	4,93 (6)	0,82	90,03
	<i>S. postica</i>	340	67,52 (59,75–81,94)	5,70 (± 0,79) (< 0,0001)	9,57 (6)	1,59	

¹N: número de abelhas testadas;

²IC: intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro;

³χ²: valor qui-quadrado de Pearson e graus de liberdade;

⁴h: fator de heterogeneidade;

⁵RS: razão de suscetibilidade [CL₅₀ *Scaptotrigona postica* (tolerante) / LC₅₀ *Apis mellifera* (tolerante)].

4.3.2. Efeito dos inseticidas neonicotinoides nas habilidades de locomoção

A exposição oral de abelhas às concentrações letais (CL_{50}) não causou mortalidade das abelhas durante o período experimental. Para ambas as espécies de abelhas, a velocidade média diminuiu após a exposição a todos os inseticidas testados. Acetamiprido causou o menor impacto sobre *A. mellifera*, com valores de velocidade média semelhantes ao grupo controle ($1,39 \pm 0,09$ cm s⁻¹). Por outro lado, imidacloprido causou a maior redução na velocidade média (~2 vezes) em comparação ao grupo controle (Figura 1A), e tiacloprido apresentou valores intermediários para essa variável comportamental. No entanto, a exposição de *S. postica* aos inseticidas neonicotinoides resultou em níveis maiores de alterações comportamentais em relação às abelhas africanizadas. Para *S. postica*, o menor impacto (~3 vezes) foi observado em abelhas tratadas com tiacloprido, enquanto imidacloprido causou o maior comprometimento da função motora (~5,5 vezes) em relação ao grupo controle (Figura 2A). Houve diminuição significativa na distância percorrida pelas abelhas expostas, a todos os neonicotinoides em relação ao grupo controle para ambas as espécies de abelhas (Figura 1B e 2B). Acetamiprido e tiacloprido tiveram os menores impactos na locomoção de *A. mellifera* e *S. postica*, enquanto que, imidacloprido foi o inseticida que mais afetou o comportamento de locomoção das abelhas.

Os resultados indicaram um aumento pronunciado na duração do repouso de ambas as espécies de abelhas. Para *A. mellifera*, resultados semelhantes foram obtidos em abelhas tratadas com acetamiprido e abelhas controle (Figura 1C). *S. postica* demonstrou grandes alterações na duração de repouso após a exposição ao acetamiprido (7,8 vezes), tiacloprido (8,5 vezes) e imidacloprido (9,0 vezes) em comparação com abelhas controle (Figura 2C). Todos os neonicotinoides testados causaram diminuição na frequência que as abelhas paravam para repouso, considerando o tempo de avaliação de 5 min. Acetamiprido apresentou resultados semelhantes ao grupo controle, enquanto que, imidacloprido foi o mais prejudicial para *A. mellifera*. Já para *S. postica* o tiacloprido foi o menos prejudicial e o imidacloprido o composto que causou o maior impacto, com um decréscimo de ~8,0 vezes no número de paradas de repouso em comparação com o controle.

A mobilidade contínua foi utilizada para quantificar o movimento de um inseto, mesmo que seu ponto central permaneça no mesmo local (tremores), portanto qualquer movimento resultante dos efeitos neurotóxicos dos neonicotinoides, antes do efeito de paralisia, foi detectado pelo software e considerado como uma variável comportamental. Os resultados indicam que a exposição de *A. mellifera* ao acetamiprido apresentou similaridade com as abelhas controle. No entanto, imidacloprido e tiacloprido causaram os maiores efeitos para *A. mellifera* (Figura 1D).

Para *S. postica*, não houve similaridade entre os resultados do controle e tratamentos, sendo o menor impacto observado para o tiacloprido (Figura 2D).

Figura 1. Avaliação das habilidades de locomoção após tratamento oral de operárias forrageiras de abelhas *Apis mellifera* africanizada com inseticidas neonicotinoides. **A-** Velocidade média, **B-** Distância percorrida, **C-** Duração e Frequência de repouso e **D-** Mobilidade contínua. Médias seguidas das mesmas letras evidenciam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos (inseticidas) com base nos intervalos de credibilidade bayesianos a 95% (95% CrI).

Figura 2. Avaliação das habilidades de locomoção após exposição oral de operárias forrageiras de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* a inseticidas neonicotinoides. **A-** Velocidade média, **B-** Distância percorrida, **C-** Duração e Frequência de repouso e **D-** Mobilidade contínua. Médias seguidas das mesmas letras evidenciam que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos (inseticidas) com base nos intervalos de credibilidade bayesianos a 95% (95% CrI).

4.4. Discussão

O presente estudo verificou efeitos consideráveis na toxicidade oral de três inseticidas neonicotinoides que são comumente usados para controlar insetos pragas em muitos sistemas de produção agrícola sobre abelhas operárias recém-emergidas de *A. mellifera* e *S. postica* e seus efeitos nas habilidades de locomoção das abelhas operárias forrageiras.

Os resultados indicam os diferentes níveis de toxicidade entre os grupos de neonicotinoides e entre as espécies de abelhas testadas. Acetamiprido e tiacloprido foram os

menos tóxicos para as abelhas, eles contêm o radical N-ciano-amidina, que confere menor toxicidade (Elbert et al. 2008, Iwasa et al. 2004, Tison et al. 2017) e os neonicotinoides com radical N-nitroguanidina (imidacloprido), que são altamente tóxicos para insetos não alvo (Decourtye & Devillers 2010, Elbert et al. 2008). Assim, acetamiprido e tiacloprido apresentaram os maiores valores de CL_{50} para *A. mellifera* e *S. postica*, indicando que esses inseticidas são menos prejudiciais a esses polinizadores do que imidacloprido, que apresentou o menor valor de CL_{50} .

Embora as informações sobre a toxicidade oral dos neonicotinoides para espécies de abelhas (especialmente espécies não *Apis*) sejam escassas, os resultados corroboram aqueles obtidos por Jacob et al. (2019) em avaliação da suscetibilidade oral aguda da espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Latreille) aos inseticidas neonicotinoides. Neste estudo, os autores verificaram menor toxicidade para acetamiprido, seguido pelo tiacloprido e imidacloprido, assim como em estudos de exposição tópica que confirmam essa variação nos níveis de suscetibilidade entre esses três neonicotinoides (Decourtye & Devillers 2010, Iwasa et al. 2004, Valdovinos-Núñez et al. 2009).

No presente estudo, os níveis de toxicidade oral dos inseticidas foram maiores para *A. mellifera* que para *S. postica*. Diferenças nos níveis de suscetibilidade entre espécies de abelhas foram relatadas em outros estudos, e combinados em uma meta-análise por Arena & Sgolastra (2014). Esses autores relataram que das seis classes de inseticidas avaliadas, as espécies de abelhas não-*Apis* foram menos tolerantes que as abelhas do gênero *Apis* apenas aos inseticidas neonicotinoides. Estes resultados sugerem que a diferença na suscetibilidade pode ser dependente da sensibilidade intrínseca das espécies de abelhas, bem como sobre sua atividade de nidificação e comportamento de forrageio, especialmente para espécies não-*Apis*, para as quais essa informação é escassa.

Diferentes fatores podem resultar em variações na suscetibilidade das abelhas aos inseticidas neonicotinoides. Em geral, as espécies de abelhas com um tamanho corporal maior tendem a tolerar maiores quantidades de inseticidas (Devillers et al. 2003, Thompson 2016). Entretanto, neste estudo, a menor espécie, *S. postica*, mostrou-se mais tolerante que *A. mellifera* aos três inseticidas neonicotinoides. Resultados semelhantes foram relatados por Yue et al. (2018) para *A. cerana*, que apesar de seu menor peso corporal, apresentou maior tolerância que *A. mellifera* a dois dos três neonicotinoides avaliados. Segundo esses autores, as características fisiológicas e genéticas podem ser responsáveis pelas diferenças de sensibilidade entre as espécies. Além disso, o tempo necessário para metabolizar os compostos (Iwasa et al. 2004, Johnson 2015, Tomizawa et al. 1995) e a afinidade de ligação entre as moléculas neonicotinoides e/ou seus

metabólitos com os subtipos nAChR também podem estar envolvidos na toxicidade diferencial dos neonicotinoides (Casida 2011, Decourtye et al. 2003, Nauen et al. 2001).

Brunet et al. (2005) observaram o rápido metabolismo de acetamiprido após exposição oral de abelhas *A. mellifera* e sugeriram que a tolerância relativamente alta das abelhas, deve-se à metabolização desse inseticida em metabólitos de baixa toxicidade para as abelhas. Dai et al. (2010) demonstraram que o fungo *Rhodotorula mucilaginosa* (Jörg.) Harr. é capaz de converter acetamiprido em metabólitos sem atividade inseticida e converte tiacloprido em metabólitos de baixa toxicidade para *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae). A baixa toxicidade desses inseticidas sugere que as abelhas têm uma capacidade inata de metabolizar os neonicotinoides com radical N-ciano (Alptekin et al. 2016).

Manjon et al. (2018) relataram que as grandes diferenças nos níveis de toxicidade entre grupos de inseticidas com radicais ciano ou nitro estão relacionadas à habilidade de cinco subfamílias da enzima do citocromo P450 em degradarem as moléculas de acetamiprido e tiacloprido de modo mais eficientemente que os inseticidas imidacloprido e tiametoxam. Estas enzimas são altamente expressas durante o processo de desintoxicação, garantindo uma metabolização rápida e eficiente de acetamiprido e de tiacloprido em compostos de baixa toxicidade para *A. mellifera* e *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). No entanto, mais estudos são necessários para avaliar os fatores que estão envolvidos nos níveis de suscetibilidade interespecífica.

Além da toxicidade oral aguda, os inseticidas neonicotinoides afetaram, em diferentes graus, as habilidades de locomoção de *A. mellifera* e *S. postica*. Dos inseticidas testados, acetamiprido causou o menor impacto negativo em todas as variáveis de locomoção avaliadas para *A. mellifera*. No entanto, para *S. postica* acetamiprido afetou todas as variáveis comportamentais das abelhas, bem como tiacloprido que causou efeito semelhante ao imidacloprido para todas as habilidades de locomoção sobre as duas espécies de abelhas. Apesar de se tratar de uma espécie sem ferrão, a exposição oral de *T. angustula* à CL_{50} ($173,26 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) de acetamiprido causou redução apenas sobre a distância percorrida pelas abelhas em placas de Petri, enquanto que a exposição à tiacloprido ($CL_{50} 54,09 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) apresentou resultados semelhantes aos verificados para imidacloprido em todas as variáveis avaliadas (velocidade média, distância percorrida, duração e frequência de repouso) (Jacob et al. 2019).

Nenhum efeito significativo sobre as habilidades de locomoção foi observado para abelhas *A. mellifera* contaminadas por via oral com 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g abelha}^{-1}$ de acetamiprido, em estudos prévios (Aliouane et al. 2009, El Hassani et al. 2008). Contudo, efeito prejudicial do tiacloprido foi relatado por Fisher et al. (2014), que relatou redução da velocidade de voo de *A.*

mellifera expostas oralmente a tiacloprido ($1,25 \text{ mg abelha}^{-1}$). Segundo os autores, doses subletais de tiacloprido, imidacloprido ($11,25 \text{ ng abelha}^{-1}$) e clotianidina ($2,5 \text{ ng abelha}^{-1}$) comprometeram a capacidade de navegação e retorno para a colônia. Tison et al. (2016) também relatou que a exposição crônica de abelhas melíferas à concentração subletal de $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tiacloprido causou alterações na capacidade de forrageamento, desempenho de comunicação social, navegação e homing. Além de causar alterações nas funções de aprendizado e memória (Tison et al. 2017). Estes resultados confirmam que os efeitos dos pesticidas podem ser específicos de uma determinada espécie de abelha (Sánchez-Bayo et al. 2017), além de estar relacionados ao ingrediente ativo de cada neonicotinoide e dose utilizada (Fischer et al. 2014, Williamson et al. 2014).

Imidacloprido causou comprometimento significativo das habilidades de locomoção em relação ao grupo de abelhas não tratadas, neste estudo. Resultados semelhantes foram relatados para doses subletais de imidacloprido em exposição tópica (50 e 500 ng mL^{-1}), onde *A. mellifera* caminharam por distâncias mais curtas e passaram mais tempo na área de alimentação. Além disso, foi observado um menor tempo de interação entre os indivíduos em relação ao grupo de abelhas que receberam apenas sacarose. Em contraste, baixas concentrações de imidacloprido ($0,05$; $0,5$ e 5 ng mL^{-1}) resultaram em um estímulo da atividade locomotora (Teeters et al. 2012). O aumento da atividade locomotora de *A. mellifera* também foi relatado por Lambin et al. (2001) após exposição tópica de $1,25 \text{ ng abelha}^{-1}$ imidacloprido e diminuição da mobilidade após exposição a concentrações acima de 5 ng abelha^{-1} . Williamson et al. (2014) não encontraram mudanças comportamentais significativas, incluindo caminhar, voar e sentar de *A. mellifera* após a exposição à concentração de imidacloprido ($2,56 \text{ ng mL}^{-1}$), tiametoxam ($2,92 \text{ ng mL}^{-1}$) ou clotianidina ($2,50 \text{ ng mL}^{-1}$) relatando apenas uma perda de controle postural. Ingestão de dietas contaminadas com imidacloprido em doses entre $0,08$ e $125,0 \text{ g L}^{-1}$ não causou alterações detectáveis sobre a taxa de alimentação, locomoção e longevidade de *A. mellifera*, enquanto que, para *Bombus terrestris* L., a taxa de alimentação e a locomoção sofreram redução após ingestão de concentrações acima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Neste estudo, os autores sugerem que a maior tolerância de *A. mellifera* deve-se ao maior nível metabólico para desintoxicação desta espécie em comparado à *B. terrestris* (Cresswell et al. 2012). Exposição oral de *A. mellifera jemenitica* Ruttner às doses subletais de imidacloprido ($0,1$; $0,5$ e $1,0 \text{ ng abelha}^{-1}$) causou altos níveis de comprometimento de aprendizagem e retenção de memória com redução nas respostas de extensão de probóscide de acordo com a dose ministrada (Iqbal et al. 2018). Resultados compatíveis com estudos anteriores de exposição de *A. mellifera* a diferentes doses de imidacloprido (Decourtye et al. 2003, Gonalons & Farina 2015, Tan et al. 2015).

O tratamento de larvas da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 com diferentes concentrações de imidacloprido comprometeu o desenvolvimento dos corpos pedunculados, região do cérebro responsável pela memória e aprendizagem, e também prejudicou a atividade de caminhada de adultos emergidos de larvas tratadas (Tomé et al. 2012, Çakmak et al. 2018). Resultados semelhantes foram verificados por Tan et al. (2015) quando larvas de *A. cerana* foram expostas ao imidacloprido (0,24 ng abelha⁻¹) ocorrendo o comprometimento da aprendizagem olfativa de abelhas adultas, com redução de cerca de 4,8 vezes na capacidade de aquisição de memória a curto prazo em relação ao grupo controle. Já a exposição oral de abelhas adultas (0,1 ng abelha⁻¹) essa redução foi de aproximadamente 1,6 vezes. Segundo Peng & Yang (2016), a exposição de abelhas em fase larval compromete o desenvolvimento neural, com redução na densidade celular da região dos corpos pedunculados, diminuindo a capacidade de aprendizagem olfativa de abelhas adultas.

Perda de controle postural, tremores, movimentos descoordenados e desorientados foram observados no presente estudo. O comprometimento motor tem sido comumente observado após a exposição aos neonicotinoides, mas a intensidade das alterações é dependente da dose (Lambin et al. 2001, Sánchez-Bayo et al. 2017, Williamson et al. 2014). Prejuízo na aprendizagem, memória, forrageamento e performances de retorno podem depender da dose, via e tempo de exposição a compostos do mesmo grupo químico (Alkassab et al. 2017, Pisa et al. 2017).

Os efeitos dos inseticidas neonicotinoides são complexos, uma vez que têm afinidades diferentes para os vários subtipos nAChR e podem ser agonistas parciais ou superagonistas dos receptores colinérgicos nicotínicos (Brown et al. 2006, Déglise et al. 2002). No entanto, independentemente do grau, o comprometimento das habilidades de locomoção pode afetar diversas atividades realizadas pelas abelhas, incluindo o cuidado da prole, a produção de células e a remoção de detritos, além de interferir em atividades complexas como forrageamento, memória e aprendizagem. Essas funções são importantes para o desenvolvimento, organização e sobrevivência de toda a colônia. Assim, o comprometimento dessas habilidades pode reduzir serviços de polinização prestados pelas abelhas (Alkassab et al. 2017, Karahan et al. 2015, Tan et al. 2015, Tomé et al. 2012, Pisa et al. 2017).

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicaram a maior sensibilidade da abelha africanizada *A. mellifera* em relação à abelha sem ferrão *S. postica* a três inseticidas neonicotinoides. Dos neonicotinoides testados, imidacloprido foi considerado altamente prejudicial para ambas as espécies de abelhas, enquanto acetamiprido e tiacloprido causaram menor impacto aos polinizadores. Mesmo assim, devem ser aplicados com cautela, pois altas

doses desses inseticidas podem afetar o comportamento de abelhas africanizadas e de abelhas sem ferrão, comprometendo os serviços de polinização e a produção de alimentos nos agroecossistemas.

Referências

- Aliouane Y., Hassani A.K.E., Gary V., Armengaud C., Lambin M., Gauthier M. 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 113–122.
- Alkassab A.T., Kirchner W.H. 2017. Sublethal exposure to neonicotinoids and related side effects on insect pollinators: honeybees, bumblebees, and solitary bees. *J. Plant Dis. Protect.* 124, 1–30.
- Alptekin S., Bass C., Nicholls C., Paine M.J., Clark S.J., Field L., Moores G.D. 2016. Induced thiacloprid insensitivity in honeybees (*Apis mellifera* L.) is associated with up-regulation of detoxification genes. *Insect Mol. Biol.* 25, 171–180.
- Arena M., Sgolastra F. 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology* 23, 324–334.
- Ascher J.S., Pickering J. 2018. Discover life: bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species. Acesso 13 Fevereiro 2018.
- Barbosa W.F., Smaghe G., Guedes R.N.C. 2015. Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. *Pest Manag. Sci.* 71, 1049–1053.
- Bonmatin J.M., Moineau I., Charvet R., Fleche C., Colin M.E., Bengsch E.R. 2003. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Anal. Chem.* 75, 2027–2033.
- Box G.E.P., Cox D.R. 1964. An analysis of transformations. *J. R. Soc.* 26, 211–252.
- Brandt A., Gorenflo A., Siede R., Meixner M., Büchler R. 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47.
- Brown L.A., Ihara M., Buckingham S.D., Matsuda K., Sattelle D.B. 2006. Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 99, 608–615.
- Brunet J.L., Badiou A., Belzunces L.P. 2005. In vivo metabolic fate of [¹⁴C] -acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Manag. Sci.* 61, 742–748.

- Çakmak İ, Hranitz JM, Blatzheim L, Bower CD, Polk T, Levinson B and Wells H (2018) Effects of thiamethoxam on the behavior of foraging honey bees with artificial flower choices. *Bee J* 18:2–13.
- Casida J.E. 2011. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2923–2931.
- Costa L.M., Grella T.C., Barbosa R.A., Malaspina O., Nocelli R.C.F. 2015. Determination of acute lethal doses (LD₅₀ and LC₅₀) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 62, 578–582.
- Costanza R., d'Arge R., de Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O'Neill R.V., Paruelo J., Raskin R.G., Sutton P., van den Belt M. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387,253–260.
- Cresswell J.E., Page C.J., Uygun M.B., Holmbergh M., Li Y., Wheeler J.G., Laycock I., Pook C.J., Ibarra N.H., Smirnoff N., Tyler C.R. 2012. Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology*. 115, 365-371.
- Dai Y.J., Ji W.W., Chen T., Zhang W.J., Liu Z.H., Ge F., Yuan S. 2010. Metabolism of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and thiacloprid by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain IM-2. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2419–2425.
- Decourtye A., Lacassie E., Pham-Delègue M.H. 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag. Sci.* 59, 269–278.
- Decourtye A., Devillers J. 2010. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: Tany S.H. (eds). *Insect nicotinic acetylcholine receptors*, Springer, New York, pp. 85–95.
- Devillers J., Decourtye A., Budzinski H., Pham-Delegue M.H., Cluzeau S., Maurin G. 2003. Comparative toxicity and hazards of pesticides to *Apis* and non-*Apis* bees. A chemometrical study. *SAR QSAR Environ. Res.* 14, 389–403.
- Dégliise P., Grünewald B., Gauthier M. 2002. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci. Lett.* 321, 13-16.
- Elbert A., Haas M., Springer B., Thielert W., Nauen R. 2008. Applied aspects of neonicotinoid use in crop protection. *Pest Manag. Sci.* 64, 1099–1105.
- El Hassani A.K., Dacher M., Gary V., Lambin M., Gauthier M., Armengaud C. 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 653-661.
- Ellis J.D., Evans J.D., Pettis J. 2010. Colony losses, managed colony population decline, and colony collapse disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49, 134–136.

- Fischer J., Mueller T., Spatz A.K., Greggers U., Gruenewald B., Menzel R. 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PloS ONE* 9, e91364.
- Garibaldi L.A., Muchhala N., Motzke I., Bravo-Monroy L., Olschewski R., Klein A.M. 2012. Services from plant-pollinator interactions in the Neotropics. In Rapidel B., DeClerck F., Le Coq J.F., Beer J. (eds.). *Ecosystem services from agriculture and agroforestry: measurement and payment*, Londres: Earthscan Publications, 119-139.
- Garibaldi L.A., Carvalheiro L.G., Leonhardt S.D., Aizen M.A., Blaauw B.R., Isaacs R., Kuhlmann M., Kleijn D., Klein A.M., Kremen C., Morandin L., Scheper J., Winfree R. 2014. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. *Front. Ecol. Environ.* 12, 439–447.
- Gonalons C., Farina W.M. 2015. Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS One*. 10, e0140814.
- Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E.L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957.
- Haddad N (2011). Honey bee viruses, diseases and hive management in the Middle East and their relation to the colony collapse disorder and bee losses. *Uludag Bee J* 11:17–24.
- Imperatriz-Fonseca V.L., Nunes-Silva P. 2010. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotrop.* 10,59–62.
- Iqbal J., Alqarni A. S., Raweh H.S.A. 2018. Effect of sub-lethal doses of imidacloprid on learning and memory formation of indigenous Arabian bee (*Apis mellifera jemenitica* Ruttner) adult foragers. *Neotrop. Entomol.* 48, 1-8.
- Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.* 23, 371–378.
- Jacob C.R.O., Zanardi O.Z., Malaquias J.B., Silva C.A.S., Yamamoto P.T. 2019. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere.* 224, 65-70.
- Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A. 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908.
- Johnson R.M. 2015. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434.
- Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A., Frazier M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity - USA. *Apidologie* 41, 312–331.
- Karahan A, Çakmak I, Hranitz JM, Karaca I and Wells H (2015) Sublethal imidacloprid effects on honey bee flower choices when foraging. *Ecotoxicology* 24:2017–2025.

- Kerr W.E., Carvalho G.A., Silva A.C., Assis M.G.P. 2010. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas* 12, 20–41.
- Klein A.M., 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. R Soc. B* 274, 303–313.
- Kremen C., Williams N.M., Aizen M.A., Gemmill-Herren B., LeBuhn G., Minckley R., Packer L., Potts S.G., Roulston T., Steffan-Dewenter I., Vázquez D.P., Winfree R., Adams L., Crone E.E., Greenleaf S.S., Keitt T.H., Klein A.M., Regetz J., Ricketts T.H. 2007. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecol. Lett.* 10, 299–314.
- 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.* 48, 129–134.
- Lu C., Warchol K.M., Callahan R.A. 2014. Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bull. Insectol.* 67, 125–130.
- Manjon C., Troczka B.J., Zaworra M., Beadle K., Randall E., Hertlein G., Singh K.S., Zimmer C.T., Homem R.A., Lueke B., Reid R., Kor L., Kohler M., Benting J., Williamson M.S., Davies T.G.E., Field L.M., Bass C., Nauen R. 2018. Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Curr. Biol.* 28, 1137–1143.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. MAPA/CGAF/DFIA/DAS, Brasília, Brazil. http://www.extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso 10 Fevereiro 2018.
- Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Schmuck R. 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag. Sci.* 57, 577–586.
- Neumann P., Carreck N.L. 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49, 1–6.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Guidelines for testing of chemicals Number 214. 1998. Honeybees, acute oral toxicity test. Environmental Health Safety Division, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Palladini J.D., Maron J.L. 2014. Reproduction and survival of a solitary bee along native and exotic floral resource gradients. *Oecologia* 176, 789–798.
- Pisa L.W., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bonmatin J.M., Downs C.A., Goulson D., Kreutzweiser D.P., Krupke C., Liess M., McField M., Morrissey C.A., Noome D.A., Settele J.,

- Simon-Delso N., Stark J.D., van der Sluijs J.P., van Dyck H., Wiemers M. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 68–102.
- Pisa L., Goulson D., Yang E.C., Gibbons D., Sánchez-Bayo F., Mitchell E., Aebi A., van der Sluijs J., MacQuarrie C.J.K., Giorio C., Long E.Y., McField M., van Lexmond M.B., Bonmatin J.M. 2017. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: Impacts on organisms and ecosystems. *Environm. Sci. Pollut. Res.* 1-49.
- Peng Y.C., Yang E.C. 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies. *Sci. Rep.* 6, 19298.
- 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, 345–353.
- R Core Team 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Sánchez-Bayo F., Belzunces L., Bonmatin J.M. 2017. Lethal and sublethal effects, and incomplete clearance of ingested imidacloprid in honey bees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology* 26, 1199-1206.
- SAS Institute. 2011. Statistical analysis system: getting started with the SAS learning. Version 9.2. SAS Institute, Cary.
- Silva M.B., Nocelli R.C.F., Soares H.M., Malaspina O. 2016. Efeitos do imidacloprido sobre o comportamento das abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). *Ciênc. Tecnol. Amb.* 3, 21–28.
- Soares H.M., Jacob C.R.O., Carvalho S.M., Nocelli R.C.F., Malaspina O. 2015. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 675–680.
- Staveley J.P., Law S.A., Fairbrother A., Menzie C.A. 2014. A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Hum. Ecol. Risk Assess.* 20, 566–591.
- Tadei R., Domingues C.E.C., Malaquias J.B., Camilo E.V., Malaspina O., Silva-Zacarin E.C.M. 2019. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. *Sci. Rep.* 9, 3277.
- Tan K., Chen W., Dong S., Liu X., Wang Y., Nieh J.C. 2015. A neonicotinoid impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. *Sci. Rep.* 5, 10989.
- Teeters B.S., Johnson R.M., Ellis M.D., Siegfried B.D. 2012. Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1349-1354.
- Thompson H. 2016. Extrapolation of acute toxicity across bee species. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 12, 622–626.

- Thorp R.W. 1979. Structural, behavioral, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 66, 788–812.
- Tison L., Hahn M.L., Holtz S., Rößner A., Greggers U., Bischoff G., Menzel R. 2016. Honey bees' behavior is impaired by chronic exposure to the neonicotinoid thiacloprid in the field. *Environ. Sci. Technol.* 50, 7218-7227.
- Tison L., Holtz S., Adeoye A., Kalkan Ö., Irmisch N.S., Lehmann N., Menzel R. 2017. Effects of sublethal doses of thiacloprid and its formulation Calypso® on the learning and memory performance of honey bees. *J. Exp. Biol.* 220, 3695–3705.
- Tomé H.V.V., Martins G.F., Lima M.A.P., Campos L.A.O., Guedes R.N.C. 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE* 7, e38406.
- Tomé H.V.V., Barbosa W.F., Corrêa A.S., Gontijo L.M., Martins G.F., Guedes R.N.C. 2015. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Ann. Appl. Biol.* 167, 186–196.
- Tomizawa M., Otsuka H., Miyamoto T., Eldefrawi M.E., Yamamoto I. 1995. Pharmacological characteristics of insect nicotinic ion channel and the comparison of the effect of nicotinoids and neonicotinoids. *J. Pestic. Sci.* 20, 57–64.
- Tomizawa M., Casida J.E. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364.
- Valdovinos-Núñez G.R., Quezada-Euán J.J.G., Ancona-Xiu P., Moo-Valle H., Carmona A., Ruiz Sánchez E. 2009. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *J. Econ. Entomol.* 102, 1737–1742.
- Williamson S.M., Willis S.J., Wright G.A. 2014. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology* 23, 1409-1418.
- Yue M., Luo S., Liu J., Wu J. 2018. *Apis cerana* is less sensitive to most neonicotinoids, despite of their smaller body mass. *J. Econ. Entomol.* 111, 39–42.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ecossistemas agrícolas apresentam grande dependência da polinização realizada pelas abelhas da espécie *A. mellifera* e das espécies de abelhas nativas, havendo grande contribuição na quantidade e qualidade da produção de alimentos. Em um cenário extremo, caso a perda de polinizadores atingisse uma escala global, a produção e a oferta de alimentos reduziriam drasticamente.

Como a citricultura é uma das principais commodities do agronegócio brasileiro e imidacloprido é um dos inseticidas neonicotinoides utilizado nos pomares para o manejo de insetos praga, foi realizado um estudo para verificar os níveis residuais desse inseticida em amostras de flor de laranjeira e suas implicações para as populações de abelhas. Os resultados indicaram que houve pouca variação entre a quantidade de imidacloprido detectado nas amostras das seis regiões investigadas. A amostragem das espécies de abelhas que visitam os recursos florais das plantas cítricas mostrou grande riqueza de espécies entre as regiões de cultivo, sendo *A. mellifera* a espécie predominante em todas elas. Neste estudo, não houve relação entre a concentração de resíduos de imidacloprido em flores de citros e o número de espécies de abelhas de cada região de cultivo. Apesar da toxicidade de imidacloprido, outros fatores podem estar relacionados com a riqueza de polinizadores, entre eles, a aplicação de outros agrotóxicos utilizados no manejo de pragas nos pomares.

A exposição oral de abelhas melíferas e da espécie nativa *S. postica* à concentração residual de imidacloprido detectada em campo causou alterações em todas as variáveis de locomoção avaliadas, enquanto que para *T. angustula* foi verificada apenas redução na frequência de repouso. Para *A. mellifera* africanizada o nível de alterações da função motora apresentou pouca variação, quando comparado os resultados obtidos após exposição às duas concentrações subletais testadas, já as espécies nativas houve maior comprometimento da atividade de locomoção de acordo com a dose ministrada, sendo *S. postica* mais sensível em relação a *T. angustula*.

As concentrações detectadas neste estudo apresentaram níveis médios inferiores àqueles estabelecidos pelos efeitos não observáveis (NOEL) de 20 ng g⁻¹ para abelhas *A. mellifera*. Entretanto, em laboratório, a exposição de abelhas às concentrações subletais de imidacloprido causou alterações das funções motoras das três espécies estudadas. Tais resultados reforçam a necessidade de avaliações toxicológicas e comportamentais com diferentes espécies de polinizadores, uma vez que existe uma ampla variação de suscetibilidade entre eles.

Neste sentido, estudos toxicológicos são importantes para conhecer não somente os impactos dos agrotóxicos sobre as abelhas, mas e também auxiliar na manutenção dessas espécies nos ambientes agrícolas. A avaliação de toxicidade oral aguda (CL_{50}) dos inseticidas neonicotinoides (acetamiprido, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam) sobre a espécie *A. mellifera* africanizada e as espécies de abelhas nativas sem ferrão *S. postica* e *T. angustula*, demonstraram que os níveis de suscetibilidade foram dependentes dos ingredientes ativos e das espécies de abelhas estudadas. Entre os inseticidas, acetamiprido foi considerado menos nocivo, seguido pelo tiacloprido, imidacloprido e tiametoxam, sendo este último avaliado apenas para espécie *T. angustula*.

A abelha *A. mellifera* demonstrou maior suscetibilidade a todos os neonicotinoides avaliados, quando comparado à espécie de abelha sem ferrão *S. postica*. Além disso, foram verificadas alterações na atividade de locomoção (velocidade média, distância percorrida, duração e frequência de repouso, e movimento contínuo) das abelhas tratadas em comparação ao controle. Os menores níveis de comprometimento da atividade locomotora foram observados quando as três espécies de abelhas foram tratadas com acetamiprido. Mesmo assim, este inseticida deve ser utilizado no manejo de pragas dos citros com cautela para que não haja prejuízos nos serviços de polinização, devido à exposição constante das abelhas a este inseticida. Tiacloprido também causou baixo impacto na atividade locomotora de *A. mellifera* e *S. postica*, porém para *T. angustula* os impactos causados após ingestão de dieta contaminada foram próximos aos resultados obtidos para a exposição ao neonicotinoide imidacloprido.

Considerando as atividades desempenhadas pelas abelhas no interior da colônia como o cuidado com a cria, limpeza, construção de células, defesa, manipulação, procura, coleta e comunicação de fonte de alimento podem ser comprometidas, visto as alterações nas variáveis avaliadas neste estudo em relação ao grupo controle, como velocidade, distância ou mesmo o aumento no repouso das abelhas pode afetar negativamente o desempenho, manutenção e sobrevivência de toda a colônia. Tendo em vista o crescente uso de inseticidas neonicotinoides para o controle de pragas, a importância dos serviços ambientais prestados pelos polinizadores, os resultados deste estudo são importantes para auxiliar na definição de estratégias de manejo em diferentes culturas onde os neonicotinoides são os principais inseticidas utilizados no controle de pragas, visando à redução dos impactos negativos e manutenção de ambiente propício para a atividade de polinizadores em áreas agrícolas.