

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/11/2025

At the author's request, the full text of this thesis/dissertation will not be available online until November 30, 2025

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**EFEITO DE DOSE LETAL E SUBLETAL DO IMIDACLOPRIDE NO
TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS**

ISABELLA CRISTINA DE CASTRO LIPPI

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Doutora em Zootecnia**

BOTUCATU – SP

Julho 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EFEITO DE DOSE LETAL E SUBLETAL DO IMIDACLOPRIDE NO
TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS**

ISABELLA CRISTINA DE CASTRO LIPPI

Orientador: Prof. Dr. Orientador Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Dr. Samir Moura Kadri

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Doutora em Zootecnia**

BOTUCATU – SP

Julho - 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lippi, Isabella Cristina de Castro.

Efeito de dose letal e subletal do imidaclopride no transcriptoma de abelhas *Apis mellifera* africanizadas / Isabella Cristina de Castro Lippi. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Coorientador: Samir Moura Kadri
Capes: 50405004

1. Abelha - Criação. 2. Produtos químicos agrícolas.
3. Genômica. 4. Abelhas.

Palavras-chave: Abelhas; Agrotóxico; Apicultura; Genômica.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **ISABELLA CRISTINA DE CASTRO LIPPI**, RA nº: ZNP200158, RG nº 34.922.985-5, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 30/07/2024, a tese intitulada **EFEITO DE DOSE LETAL E SUBLETAL DO IMIDACLOPRIDE NO TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS**, junto ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Curso de Doutorado, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Botucatu, 30 de julho de 2024

Cláudia Cristina Moreci
Assistente Administrativo
Seção de Pós-Graduação / FMVZ

Biografia da autora

Isabella Cristina de Castro Lippi, nascida em São Paulo – SP no dia 15 de março de 1993, ingressou no curso de Medicina Veterinária no ano de 2013 na UNESP de Jaboticabal- FCAV e concluindo o curso no ano de 2017. Em 2018 iniciou o mestrado em Zootecnia na UFGD e conquistou o título de mestre em Zootecnia em fevereiro de 2020, no mesmo ano que iniciou o curso de doutorado no programa de pós-graduação em Zootecnia da UNESP de Botucatu – FMVZ, atuando nas áreas de apicultura, genética e produção animal.

Agradecimentos

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

Agradeço à minha família, em especial meus filhos que me motivam a sempre seguir em frente. Agradeço meu companheiro Henrique que nos acompanha com muito carinho e dedicação, sem essa parceria não seria possível conquistar meus objetivos e sonhos, passamos por muitas dificuldades, mas passamos juntos e isso faz toda a diferença. Agradeço à minha mãe e meu pai que sempre me apoiaram e me encorajaram, acreditaram em mim e viabilizaram a minha chegada até aqui.

Agradeço ao meu professor orientador por toda compreensão, acolhimento, ensinamentos, paciência e tudo que foi feito por mim para que eu conseguisse finalizar essa etapa tão importante na minha vida. Com certeza foi essencial a humanidade do senhor, então agradeço imensamente.

Agradeço aos meus queridos amigos de setor, Yanzinho, Jaine (Janaína) e Iloran, vocês fizeram meus dias felizes, animados, alimentados com bolinhos e café, fizeram com que as dificuldades fossem regadas de risadas (as vezes de desespero), me animaram, me acolheram, me ajudaram quando eu precisei, me apoiaram, e eu sou muita grata pelo presente que foi ter vocês na minha vida. Espero que os nossos caminhos ainda se cruzem por muitas e muitas vezes, torço pelo sucesso de todos vocês.

Agradeço a todos os integrantes e estagiários do grupo Néctar que contribuíram para a realização de trabalhos, projetos, confraternizações e construção de momentos tão especiais que carrego com muito carinho. Ju, Aline, Gui, Suelen, Torres, Elisa, Júlia, Giovanna, muito obrigada. Agradeço também aos queridos funcionários Maurício e Dinho que fazem tanto para que o setor continue funcionando de forma adequada, vocês são essenciais para o funcionamento da universidade e das nossas pesquisas.

Agradeço imensamente a Cláudia por sempre ajudar em absolutamente tudo que precisamos, e ser uma grande mãezona para os alunos da pós-graduação. Muito obrigada, Claudinha. Agradeço também o Dinho e o Maurício por todo trabalho e ajuda.

Agradeço pela CAPES pela bolsa cedida que foi essencial para a permanência na pós-graduação.

Resumo

A introdução de subespécies europeias e africanas no Brasil levou ao surgimento das abelhas africanizadas, que combinam alta produtividade com comportamento defensivo. As abelhas desempenham um papel crucial na polinização, essencial para a fertilização e reprodução de plantas, contribuindo para 35% da produção agrícola global. A polinização aumenta a qualidade e quantidade das culturas, movendo um setor econômico significativo. A polinização, além de sua importância econômica, é vital para a biodiversidade e a produção sustentável de alimentos. A perda de polinizadores pode trazer consequências negativas para a produção agrícola e a saúde humana, evidenciando a necessidade de práticas agrícolas sustentáveis e de proteção às abelhas. A atividade apícola é vital para a agricultura familiar, oferecendo produtos como mel, própolis, cera, e geleia real, com o Brasil se destacando como um grande produtor de mel orgânico. As abelhas enfrentam ameaças significativas de agrotóxicos, que têm efeitos letais e subletais. Esses produtos químicos, como os neonicotinoides, afetam o comportamento, desenvolvimento e saúde das abelhas, comprometendo a sobrevivência das colônias. Os neonicotinoides agem como agonistas da acetilcolina nas abelhas, causando hiperexcitabilidade e, em doses subletais, problemas comportamentais e fisiológicos. As ferramentas moleculares são fundamentais para estudar esses efeitos servir como guia para o desenvolvimento de estratégias de mitigação. O presente estudo expôs as abelhas a doses letais (Ingestão: 0,081 µg/abelha; Contato: 0,063 µg/abelha) ou subletais (Ingestão: 0,00081 µg/abelha; Contato: 0,00063 µg/abelha) de imidaclopride por ingestão ou contato e analisaram seus transcriptomas após 1 e 4 horas de exposição. Os resultados mostraram uma expressão diferencial significativa de genes associados a processos biológicos fundamentais, como o sistema imunológico, metabolismo nutricional, detoxificação, ritmo circadiano e comportamento de forrageamento. Após 1 hora de ingestão de imidaclopride, 1.516 genes (73 da dose letal; 1.509 da dose subletal) apresentaram expressão diferencial em comparação com o controle, enquanto após 4 horas, 758 genes (733 da dose letal; 25 da dose subletal) exibiram expressão diferencial em comparação com o controle. Após uma hora de contato com o inseticida, 49 genes apresentaram expressão diferencial em comparação com o controle, sendo 20 exclusivos de cada dose e 9 genes foram comuns entre os tratamentos. Considerando o período de 4 horas de contato com o inseticida, 48 genes apresentaram expressão diferencial em comparação com o controle, sendo 42 genes diferencialmente expressos na dose letal e 18 na dose subletal. A exposição ao imidaclopride pode afetar a função olfativa das abelhas, essencial para a polinização. Além disso, foram observadas alterações metabólicas que podem impactar o desempenho das abelhas, bem como perturbações nos ritmos circadianos, essenciais para a sobrevivência das colônias. Houve também evidências de uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Esses estudos ressaltam a importância de considerar os efeitos

subletais dos pesticidas e suas consequências a longo prazo para as populações de abelhas e o funcionamento dos ecossistemas. Eles fornecem insights valiosos para o desenvolvimento de políticas públicas visando o manejo sustentável de pesticidas e a preservação das abelhas, essenciais para a segurança alimentar global.

Palavras-chave: Apicultura; Inseticida; Transcriptoma

Abstract

The introduction of European and African subspecies in Brazil led to the emergence of Africanized bees, which combine high productivity with defensive behavior. Bees play a crucial role in pollination, essential for the fertilization and reproduction of plants, contributing to 35% of global agricultural production. Pollination increases the quality and quantity of crops, driving a significant economic sector. In addition to its economic importance, pollination is vital for biodiversity and the sustainable production of food. The loss of pollinators can have negative consequences for agricultural production and human health, highlighting the need for sustainable agricultural practices and the protection of bees. Beekeeping is vital for family farming, offering products such as honey, propolis, wax, and royal jelly, with Brazil standing out as a major producer of organic honey. Bees face significant threats from pesticides, which have lethal and sublethal effects. These chemicals, such as neonicotinoids, affect the behavior, development, and health of bees, compromising the survival of colonies. Neonicotinoids act as acetylcholine agonists in bees, causing hyperexcitability and, in sublethal doses, behavioral and physiological problems. Molecular tools are essential for studying these effects and guiding the development of mitigation strategies. This study exposed bees to lethal (Ingestion: 0.081 $\mu\text{g}/\text{bee}$; Contact: 0.063 $\mu\text{g}/\text{bee}$) or sublethal (Ingestion: 0.00081 $\mu\text{g}/\text{bee}$; Contact: 0.00063 $\mu\text{g}/\text{bee}$) doses of imidacloprid through ingestion or contact and analyzed their transcriptomes after 1 and 4 hours of exposure. The results showed significant differential gene expression associated with fundamental biological processes, such as the immune system, nutritional metabolism, detoxification, circadian rhythm, and foraging behavior. After 1 hour of imidacloprid ingestion, 1,516 genes (73 from the lethal dose; 1,509 from the sublethal dose) showed differential expression compared to the control, while after 4 hours, 758 genes (733 from the lethal dose; 25 from the sublethal dose) exhibited differential expression compared to the control. After one hour of contact with the insecticide, 49 genes were differentially expressed compared to the control, with 20 unique to each dose and 9 genes common between the treatments. Considering the 4-hour contact period with the insecticide, 48 genes were differentially expressed compared to the control, with 42 genes differentially expressed at the lethal dose and 18 at the sublethal dose. Imidacloprid exposure can affect the olfactory function of bees, essential for pollination. Additionally, metabolic changes were observed that could impact bee performance, as well as disruptions in circadian rhythms, essential for colony survival. There was also evidence of an adaptive response to oxidative stress. These studies highlight the importance of considering the sublethal effects of pesticides and their long-term consequences for bee populations and ecosystem functioning. They provide valuable insights for the development of public policies aimed at sustainable

pesticide management and the preservation of bees, essential for global food security.

Keywords: Apiculture; Insecticide; Transcriptome

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Abelha operária, Rainha e Zangão.....	17
Quadro 1 : Funções executadas pelas operárias de acordo com a idade.....	19
Quadro 2 Período de desenvolvimento (dias) de crias de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizada.....	20
Figura 2. Passos básicos de um experimento típico de RNA-seq.....	28

CAPÍTULO 2

Figura 1. Diagrama de Venn representando o número de genes diferencialmente expressos (GDEs) entre os grupos experimentais expostos ao imidaclopride após uma hora (A) e quatro horas (B) na dose letal (IG50) e na dose subletal (IGSUB) em comparação ao grupo controle.	43
Figura 2. Histograma representando o número de genes diferencialmente expressos (DEGs) regulados negativamente e positivamente para os grupos experimentais expostos à imidaclopride após um período de uma hora (A) e quatro horas (B), usando dose letal (IG50) e dose subletal (IGSUB) em comparação ao grupo controle	44
Figura 3 Análise de ontologia genética (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a uma dose letal de imidaclopride (IG50). Processos biológicos (BP) são indicados em vermelho.	44
Figura 4. Análise de ontologia genética (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a uma dose subletal de imidaclopride (IGSUB). Processos biológicos (BP) são indicados em vermelho, componentes celulares (CC) são indicados em verde e funções moleculares (MF) são indicadas em azul	45
Figura 5. Análise de ontologia genética (GO) da intersecção dos grupos experimentais após uma hora de exposição a doses letais e subletais de imidaclopride. Processos biológicos (BP) são indicados em vermelho.	46

- Figura 6.** Análise de ontologia genética (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a uma dose letal de imidaclopride (IG50). Processos biológicos (BP) são indicados por vermelho, componentes celulares (CC) indicados por verde e funções moleculares (MF) indicadas por azul. 47
- Figura 7.** Análise de ontologia genética (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a uma dose subletal de imidaclopride (IGSUB). Funções moleculares (MF) são indicadas em vermelho. 48
- Figura 8.** Análise de ontologia genética (GO) da intersecção dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a doses letais e subletais de imidaclopride. Funções moleculares (MF) são indicadas em vermelho. 48
- Figura 9.** Análise de cluster dos genes diferencialmente expressos após 1 e 4 horas de exposição às doses utilizadas (letal: IG50 e IGSUB: IGSUB) e grupo controle. 49
- * Log fold change (logFC)

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Diagrama de Venn representando o número de genes diferencialmente expressos (GDEs) entre os grupos experimentais expostos ao imidaclopride após uma hora (A) e quatro horas (B) na dose letal (LD50) e na dose subletal (LD50/100) em comparação ao grupo controle. 76
- Figura 2.** Histograma representando o número de genes diferencialmente expressos (DEGs) regulados negativamente e positivamente para os grupos experimentais expostos à imidaclopride após um período de uma hora (A) e quatro horas (B), usando dose letal (LD50) e dose subletal (LD50/100) em comparação ao grupo controle 76
- Figura 3** Análise de ontologia genética (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a uma dose letal de imidaclopride (LD50). Componentes celulares (CC) são indicados em vermelho. 77
- Figura 4.** Análise de ontologia genética (GO) da intersecção dos grupos experimentais após uma hora de exposição a doses letais e subletais de 77

imidaclopride. Processos biológicos (BP) são indicados em vermelho e funções moleculares (MF) são indicadas em azul

Figura 5. Análise de ontologia genética (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a uma dose letal de imidaclopride (LD50). Vermelho indica processos biológicos (PB) e azul indica componentes celulares (CC). 78

Figura 6. Análise da Ontologia Gênica (GO) dos grupos experimentais foi realizada após quatro horas de exposição à dose subletal de imidaclopride (IG50). Vermelho indica processos biológicos (PB), verde indica componentes celulares (CC) e azul indica funções moleculares (FM). 79

Figura 7. Análise da Ontologia Gênica (GO) da intersecção dos grupos experimentais foi realizada após quatro horas de exposição às doses letais e subletais de imidaclopride. Vermelho indica processos biológicos (PB), verde indica componentes celulares (CC) e azul indica funções moleculares (FM). 80

Figura 8. Análise de cluster dos genes diferencialmente expressos após 1 e 4 horas de exposição às doses utilizadas (letal: LD50 e Subletal: LD50/100) e grupo controle. 80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 4

Tabela 1. O impacto da polinização por abelhas <i>Apis mellifera</i> na qualidade e produtividade das colheitas em vários países.	103
Tabela 2. Genes diferencialmente expressos que podem ter impactos na atividade de polinização.	104

Lista de abreviaturas e siglas

<i>A. Mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i>
DL50	Dose letal
DL50/100	Dose subletal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
RNA-seq	Sequenciamento de ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
ORF	Fase de leitura aberta
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
DEGs	Genes diferencialmente expressos
GO	Ontologia genética
BP	Processos biológicos
MF	Funções moleculares
CC	Componentes celulares
IG50	Dose letal por ingestão
IGSUB	Dose subletal por ingestão
CONT50	Dose letal por contato
CONTSUB	Dose subletal por contato
ACh	Acetilcolina
AChR	Receptor de acetilcolina
AChE	Aceticolinesterase
AChE2	Aceticolinesterase-2
OBPs	Proteínas de ligação de odor
CSPs	Proteínas quimissensoriais
MRJPs	Proteínas da geleia real
AMPs	Peptídeos ligados à atividade antimicrobiana
APDs	Apiderminas
CPs	Proteínas cuticulares
CAT	Catalase
SOD	Superoxide dismutase

Sumário

Capítulo I.....	15
Introdução.....	15
1. As abelhas <i>Apis mellifera</i> : histórico e aspectos gerais da biologia.....	15
2. A importância das abelhas.....	20
3. Impacto dos agrotóxicos na sobrevivência das abelhas.....	22
4. Ferramentas para estudos genéticos em abelhas.....	25
Objetivos.....	29
Referências.....	29
Capítulo II.....	40
Capítulo III.....	54
Transcriptomic Analysis of the Head Reveals Molecular Mechanisms Underlying Topical Imidacloprid Effects on <i>Apis mellifera</i> Forager Bees.....	55
Abstract	56
Introduction	57
Materials and Methods	58
Results	61
Discussion	63
Capítulo IV.....	81
Lethal and sublethal doses of imidacloprid can undermine agricultural pollination services carried out by <i>Apis mellifera</i> bees.....	82
Abstract	82
Introduction	83
Materials and methods	84
Conclusion	91
Acknowledgements	92
Availability of data and materials	92
References	92
Capítulo V.....	105
Implicações	106

Capítulo I

Introdução

1. As abelhas *Apis mellifera*: histórico e aspectos gerais da biologia

Sugere-se que o gênero *Apis* originou-se na Ásia após a separação dos continentes. Antes que os colonizadores europeus trouxessem abelhas melíferas para o continente americano, a distribuição da abelha *Apis* ocorreu no restante do continente africano, Europeu, Oriente Médio e partes da Ásia. Estudos genéticos e com base em características morfológicas e nidificação, sugeriram dez espécies de abelhas que pertencem ao gênero *Apis*: as abelhas anãs (*Apis florea* e *Apis andreniformis*) e as abelhas gigantes (*Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis binghami* e *Apis nigrocincta*) que constroem ninhos em locais abertos, compostos por um único ou poucos favos; e as abelhas medianas, que constroem ninhos formados por diversos favos dentro de cavidades (*Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis koschevnikovi* e *Apis nuluensis*) (Garnery et al., 1992; Radloff et al., 2011; Wallberg et al., 2014; Gupta, 2014).

A maioria das espécies de abelhas é solitária, ou vivem em grupos constituídos por fêmeas adultas que se envolvem independentemente na construção do ninho, defesa e cuidados com a prole, mas sem divisão reprodutiva do trabalho (Wcislo & Tierney, 2009). Um menor número de táxons, grupos familiares (um organismo feminino e sua prole feminina) evoluíram para sociedades eussociais, nas quais um grupo de fêmeas funcionalmente estéreis permanecem no ninho para ajudar sua rainha progenitora a criar a prole. As abelhas comunais e seus tipos sociais semelhantes provavelmente não representam um estágio de transição para a eussocialidade, mas são uma estratégia social diferente e ecologicamente relevante (Wcislo et al., 2017). A *Apis mellifera* é uma espécie eussocial, que vive em colônias com comportamento social bem desenvolvido, caracterizado pelo compartilhamento do ninho, cuidado cooperado das crias (indivíduos adultos cuidam das larvas em

desenvolvimento), hierarquia da reprodução e sobreposição de gerações (Danforth, 2007).

Os humanos começaram a usufruir da cera e mel de colônias de abelhas há milhares de anos. Pinturas rupestres na África e Espanha, datadas de aproximadamente 6.000 a.C., representam a extração de mel realizada em colônias selvagens, de maneira extrativista, alocados em fendas de rochas (Crane, 1999; Wallberg et al., 2014).

A atividade humana foi responsável por fomentar o transporte de colônias de abelhas ao redor do mundo, por realizar a seleção artificial para características desejáveis e o fluxo gênico, incluindo a expansão de linhagens híbridas de abelhas (Schneider et al., 2004). A alta capacidade de adaptação das abelhas permitiu sua sobrevivência em ambientes extremos, como na tundra, desertos e florestas tropicais (Seeley, 2009), apresentando notável capacidade morfológica e iniciou oficialmente em 1839, quando o padre Antonio Carneiro importou de Portugal 100 colônias de abelhas *Apis mellifera*. Entre 1845 e 1880, imigrantes alemães e italianos trouxeram outras subespécies de *Apis mellifera*: a abelha negra da Alemanha, *Apis mellifera mellifera* e a italiana *Apis mellifera lingustica*, para regiões do Sul e Sudeste do país (Crane, 1999).

Em 1956, o professor Warwick Estevan Kerr viajou para a África para selecionar rainhas. O projeto tinha objetivo de comparar as abelhas africanas com as europeias, visando estratégias para melhorar a produção e rusticidade, determinando então qual espécie seria mais apropriada para as condições brasileiras (Scott Schneider et al., 2004; Spivak et al., 2019). Apesar da maior produtividade, as abelhas africanas apresentavam pronunciado comportamento defensivo, característica indesejável para a apicultura comercial (Gonçalves, 2001). Sendo assim, o objetivo da estratégia de introdução das abelhas africanas no Brasil era realizar seleções genéticas para obtenção de abelhas que apresentassem a mansidão das abelhas europeias com a alta produtividade das abelhas africanas (Stort & Gonçalves, 1994).

Após uma falha no manejo, enxames 26 colmeias escaparam para o ambiente e ocorreu então o cruzamento das abelhas africanas com as linhagens

Acknowledgements

This work was supported by The São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant number 2020/10524-0) and Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) (grant number 88887.502119/2020-00).

Availability of data and materials

Data are available at NCBI with the following BioProject number: PRJNA1017469. Link to access: <https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA1017469?reviewer=jlobefcv0mu32oor8ab4i7o2lv>

References

AIZEN, M. A., & HARDER, L. D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current biology*, 19(11), 915-918. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.071>

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

BLOCH, G., BAR-SHAI, N., CYTTER, Y., & GREEN, R. (2017). Time is honey: circadian clocks of bees and flowers and how their interactions may influence ecological communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1734), 20160256. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0256>

BONNEAU, M. N., SAMSON-ROBERT, O., FOURNIER, V., & CHOUINARD, G. (2021). Commercial bumble bee (*Bombus impatiens*) hives under exclusion netting systems for apple pollination in orchards. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 36(3), 234-244. <https://doi.org/10.1017/S1742170520000095>

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. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 239-245.

CHAUTÁ-MELLIZO, A., CAMPBELL, S. A., BONILLA, M. A., THALER, J. S., & POVEDA, K. (2012). Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. *Basic and applied ecology*, 13(6), 524-532. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2012.08.013>

CHRISTEN, V., MITTNER, F., & FENT, K. (2016). Molecular Effects of Neonicotinoids in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science & Technology*, 50(7), 4071–4081. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00678>

CHRISTEN, V., SCHIRRMANN, M., FREY, J. E., & FENT, K. (2018). Global Transcriptomic Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Neonicotinoids Clothianidin, Imidacloprid, and Thiamethoxam in the Brain of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science & Technology*, 52(13), 7534–7544. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01801>

CORONA, M., VELARDE, R. A., REMOLINA, S., MORAN-LAUTER, A., WANG, Y., HUGHES, K. A., & ROBINSON, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7128-7133 <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>

COX-FOSTER, D. L., CONLAN, S., HOLMES, E. C., PALACIOS, G., EVANS, J. D., MORAN, N. A., & LIPKIN, W. I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848), 283-287. <http://doi.org/10.1126/science.1146498>

CRANE, E. (1990). *Bees and beekeeping: science, practice and world resources*. Heinemann Newnes.

EILERS, E. J., KREMEN, C., SMITH GREENLEAF, S., GARBER, A. K., & KLEIN, A.-M. (2011). Contribution of Pollinator-Mediated Crops to Nutrients in the Human Food Supply. *PLoS ONE*, 6(6), e21363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021363>

ELSTON, C., THOMPSON, H. M., & WALTERS, K. F. A. (2013). Sub-lethal effects of thiamethoxam, a neonicotinoid pesticide, and propiconazole, a DMI fungicide, on colony initiation in bumblebee (*Bombus terrestris*) micro-colonies. *Apidologie*, 44(5), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0206-9>

ERBAN, T., HARANT, K., CHALUPNIKOVA, J., KOCOUREK, F., & STARA, J. (2017). Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: An in-depth proteomic study employing a transcriptome database. *Journal of Proteomics*, 150, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.09.016>

FENT, K., SCHMID, M., & CHRISTEN, V. (2020). Global transcriptome analysis reveals relevant effects at environmental concentrations of cypermethrin in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution*, 259, 113715. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113715>

FREE, J. B., RAW, A., & WILLIAMS, I. H. (1975). Pollination of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Jamaica by honeybees and wasps. *Applied Animal Ethology*, 1(3), 213-223. [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(75\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0304-3762(75)90013-9)

FRIEDRICH, A., THOMAS, U., & MÜLLER, U. (2004). Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP–protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4460-4468. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0669-04.2004>

FULLER, Z.L., NIÑO, E.L., PATCH, H.M., BEDOYA-REINA, O.C., BAUMGARTEN, T., MULI, E., & MILLER, W. (2015). Genome-wide analysis of signatures of selection in populations of African honeybees (*Apis mellifera*) using new web-based tools. *BMC gen*, 16(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1712-0>

GALLAI, N., SALLES, J. M., SETTELE, J., & VAISSIÈRE, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological economics*, 68(3), 810-821. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>.

GAO, J., JIN, S. S., HE, Y., LUO, J. H., XU, C. Q., WU, Y. Y., & DIAO, Q. Y. (2020). Physiological analysis and transcriptome analysis of Asian honey bee (*Apis cerana cerana*) in response to sublethal neonicotinoid imidacloprid. *Insects*, 11(11), 753. <https://doi.org/10.3390/insects11110753>

GESLIN, B., AIZEN, M.A., GARCIA, N., PEREIRA, A.J., VAISSIÈRE, B. E., & GARIBALDI, L.A. (2017). The impact of honey bee colony quality on crop yield and farmers' profit in apples and pears. *Agriculture, ecosystems & environment*, 248, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.07.035>

GOULSON, D., LYE, G. C., & DARVILL, B. (2008). Decline and Conservation of Bumble Bees. *Annual Review of Entomology*, 53(1), 191–208. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106>

GUEZ, D., SUCHAIL, S., GAUTHIER, M., MALESZKA, R., & BELZUNCES, L. P. (2001). Contrasting Effects of Imidacloprid on Habituation in 7- and 8-Day-Old Honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 76(2), 183–191. <https://doi.org/10.1006/nlme.2000.3995>

HALDER, S., GHOSH, S., KHAN, R., KHAN, A. A., PERWEEN, T., & HASAN, M. A. (2019). Role of pollination in fruit crops: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 8(5), 695-702.

HENRY, M.; BEGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J. F.; AUPINEL, P.; DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, v.336, n.6079, p.348-350, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00677.x>

HOWPAGE, D., SPOONER-HART, R. N., & VITHANAGE, V. (2001). Influence of honey bee (*Apis mellifera*) on kiwifruit pollination and fruit quality under Australian conditions. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29(1), 51-59. <https://doi.org/10.1080/01140671.2001.9514160>

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

KHALIFA, S. A., ELSHAFIEY, E. H., SHETAIA, A. A., EL-WAHED, A. A. A., ALGETHAMI, A. F., MUSHARRAF, S. G., & EL-SEEDI, H. R. (2021). Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 12(8), 688.

KHAN, M. R., & KHAN, M. R. (2004). The role of honey bees *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) in pollination of apple. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(3), 359-362.

KLATT, B.K., HOLZSCHUH,A., WESTPHAL,C., CLOUGH,Y., SMIT,I., PAWELZIK,E.,et al. (2014). Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the royal society B: biological sciences* 281:20132440. <https://doi:10.1098/rspb.2013.2440>

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. Proceedings of the royal society B: biological sciences, 274(1608), 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.372>

KLEIN, B.A., KLEIN, A., WRAY, M.K., MUELLER, U.G., & SEELEY, T.D. (2010). Sleep deprivation impairs precision of waggle dance signaling in honey bees. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(52), 22705-22709. <https://doi.org/10.1073/pnas.100943910>

KUNIEDA, T., FUJIYUKI, T., KUCHARSKI, R., FORET, S., AMENT, S. A., TOTH, A. L., & MALESZKA, R. (2006). Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. Insect molecular biology, 15(5), 563-576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00677.x>

LEAL, W. S., CHEN, A. M., & ERICKSON, M. L. (2005). Selective and pH-dependent binding of a moth pheromone to a pheromone-binding protein. Journal of chemical ecology, 31, 2493-2499. <http://doi.org/10.1007/s10886-005-7458-4>

LI, H., WU, F., ZHAO, L., TAN, J., JIANG, H., & HU, F. (2015). Neonicotinoid insecticide interact with honeybee odorant-binding protein: implication for olfactory dysfunction. International journal of biological macromolecules, 81, 624-630. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.055>

LI, Z., YU, T., CHEN, Y., HEERMAN, M., HE, J., HUANG, J., & SU, S. (2019). Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. Pesticide biochemistry and physiology, 156, 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.001>

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, 50-56. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v64i1.1190>

MAYACK, B. K. (2023). Modeling disruption of *Apis mellifera* (honey bee) odorant-binding protein function with high-affinity binders. Journal of Molecular Recognition, 36(5), e3008. <https://doi.org/10.1002/jmr.3008>

MALERBO-SOUZA, D. T., NOGUEIRA-COUTO, R. H., & COUTO, L. A. (2004). Honey bee attractants and pollination in sweet orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, var. Pera-Rio. Journal of Venomous Animals and Toxins including

Tropical Diseases, 10, 144-153. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992004000200004>

MARTINS, J. R., NUNES, F. M., CRISTINO, A. S., SIMÕES, Z. L., & BITONDI, M. M. (2010). The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-23>

MATSUDA, K., BUCKINGHAM, S. D., KLEIER, D., RAUH, J. J., GRAUSO, M., & SATTELLE, D. B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 573–580. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01820-4](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01820-4)

MELÉNDEZ-RAMÍREZ, V., PARRA-TABLA, V., KEVAN, P. G., RAMÍREZ-MORILLO, I., HARRIES, H., FERNÁNDEZ-BARRERA, M., & ZIZUMBO-VILLAREAL, D. (2004). Mixed mating strategies and pollination by insects and wind in coconut palm (*Cocos nucifera* L.(Arecaceae)): importance in production and selection. *Agricultural and Forest Entomology*, 6(2), 155-163. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2004.00216.x>

MOORE, D. (2001). Honey bee circadian clocks: behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *Journal of insect physiology*, 47(8), 843-857. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00057-9)

MORSE, R. A., & CALDERONE, N. W. (2000). The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee culture*, 128(3), 1-15.

MOTOBU, M., TSUJI, N., MIYOSHI, T., HUANG, X., ISLAM, M. K., ALIM, M. A., & FUJISAKI, K. (2007). Molecular characterization of a blood-induced serine carboxypeptidase from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *The FEBS journal*, 274(13), 3299-3312. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05852.x>

NAUMANN, K., WINSTON, M. L., SLESSOR, K. N., & SMIRLE, M. J. (1994). Synthetic honey bee (Hymenoptera: Apidae) queen mandibular gland pheromone applications affect pear and sweet cherry pollination. *Journal of Economic Entomology*, 87(6), 1595-1599. <https://doi.org/10.1093/jee/87.6.1595>

PALMER, M. J., MOFFAT, C., SARANZEWA, N., HARVEY, J., WRIGHT, G. A., & CONNOLLY, C. N. (2013). Cholinergic pesticides cause mushroom body

neuronal inactivation in honeybees. *Nature Communications*, 4(1).
<https://doi.org/doi:10.1038/ncomms2648>

PEÑA, J. F., & CARABALÍ, A. (2018). Effect of Honey Bee (L.) Density on Pollination and Fruit Set of Avocado (Mill.) Cv. Hass. *Journal of Apicultural Science*, 62(1), 5-14. <https://doi.org/10.2478/jas-2018-0001>

PISA, L. W., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L. P., BONMATIN, J. M., DOWNS, C. A., GOULSON, D., WIEMERS, M. (2014). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 68–102. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>

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

RAJAGOPAL, D., & ESWARAPPA, G. (2005). Pollination potentiality of honeybees in increasing productivity of guava in Karnataka. *Changing trends in pollen spore research*, 131-141.

RAYMANN, K., MOTTA, E. V., GIRARD, C., RIDDINGTON, I. M., DINSER, J. A., & MORAN, N. A. (2018). Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome. *Applied and environmental microbiology*, 84(13), e00545-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00545-18>

ROAT, T. C., DOS SANTOS-PINTO, J. R. A., DOS SANTOS, L. D., SANTOS, K. S., MALASPINA, O., & PALMA, M. S. (2014). Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. *Ecotoxicology*, 23(9), 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1305-8>

SÁEZ, A., AIZEN, M. A., MEDICI, S., VIEL, M., VILLALOBOS, E., & NEGRI, P. (2020). Bees increase crop yield in an alleged pollinator-independent almond variety. *Scientific reports*, 10(1), 3177. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59995-0>

SÁNCHEZ-BAYO, F., GOULSON, D., PENNACCHIO, F., NAZZI, F., GOKA, K., & DESNEUX, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International*, 89-90, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009>

SÁNCHEZ-GRACIA, A., VIEIRA, F. G., & ROZAS, J. (2009). Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3), 208-216. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.55>

SCHNEIDER, C. W., TAUTZ, J., GRÜNEWALD, B., & FUCHS, S. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PloS one*, 7(1), e30023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030023>

SIMON-DELISO, N., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L. P., BONMATIN, J. M., CHAGNON, M., DOWNS, C., WIEMERS, M. (2014). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5–34. <http://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>

SOKOLOWSKI, M.B. (2001). *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nature Reviews Genetics*, 2(11), 879-890. <https://doi.org/10.1038/35098592>

TACKENBERG, M.C., GIANNONI-GUZMÁN, M.A., SANCHEZ-PEREZ, E., DOLL, C.A., AGOSTO-RIVERA, J.L., BROADIE, K., & MCMAHON, D.G. (2020). Neonicotinoids disrupt circadian rhythms and sleep in honey bees. *Scientific reports*, 10(1), 17929. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72041-3>

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. *Environmental Science & Technology*, 50(13), 7218–7227. <http://doi.org/10.1021/acs.est.6b02658>

UDDIN, S., BROOKS, P. R., & TRAN, T. D. (2022). Chemical characterization, α -Glucosidase, α -amylase and lipase inhibitory properties of the Australian honey bee propolis. *Foods*, 11(13), 1964. <https://doi.org/10.3390/foods11131964>

VIANA, B.F., DA ENCARNACÃO COUTINHO, J.G., GARIBALDI, L.A., CASTAGNINO, G.L.B., GRAMACHO, K.P., & SILVA, F.O. (2014). Stingless bees further improve apple pollination and production. *Journal of Pollination Ecology*, 14, 261-269. [https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2014\)26](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2014)26)

VIDAL, M. D. F. (2021). Mel natural: cenário mundial e situação da produção na área de atuação do BNB.

WALTERS, S.A. (2005). Honey bee pollination requirements for triploid watermelon. *HortScience*, 40(5), 1268-1270.

WILLIAMS, G. R., TROXLER, A., RETSCHNIG, G., ROTH, K., YAÑEZ, O., SHUTLER, D., GAUTHIER, L. (2015). Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Scientific Reports*, 5, 14621. <https://doi.org/10.1038/srep14621>

WILLIAMSON, S. M., & WRIGHT, G. A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 216(10), 1799-1807. <https://doi.org/10.1242/jeb.083931>

WILLIAMSON, S. M., MOFFAT, C., GOMERSALL, M. A., SARANZEWA, N., CONNOLLY, C. N., & WRIGHT, G. A. (2013). Exposure to acetylcholinesterase inhibitors alters the physiology and motor function of honeybees. *Frontiers in physiology*, 4, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00013>

WINFREE, R., GROSS, B. J., & KREMEN, C. (2011). Valuing pollination services to agriculture. *Ecological Economics*, 71, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2011.08.001>

WOODCOCK, B. A., BULLOCK, J. M., SHORE, R. F., HEARD, M. S., PEREIRA, M. G., REDHEAD, J., & PYWELL, R. F. (2017). Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science*, 356(6345), 1393-1395. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1190>

WU, P., TSCHARNTKE, T., WESTPHAL, C., WANG, M., OLHNUUD, A., XU, H., & LIU, Y. (2021). Bee abundance and soil nitrogen availability interactively modulate apple quality and quantity in intensive agricultural landscapes of China. *Agriculture, ecosystems & environment*, 305, 107168. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107168>

ZHANG, E., & NIEH, J.C. (2015). The neonicotinoid imidacloprid impairs honey bee aversive learning of simulated predation. *Journal of Experimental Biology*, 218(20), 3199-3205. <https://doi.org/10.1242/jeb.127472>