

# RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 03/03/2022.

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA E DO  
INSETICIDA ACETAMIPRIDA EM ABELHAS EUSSOCIAIS  
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

**CAIO EDUARDO DA COSTA DOMINGUES**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA E DO  
INSETICIDA ACETAMIPRIDA EM ABELHAS EUSSOCIAIS  
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

**CAIO EDUARDO DA COSTA DOMINGUES**

**Orientador:** Prof. Dr. Osmar Malaspina

**Coorientadora:** Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro - SP  
2021**

D671a Domingues, Caio Eduardo da Costa  
Análise dos efeitos do fungicida piraclostrobina e do inseticida acetamiprida em abelhas eussociais (Hymenoptera: Apidae) / Caio Eduardo da Costa Domingues. -- Rio Claro, 2021  
187 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Osmar Malaspina  
Coorientadora: Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

1. Apis mellifera. 2. Biomarcadores. 3. Biomonitoramento. 4. Concentrações residuais. 5. Melipona scutellaris. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA E DO INSETICIDA ACETAMIPRIDA EM ABELHAS EUSSOCIAIS (HYMENOPTERA: APIDAE)

**AUTOR: CAIO EDUARDO DA COSTA DOMINGUES**

**ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA**

**COORIENTADORA: ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



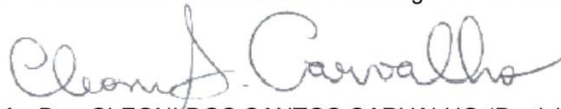
Prof. Dr. OSMAR MALASPINA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro




Profa. Dra. CRISTIANE RONCHI DE OLIVEIRA (Participação Virtual)  
UniAnchieta / Centro Universitário Padre Anchieta



Profa. Dra. SILVIA PIERRE IRAZUSTA (Participação Virtual)  
FATEC Sorocaba / Faculdade de Tecnologia de Sorocaba



Profa. Dra. CLEONI DOS SANTOS CARVALHO (Participação Virtual)  
UFSCar Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. ARMINDO ANTONIO ALVES (Participação Virtual)  
x / x

Rio Claro, 03 de março de 2021

*Dedico esta tese e todas as minhas conquistas acadêmicas...  
Aos meus amados pais, Siomara Maria da Costa Domingues e Carlos  
Eduardo Lealdini Domingues, pelo amor infindável, pelos esforços  
incessáveis, por tudo que abdicaram para investirem na minha formação e  
pelo exemplo que são para mim. Amo vocês!  
À memória de minha avó, Alaíde Táparo Bernardes da Costa, por todo amor  
dedicado ao longo de sua vida, pelos eminentes valores que me ensinou e por  
sempre me incentivar nos estudos. Saudade eterna.  
À minha maior inspiração acadêmica, Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias  
da Silva Zacarin, por tudo que fez por mim e pela importância imensurável  
que representa na minha vida. Muito obrigado!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram e me encorajaram a seguir o deslumbrante e instigador caminho da pesquisa científica, mesmo em tempos pandêmicos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Rio Claro. Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) e ao Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), pelo ensino público de excelente qualidade (ensino, pesquisa e extensão), e por me fornecerem toda a estrutura para o desenvolvimento da presente tese de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) (PPGBCM), pela qualidade das disciplinas oferecidas e a Seção Técnica de Pós-Graduação do Instituto de Biociências (STPGIB) e a Biblioteca do Instituto de Biociências, pelo suporte acadêmico.

À Universidade de Coimbra (UC), Portugal. Ao *Centre for Functional Ecology* (CFE) e ao *Soil Ecology and Ecotoxicology Laboratory* (SEEL), pelo acolhimento afetuoso que recebi durante todo o período que morei em Portugal e por todo o suporte disponibilizado na minha pesquisa científica.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), câmpus de Sorocaba. Ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Abelhas (NuPECA) e ao Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental (LEIA), onde desenvolvi o meu mestrado e parte da minha pesquisa de doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de doutorado no país (*Processo número 2016/15743-7*) e pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE) (*Processo número 2018/05072-3*). Sou extremamente grato pelo suporte financeiro durante toda minha pós-graduação.

Ao prof. Dr. Osmar Malaspina, pela excelente orientação ao longo de todo o meu doutorado e por sempre acreditar em mim, pelo incentivo em todos os projetos, por todas as inúmeras oportunidades a mim proporcionadas, pelos ensinamentos, pela atenção, pelos conselhos e pela amizade. Muito obrigado por tudo!

À profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, pela incrível coorientação (orientação) ao longo do doutorado, pelos ensinamentos e por todo o tempo dedicado na minha formação, pela atenção, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, por ser uma

inspiração e por nunca me abandonar. Você é o meu maior exemplo profissional e uma pessoa maravilhosa. Obrigado pela nossa amizade verdadeira e por tudo que passamos durante todos esses anos. Estarei sempre com você, em qualquer situação, por mais difícil que pareça. Você é muito especial na minha vida, minha segunda mãe. Amo você.

Ao prof. Dr. José Paulo Filipe Afonso de Sousa, pela oportunidade de desenvolver parte do meu doutorado na UC - Portugal, pela admirável supervisão, por acreditar em mim e no meu trabalho, pela atenção e pelos ensinamentos, sou muito grato.

Ao prof. Dr. Giuliano Grici Zacarin, pela amizade verdadeira construída ao longo de toda minha jornada acadêmica. Agradeço por todo o incentivo nos estudos, pelos ensinamentos, pelos conselhos e por todos os momentos compartilhados. Obrigado por ser um dos responsáveis por despertar o meu amor pela ciência e pela pesquisa acadêmica. Você é muito especial na minha vida.

À profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela amizade, pelos ensinamentos, pela ajuda, pela recepção no grupo de pesquisa e por todos os momentos compartilhados. Obrigado Ro.

À profa. Dra. Thaisa Cristina Roat, pela amizade, por todos os ensinamentos ao longo do meu doutorado e por sempre acreditar em mim. Muito obrigado mesmo.

A todos os professores que tive durante minha vida, pelos ensinamentos, pela atenção, pelo apoio e paciência. Muito obrigado.

À Necis Miranda de Lima, pela amizade, pelas conversas e risadas, pelos momentos compartilhados e pelo suporte incrível para o desenvolvimento dos meus projetos. Obrigado por tudo.

Aos apicultores de Rio Claro e Sorocaba, Antonio Sergio Pascon e Edson Sampaio, pela amizade, pela manutenção das colônias e coleta das abelhas para realização dos bioensaios laboratoriais.

Aos funcionários do Departamento de Biologia da UNESP - Rio Claro, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte, Antonio Teruyoshi Yabuki e Cristiane Marcia Mileo, pelo auxílio na minha pesquisa, pela atenção e pelos momentos descontraídos.

Ao técnico administrativo do Centro de Ciências Humanas e Biológicas (**CCHB**) da UFSCar Sorocaba, Fernando Urban Gamero, pelo auxílio e amizade.

Aos amigos que a Junção GAP, Primeiros Passos na Ciência e BioCelMol me deram a oportunidade de conhecer e conviver. Obrigado pelos momentos incríveis que passamos.

Agradeço os meus queridos amigos que fiz nos diferentes laboratórios do Brasil: Adriana (Argentina), Aline Catae, Ana Carolina Batista, Beatriz Pereira, Carina Silva, Cristiane Oliveira, Corina Barrera (Argentina), Daiana Tavares, Elisangela Fernandes, Gisele Possignolo, Gregório (México), Hellen Soares, Isabella Camargo, Josimere Assis, Letícia Ceschi, Moema Hausen, Monique Souza, Nicole Butolo, Rodrigo Barbosa, Thamiris Sipriano, Vanessa Bezerra, por todos os momentos e as experiências compartilhadas.

À Pâmela Decio pela amizade construída no CEIS e pela parceria diária que temos na UFSCar Sorocaba.

À Rafaela Tadei, pela amizade, pelos momentos que compartilhamos ao longo dos anos e por toda ajuda disponibilizada nos meus bioensaios laboratoriais na UFSCar Sorocaba.

Ao Heraldo Mauch, por me escolher como orientador e por acreditar em mim, pela amizade, por toda ajuda nos meus experimentos e por todos os momentos compartilhados. Obrigado.

Aos meus grandes amigos Patricia Azevedo e Luciano Delmondes, por tudo que fizeram por mim em Rio Claro, pelos conselhos, pelos momentos maravilhosos compartilhados e por estarem sempre comigo. Obrigado.

Ao meu amigo de infância, Karel Pianez Nieri, pelo apoio ao longo de todo o meu período acadêmico e por não desistir de mim.

Agradeço a todos os inúmeros amigos queridos que fiz em Portugal, vocês foram essenciais nesse período e contribuíram para melhor experiência acadêmica e pessoal da minha vida. Um agradecimento especial ao Artur Sarmiento, Mykola Rasko/Jack (Campeão), Nuno Capela e Rúben Mina, pelo acolhimento indescritível que recebi desde o primeiro dia que desembarquei em Portugal, pelos projetos que desenvolvemos juntos, pelos ensinamentos que compartilharam, pela paciência que tiveram comigo, pelos momentos de dificuldade que me ajudaram a superar, por todos os incontáveis momentos engraçados que desfrutamos juntos, por tudo que fizeram por mim e por se tornarem amigos/irmãos tão especiais na minha vida. Vocês transformaram esse período de estudos simplesmente inesquecível, eu amo vocês!

Ao meu amigo/irmão Paulo José Balsamo, pelo companheirismo desde o início do meu mestrado, por todas as dificuldades que me ajudou a superar, pelas conversas que se alongavam até de madrugada, pela parceria nos congressos, por gentilmente ceder um lugar no seu apartamento para conclusão do meu doutorado, por tudo que faz por mim e pela amizade verdadeira. Te admiro muito e agradeço por estar na minha vida.

À minha amiga Lais Vieira Bello Inoue, pela nossa amizade, por tudo que fez por mim nesse doutorado, por participar em praticamente todos os meus bioensaios, por todas as vezes que abdicou do seu final de semana para me ajudar, por acreditar em mim e nas minhas ideias, por todos os momentos engraçados e tensos que compartilhamos na UNESP ou em Rio Claro, pelos congressos e passeios que desfrutamos, por ser essa pessoa incrível que admiro muito. Obrigado de coração, Nem.

Ao meu grande amor, Leticia Salvioni Ansaloni, por tudo que acrescentou de bom na minha vida desde o dia que te conheci, por me amar e me fazer extremamente feliz, por confiar e respeitar as minhas convicções, por todos os momentos de dificuldade que superamos juntos, por todos os momentos incríveis que passamos e por todos aqueles que ainda viveremos. Obrigado por todo o apoio, pelo incentivo, pelos conselhos, por ter muita paciência com a minha dedicação ao trabalho e por participar da realização deste sonho. Te amo muito.

Aos meus pais, Siomara e Carlos, por toda dedicação que tiveram ao longo dos anos para me proporcionarem uma excelente formação acadêmica, pelos valores e princípios que levarei para o resto da minha vida, por todas as dificuldades superadas, pelos momentos maravilhosos que compartilhamos e por todos os outros que ainda iremos compartilhar e por todo o amor. Essa realização eu divido com vocês. Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim, amo vocês.

Ao gatinho Lilico.

*“O desejo profundo da humanidade pelo  
conhecimento é justificativa suficiente para nossa  
busca contínua”  
(Stephen Hawking)*

## RESUMO

As abelhas são essenciais na preservação de ecossistemas e muito importantes na agricultura, tendo em conta a relevância dos serviços ecossistêmicos de polinização prestados por estes insetos. A espécie *Apis mellifera* é a principal polinizadora em culturas agrícolas, proporcionando benefícios na qualidade e quantidade da produção de muitas espécies utilizadas na alimentação humana. Em contrapartida, a espécie nativa sem ferrão *Melipona scutellaris* é vital para a manutenção da flora nativa. No entanto, o uso de agrotóxicos associado à fragmentação de habitats e agricultura intensiva são uma ameaça às populações dessas espécies de abelhas. Tendo isso em vista, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos biológicos do fungicida piraclostrobina, em escala individual e subindividual, de larvas, recém-emergidas e forrageiras de *A. mellifera* Africanizada e forrageiras de *M. scutellaris*, bem como avaliar o desenvolvimento de colônias de *A. mellifera iberiensis* antes e após exposição ao inseticida acetamiprida em plantações de eucaliptos em Portugal. Na primeira parte da pesquisa, conduzida em laboratório, larvas de *A. mellifera* Africanizada receberam dieta artificial, *in vitro*, contendo três concentrações de piraclostrobina [911,25 ng/mL; 94,06 ng/mL e 30,25 ng/mL], do terceiro ao sexto dia de alimentação. Após a exposição, larvas de quinto instar e recém-emergidas foram dissecadas, processadas histologicamente para avaliação imuno-histoquímica por meio do diagnóstico de morte celular no epitélio do intestino e marcação de quitina na matriz peritrófica. Efeitos prejudiciais no desenvolvimento pós-embrionário não foram observados. Entretanto, as concentrações mais altas de piraclostrobina induziram lesões no intestino, como morte celular, e aumento na intensidade de marcação de quitina na matriz peritrófica das larvas e recém-emergidas. Na segunda parte da pesquisa laboratorial, abelhas recém-emergidas e forrageiras de *A. mellifera* Africanizada e *M. scutellaris* foram submetidas a exposição oral por cinco dias, a três concentrações residuais de piraclostrobina [0,125 ng i.a./mL; 0,025 ng i.a./mL e 0,005 ng i.a./mL]. Os parâmetros observados foram tempo de sobrevivência dos adultos, análises morfológicas, qualitativas e semiquantitativas, e histoquímicas. Os resultados demonstraram redução da longevidade, aumento nos índices totais de lesões e diminuição na intensidade de marcação de macromoléculas como proteínas, polissacarídeos neutros e glicoconjugados, no intestino médio das forrageiras de *A. mellifera* e *M. scutellaris*. As operárias recém-emergidas de *A. mellifera* não apresentaram redução da sobrevivência e lesões no intestino médio, contudo, houve redução de intensidade de marcação para polissacarídeos neutros e glicoconjugados. Como consequência da exposição ao piraclostrobina, a saúde individual de ambas as espécies foi afetada e isso pode comprometer e prejudicar a manutenção da saúde da colônia. Nesse sentido, estudos com concentrações residuais de fungicidas presentes no alimento e os seus efeitos em diferentes espécies de abelhas são relevantes para estimar a sensibilidade interespecífica e subsidiar futuros programas de avaliação de risco das abelhas. Em relação à pesquisa conduzida em Portugal, duas janelas de estudo foram selecionadas em paisagens dominadas por eucaliptos. No centro de cada local foi instalado um apiário, sendo definidos como apiário controle e apiário com aplicação pontual de acetamiprida. O monitoramento foi realizado durante seis meses, onde a saúde e o desenvolvimento das colônias, bem como a distância de forrageamento, presença de resíduos de agrotóxicos e a utilização de recursos nas paisagens foram avaliadas. Os resultados demonstraram que não houve diferença no desenvolvimento das colônias, observados por meio da população adulta, células de ninho e produção de mel entre os locais, antes e após exposição ao inseticida. A distância de forrageamento das colônias do apiário aplicação indicaram que menos de 4% entraram em contato com o raio da aplicação pontual. A coleta de recursos pelas colônias demonstrou-se mais intensa antes da aplicação de

acetamiprida, com destaque para as espécies da vegetação arbustiva e subarbustiva. Apesar disso, resíduos de acetamiprida foram detectados em amostras de pólen e *bee bread*. Diante do exposto, o período de aplicação do inseticida não foi prejudicial para as colônias, contudo, os resultados se aplicam as condições específicas do local estudado. Desta maneira, os parâmetros utilizados no monitoramento das colônias ofereceram informações importantes que podem contribuir para uma menor exposição das abelhas nas diferentes paisagens em que os agrotóxicos são utilizados.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*. Biomarcadores. Biomonitoramento. Concentrações residuais. *Melipona scutellaris*.

## ABSTRACT

Bees are essential in the preservation of ecosystems and important in agriculture, considering the relevance of the ecosystem services of pollination provided by these insects. *Apis mellifera* is the main pollinator in crops, providing benefits in the quality and quantity of the production of many species used in human food. In contrast, the stingless native species *Melipona scutellaris* is vital for the maintenance of native flora. However, the use of pesticides associated with habitat fragmentation and intensive agriculture are a threat to the populations of these bee species. Keeping this in view, the present study aimed to evaluate the biological effects of fungicide pyraclostrobin, on an individual and subindividual scale, of larvae, newly emerged bees, and foragers of Africanized *A. mellifera* and foragers of *M. scutellaris*, as well as to evaluate the development of *A. mellifera iberiensis* colonies before and after exposure to the insecticide acetamiprid in eucalyptus plantations in Portugal. In the first part of the research, conducted in the laboratory, Africanized *A. mellifera* larvae were given an artificial diet, *in vitro*, containing three concentrations of pyraclostrobin [911,25 ng/mL; 94,06 ng/mL and 30,25 ng/mL], from the third to the sixth day of feeding. After exposure, fifth instar larvae and newly emerged bees were dissected, processed histologically for immunohistochemical evaluation through the diagnosis of cell death in the intestine epithelium and chitin marking in the peritrophic matrix. Harmful effects on post-embryonic development were not observed. However, higher concentrations of pyraclostrobin induced lesions in the intestine, such as cell death, and increased intensity of chitin marking in the peritrophic matrix of larvae and newly emerged bees. In the second part of the laboratory research, newly emerged bees, and foragers of Africanized *A. mellifera* and *M. scutellaris* were subjected to oral exposure for five days to three residual concentrations of pyraclostrobin [0.125 ng a.i./mL; 0.025 ng a.i./mL and 0.005 ng a.i./mL]. The parameters observed were survival rate, morphological, qualitative and semi-quantitative analyses, and histochemicals. The results showed a reduction in longevity, an increase in the total lesions index and a decrease in the labeling intensity of macromolecules such as proteins, neutral polysaccharides and glycoconjugates, in the midgut of foragers of *A. mellifera* and *M. scutellaris*. The newly emerged workers of *A. mellifera* did not present reduction of survival and lesions in the midgut, however, there was a reduction of labeling intensity for neutral polysaccharides and glycoconjugates. As a consequence of exposure to pyraclostrobin, the individual health of both species has been affected and this can compromise and harm the maintenance of the health of the colony. In this sense, studies with residual concentrations of fungicides present in food and their effects on different bee species are relevant to estimate interspecific sensitivity and to subsidize future programs of risk assessment of bees. Regarding the research conducted in Portugal, two areas were selected in landscapes dominated by eucalyptus. In the center of each location was installed an apiary, in which were defined as a control apiary and apiary with a punctual application of acetamiprid. The monitoring was carried out over six months, where the health and development of the colonies, as well as the foraging ranges, presence of pesticide residues and the use of resources in the landscapes were evaluated. The results showed that there was no difference in the development of the colonies, observed through the adult population, nest cells and honey production between the sites, before and after exposure to the insecticide. The foraging ranges of the apiary application colonies indicated that less than 4% came in contact with the radius of the point application. The collection of resources by the colonies proved to be more intense before the application of acetamiprid, with emphasis on species of shrub and subarbustive vegetation. Nevertheless, acetamiprid residues were detected in pollen and bee bread samples. Therefore, the period of application of the insecticide was not harmful to the colonies,

however, the results apply to the specific conditions of the site studied. In this way, the parameters used in the monitoring of the colonies offered important information that can contribute to a lower exposure of the bees in the different landscapes where the pesticides are used.

**Keywords:** *Apis mellifera*. Biomarkers. Biomonitoring. Residual concentrations. *Melipona scutellaris*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3 CAPÍTULO 1</b> .....	26
<b>Efeitos da exposição larval ao fungicida piraclostrobina no desenvolvimento pós-embrionário de operárias de <i>Apis mellifera</i> Africanizada</b> .....	27
<b>HIGHLIGHTS</b> .....	27
<b>GRAPHICAL ABSTRACT</b> .....	28
<b>RESUMO</b> .....	29
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	30
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
2.1. OBTENÇÃO DAS LARVAS DE <i>A. mellifera</i> AFRICANIZADA E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO .....	33
2.2. COMPOSIÇÃO E ELABORAÇÃO DA DIETA LARVAL .....	34
2.3. PIRACLOSTROBINA E CONCENTRAÇÕES ESCOLHIDAS .....	35
2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	36
2.5. EXPOSIÇÃO REPETIDA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE PIRACLOSTROBINA .....	38
2.6. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO REPETIDA.....	39
2.7. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS INTESTINOS DE LARVAS E ADULTOS .....	39
2.8. PROCESSAMENTO DAS LÂMINAS PARA IMUNO-FLUORESCÊNCIA .....	39
<b>2.8.1. Detecção de morte celular pelo método do TUNEL</b> .....	40
<b>2.8.2. Marcação da matriz peritrófica (WGA-FITC)</b> .....	40
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>3 RESULTADOS</b> .....	42
3.1. EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO PIRACLOSTROBINA... 42	
3.2. REAÇÃO DO TUNEL .....	43
3.3. QUANTIFICAÇÃO DO WGA-FITC .....	46
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53
<b>4 CAPÍTULO 2</b> .....	60
<b>Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees</b> ★ .....	61

<b>HIGHLIGHTS</b> .....	61
<b>GRAPHICAL ABSTRACT</b> .....	62
<b>ABSTRACT</b> .....	63
<b>1. Introduction</b> .....	64
<b>2. Materials and Methods</b> .....	66
2.1. <i>Fungicide</i> .....	66
2.2. <i>Toxicological bioassays</i> .....	67
2.2.1. Experimental design .....	67
2.2.2. Bioassays: newly emerged and forager bees .....	67
2.3. <i>Histological procedure of midguts</i> .....	68
2.4. <i>Semi-quantitative analysis of midguts (lesion index)</i> .....	68
2.5. <i>Histochemical quantification</i> .....	69
2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	69
<b>3. Results</b> .....	69
3.1. <i>Survival rate</i> .....	69
3.2. <i>Morphological analysis</i> .....	70
3.3. <i>Lesion index</i> .....	73
3.4. <i>Histochemistry analysis</i> .....	75
<b>4. Discussion</b> .....	77
<b>5. Conclusion</b> .....	82
<b>Author contribution</b> .....	82
<b>Declaration of competing interest</b> .....	82
<b>Acknowledgements</b> .....	83
<b>References</b> .....	83
<b>5 CAPÍTULO 3</b> .....	91
<b>Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee <i>Melipona scutellaris</i></b> .....	92
<b>HIGHLIGHTS</b> .....	92
<b>GRAPHICAL ABSTRACT</b> .....	93
<b>ABSTRACT</b> .....	94
<b>1. Introduction</b> .....	95
<b>2. Materials and Methods</b> .....	98
2.1. <i>Collection of stingless bees and toxicological bioassays</i> .....	98
2.2. <i>Processing of organs for light microscopy</i> .....	99
2.3. <i>Midgut histopathological analysis: Lesion index determination</i> .....	99
2.4. <i>Histochemical marking intensity on the midgut</i> .....	100

2.5. <i>Survival analysis and lethal mean time</i> .....	100
2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	100
<b>3. Results</b> .....	101
3.1. <i>Lesion indexes and organ index</i> .....	101
3.2. <i>Morphological analysis and histochemical quantification</i> .....	103
3.3. <i>Survival pattern and median lethal time</i> .....	106
<b>4. Discussion</b> .....	108
<b>5. Conclusion</b> .....	113
<b>Acknowledgments</b> .....	114
<b>References</b> .....	114
<b>6 CAPÍTULO 4</b> .....	123
<b>Abordagem multifatorial para avaliar os efeitos da exposição ao acetamiprida em colônias de <i>Apis mellifera iberiensis</i> em plantações de <i>Eucalyptus</i></b> .....	124
<b>RESUMO</b> .....	124
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	125
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	129
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	129
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	130
3.1. SELEÇÃO DOS LOCAIS DE ESTUDO E INSTALAÇÃO DOS APIÁRIOS .....	130
3.2. MONITORAMENTO DOS ATRIBUTOS DAS COLÔNIAS DE <i>A. mellifera iberiensis</i> .....	132
3.2.2. <b>Demografia e quantidades de reservas</b> .....	134
3.2.3. <b>Estado sanitário: identificação e prevalência de agentes infecciosos</b> .....	138
3.3. APLICAÇÃO DE ACETAMIPRIDA (Epik SG®) E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO .....	139
3.3.1. <b>Medida de atividade de forrageamento</b> .....	140
3.4. AVALIAÇÃO DOS RECURSOS FLORAIS .....	141
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	143
<b>4 RESULTADOS</b> .....	144
4.1. CONDIÇÕES EXTERNAS E INTERNAS .....	144
4.2. MONITORAMENTO COM AS BALANÇAS AUTOMÁTICAS.....	144
4.3. DESENVOLVIMENTO DAS COLÔNIAS .....	145
4.4. ESTADO SANITÁRIO DAS COLÔNIAS.....	148
4.5. AVALIAÇÃO DE MULTIRESÍDUOS E DE ACETAMIPRIDA .....	148
4.6. FORRAGEAMENTO E RECURSOS FLORAIS.....	150
4.7. ANÁLISE PALINOLÓGICA DO PÓLEN E MEL COLETADOS .....	155

<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	160
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	164
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	165
<b>APÊNDICES</b> .....	175
<b>APÊNDICE 1</b> .....	175
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	176
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	178
<b>ANEXOS</b> .....	185
<b>ANEXO 1</b> .....	185
<b>ANEXO 2</b> .....	186
<b>ANEXO 3</b> .....	187

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os serviços e processos ambientais fornecidos pela natureza (COSTANZA *et al.*, 1997; DAILY, 1997; BOYD; BANZHAF, 2007; COSTANZA *et al.*, 2017), a polinização é reconhecidamente importante na reprodução de espécies vegetais, garantindo a perpetuação e atuando na manutenção da biodiversidade no planeta Terra, o que representa muitos benefícios aos seres humanos (HEIN, 2009; OBUTE, 2010; COSTANZA *et al.*, 2017). Atrelado aos serviços ecossistêmicos, a polinização tem grande relevância e importância na produção de alimentos. Inúmeros trabalhos atribuíram valores ao serviço de polinização (COSTANZA *et al.*, 1997; GALLAI *et al.*, 2009; HANLEY *et al.*, 2015), sendo o mais recente com estimativas em torno de 235 a 577 bilhões de dólares/ano (IPBES, 2016). No Brasil, os valores se aproximam de 12 bilhões de dólares, que representa a renda total das culturas dependentes de polinizadores (GIANNINI *et al.*, 2015a).

Segundo levantamento realizado por Ollerton, Winfree e Tarrant (2011), os cálculos aproximados demonstraram que 308.006 espécies de angiospermas são polinizadas por animais, o que representa 87,5% da diversidade de espécies vegetais com flores estimadas por Paton *et al.* (2008). Embora exista uma ampla variedade de animais polinizadores como borboletas (REDDI; BAI, 1984), mariposas (HAHN; BRUHL, 2016), moscas (SSYMANK *et al.*, 2008), besouros (COSTA *et al.*, 2017), aves (DELLINGER *et al.*, 2014) e mamíferos (CARTHEW; GOLDINGAY, 1997; SAZIMA; BUZATO; SAZIMA, 1999), as abelhas representam o maior grupo dos polinizadores (HUNG *et al.*, 2018).

As abelhas, exercem um papel ecológico extremamente importante, uma vez que seus serviços ecossistêmicos de polinização contribuem para a manutenção da estrutura e funcionamento de grande parte dos ecossistemas naturais (KLEIN *et al.*, 2007; HUNG *et al.*, 2018). Adicionalmente, elas têm um papel econômico na produção de plantas cultivadas (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010), já que a polinização realizada por abelhas proporciona maior quantidade e melhor qualidade dos frutos, menores taxas de malformações, maior vida útil e consequentemente maior valor comercial (KLATT *et al.*, 2014) e, também, são reconhecidas economicamente pela comercialização de produtos apícolas como mel, própolis, geleia real, cera, pólen e seu veneno (SCHMIDT, 1997).

Com ocorrência em uma grande diversidade de áreas geográficas, a espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) é reconhecidamente um polinizador de alto valor econômico (HUNG *et al.*, 2018). Por suas características generalistas, fornecem os serviços de polinização para uma ampla diversidade de culturas agrícolas e geram valor por meio da

comercialização de produtos apícolas, uma vez que são facilmente manejadas (GARY *et al.*, 1985; KLEIN *et al.*, 2007). No Brasil, as abelhas Africanizadas *A. mellifera* são resultantes do cruzamento de subespécies europeias (italiana, alemã e austríaca) com uma subespécie africana (KERR, 1967; DE JONG, 1996) e exibem enorme relevância na polinização de diversos tipos de culturas agrícolas como, por exemplo, melão e maçã (SILVA; PACHECO FILHO; FREITAS, 2015), café, caju, citros, pitanga, manga, girassol e algodão (GIANNINI *et al.*, 2015b). Ainda nesse sentido, seus serviços de polinização podem incrementar a produção de espécies que não dependem da polinização por insetos como é o caso da soja (CHIARI *et al.*, 2005; CHIARI *et al.*, 2008).

Por outro lado, o Brasil apresenta uma rica abundância de diversidade de espécies nativas “sem ferrão” (MICHENER, 2007; PEDRO, 2014), que baseado em diferentes características biológicas das espécies podem ser implementadas como uma alternativa promissora na polinização em diferentes culturas agrícolas (SILVA; PACHECO FILHO; FREITAS, 2015). Esse é o caso da espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811), que consegue realizar a polinização por vibração (*buzz pollination*) no momento da coleta do pólen das flores, visto que utilizam sua musculatura torácica (músculos longitudinais e verticais) para produzir vibrações nas anteras e com isso liberar o pólen (BUCHMANN; HURLEY, 1978; NUNES-SILVA; HRNCIR; IMPERATRIZ-FONSECA, 2010). Entretanto, a grande importância destas espécies se dá pela sua imprescindibilidade na polinização da flora nativa, que é vital na reconstrução de florestas tropicais e de suma relevância para a manutenção da biodiversidade de ecossistemas no país (KERR, 1997; BALLIVIAN, 2008; IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010; SILVA; PAZ, 2012).

Contudo, a degradação e fragmentação de habitats naturais, associada a contínua expansão de monoculturas, que leva a escassez de diversidade de recursos florais e o intenso uso de agrotóxicos, vem prejudicando as populações de abelhas (GOULSON *et al.*, 2015). Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos relataram a perda acentuada de colônias de abelhas *A. mellifera* em diferentes continentes (vanENGELSDORP *et al.*, 2008; POTTS *et al.*, 2010; vanENGELSDORP *et al.*, 2011; BRODSCHNEIDER *et al.*, 2018), que ficou conhecida mundialmente como *Colony Collapse Disorder* (CCD) (COX-FOSTER *et al.*, 2007; ELLIS; EVANS; PETTIS, 2010; NEUMANN; CARRECK, 2010). Há evidências que as causas da CCD possam estar relacionadas com a combinação e interação de múltiplos fatores estressores (GOULSON *et al.*, 2015). No Brasil, também há relatos do declínio das populações de abelhas (CARVALHO *et al.*, 2012; PIRES *et al.*, 2016) e os riscos não

somente se aplicam à espécie exótica manejada *A. mellifera*, mas também às espécies nativas (van der VALK *et al.*, 2012).

Segundo Ferreira *et al.* (2012), aproximadamente um terço do território brasileiro está destinado para a produção agrícola, representando uma ameaça as abelhas pela fragmentação dos habitats e pela exposição aos agrotóxicos. De acordo com o dossiê ABRASCO (2015), 70% dos alimentos *in natura* consumidos no Brasil contêm resíduos de agrotóxicos. No entanto, não há um estudo sistematizado no Brasil em relação a concentração de agrotóxicos presentes no pólen e néctar das plantas cultivadas que são visitadas por abelhas.

Os inseticidas são agrotóxicos amplamente estudados e vários trabalhos demonstraram os efeitos adversos em larvas e operárias adultas de *A. mellifera* (ROAT *et al.*, 2014; TAVARES *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2017; FRIOL *et al.*, 2017; ROAT *et al.*, 2017; TAVARES *et al.*, 2019; BALSAMO *et al.*, 2019) e abelhas nativas sem ferrão (LOURENÇO *et al.*, 2012; JACOB *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2015; MARIANO *et al.*, 2016; DORIGO *et al.*, 2019). Apesar disso, segundo Heimbach *et al.* (2017) estudos que avaliem a exposição aos inseticidas em escalas de paisagem ainda são limitados, embora resíduos destes agrotóxicos sejam encontrados em matrizes apícolas (NIELL *et al.*, 2017).

Detectado em concentrações residuais no ambiente, o inseticida acetamiprida pertencente aos grupos dos neonicotinóides, que são os agrotóxicos mais utilizados e comercializados em todo o mundo (BASS *et al.*, 2015; HAN; TIAN; SHEN, 2017). O mecanismo de ação deste grupo ocorre pela ligação aos receptores nicotínicos de acetilcolina, localizados nos neurônios pós-sinápticos, onde a enzima acetilcolinesterase não consegue degradar rapidamente essas moléculas, causando hiperexcitação do sistema nervoso central, paralisia e morte do inseto (TOMIZAWA; CASIDA, 2003; GYORI *et al.*, 2017). Atualmente no Brasil, é encontrado em 34 produtos formulados, livre ou associados a outras moléculas, que são utilizados em plantações de eucaliptos e em culturas agrícolas como maçã, mamão, melão e tomate (MAPA, 2021).

Alguns estudos destacam os efeitos prejudiciais de concentrações subletais de acetamiprida em abelhas *A. mellifera*, como redução da longevidade, alteração na atividade de forrageamento (SHI *et al.*, 2020) e no comportamento (EL HASSANI *et al.*, 2008). Wang, Zhu e Li (2020) demonstraram potencial sinérgico de acetamiprida com outros agrotóxicos e os efeitos tóxicos da mistura. Entretanto, estudos que contemplem os efeitos da exposição ao acetamiprida em escala de campo são escassas.

Em relação a quantidade de estudos entre agrotóxicos, pesquisas utilizando os fungicidas não apresentaram o mesmo crescimento nas últimas décadas quando comparado com os inseticidas (WOOD; GOULSON, 2017; CULLEN *et al.*, 2019), embora em algumas culturas agrícolas e no seu entorno, os fungicidas são encontrados em maior quantidade (PETTIS *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2015; DAVID *et al.*, 2016). Adicionalmente, o risco da exposição das abelhas aos fungicidas é aumentado em condições realísticas, o que torna preocupante a escassez de estudos do efeito dos fungicidas em abelhas.

O piraclostrobina é um fungicida pertencente ao grupo das estrobilurinas, que representa o segundo maior grupo em vendas no mercado mundial (MORTON; STAUB, 2008). O mecanismo de ação dos fungicidas estrobilurinas ocorre por meio da inibição da respiração de fungos e demais eucariotos (BARTLETT *et al.*, 2002; PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009). No Brasil, o piraclostrobina pode ser encontrado em 24 produtos formulados no mercado, na sua forma livre ou associado a outros ingredientes ativos (MAPA, 2020). Das culturas agrícolas em que ele é utilizado, sete delas são polinizadas por *A. mellifera* Africanizada ou *M. scutellaris* (SILVA; PACHECO FILHO; FREITAS, 2015).

Segundo Battaglin *et al.* (2011), a interpretação de baixa toxicidade dos fungicidas estrobilurinas eram limitadas devido as lacunas de conhecimento. Indo ao encontro, Degrandi-Hoffman *et al.* (2015) demonstraram efeitos adversos do fungicida piraclostrobina em *A. mellifera* similares aos de má nutrição, o que pode comprometer a colônia tornando-a mais susceptíveis a doenças. Pettis *et al.* (2013) detectaram concentrações extremamente elevadas de piraclostrobina em amostras de pólen. Nesse contexto, a alimentação contendo resíduos do fungicida podem prejudicar a performance individual e conseqüentemente afetar a colônia.

Ao ingerir o alimento contendo resíduos de agrotóxicos, este será digerido e absorvido no intestino médio da abelha. Logo, por essa via de exposição, o intestino é o primeiro órgão a entrar em contato com o agrotóxico. O intestino dos insetos é dividido em três regiões principais (intestino anterior, médio e posterior), sendo o intestino médio responsável principalmente pela digestão e absorção de nutrientes (CRUZ-LANDIM; RODRIGUES, 1967; SERRÃO; CRUZ-LANDIM, 1996). Como hipótese da presente pesquisa, provavelmente, os sintomas de má nutrição observados por Degrandi-Hoffman *et al.* (2015) em abelhas expostas ao piraclostrobina possa estar relacionado às alterações morfofisiológicas no epitélio do intestino médio, o que estaria comprometendo a sua função.

Nesse contexto, como hipótese, considerando a importância ecológica e econômica das espécies *A. mellifera* Africanizada e *M. scutellaris* e uma vez que os fungicidas estão cada

vez mais presentes nas culturas agrícolas, é imprescindível analisar os efeitos destes agrotóxicos em ambas as espécies e comparar a sensibilidade e fornecer dados para futuros estudos de estimativa a sensibilidade entre diferentes espécies de abelhas. Nesse sentido, o estudo pretende adicionar informações importantes como forma de contribuir para proteção e manutenção das populações de duas importantes espécies de abelhas no país. Adicionalmente, considerando a utilização do inseticida acetamiprida em muitas culturas e em paisagens dominadas por eucaliptos, é muito relevante avaliar os efeitos da exposição deste inseticida em um cenário realístico como forma de suprir as lacunas de conhecimento ainda existentes.

Os resultados do presente estudo serão apresentados na forma de quatro artigos organizados em capítulos, dos quais dois já estão publicados e os outros dois estão em fase de envio para revistas científicas da área. Os três primeiros capítulos foram desenvolvidos no Brasil, com foco no fungicida piraclostrobina e o último capítulo foi desenvolvido em Portugal, como foco no inseticida acetamiprida.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos por meio do presente estudo, pode-se concluir que:

- As concentrações residuais do fungicida piraclostrobina demonstraram toxicidade para a espécie exótica *A. mellifera* Africanizada e para a espécie brasileira nativa *M. scutellaris*.

- O piraclostrobina pode induzir respostas tardias em abelhas recém-emergidas de *A. mellifera* Africanizada, mesmo após exposição durante a fase larval, comprovadas por meio das análises de morte celular no intestino e pela quantificação de quitina da matriz peritrófica.

- As análises de sobrevivência, histológicas e histoquímicas (intestino médio), comprovaram que as forrageiras de *A. mellifera* Africanizada são mais sensíveis as concentrações residuais do piraclostrobina que as operárias recém-emergidas. Contudo, ficou elucidado que ambas as idades apresentaram respostas frente a exposição ao piraclostrobina, sendo que a saúde da colônia pode ser comprometida.

- As forrageiras de *M. scutellaris* evidenciaram que são muito sensíveis as concentrações residuais do piraclostrobina e, em virtude das características da colônia dessa espécie, os efeitos adversos provavelmente são mais difíceis de recuperar que nas abelhas melíferas.

- A aplicação pontual do inseticida acetamiprida, em uma paisagem dominada por eucaliptos, não alterou o desenvolvimento das colônias de *A. mellifera iberiensis*. Entretanto, resíduos de acetamiprida foram detectados nos recursos coletados pelas abelhas.

- As análises palinológicas identificaram que espécies arbustivas e subarbustivas, *Cistus ladanifer*, *Cytisus sp.* e *Rubus sp.* são as mais utilizadas como recursos, pólen e néctar, pelas colônias nas paisagens dominadas por eucaliptos.

- A implementação de balanças automáticas nas colônias e as análises palinológicas das espécies botânicas, podem subsidiar programas de monitoramento de abelhas em paisagens com aplicações de agrotóxicos.

- Diante dos fatos apresentados, esta pesquisa contribuiu fortemente para estreitar as lacunas de conhecimento em relação os efeitos dos fungicidas em abelhas, com base nos resultados obtidos dos múltiplos parâmetros analisados. Nessa perspectiva, os dados gerados apontam os riscos associados dos fungicidas em organismos não-alvo e enfatizam a importância dos biomarcadores utilizados nos estudos ecotoxicológicos com abelhas. Indo ao encontro, foi possível destacar a relevância do gerenciamento das colônias nas paisagens de

eucaliptos onde os agrotóxicos, como o acetamiprida, são aplicados e a influência do manejo adequado nestas áreas, contribuindo para um melhor monitoramento de avaliação de risco para as abelhas. A pesquisa ainda pode se subdividir para diferentes áreas, como forma de expandir e agregar ainda mais conhecimento a respeito do tema aqui abordado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASCO. **Dossiê Abrasco**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Disponível em: < <https://abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/>>. Acesso em: 17 Ago. 2020.
- BALLIVIAN, J. M. P. **Abelhas nativas sem ferrão**. 1. ed. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128 p.
- BALSAMO, P. J.; DOMINGUES, C. E. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; GREGORC, A.; IRAZUSTA, S. P.; SALLA, R. F.; COSTA, M. J.; ABDALLA, F. C. Impact of sublethal doses of thiamethoxam and *Nosema ceranae* inoculation on the hepato-nephrotoxic system in young Africanized *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 1, p. 1-12, 2019.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M. PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.
- BASS, C.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 78-87, 2015.
- BATTAGLIN, W. A.; SANDSTROM, M. W.; KUIVILA, K. M.; KOLPIN, D. W.; MEYER, M. T. Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other Fungicides in US streams, 2005-2006. **Water Air & Soil Pollution**, v. 218, p. 307-322, 2011.
- BOYD, J.; BANZHAF, S. What are ecosystem services? The need for standardized environmental accounting units. **Ecological Economics**, v. 63, n. 2-3, p. 616-626, 2007.
- BRODSCHNEIDER, R.; GRAY, A.; ADJLANE, N.; BALLIS, A.; BRUSBARDIS, V.; CHARRIÈRE, J.-D.; CHLEBO, R.; COFFEY, M. F.; DAHLE, B.; GRAAF, D. C.; DRAZIC, M. M.; EVANS, G. *et al.* Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, p. 452-457, 2018.
- BUCHMANN, S. L.; HURLEY, J. P. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 72, p. 639-657, 1978.
- CARTHEW, S. M.; GOLDINGAY, R. L. Non-flying mammals as pollinators. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 3, p. 104-108, 1997.
- CARVALHO, S. M.; ROAT, T.; PEREIRA, A. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; NOCELLI, R. C. F.; CARVALHO, C.; MALASPINA, O. Losses of Brazilian bees: an overview of factors that may affect these pollinators. **Julius-Kühn Archives**, v. 437, p. 159-166, 2012.
- CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. A. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; SAKAGUTI, E. S.; ATTENCIA, V. M.; COSTA, F. M.; MITSUI, M. H. Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 31-36, 2005.

CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. A. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; TOLEDO, T. C. S. O. A.; LOPES, T. S. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica (*Glycine max* L. Merrill) Rondoup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum Agronomy (Online)**, v. 30, n. 2, p. 267-271, 2008.

COSTA, M. S.; SILVA, R. J.; PAULINO-NETO, H. F.; PEREIRA, M. J. B. Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) in Brazilian cerrado: Behavioral features of its principal pollinators. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. 1-14, 2017.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; 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. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, p. 253-260, 1997.

COSTANZA, R.; GROOT, R.; BRAAT, L.; KUBISZEWSKI, I.; FIORAMONTI, L.; SUTTON, P.; FARBER, S.; GRASSO, M. Twenty years of ecosystem services: How far have we come and how far do we still need to go? **Ecosystem Services**, v. 28, p. 1-16, 2017.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P.-L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; vanENDELSDORP, D. *et al.* A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007.

CRUZ-LANDIM, C.; RODRIGUES, L. Comparative anatomy and histology of the alimentary canal of adult Apinae. **Journal of Apicultural Research**, v. 6, n. 1, p. 17-28, 1967.

CULLEN, M. G.; THOMPSON, L. J.; CAROLAN, J. C.; STOUT, J. C.; STANLEY, D. A. Fungicides, herbicides and bees: a systematic review of existing research and methods. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. 1-17, 2019.

DAILY, G. C. **Nature's services: societal dependence on natural ecosystems**. 1. ed. Washington: Island Press, 1997. 392 p.

DAVID, A.; BOTÍAS, C.; ABDUL-SADA, A.; NICHOLLS, E.; ROTHERAY, E. L.; HILL, E. M.; GOULSON, D. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. **Environment International**, v. 88, p. 169-178, 2016.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, n. 2, p. 67-70, 1996.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; DEJONG, E. W.; CHAMBERS, M. L.; HIDALGO, G. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518-2528, 2015.

DELLINGER, A. S.; PENNEYS, D. S.; STAEDLER, Y. M.; FRAGNER, L.; WECKWERTH, W.; SCHONENBERGER, J. A specialized bird pollination system with a

bellows mechanism for pollen transfer and staminal food body rewards. **Current Biology**, v. 24, p. 1615-1619, 2014.

DOMINGUES, C. E. C.; ABDALLA, F. C.; BALSAMO, P. J.; PEREIRA, B. V. R.; HAUSEN, M. A.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

DORIGO, A. S.; ROSA-FONTANA, A.; SOARES-LIMA, H. M.; TEIXEIRA, J. S. G.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLoS One**, v. 14, p. 1-17, 2019.

EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GARY, V.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 653-661, 2008.

ELLIS, J.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 134-136, 2010.

FERREIRA, J.; PARDINI, R.; METZGER, J. P.; FONSECA, C. R.; POMPEU, P. S.; SPAROVEK, G.; LOUZADA, J. Towards environmentally sustainable agriculture in Brazil, challenges and opportunities for applied ecological research. **Journal of Applied Ecology**, v. 49, p. 535-541, 2012.

FRIOL, P. S.; CATAE, A. F.; TAVARES, D. A.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56-66, 2017.

GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.

GARY, N.; DALY, H. V.; LOCKE, S.; RACE, M. The africanized honey bee: ahead of schedule. **California Agriculture**, v. 39, n. 11-12, p. 4-7, 1985.

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO JR, E. A.; VEIGA, A. K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, p. 209-223, 2015b.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015a.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1-16, 2015.

GYORI, J.; FARKAS, A.; STOLYAR, O.; SZEKACS, A.; MORTL, M.; VEHVSZKY, A.

Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. **Acta Biologica Hungarica**, v. 68, n. 4, p. 345-357, 2017.

HAHN, M.; BRUHL, C. A. The secret pollinators: an overview of moth pollination with a focus on Europe and North America. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 10, p. 21-28, 2016.

HAN, W.; TIAN, Y.; SHEN, X. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. **Chemosphere**, v. 192, p. 59-65, 2018.

HANLEY, N.; BREEZE, T. D.; ELLIS, C.; GOULSON, D. Measuring the economic value of pollination services: Principles, evidence and knowledge gaps. **Ecosystem Services**, v. 14, p. 124-132, 2015.

HEIMBACH, F.; SCHMUCK, R.; GRUNEWALD, B.; CAMPBELL, P.; SAPPINGTON, K.; STEEGER, T.; DAVIES, L. P. The Challenge: Assessment of risks posed by systemic insecticides to hymenopteran pollinators: New perception when we move from laboratory via (semi-)field to landscape scale testing? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 17-24, 2017.

HEIN, L. The economic value of the pollination service, a review across scales. **The Open Ecology Journal**, v. 2, p. 74-82, 2009.

HUNG, J.-L. J.; KINGSTON, J. M.; ALBRECHT, M.; HOLWAY, D. A.; KOHN, J. R. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1870, p. 1-8, 2018.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 59-62, 2010.

IPBES. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. In: POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T. (Eds). **Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**, Bonn: IPBES, 2016. 552 p.

JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science**, v. 71, p. 114-122, 2015.

KERR, W. E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, v. 39, n. 2, p. 3-5, 1967.

KLATT, B. K., HOLZSCHUH, A.; WESTPHAL, C.; CLOUGH, Y.; SMIT, I.; PAWELZIK, E.; TSCHARNTKE, T. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, p. 1-8, 2014.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 921-924, 2012.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 16 Ago. 2020.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/ap\\_ing\\_ativo\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_ingrediente\\_ativo=4](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_ing_ativo_detalhe_cons?p_id_ingrediente_ativo=4)>. Acesso em: 03 Fev. 2021.

MARIANO, L. C.; GRELLA, T. C.; BARBOSA, R. A.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 62, p. 578-582, 2016.

MICHENER, C. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. 953 p.

MORTON, V.; STAUB, T. A short history of fungicides. **The American Phytopathological Society net Feature**, 2008.

Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx>>. Acesso em: 10 Ago. 2020.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee Colony Losses. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2010.

NIELL, S.; JESÚS, F.; PÉREZ, N.; PÉREZ, C.; PAREJA, L.; ABBATE, S.; CARRASCO-LETELIER, L.; DÍAZ, S.; MENDOZA, Y.; CESIO, V.; HEINZEN, H. Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor. **Science of The Total Environment**, v. 581-582, p. 25-31, 2017.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 140-151, 2010.

OBUTE, G. C. Pollination: A threatened vital biodiversity service to humans and the environment. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 2, n. 1. p. 1-13, 2010.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321-326, 2011.

PARK, M. G.; BLITZER, E. J.; GIBBS, J.; LOSEY, J. E.; DANFORTH, B. N. Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1809, p. 1-9, 2015.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIN, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.

PATON, A. J.; BRUMMITT, N.; GOVAERTS, R.; HARMAN, K.; HINCHCLIFFE, S.; ALLKIN, B.; LUGHADHA E. N. Towards target 1 of the global strategy for plant conservation: a working list of all known plant species-progress and prospects. **Taxon**, v. 57, n. 2, p. 602-611, 2008.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; vanENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1-9, 2013.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

POTTS, S. G.; ROBERTS, S.; DEAN, R.; MARRIS, G.; BROWN, M.; JONES, R.; NEUMANN, P.; SETTELE, J. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, p. 15-22, 2010.

REDDI, C. S.; BAI, G. M. Butterflies and pollination biology. **Proceedings: Animal Sciences**, v. 93, n. 4, p. 391-396, 1984.

ROAT, T. C.; SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. **Ecotoxicology**, v. 23, p. 1659-1670, 2014.

ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1652-1660, 2017.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic forest sites in Brazil. **Annals of Botany**, v. 83, p. 705-712, 1999.

SCHMIDT, J. O. Bee Products. In: MIZRAHI, A.; LENSKEY, Y. (Eds.). **Bee Products**. Boston: Springer, 1997, p. 15-26.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Cytobios**, v. 88, n. 354, p. 161-171, 1996.

SHI, J.; YANG, H.; YU, L.; LIAO, C.; LIU, Y.; JIN, M.; YAN, W.; WU, X. B. Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. **Science of The Total Environment**, v. 738, p. 1-7, 2020.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 146-152, 2012.

SILVA, C. I.; PACHECO FILHO, A. J. S.; FREITAS, B. M. Polinizadores manejados no Brasil e sua disponibilidade para a agricultura. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Org.). **Agricultura e Polinizadores**. 1. ed. São Paulo: A.B.E.L.H.A, 2015, v. 1, p. 19-31.

SOARES, H. M.; JACOB, C. R. O.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, p. 675-680, 2015.

SSYMANK, A.; KEARNS, C. A.; PAPE, T.; THOMPSON, F. C. Pollinating Flies (Diptera): A major contribution to plant diversity and agricultural production. **Biodiversity**, v. 9, n. 1-2, p. 86-89, 2008.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370-378, 2015.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Exposure to thiamethoxam during the larval phase affects synapsin levels in the brain of the honey bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 523-528, 2019.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 339-364, 2003.

van der VALK; KOOMEN, I.; NOCELLI, R. C. F.; RIBEIRO, M. F.; FREITAS, B. M.; CARVALHO, S.; KASINA, J. M.; MARTINS, D.; MUTISO, G.; ODHIAMBO, C.; KINUTHIA, W.; GIKUNGU, M. *et al.* Aspects determining the risk of pesticides to wild bees: risk profiles for focal crops on three continents. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 437, p. 142-158, 2012.

vanENGELSDORP, D.; HAYES, J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. 1-6, 2008.

vanENGELSDORP, D.; HAYES, J. JR.; UNDERWOOD, R. M.; CARON, D.; PETTIS, J. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. **Journal of Apicultural Research**, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2011.

WANG, Y.; ZHU, Y. C.; LI, W. Interaction patterns and combined toxic effects of acetamiprid in combination with seven pesticides on honey bee (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, n. 1, p. 1-10, 2020.

WOOD, T. J.; GOULSON, D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17285-17325, 2017.